

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA



**DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE COMPUESTOS
ANABÓLICOS POR CG/PTV/EM**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA:

LAURA RENNÉ VELÁZQUEZ CHONG

DIRECTOR DE TESIS

**DR. OSVALDO NICOLÁS RODRÍGUEZ VALDÉS
DR. JOSÉ GUILLERMO RODRÍGUEZ VENTURA**

Tijuana, Baja California

Marzo de 2011

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

FOLIO No. 057

Tijuana, B. C., a 07 de marzo de 2011

C. LAURA RENNÉ VELÁZQUEZ CHONG
Pasante de: Maestro en Ciencias Químicas
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

Es propuesto, por los CC. Dres. José Guillermo Rodríguez Ventura y Osvaldo
Nicolás Rodríguez Valdés

quienes serán responsables de la calidad de trabajo que usted presente,
referido al tema "Desarrollo método analítico para la determinación de compuestos
anabólicos por CG/PTV/EM".

el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- GENERALIDADES
- III.- PROPUESTA DEL MÉTODO ANALÍTICO
- IV.- EXPERIMENTOS REALIZADOS
- V.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS
- VI.- CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO
- VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
- VIII.- APÉNDICE

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA



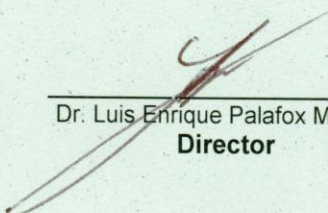
Q. Noemí Hernández Hernández
Sub-Director Secretario



Dr. José Guillermo Rodríguez Ventura
Asesor



Dr. Osvaldo Nicolás Rodríguez Valdés
Asesor



Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

El Dr. Osvaldo Nicolás Rodríguez Valdés, Representante Regional de Instrumentos y Equipos Falcon, S. A. de C. V., anteriormente Investigador Titular del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California, el Dr. José Guillermo Rodríguez Ventura, Profesor Titular del Posgrado en Ciencias Químicas y Co-director de tesis, el Dr. José Ernesto Vélez López, Profesor Titular del Posgrado en Ciencias Químicas, y la Dra. Sonia del Carmen Soto Alvarado, Profesor Titular del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, todos miembros del comité particular de tesis.

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Comité de Tesis indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito para la obtención del grado de:

Maestría en Ciencias Químicas

Comité de Tesis

Dr. Osvaldo Nicolás Rodríguez Valdés

Dr. José Guillermo Rodríguez Ventura

Dra. Sonia del Carmen Soto Alvarado

Dr. José Ernesto Vélez López

Tijuana, Baja California

Marzo de 2011

DEDICATORIA:

A la búsqueda incansable del conocimiento y el desarrollo intelectual, por un mundo donde la alimentación y la ciencia sean seguras para el ser humano.

A mi gran familia materna y paterna, mis abuelos Eva y Victor, a mis padres Heriberto y Esther, a mis hermanos Diana, Adriana, Zayherí, Luis y Christian, motores de mi vida y fuente de inspiración para la mejora y la superación personal. A Lupita, Lupe, Héctor y Jorge, mis tíos, amigos y consejeros. Gracias a todos por su amor incondicional.

A mis maestros, tutores de conocimientos y de vida. Gracias por sus enseñanzas y sus sabios consejos, por creer y desarrollar las capacidades que no conocía poseer.

A mis amigos y compañeros, por su apoyo sincero y sus palabras de aliento. Los llevo en el corazón. Gracias por llegar conmigo hasta el final.

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco a la Universidad Autónoma de Baja California, a la Coordinación de Posgrado e Investigación, por el apoyo al proyecto “Desarrollo analítico para la detección y monitoreo de hormonas naturales y artificiales en ganado bovino”, en el cual participé como tesista de posgrado, correspondiente a la Séptima Convocatoria Interna de Apoyo a Proyectos de Investigación, durante 2002 y 2003. Al Laboratorio de Toxicología Analítica del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, donde se desarrolló el presente trabajo de tesis. A los Doctores Eduardo Sánchez López y Alejandro Plascencia Jorquera, por su apoyo para llevar a cabo mis estudios de posgrado. A la Coordinación del Posgrado en Ciencias Químicas e Ingeniería, por su incondicional apoyo tanto en mi formación académica y personal.

A mis tutores los Doctores José Guillermo Rodríguez Ventura, Sonia del Carmen Soto Alvarado, José Ernesto Vélez López por guiarme en mi formación profesional, por sus consejos, su paciencia y su amistad. Al Doctor Osvaldo Nicolás Rodríguez Valdés, por creer en mí y confiar en mis capacidades para desarrollar métodos analíticos, por su apoyo incondicional.

A la Fundación PRODUCE para la Investigación Agropecuaria y Forestal del Estado de Baja California, A.C. por el respaldo otorgado a los proyectos “Desarrollo analítico para la detección y monitoreo de hormonas naturales y artificiales en ganado bovino” y “Validación y Transferencia de tecnología en la determinación de compuestos anabólicos en matrices biológicas por el sistema GC/PTV/MS”, en las convocatorias 2002, 2003 y 2004, los cuales también tuvieron el aval de la Dirección de Ganadería de la Secretaría de Fomento Agropecuario del Estado de Baja California y de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de Baja California.

Al Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal, por su interés en la implementación de la metodología de Clenbuterol por GC/MS y Hormonas por GC/MS, para ampliación del programa de Monitoreo de Residuos

Tóxicos en productos de origen Animal y su aplicación como método alternativo de la Norma Oficial Mexicana, NOM-034-ZOO-1996.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por su apoyo en el otorgamiento de la beca No. 187341, para la realización de mis estudios de posgrado.

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>a</i>	Voltaje DC
ACS	American Chemistry Society
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
BPL	Buenas Prácticas de Laboratorio
BSA	N,O-bis (trimetilsilil) acetamida
BSTFA	N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida
C	Carbono
CE-3,4-Q	Catecol Estrógeno-3,4-Quinona
CENAPA	Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal
CG	Cromatografía de Gases
CG/PTV/EM	Cromatografía de gases/Inyector de vaporización con temperatura programable/Espectrometría de masas
CO ₂	Dióxido de carbono
-COOH	Grupo carboxilo
° C	grado centígrado
d _c	Corriente continua
DES	Dietilestilbestrol
DES Q	DES Quinona
dG	Desoxiguanina
D. I.	Diámetro interno
DIES	Dienestrol
DMDCS	Dimetildiclorosilano
<i>e</i>	Electrón
E	Trans
E,E	trans, trans
EC	European Commision
EC ₅₀	Concentración efectiva media
EI	Impacto Electrónico o Ionización Electrónica
EM	Espectrometría de Masas

ema	entidad mexicana de acreditación, a. c.
eV	Electron voltio
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
g	Gramo
GC/MS	Cromatografía de gases/Espectrometría de masas
GC/MS/MS	Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas/Espectrometría de Masas
GR	Grado Reactivo
H	Hidrógeno
HC	Hormona del crecimiento
hER	Human oestrogen receptor recombinant yeast
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
%HR	Por ciento de humedad relativa
IARC	International Agency for Research on Cancer
IEC	International Electrotechnical Commission
IMNC	Instituto Mexicano de Normalización y Certificación, a. c.
ISO	International Organization of Standarization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JEFCA	Joint FAO/WHO Committee on Food Additives
Kg	kilogramo
kHz	kiloHertz
kPa	kilopascal
kV	kilovoltios
L	litro
LC/MS	Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masas
LC/MS/MS	Cromatografía de Líquidos/Espectrometría de Masas/Espectrometría de Masas
LC/UV/DAD	Cromatografía Líquida/Espectroscopía Ultravioleta Visible/Detector de Arreglo de Diodos
µg	microgramo
µL	microlitro

μm	micrometro
M	Masa de un ion
m	metro
mm	milimetro
m/z	Relación masa/carga
Mg	miligramo
MHz	megaHertz
min	minuto
mL	mililitro
mol	mol
N	Normal
N_2	Nitrógeno biatómico
NCI	Ionización Química Negativa
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
ng	nanogramo
N7Gua	N7-Guanina
=NH	Grupo imido
$-\text{NH}_2$	Grupo amino
NOM	Norma Oficial Mexicana
-OH	Hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
$-\text{OSiR}_3$	Trialkilsililoxi
PFTBA	Perfluorotributilamina
PN	Part Number
PM	peso molecular
psi	libra por pulgada cuadrada
psig	libra por pulgada cuadrada de presión de manómetro
PTFE	Politetrafluoroetileno
PTV	Inyector de vaporización con Temperatura Programable
q	Voltaje rf
r	radio

r_0	radio de la trayectoria interna del cuadrupolo
R	Radical
(R)	Configuración absoluta <i>rectus</i>
RALs	Lactonas Resorcílicas Ácidas
rf	Radiofrecuencia
rtER	Rainbow trout oestrogen receptor (rtER) recombinant yeast
(S)	Configuración absoluta <i>sinister</i>
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SCAN	Barrido total de iones
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
-SH	Grupo tiol
-Si(CH ₃) ₃	Grupo trimetilsilil
SIM	Monitoreo de Ion Selectivo
Si-OH	silanol
Sol.	solución
SPB-1	100% Poli (dimetilsiloxano)
SPB-5	Poli (5%difenil-95% dimetilsiloxano)
$t_{1/2}$	tiempo de vida media
TAL	Taleranol
TMCS	Trimetilclorosilano
TMS	Trimetilsilil
TMSI	N-trimetilsililimidazol
UV	Ultravioleta
V	Voltaje
Z	cis
Z,Z	cis, cis
ZEN	Zearalenona
ZER	Zeranol
ZOO	Zoosanitaria
α	alfa

β	beta
δ	delta
ω	Frecuencia

ÍNDICE

	Página
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Lista de abreviaturas.....	viii
Índice.....	xiii
Lista de Figuras.....	xviii
Lista de Tablas.....	xxii
Resumen.....	xxv
CAPÍTULO I	
1. Introducción.....	2
CAPÍTULO II	
2. Generalidades.....	8
2.1. Clasificación de sustancias anabólicas.....	9
2.2. Relación estructura-actividad y metabolismo de compuestos anabólicos utilizados en la industria de engorda.....	11
2.2.1. Compuestos estilbénicos.....	11
2.2.1.1. Dietilestilbestrol.....	11
2.2.1.2. Dienestrol.....	15
2.2.1.3. Hexestrol.....	17
2.2.2. Hormonas esteroideas.....	19
2.2.2.1. Biosíntesis y metabolismo de esteroides.....	20
2.2.2.2. Biosíntesis y metabolismo de Estrona y Estradiol.....	21
2.2.2.3. Progesterona.....	23
2.2.2.4. Testosterona.....	24
2.2.3. Actividad y metabolismo de las Lactonas Resorcílicas Ácidas (RALs).....	26
2.2.3.1. Zearalenona y los metabolitos α -zearalanol, zearalanona y β -zearalanol.....	26
2.3. Métodos analíticos para la cuantificación de sustancias anabólicas.....	30

ÍNDICE

	Página
CAPÍTULO III	
3. Diseño de la propuesta analítica para la determinación de residuos de compuestos anabólicos.....	34
3.1. Configuración del sistema CG/PTV/EM.....	34
3.1.1. Cromatógrafo de gases (CG) con automuestreador.....	34
3.1.2. Inyector de vaporización con temperatura programable (PTV).....	36
3.1.2.1. Distribución de flujo en el modo de venteo de disolventes (solvent vent).....	37
3.1.2.2. Consideraciones sobre la temperatura, presión y flujo.....	39
3.1.2.3. Secuencia de operaciones del PTV.....	41
3.1.2.4. Inyección de grandes volúmenes.....	45
3.1.3. Espectrómetro de masas cuadrupolo (EM).....	47
3.2. Método de derivatización.....	58
3.2.1. Generalidades de las reacciones de silanización.....	58
3.2.2. Mecanismo general.....	58
3.2.3. Reactivos derivatizantes propuestos.....	59
3.2.3.1. BSTFA (N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida).....	59
3.2.3.2. TMSI o TMSIM (N-trimetilsililimidazol).....	60
3.3. Validación del método analítico.....	62
3.3.1. Características de funcionamiento del modelo de validación elegido.....	62
3.3.2. Protocolo de validación del método analítico.....	65
3.3.2.1. Adecuabilidad del sistema.....	67
3.3.2.2. Linealidad del sistema.....	67
3.3.2.3. Cálculo de la repetibilidad del sistema con el Factor de Respuesta (FR).....	69
3.3.2.4. Cálculo de la precisión por punto del sistema.....	70

ÍNDICE

	Página
3.3.2.5. Límite de detección, límite de identificación y límite de determinación del sistema.....	71
CAPÍTULO IV	
4. Parte experimental.....	76
4.1. Instrumentación, materiales y reactivos.....	76
4.1.1. Instrumentos.....	77
4.1.2. Materiales y reactivos.....	77
4.2. Preparación del material de vidrio. Lavado y desactivación.....	79
4.2.1. Lavado del material de vidrio.....	79
4.2.2. Reutilización de los liners de vidrio.....	80
4.2.3. Desactivación del material de vidrio (silanización).....	80
4.3. Preparación de soluciones y soluciones estándar	81
4.3.1. Preparación de soluciones.....	81
4.3.1.1. Acetato de etilo anhidro.....	81
4.3.1.2. Solución derivatizante BSTFA/TMSI 2%.....	81
4.2.1.3. Mezcla crómica.....	81
4.3.2. Preparación de soluciones estándar	82
4.3.2.1. Solución madre de Dietilestilbestrol –DES- 100 mg/L.....	82
4.3.2.2. Solución madre de α -zearalanol –Zeranol- 100 mg/L.....	82
4.3.2.3. Solución madre de β -zearalanol -Taleranol- 100 mg/L.....	82
4.3.2.4. Solución madre de Hexestrol 100 mg/L.....	82
4.3.2.5. Solución madre de Dienestrol 100 mg/L.....	82
4.3.2.6. Solución madre de Epitestosterona 100 mg/L.....	83
4.3.2.7. Solución madre de Estrona 100 mg/L.....	83
4.3.2.8. Solución madre de 17 β -estradiol 100 mg/L.....	83
4.3.2.9. Solución madre de Progesterona 100 mg/L.....	83
4.3.2.10. Solución madre de Zearalanona 100 mg/L.....	83
4.3.2.11. Solución madre de α -zearalenol 100 mg/L.....	83
4.3.3. Preparación de las soluciones de trabajo.....	84
4.3.3.1. Solución de trabajo de DES 100 μ g/L.....	84

ÍNDICE

	Página
4.3.3.2. Solución de trabajo de Zeranol 100 µg/L.....	84
4.3.3.3. Solución de trabajo de Taleranol 100 µg/L.....	84
4.3.3.4. Solución de trabajo de Hexestrol 100 µg/L.....	84
4.3.3.5. Solución de trabajo de Dienestrol 100 µg/L.....	84
4.3.3.6. Solución de trabajo de Epitestosterona 100 µg/L.....	84
4.3.3.7. Solución de trabajo de Estrona 100 µg/L.....	84
4.3.3.8. Solución de trabajo de 17β-estradiol 100 µg/L.....	84
4.3.3.9. Solución de trabajo de Progesterona 100 µg/L.....	85
4.3.3.10. Solución de trabajo de Zearalanona 100 µg/L.....	85
4.3.3.11. Solución de trabajo de α-zearalenol 100 µg/L.....	85
4.3.3.12. Solución de trabajo mezcla de anabólicos 1000 µg/L.....	85
4.3.3.13. Solución de trabajo mezcla de anabólicos 100 µg/L.....	85
4.4. Procedimiento experimental.....	86
4.4.1. Preparación de las mezclas de anabólicos-TMS para la inyección en el sistema CG/PTV/EM. Monitoreo en modo SCAN.....	87
4.4.2. Análisis de los derivados TMS de los anabólicos Dietilestilbestrol (DES), Zeranol, Taleranol, Hexestrol, Dienestrol, Epitestosterona, Estrona, 17β-estradiol, Zearalanona, Progesterona, α-zearalenol.....	88
4.4.2.1. Consideraciones previas de operación. Automuestreador.....	88
4.4.2.2. Consideraciones previas de operación. PTV.....	89
4.4.2.3. Consideraciones previas de operación. Horno.....	89
4.4.2.4. Consideraciones previas de operación. Espectrómetro de masas.....	89
 CAPÍTULO V	
5. Resultados y discusión.....	91
5.1. Determinación de las condiciones instrumentales para el sistema CG/EM/SCAN y CG/EM/SIM para el análisis de Dietilestilbestrol,	

ÍNDICE

	Página
Hexestrol, Dienestrol, Estrona, 17 β -estradiol, Progesterona, Testosterona, Zeranol, Taleranol, Zearalanona y α -zearalenol.....	91
5.2. Estudio estructural de los derivados trimetilsilil de los compuestos anabólicos.....	105
5.2.1. Estilbenos.....	105
5.2.2. Hormonas esteroideas.....	115
5.2.3. Lactonas resorcílicas ácidas.....	123
5.3. Resultados de validación del método analítico.....	130
5.3.1. Adecuabilidad del sistema.....	130
5.3.2. Linealidad del sistema.....	130
5.3.3. Precisión y exactitud del método.....	131
5.3.4. Repetibilidad del método.....	133
5.3.5. Límite de detección, límite de identificación y límite de determinación.....	135
CAPÍTULO VI	
6. Conclusiones.....	138
CAPITULO VII	
7. Recomendaciones.....	141
Referencias bibliográficas.....	143
Anexos.....	150
Publicaciones y trabajos presentados.....	214

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Metabolitos de Dietilestilbestrol.....	13
2	Metabolitos y análogos del Dietilestilbestrol.....	14
3	Propuesta de formación del metabolito Dienestrol a partir de DES semiquinona.....	16
4	Hexestrol y metabolitos principales.....	17
5	Formación de hormonas esteroides a partir del colesterol vía pregnenolona.....	21
6	Metabolitos principales de la estrona y estradiol.....	22
7	Metabolitos principales de la progesterona.....	23
8	Metabolitos principales de la testosterona.....	25
9	Ruta metabólica de la zearalenona, donde se observa la formación de los metabolitos α -zearalenol, α -zearalanol (zeranol), zearalanona y β -zearalanol (taleranol).....	27
10	Configuración típica de un cromatógrafo de gases.....	35
11	Principio de la separación cromatográfica gas-líquido.....	35
12	Etapa I, introducción de muestra y eliminación de disolvente.....	38
13	Etapa II, transferencia de la muestra.....	39
14	Relaciones de tiempo del proceso de análisis empleando el PTV en el modo de venteo de disolventes.....	43
15	Filtro de masas cuadrupolo.....	48
16	Características del par de varillas del eje x de un cuadrupolo.....	50
16(a)	Trayectorias de los iones con no voltaje rf	50
16(b)	Trayectorias de los iones con voltaje de dc y rf	50
16(c)	Áreas estables para los parámetros a y q	51
17	Características de transmisión para el filtro de masas de un cuadrupolo.....	52
18	Características del par de varillas del eje y de un cuadrupolo.....	54
18(a)	Trayectorias de los iones con no voltaje rf	54
18(b)	Trayectorias de los iones con voltajes de dc y rf	54

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
18(c)	Valores estables para los parámetros a y q	55
19	Áreas para los parámetros a y q que dan la estabilidad matemática tridimensional de los iones moviéndose en el cuadrupolo.....	56
20	Diagrama práctico de estabilidad para un filtro de masas cuadrupolo.....	57
21	Reacción general para la formación de los derivados trialquilsilil.....	58
22	Cromatograma de separación de compuestos anabólicos y repetibilidad de los tiempos de retención.....	94
23	Proceso de formación de los derivados silanizados durante la inyección por PTV, modo venteo de disolventes.....	95
24	Programa del sistema de inyección múltiple por PTV y de separación cromatográfica (CG) desarrollado para el análisis de residuos de compuestos anabólicos.....	96
25	Cromatograma total de iones (TIC) de los compuestos anabólicos en el modo de barrido total.....	107
26	Identificación de Dietilestilbestrol-2TMS y Dienestrol-2TMS, en un pico superpuesto, por la técnica de búsqueda de iones de cuantificación por fragmentografía de masas.....	108
27	Espectro de masas de Hexestrol-2TMS, en el modo de barrido completo y fragmentos iónicos característicos.....	109
28	Espectro de masas de Dietilestilbestrol-2TMS, en el modo de barrido completo y fragmentos iónicos característicos.....	110
29	Espectro de masas de Cis-dietilestilbestrol-2TMS y Trans- dietilestilbestrol-2TMS en el modo SIM. Fragmentos iónicos característicos y análisis de repetibilidad.....	111

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
30	Comparación entre la información espectral del barrido completo del trans-dietilestilbestrol-2TMS y la librería de espectros de la NIST.....	112
31	Espectro de masas de Dienestrol-2TMS, en el modo de barrido completo y fragmentos iónicos característicos.....	113
32	Comparación entre la información espectral en el barrido completo del Dienestrol-2TMS y la librería de espectros de la NIST.....	114
33	Espectro de masas de la Testosterona-TMS, en modo de barrido completo y fragmentos iónicos característicos.....	116
34	Fragmentaciones características de los estrógenos por ruptura bencílica y por ionización del grupo carbonilo.....	117
35	Espectro de masas de la Estrona-TMS, en modo de barrido completo y fragmentos iónicos característicos.....	118
36	Espectro de masas de la Estrona-TMS, en el modo SIM. Fragmentos iónicos característicos y análisis de repetibilidad.....	119
37	Espectro de masas del 17 β -estradiol-2TMS, en modo de barrido completo y rutas de fragmentación características.....	120
38	Espectro de masas del 17 β -estradiol-2TMS, en modo de barrido completo y fragmentos iónicos característicos.....	121
39	Espectro de masas de la Progesterona, en modo de barrido completo y fragmentos iónicos característicos.....	122
40	Espectro de masas del Zearalanona-2TMS, en modo de barrido completo y fragmentos iónicos característicos.....	124
41	Barrido total de iones del α -zearalanol-3TMS (Zeranol-3TMS).....	125
42	Espectro de masas de β -zearalanol-3TMS (Taleranol-3TMS), en modo SIM. Fragmentos iónicos característicos y análisis de repetibilidad.....	126

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
43	Patrones de fragmentación de algunas pérdidas características de la α -zearalanol-3TMS (Zeranol-3TMS) y β -zearalanol-3TMS (Taleranol-3TMS).....	127
44	Comparación entre la información espectral del barrido completo del α -zearalanol-3TMS y la librería de espectros de la NIST.....	128
45	Patrón de fragmentación de algunas pérdidas características del α -zearalenol-3TMS.....	129

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Clasificación de compuestos anabólicos por su estructura química.....	9
2	Clasificación de compuestos anabólicos por su efecto en los sistemas biológicos.....	10
3	Anabólicos esteroides u hormonales.....	19
4	No esteroides o no hormonales.....	19
5	Estrogenicidad relativa de la zearalenona y metabolitos.....	28
6	Etapas en el proceso de inyección del PTV en el modo de purga o eliminación de disolventes.....	42
7	Presiones mínimas factibles para el flujo de salida del Helio.....	43
8	Parámetros de operación en el modo de venteo de disolventes.....	44
9	Capacidades del liner para la inyección de grandes volúmenes.....	45
10	Parámetros de control. Inyector de grandes volúmenes.....	46
11	Descripción de los parámetros de operación del inyector de grandes volúmenes.....	46
12	Parámetros para la validación de un método que involucra mediciones analíticas, de acuerdo a los requisitos de la NMX-EC-17025-IMNC-2006/ ISO/IEC 17025:2006.....	64
13	Protocolo de validación del método analítico para la determinación de DES, ZER, TAL por el sistema CG/PTV/EM.....	66
14	Expresiones matemáticas para la evaluación de la adecuabilidad del sistema.....	67
15	Estimación de los parámetros de linealidad.....	68
16	Estimadores de incertidumbre de la curva de calibración.....	69
17	Expresiones matemáticas para evaluar la repetibilidad con el factor de respuesta de una curva de calibración y por punto de calibración.....	70
18	Expresiones matemáticas para evaluar la precisión por punto de calibración.....	71

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
19 Expresiones matemáticas para calcular el límite de detección, límite de identificación y límite de determinación del sistema.....	72
20 Preparación de la solución de trabajo de mezcla de anabólicos 1000 µg/L.....	85
21 Preparación de la solución de trabajo de mezcla de anabólicos 100 µg/L.....	85
22 Preparación de las mezclas de anabólicos–TMS para monitoreo por SCAN.....	87
23 Condiciones instrumentales del Automuestreador en el sistema de CG/PTV para el análisis de residuos de compuestos anabólicos, estilbenos y lactonas resorcílicas ácidas.....	92
24 Condiciones instrumentales del PTV en el sistema de CG/PTV para el análisis de residuos de compuestos anabólicos, estilbenos y lactonas resorcílicas ácidas.....	98
25 Condiciones instrumentales del horno en el sistema de CG/PTV para el análisis de residuos de compuestos anabólicos, estilbenos y lactonas resorcílicas ácidas.....	99
26 Parámetros de optimización de la fuente de ionización cuadrupolo.....	100
27 Condiciones instrumentales del EM para (SCAN).....	100
28 Parámetros optimizados para la identificación y cuantificación de residuos anabólicos en el sistema GC/PTV/MS/SIM.....	101
29 Principales fragmentaciones de los iones de caracterización y de confirmación de los estilbenos.....	102
30 Principales fragmentaciones de los iones de caracterización y de confirmación de las hormonas esteroideas.....	103
31 Principales fragmentaciones de los iones de caracterización y de confirmación de las lactonas resorcílicas ácidas.....	104
32 Resultados de la adecuabilidad del sistema.....	130
33 Resultados de la linealidad del sistema.....	132

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
34	Resultados de la evaluación de la precisión y exactitud del método. Cálculo del factor de respuesta.....	133
35	Resultados de la evaluación de la repetibilidad del método.....	134
36	Límite de detección, límite de identificación y límite de determinación.....	136

RESUMEN

La presente investigación muestra las consideraciones analíticas que permitieron el desarrollo de un método instrumental por cromatografía gaseosa/espectrometría de masas, para la identificación y cuantificación de residuos de los compuestos anabólicos Hexestrol, Dietilestilbestrol, Dienestrol, Testosterona, Estrona, 17 β -estradiol, Zearalanona, α -zearalanol (Zeranol), β -zearalanol (Taleranol), Progesterona y α -zearalenol, empleados en la práctica veterinaria para la engorda y tratamientos reproductivos del ganado bovino, como una propuesta de mejora instrumental a la Norma Oficial Mexicana NOM-034-ZOO-1996.

El sistema analítico constó de un automuestreador para la introducción de la muestra de forma automatizada, un inyector de vaporización con temperatura programable, PTV, para optimización de la reacción de silanización de los compuestos anabólicos *in situ* e incrementar el volumen de muestra introducida al sistema de separación y medición en el cromatógrafo de gases. Las mediciones por espectrometría de masas, se llevaron a cabo por la técnica de impacto electrónico o ionización electrónica, EI, empleando un analizador cuadrupolo, realizando mediciones por el modo de barrido total de masas, SCAN, obteniendo primeramente las condiciones de separación cromatográfica más específica y la caracterización estructural de los compuestos anabólicos como derivados silanizados, posteriormente la selección de los iones de cuantificación e identificación y mediante el monitoreo de ion selectivo SIM, demostrar la confiabilidad del método analítico a través de la validación analítica evaluando la adecuabilidad, linealidad, precisión, exactitud, repetibilidad, límite de detección, límite de cuantificación y límite de determinación para los anabólicos DES, Zeranol y Taleranol.

El uso del inyector PTV aunado a la inyección automatizada, permitieron la realización de inyecciones múltiples, con el modo de operación del venteo de solventes, logrando la reproducibilidad en las inyecciones y de las reacciones de derivatización mediante el programa de calentamiento del inyector, además de la limpieza adicional de la muestra y el inyector.

La reacción *in situ* de derivatización evitó la degradación de compuestos termolábiles y eliminó las impurezas volátiles de los compuestos de derivatización e interferencias de la matriz. También se demostró que las reacciones de silanización

se pueden llevar a cabo dentro del sistema de inyección evitando la influencia del medio ambiente con condiciones de temperatura y presión controladas, y no mediante los métodos tradicionales para la formación de derivados silanizados por calentamiento en bloques y controlando las mismas variables, para su posterior inyección en el sistema cromatográfico.

Los resultados del método mostraron mayor información de la fragmentación de los iones de los compuestos anabólicos derivatizados, con una mejora en la abundancia de los iones característicos al analizar el barrido total de iones, en el aumento de la abundancia relativa de los iones moleculares, comparados con los reportados en las librerías espectrales, y la observación de los anchos de picos, más estrechos y bien resueltos en la mayoría de los casos.

En el modo de adquisición por SIM, se observaron las ventajas del sistema de inyección en grandes volúmenes y la eficiencia del programa de limpieza al obtener una mayor sensibilidad por la eliminación de interferencias de la matriz y de los residuos de derivatización, debido a la abundancia de iones y a la optimización en los parámetros de monitoreo de iones selectivo, llegando a niveles de concentración de hasta 0.05 ng/mL para DES, 0.1 ng/mL para Zeranol y 0.25 ng/mL para Taleranol.

Con los resultados de validación se propone un método que permite disminuir el error, al utilizar el método de cuantificación del estándar externo, en lugar del método del estándar interno, empleado tradicionalmente en la cuantificación por espectrometría de masas de acuerdo a la NOM-ZOO-034-1996.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

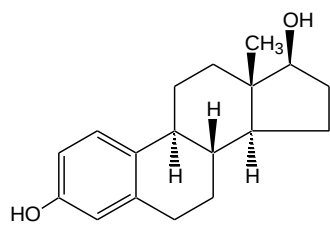
El rápido crecimiento de la población a nivel mundial, ha exigido que se dé solución a la demanda de alimentos, mejorando la cantidad y calidad de los productos que se consumen.

En el caso particular de los productos cárnicos, los sistemas de explotación ganadera han recurrido a la utilización de compuestos promotores del crecimiento, para incrementar la producción de carne. Estos compuestos son de origen natural o sintético y presentan una actividad farmacológica que promueven el incremento de la ganancia de peso y la eficiencia alimenticia.^{1,2}

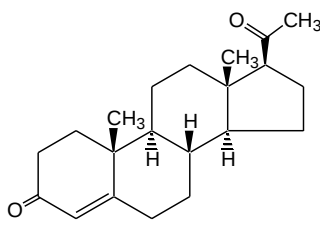
Los promotores de crecimiento empleados en la producción de carne y leche se han clasificado de acuerdo con el sistema biológico que afectan y/o promueven la eficiencia en la conversión alimenticia, en:

- Antibióticos y quimioterapéuticos, que afectan la microflora del tracto gastrointestinal.
- Compuestos ionóforos, mejoran la calidad de la flora ruminal.
- Compuestos hormonales y agentes de reparto, los cuales impactan en el metabolismo de los nutrientes después de su absorción (sustancias anabólicas).³

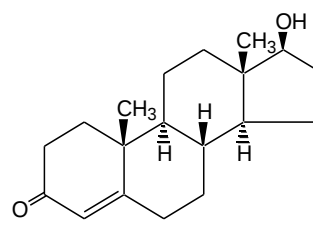
Aproximadamente un 90% del ganado vacuno de los Estados Unidos es tratado con compuestos hormonales naturales: estradiol (3,17-dihidroxi- δ (1,3,5-10)-estratrieno) (I), progesterona (4-pregnene-3,20-diona) (II) y testosterona (17 β -hidroxi-4-androsten-3-ona) (III), las hormonas sintéticas: acetato de melengestrol (17 β -acetoxi-6-metil-16-metilen-4,6-pregnadieno,3-20-diona) (IV) y acetato de trembolona (17 β -acetoxiestra, 4,9,11-trien-3-ona) (V) y un xenobiótico con propiedades anabólicas zeranol (α -zearalanol) (VI).⁴



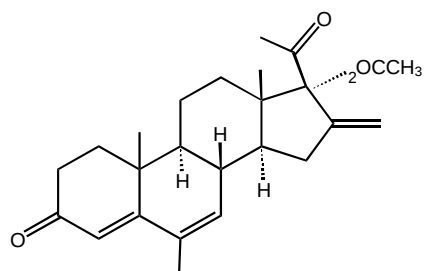
Estradiol (I)



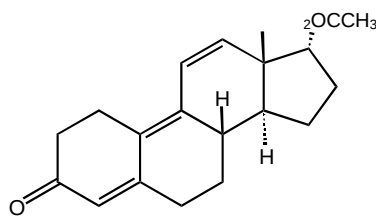
Progesterona (II)



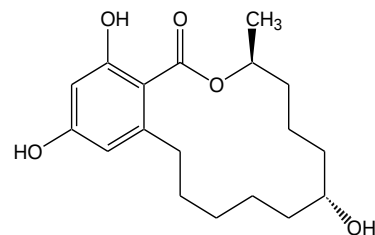
Testosterona (III)



Acetato de melengestrol (IV)

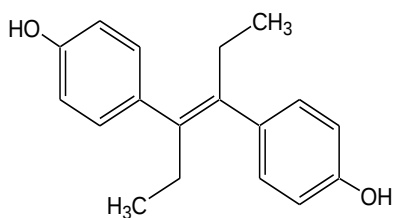


Acetato de trembolona (V)

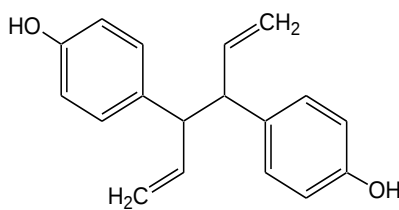


α-zearalanol (VI)

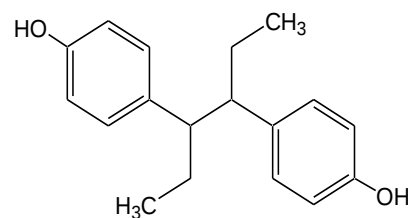
El empleo de compuestos anabólicos ha generado fuertes polémicas a nivel mundial, debido principalmente al compromiso entre cantidad y calidad de los productos cárnicos, relacionando de igual forma a la aparición de problemas colaterales que se están presentando a nivel mundial por el consumo de carne.⁵ Así pues, en los programas de monitoreo de residuos anabólicos, también se incluyen algunos compuestos cuya toxicidad está altamente comprobada, para verificar que no se empleen, aún cuando se encuentran prohibidos, tales como son los estilbenos: Dietilestilbestrol (VII), Dienestrol (VIII) y Hexestrol (IX).



Dietilestilbestrol (VII)



Dienestrol (VIII)



Hexestrol (IX)

En México, la NOM-004-ZOO-1996,⁶ identifica como uno de los moduladores de crecimiento a los anabólicos hormonales, monitoreando solamente al Dietilestilbestrol, Zeranol y su metabolito Taleranol, sin considerar a compuestos como la testosterona, progesterona, benzoato de estradiol y derivados de los mismos. El fundamento para eximirlos de la norma es que son hormonas naturales de difícil diagnóstico.¹ Los esfuerzos actuales por parte de los organismos oficiales para incluirlos en el monitoreo se enfrentan a la disyuntiva de que no todos los laboratorios de constatación que forman parte de la red de laboratorios autorizados

por la SENASICA-SAGARPA cuentan con la tecnología y el recurso humano necesario para implementarse.

En la actualidad existen en el mercado mexicano productos farmacéuticos de aplicación veterinaria, con fines terapéuticos y para promoción de crecimiento, cuya administración no está sujeta a programas de monitoreo toxicológico, ni se encuentra normada, simplemente se regulan los tiempos de administración y retiro, así como al personal autorizado para su compra y manejo.^{7, 8}

La norma oficial mexicana NOM-034-ZOO-1996,⁹ regulación que establece los lineamientos para la detección analítica de residuos hormonales en tejido animal, se encuentra en desventaja tecnológica con las de los países del primer mundo debido a la baja sensibilidad, especificidad y restricciones analíticas, tales como la degradación de la muestra en el puerto de inyección en un sistema gaseoso convencional, así como las limitantes relacionadas con el volumen de muestra en el sistema de medición y la poca reproducibilidad de las reacciones de derivatización.

Algunos de los laboratorios de constatación en Salud Animal de México, al utilizar una metodología con los sistemas analíticos sugeridos por la normatividad, así como el método de tratamiento de las muestras, en ocasiones no consiguen alcanzar los niveles de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, requeridos por la misma.

El problema radica en que las canales o ganado en pie al ser exportados, se someten a inspecciones toxicológicas donde se revisan más residuos de compuestos anabólicos y otros promotores, exponiendo al productor a que se rechace el producto.

De igual forma, cuando se introducen a nuestro país productos cárnicos provenientes de países donde se tiene aprobado el empleo de moduladores de crecimiento, el monitoreo no es completo, por lo que se puede exponer a la población nacional a consumir carne de dudosa calidad los cuales pueden provocar trastornos en la salud.

Ante el panorama mundial es importante desarrollar nuevas metodologías con tecnologías competentes, lo más económicas y sencillas posibles, que permitan aumentar el monitoreo de los residuos hormonales y anabólicos que los países a los

que se exporta exige sean analizados, y que la NOM-034-ZOO-1996, no los contempla.

Considerando la problemática mencionada, en el presente estudio se plantean los siguientes objetivos:

1. Desarrollo de un método analítico empleando el sistema de cromatografía gaseosa/inyector de vaporización con temperatura programable con el modo de venteo de solventes/espectrometría de masas (CG/PTV/EM), como alternativa instrumental en la determinación de residuos anabólicos en tejido animal por cromatografía de gases/espectrometría de masas de la Norma Oficial Mexicana NOM-034-ZOO-1996, para la detección y cuantificación de los estilbenos Dietilestilbestrol, Hexestrol y Dienestrol; las hormonas naturales Testosterona, Progesterona, 17β -estradiol y Estrona; y las lactonas resorcílicas ácidas: α -zearalanol (Zeranol), β -zearalanol (Taleranol), α -zearalenol y zearalanona.
2. Optimizar los parámetros de operación del inyector PTV para la introducción automatizada de la muestra, inyección múltiple de la misma sin el empleo de nitrógeno líquido; control de la reacción de derivatización por silanización de los analitos en el inyector por medio de un programa de temperaturas y venteo para tener una reacción reproducible, la eliminación de los excedentes de los reactivos derivatizantes e interferencias, y la introducción óptima de los analitos derivatizados al sistema de cromatografía de gases.
3. Obtención de la caracterización estructural de los compuestos anabólicos residuales a niveles de trazas (ng/mL) por espectrometría de masas.
4. Validación del método analítico para los compuestos: Dietilestilbestrol, Zeranol y Taleranol, para dar cumplimiento con la NOM-034-ZOO-1996.

La implementación e innovación de un método analítico para la determinación de hormonas naturales, sintéticas y otros compuestos con actividad anabólica con selectividad y sensibilidad aceptables, sin problemas de interpretación e incertidumbre en los resultados en el estado de Baja California, es una propuesta para apoyar a las demandas de los engordadores de ganado del Estado para producir ganado y productos con mayor calidad e inocuidad alimentaria, promover la exportación de estos productos y contribuir a minimizar el riesgo de pérdidas económicas por rechazo en los mercados internacionales.

CAPÍTULO II

GENERALIDADES

2. GENERALIDADES.

Bajo la experiencia generada en la industria farmacéutica y ganadera, para los propósitos de engorda y el aumento en la eficiencia alimenticia, se ha encontrado que el manejo de ganado bovino más beneficioso se realiza con sustancias hormonales, por sus efectos anabolizantes, al favorecer el crecimiento muscular y con ello, un impacto en la conformación de la canal.

Los compuestos hormonales anabolizantes, término que agrupa a las hormonas naturales, sintéticas y agentes de reparto (agonistas β -adrenérgicos), ejercen un efecto en el metabolismo al aumentar las funciones anabólicas (sintéticas) en detrimento de las catabólicas, actuando principalmente en el incremento de la retención de nitrógeno, promoviendo la eficiencia en el ciclo metabólico del nitrógeno, durante la síntesis proteica. Los agentes anabólicos solo afectan la senda de los nutrientes después de su absorción.¹⁰ Físicamente se refleja en un aumento de peso en los animales, debido al crecimiento de la masa muscular y en la ganancia ponderal por kilogramo de pienso consumido.^{10,11}

El empleo de sustancias moduladoras o promotoras de crecimiento, han representado una herramienta poderosa ante el desafío de la demanda de productos proteínicos como la carne y la leche, junto con otras estrategias para mejorar el rendimiento por animal, tales como la manipulación genética, el control de enfermedades, el aprovechamiento de piensos y la optimización de las raciones por computadora y técnicas de manejo más adecuados.¹⁰

Para los fines de producción animal en ganado de carne, la administración de los compuestos anabolizantes se realiza mediante implantes subcutáneos en la base de la oreja, y deben estar sujetos a una época de retracción o con dosis específicas.³

Entre los beneficios que proporciona esta práctica, y que la hace redituable, de acuerdo con las compañías farmacéuticas que comercializan estos productos se encuentran: la reducción de los costos de producción y el tiempo de alimentación que los animales pasan en el campo, para los consumidores se ofrece una mayor relación de carne magra con respecto a la presencia de grasa en el corte.

2.1. CLASIFICACIÓN DE SUSTANCIAS ANABÓLICAS.

Las sustancias anabolizantes aplicadas como moduladores de crecimiento se han clasificado de acuerdo con:

- La estructura química. (Tabla 1).
- Los impactos o efectos en el sistema biológico. (Tabla 2).

Tabla 1. Clasificación de compuestos anabólicos por su estructura química.

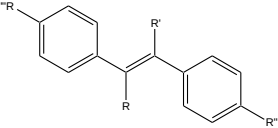
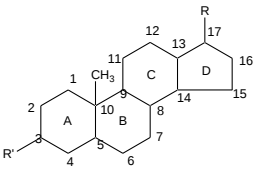
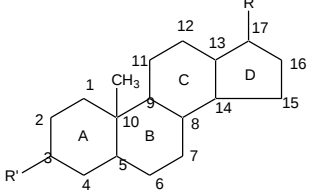
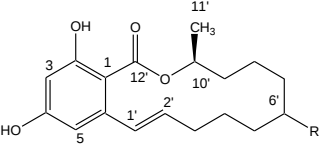
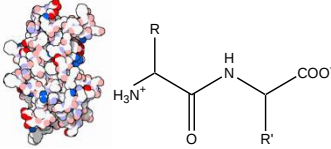
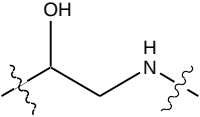
GRUPO	ESTRUCTURA GENERAL	SUSTANCIAS QUÍMICAS	
Estilbenos		Dietilestilbestrol Dienestrol Hexestrol	
Esteroides naturales		17β-estradiol Estrona Testosterona Progesterona	
Esteroides sintéticos		Metiltestosterona Trembolona Acetato de trembolona Acetato de melengestrol	Monopalmitato de estradiol Benzoato de estradiol
Lactonas resorcílicas ácidas		Zeranol y sus metabolitos: Taleranol, α-zeararenol y Zearalanona	
Hormona del crecimiento (HC) y compuestos afines		Somatotropina Somatomedina Somatostatina	Descargadores de hormona del crecimiento Somatocrina
Beta-agonistas		Ractopamina Clenbuterol	Zilpaterol Cimaterol

Tabla 2. Clasificación de compuestos anabólicos por su efecto en los sistemas biológicos.

COMPUESTOS ANABÓLICOS			
HORMONAS NO NATURALES		HORMONAS NATURALES	
<u>Estrógenos</u>	<u>Metabolitos</u>	<u>Estrógenos</u>	<u>Metabolitos</u>
Dietilestilbestrol (DES)	-	17 β -estradiol	17 α -estradiol
Hexestrol	-		
Dienestrol	-		
Etiniloestradiol	-		
α -zeranol	Taleranol (β -zeranol), zearalanona		
EFECTO ANDROGÉNICO		EFECTO ANDROGÉNICO	
17 β -nortestosterona	17 α -nortestosterona	17 β -testosterona	17 α -testosterona
Acetato de clortestosterona		(Nortestosterona) ¹	17 α -nortestosterona
Metiltestosterona			
17 β -trenbolona	17 α -trenbolona		
Metilboldenona			
EFECTO GESTÁGENICO		EFECTO GESTAGÉNICO	
Acetato de clormadinona		Progesterona	
Acetato de medroxiprogesterona			
Acetato de melengestrol			
Acetato de megestrol			

¹ Presente naturalmente en cerdos y caballos.

A continuación se presenta una descripción de la relación estructura/actividad y metabolismo de los estilbenos: Dietilestilbestrol, Dienestrol y Hexestrol; los esteroides naturales: Testosterona, Progesterona, Estrona y 17 β -estradiol; y las lactonas resorcílicas ácidas: Zeranol (α -zearalanol), Taleranol (β -zearalanol), α -zearalenol y zearalanona.

2.2. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD Y METABOLISMO DE COMPUESTOS ANABÓLICOS UTILIZADOS EN LA INDUSTRIA DE ENGORDA.

2.2.1. COMPUESTOS ESTILBÉNICOS.

Los miembros de esta familia son el dietilestilbestrol, el dienestrol y el hexestrol. De todos los estrógenos sintéticos disponibles los mejores promotores del crecimiento son los derivados del estilbeno. Los estilbenos tienen actividad genotóxica; reaccionan con el genoma del núcleo de las células favoreciendo la formación de tumores. Su actividad estrogénica es alta, inclusive por vía de la ingesta, aumentando su potencial efecto tóxico.¹²

2.2.1.1. Dietilestilbestrol.

El dietilestilbestrol (DES) es una hormona sintética, fue utilizada como tratamiento para síntomas asociados con la menopausia, desórdenes menstruales, engrosamiento de seno post parto, problemas ováricos primarios, y en la quimioterapia de cáncer de seno y de próstata avanzados. El DES fue empleado desde 1949 hasta 1971 como tratamiento para la prevención de abortos espontáneos en humanos y de forma extensiva como promotor de crecimiento para ganado bovino y ovino en tratamientos en desórdenes por deficiencia de estrógenos en la medicina veterinaria, y más recientemente como anticonceptivo post coital. Las dosis para sus aplicaciones médicas actuales tienen un rango entre 0.1 a 0.5 mg/día en un régimen acíclico para tratamientos de síntomas durante el climaterio y posterior ovariectomía, de 15 mg/día para quimioterapia de carcinoma de seno avanzado.¹³

En la actualidad, su actividad carcinogénica es altamente conocida, basada en estudios con evidencia suficiente de carcinogenicidad en humanos. El DES administrado durante el embarazo ha mostrado que incrementa la incidencia de adenocarcinomas de la vagina o la cérvix y adenosis vaginal en hijas expuestas *inútero*. La evidencia por una asociación con otros cánceres humanos ha sido, ya sea limitada (endometrio) o inadecuada (seno, ovarios). Un grupo de trabajo de la International Agency for Research on Cancer (IARC) reportó que existe suficiente evidencia de carcinogenicidad de dietilestilbestrol en animales de experimentación. Unos treinta años después se comprobaría que en las mujeres ocasiona teratogénesis, cáncer vaginal y carcinogénesis transplacentaria. En 1971 se comprobó que de ocho mujeres jóvenes (15-22 años) que presentaban adenocarcinoma vaginal, siete eran hijas de madres que se trataron con DES en su primer trimestre de embarazo por amenaza de aborto u otros problemas ginecológicos. En las últimas décadas del siglo XX se observó que el DES y sus metabolitos (Figura 1 y Figura 2) se unen a los receptores del estradiol, al metabolizarse inicialmente como DES catecol quinona. Al parecer la carcinogenicidad de estas sustancias implica su activación por los sistemas de óxido-reducción celulares.^{10,14,15}

El DES tiene dos isómeros (cis y trans) con diferente actividad en pruebas de crecimiento, siendo el isómero trans el más potente.¹⁰

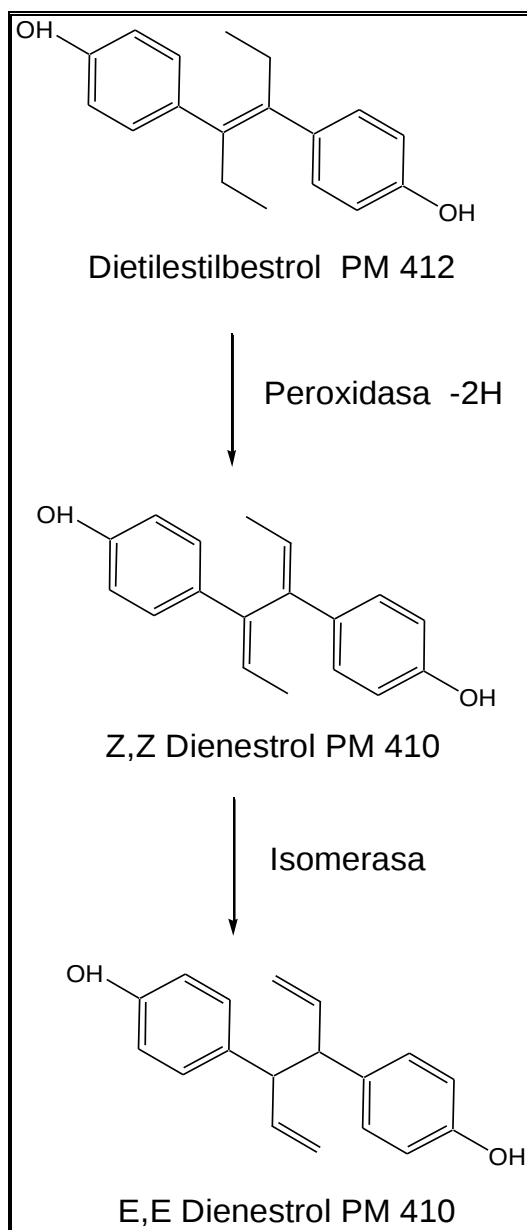


Figura 1. Metabolitos de Dietilestilbestrol.¹⁴

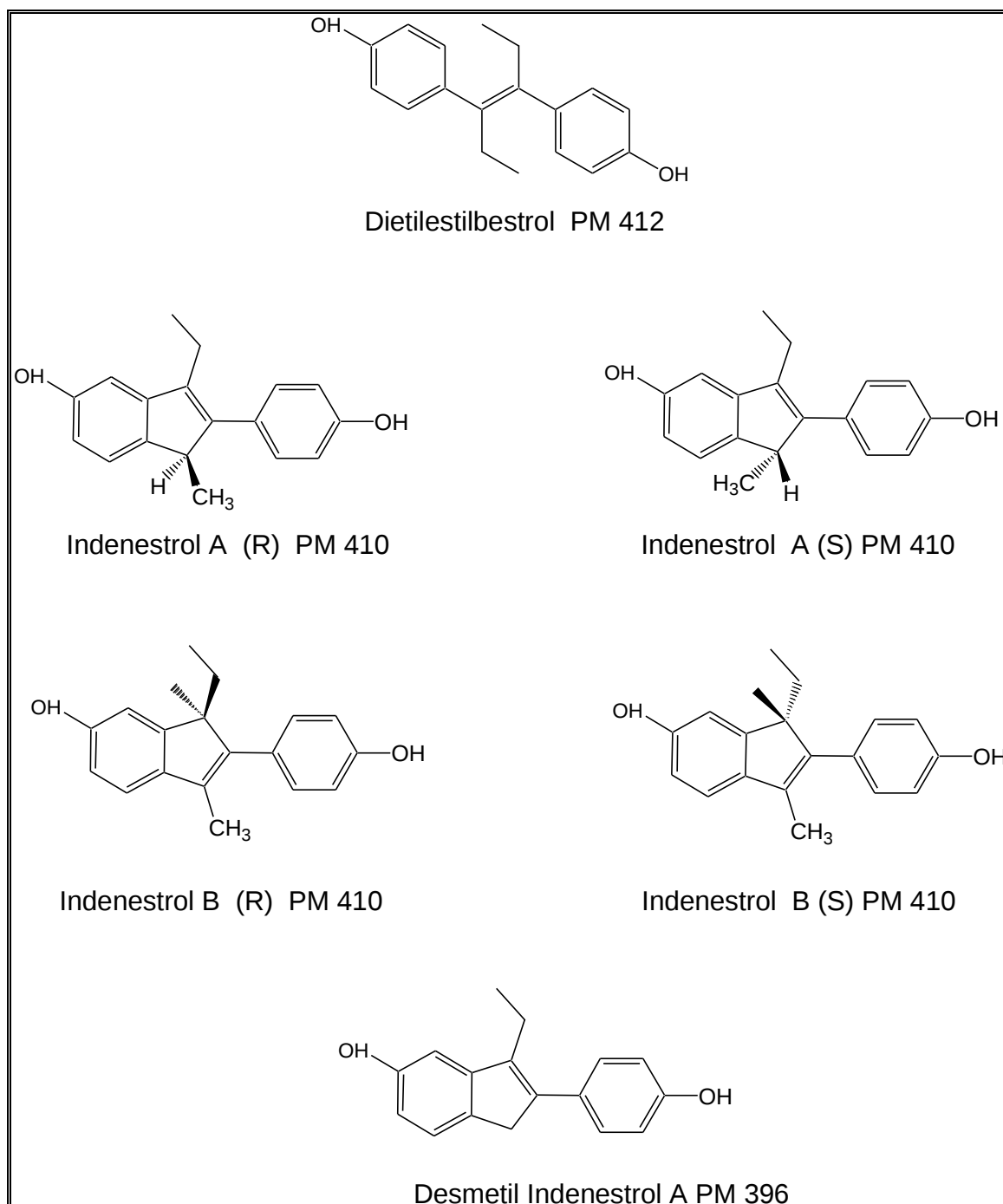


Figura 2. Metabolitos y análogos del Dietilestilbestrol.¹⁵

2.2.1.2. Dienestrol.

El dienestrol, posee dos estéreos isómeros estables: el Z,Z-dienestrol (cis,cis-dienestrol, β -dienestrol) y E,E-dienestrol (trans,trans-dienestrol, α -dienestrol). E,E-dienestrol es el principal constituyente de medicamentos a base de dienestrol, mientras que el Z,Z-dienestrol es un metabolito del Dietilestilbestrol.¹⁶

Los efectos anabólicos del dienestrol como promotor de crecimiento son menos manifiestos que el DES, de aquí que los animales tratados no alcanzaran la calidad de los que recibían con este estilbeno.

La formación del metabolito Z,Z-Dienestrol (1) (Z,Z-DIES), ha sido postulado más no establecido, a partir de la formación de radicales de DES semiquinona que se forman por reducción de DES Quinona (2) (DES Q) por citocromo P-450 reductasa y NADPH. El radical libre de las DES semiquinona resultante puede reaccionar de forma no enzimática con oxígeno molecular para formar $O_2^{\cdot -}$ y DES Q.¹⁷

En la Figura 3, Deodutta (1988), propone una ruta para la formación del Dienestrol a partir del DES-semiquinona (3).

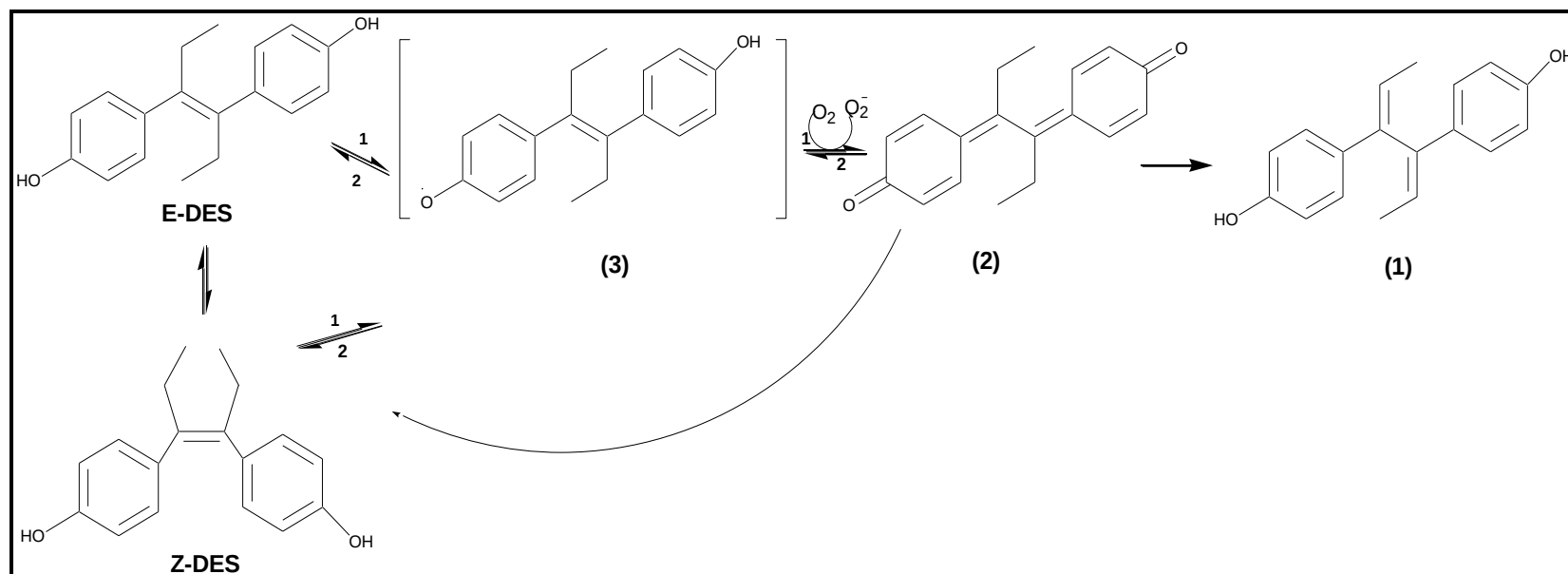


Figura 3. Propuesta de formación del metabolito Dienestrol a partir de DES semiquinona.

2.2.1.3. Hexestrol.

Este compuesto tiene una estructura similar al DES, pero se encuentra hidrogenado en el doble enlace $C_3=C_4$, es un estrógeno no esteroidal. Su metabolito principal es su catecol, Hexestrol Catecol,^{18,19,20,21} el cual puede ser metabólicamente convertido a la catecol quinona correspondiente²² (Figura 4).

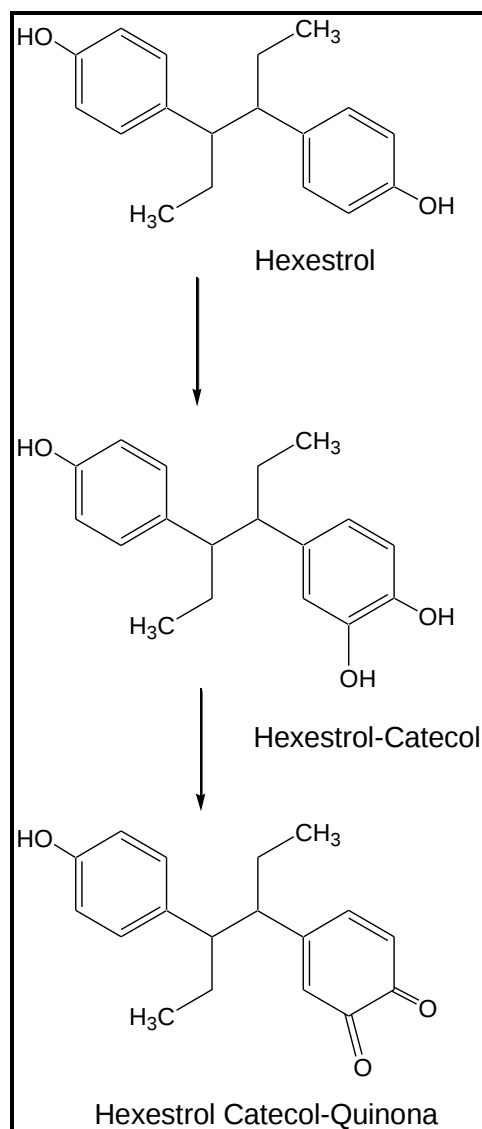


Figura 4. Hexestrol y metabolitos principales.

La hexestrol quinona posee propiedades químicas y bioquímicas similares a los compuestos de Catecol Estrógeno-3,4-Quinona (CE-3,4-Q), formando

específicamente un aducto N7Gua después de reaccionar con dG o ADN.²³ Estos datos sugieren que la hexestrol catecol quinona es un electrófilo involucrado en la iniciación de tumores por hexestrol.²²

La actividad carcinogénica del estrógeno sintético hexestrol fue medida en hámsteres sirios macho. Entre el 90 y 100% de los animales tratados con hexestrol o con 3',3'',5',5''-tetradeuteriohexestrol, implantados subcutáneamente como pellets de 25 mg, se encontraron carcinomas renales después de 6-7 meses.

El metabolismo del hexestrol in-vitro, mediados por microsomas de hígado de rata fenobarbital inducidos, permitieron la formación de 3'-hidroxihexestrol. El dietilestilbestrol no pudo ser detectado como metabolito. En la orina de los hámsteres sirios macho, se identificaron los metabolitos 3'-hidroxihexestrol, 3'-metoxihexestrol, 1-hidroxihexestrol, y otros metabolitos de hexestrol hidroxilados y/o metoxilados. Nuevamente el DES no fue detectado como un metabolito del hexestrol in vivo. La reactividad de la 3'-hidroxihexestrol fue entonces estudiada para determinar si este catecol estrógeno juega un rol en la carcinogenicidad del hexestrol. La peroxidasa de rábano picante catalizó la oxidación de 3'-hidroxihexestrol a 3',4'-hexestrol quinona. Esta reacción de oxidación pudo también ser llevada a cabo de forma no enzimática con óxido de plata o carbonato de plata en celita como oxidantes. La quinona fue inestable ($t_{1/2}$ en cloruro de metileno: 53 min). Reaccionó con compuestos con contenido de azufre tales como el mercaptoetanol por la reacción de adición de Michael para formar 3'-(2-hidroxietiltio)-5'-hidroxihexestrol. La 3',4'-Hexestrol quinona reaccionó con aminas simples tales como la etilamina para formar *N*-etil-aminohexestrol. Las reacciones químicas descritas anteriormente fueron llevadas a cabo para probar la reactividad de los metabolitos intermediarios identificados o sospechosos de hexestrol. Se concluyó que la carcinogenicidad del hexestrol no se basaba en su conversión a DES. Preferentemente, la formación del catecol estrógeno puede ser necesaria para la acción carcinogénica del hexestrol en analogía a los eventos observados anteriormente con estradiol.²⁴

2.2.2. HORMONAS ESTEROIDALES.

Los esteroides anabólicos son sustancias naturales biosintetizadas en los testículos, ovarios y glándula adrenal a partir de colesterol vía pregnenolona.

Los esteroides químicamente se pueden clasificar en dos grupos:

- a. Aquellos que carecen del grupo metilo en el carbono 17.
- b. Los que poseen el grupo metilo y que están más relacionados con la hormona testosterona, teniendo modificaciones en el anillo A, de la molécula esteroideal.

Los anabólicos en producción pecuaria, pertenecen a varios grupos químicos y no son únicamente derivados de la testosterona. Pueden clasificarse como hormonales o esteroides (Tabla 3) y no hormonales o no esteroides (Tabla 4).³

Tabla 3. Anabólicos esteroides u hormonales.

EFEECTO	COMPUESTO
Estrogénicos	17 β estradiol Benzoato de estradiol
Gestágenos	Progesterona Acetato de melengestrol
Androgénicos	Testosterona Trembolona

Tabla 4. No esteroides o no hormonales.

EFEECTO	COMPUESTO
Estrogénicos	Zeranol Hexestrol Dietilestilbestrol Dienestrol

Las hormonas naturales son sustancias que son secretadas en pequeñas dosis por ciertas glándulas, o durante procesos biológicos específicos en el

organismo. Las hormonas son transportadas hacia el órgano donde tienen su acción vía torrente sanguíneo, donde se combinan con receptores específicos y se generan ahí ciertos efectos.

Las hormonas sintéticas son sustancias que son similares a las hormonas naturales, pero no se encuentran en los organismos de humanos o animales.

A continuación se describe brevemente la biosíntesis y metabolismo de los esteroides analizados en este estudio: Estrona, Estradiol, Progesterona y Testosterona.

2.2.2.1. Biosíntesis y metabolismo de esteroides.

La producción de hormonas esteroidales a partir del colesterol se verifica con una formación intermedia de pregnenolona (Figura 5), que contiene el núcleo del colesterol pero una cadena lateral de tan solo dos carbonos. La pregnenolona es el precursor de la progesterona, que es la hormona progestativa de la placenta y del cuerpo lúteo, y a su vez, la precursora, de los andrógenos u hormonas sexuales masculinas, tales como la androsterona y la testosterona, de los estrógenos u hormonas sexuales femeninas, como la estrona y el estradiol, así como de los corticosteroides adrenales, la corticosterona y la aldosterona.²⁵

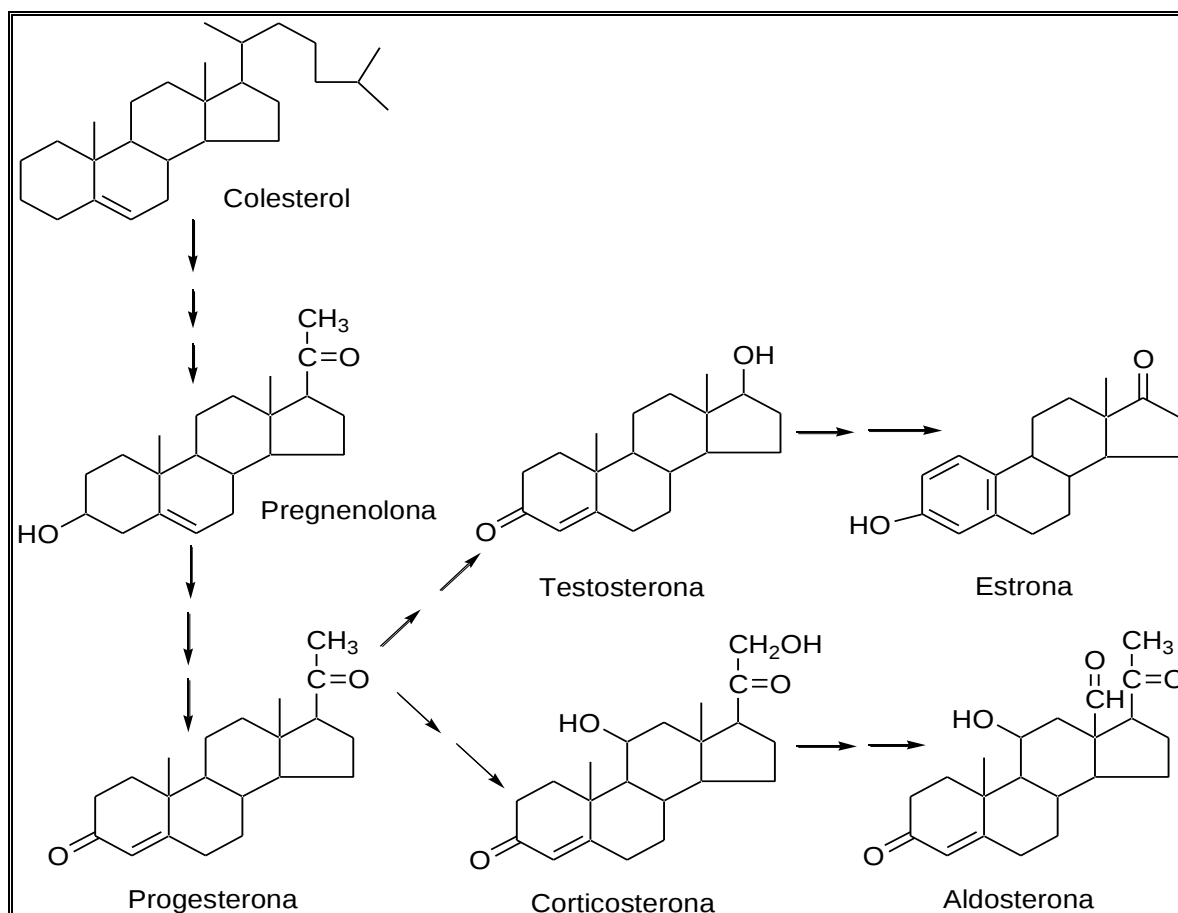


Figura 5. Formación de hormonas esteroideas a partir del colesterol vía pregnenolona.²⁵

2.2.2.2. Biosíntesis y metabolismo de Estrona y Estradiol.

Estrona.

El estradiol es sintetizado y secretado principalmente por células granulosas ováricas, mientras que la mayor parte de estrona (aproximadamente el 40% de estrógenos totales) se forma periféricamente a partir de estradiol y androstenediona. El estradiol y la estrona pueden ser intra convertidos mediante la acción de la enzima 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. La estrona puede ser nuevamente metabolizada a estriol, principalmente en el hígado. El estriol también se forma en el hígado fetal y en la placenta a partir de sulfato 16α -hidroxideshidroepiandrosterona.²⁶ En la Figura 6, se describe la ruta metabólica de la conversión de estrona a estradiol.

17 β -Estradiol.

El 17 β -Estradiol es un esteroide de 18 carbonos, es el más potente de los estrógenos naturales. Ejerce sus efectos biológicos grandemente por mecanismos de mediación de receptores, y se une con alta afinidad y alta especificidad a receptores intracelulares. El enlazamiento del 17 β -estradiol afecta directamente el crecimiento y el desarrollo del tracto reproductivo y senos, así como la aparición de los caracteres sexuales secundarios. En mujeres no preñadas, actúa sinérgicamente con la progesterona durante la fase de formación del cuerpo lúteo durante el ciclo menstrual para la iniciación de eventos de un ciclo nuevo. La producción continua de 17 β -estradiol es esencial para el crecimiento normal y el desarrollo del feto. Además de sus efectos en los tejidos reproductivos, el estradiol es una hormona metabólica importante, particularmente por su efecto en los sistemas cardiovascular, esquelético y gastrointestinal.²⁶ En la Figura 6, se describe la ruta metabólica de la conversión de estrona a estradiol.

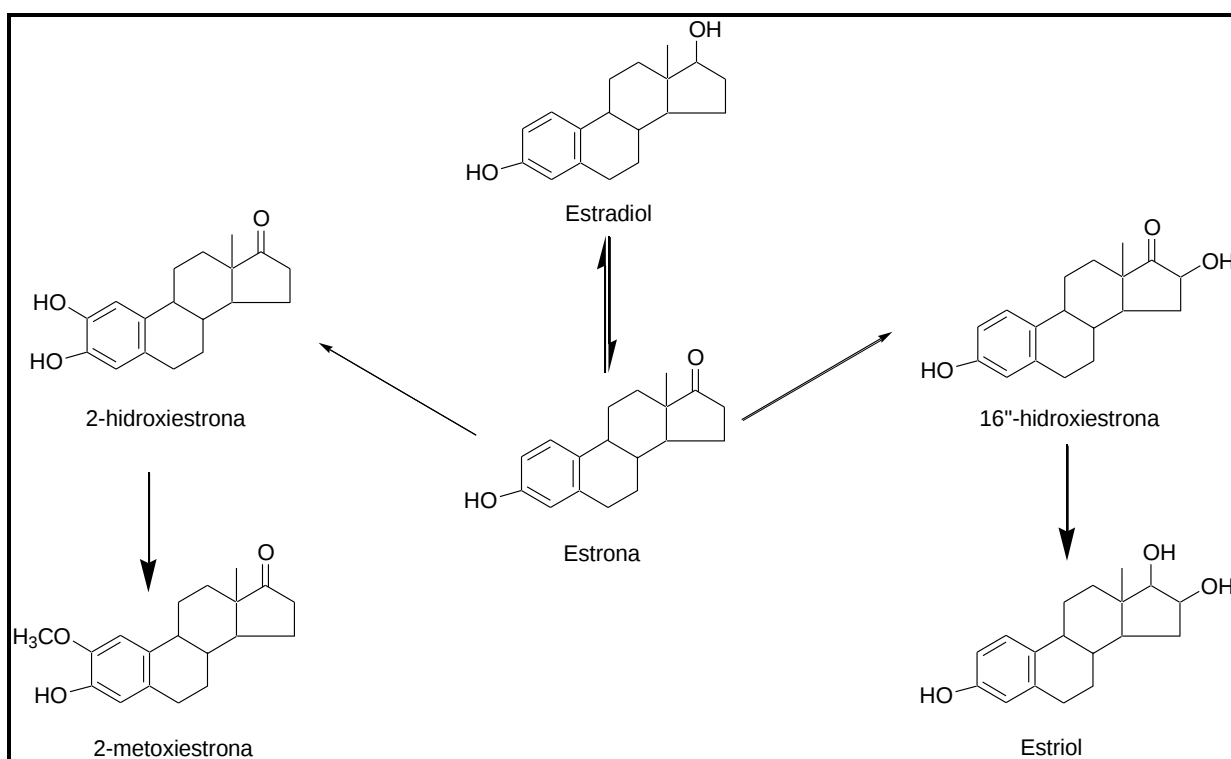


Figura 6. Metabolitos principales de la estrona y estradiol.²⁶

2.2.2.3. Progesterona.

Es un esteroide de 21 átomos de carbono y es el único progestágeno natural importante. Su función normal consiste en preparar el útero para la implantación y la manutención del embarazo. La producción de progesterona por el cuerpo lúteo es controlada por la liberación de la hormona luteinizante a través de la glándula pituitaria. En mujeres no preñadas, una concentración elevada de progesterona inhibe la liberación cíclica de la hormona luteinizante, y niveles más altos inhiben la producción de la hormona folículo estimulante. La progesterona se contrapone a algunos efectos de los estrógenos, pero por estimulación previa con estrógenos es esencial para la promoción de respuestas biológicas. La progesterona presenta una alta afinidad y alta especificidad a receptores proteínicos intracelulares, los enlaces de progesterona activan al receptor, resultando en la activación de genes específicos. En la Figura 7, se detallan los metabolitos principales de la progesterona.

Menos del 10% de la progesterona es biodisponible después de la administración oral, ya que es inactivada en el tracto gastrointestinal y/o el hígado. La progesterona tiene una poca toxicidad cuando es proporcionada como una dosis oral única.

El Comité de Expertos en Aditivos de Alimentos, JECFA, concluyó que en resumen, la progesterona no tiene potencial genotóxico, la progesterona exógena empleada para mantener el embarazo, no presentó evidencia de toxicidad y sin efectos sobre el término normal del embarazo.²⁶

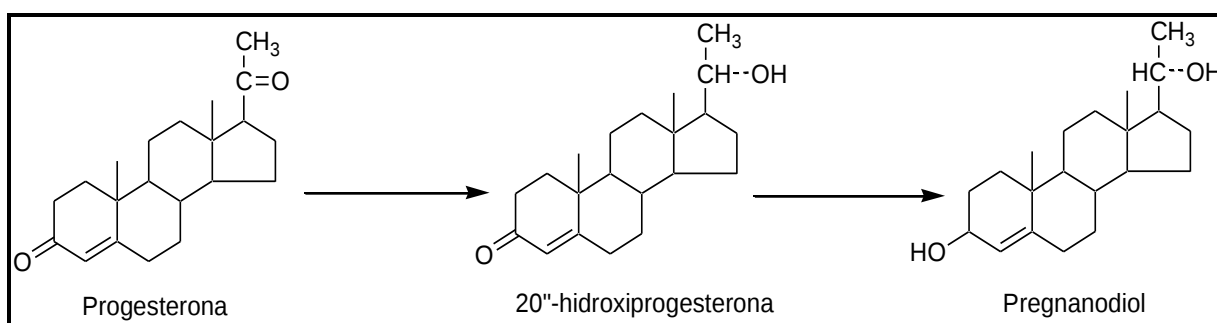


Figura 7. Metabolitos principales de la progesterona.²⁶

2.2.2.4. Testosterona.

Es un esteroide de 19 carbonos el cual posee potentes propiedades androgénicas, incluyendo el mantenimiento de la función testicular y la diferenciación de los caracteres sexuales secundarios. Ejerce sus efectos biológicos por mecanismos de mediación de receptores, y se enlaza con gran afinidad y alta especificidad a una proteína receptora intracelular, el receptor androgénico, el cual es consecuentemente activado, resultando en la activación de genes específicos. En ciertos tejidos, la testosterona es metabolizada a 5 α -dihidrotestosterona, la cual posee gran afinidad por el receptor androgénico.

Los andrógenos tienen efectos anabólicos marcados incluyendo el incremento de la síntesis de proteína en músculos y hueso. Esto se traduce en un incremento en la masa muscular. En las mujeres, los andrógenos tienen acción en músculos como el busto, útero y vagina de forma similar que los progestágenos. La hormona luteinizante y la hormona folículo-estimulante procedente de la glándula pituitaria controlan la producción de testosterona a través de los testículos. La testosterona a su vez, modula la concentración de la hormona folículo-estimulante y la hormona luteinizante, que a su vez controla los niveles circulantes de testosterona a través de un mecanismo de reacción.

La testosterona tiene una muy baja toxicidad cuando se administra en una sola dosis oral.

En estudios de toxicidad, la testosterona resultó embriotóxica, en ratas, una dosis de testosterona de 25 mg/kg de peso corporal administrado como implantes subcutáneos en el día 10 de gestación dió como resultado en la resorción de todos los embriones.

No se han realizado estudios multigeneracionales de toxicidad reproductiva con testosterona, partiendo del hecho de que las concentraciones circulantes normales son requeridas para la función reproductiva en hombres, mientras que las concentraciones elevadas de testosterona interfieren con la función reproductiva en ambos sexos.

En células mamarias, no se han encontrado datos de aberraciones cromosomales, mutaciones o aductos producidos por testosterona solamente, sin

embargo, el Comité ha reafirmado que el aumento de la tasa de cáncer prostático detectado en ratas es consistente con los efectos hormonales mediados por la testosterona y sus metabolitos.²⁶ En la Figura 8, se muestran los metabolitos principales de esta hormona.

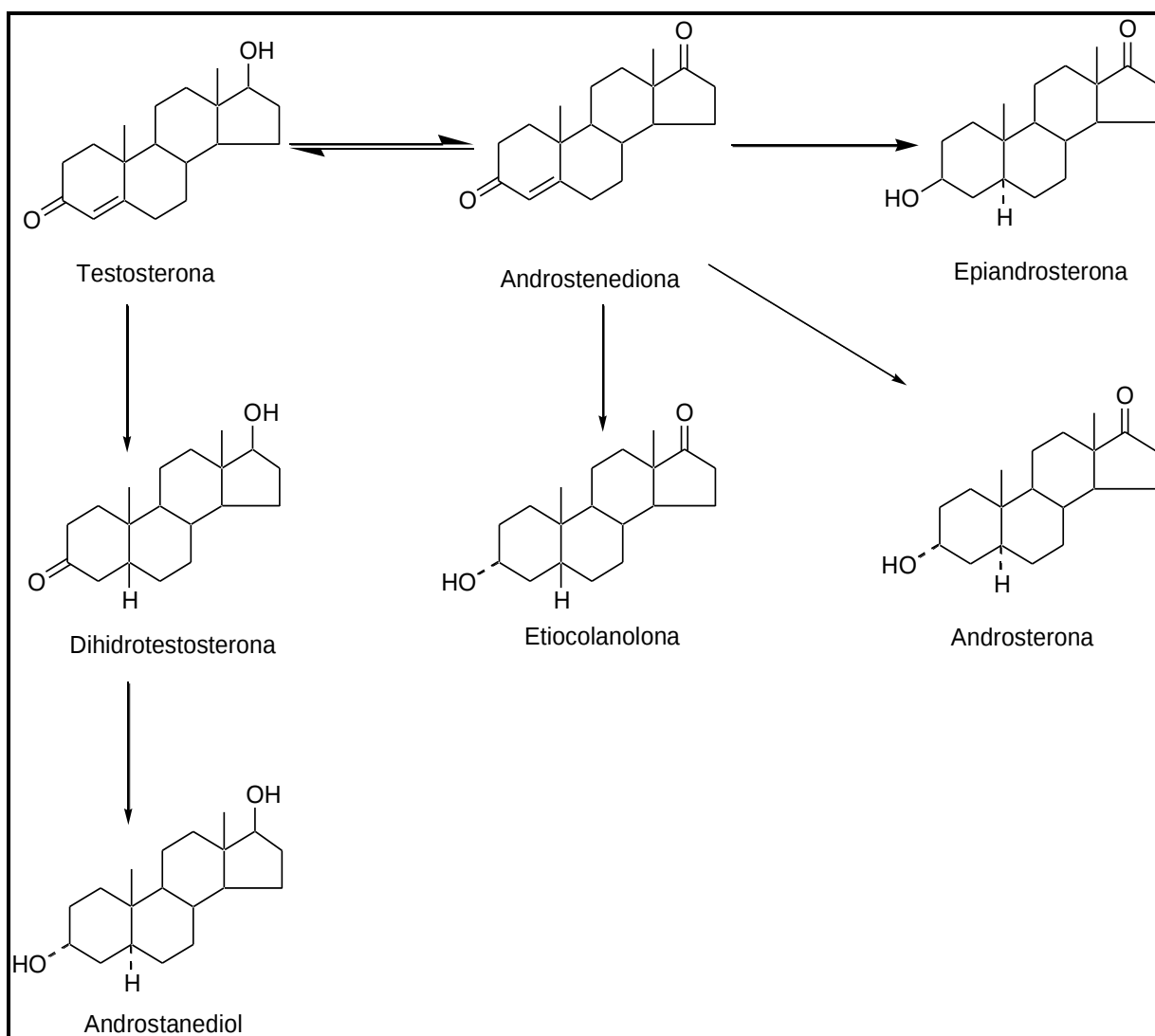


Figura 8. Metabolitos principales de la testosterona.²⁶

2.2.3. ACTIVIDAD Y METABOLISMO DE LAS LACTONAS RESORCÍLICAS ÁCIDAS (RALs).

Son sustancias consideradas principalmente como contaminantes de alimentos y forrajes debido a su relativamente alta afinidad como receptor estrogénico y su efecto potencialmente estrogénico. En la Figura 9 se muestran las estructuras y el metabolismo de las RALs, en donde se explica que el grupo carbonilo en C₆' de la zearalenona se reduce a los C₆'-α-hidroxi (α-zearalenol) y C₆'-β-hidroxi (β-zearalenol) correspondientes, en los cuales se reduce el doble enlace C₁'=C₂', para formar el α-zearalenol y el β-zearalenol, pudiendo interconvertirse a través de la zearalanona. Las RALs son producidas por especies del hongo *Fusarium*, las cuales colonizan a una gran variedad de cultivos como trigo, cebada, avena y maíz. El número de reportes de cultivos infestados por cepas patógenas de *Fusarium* se ha incrementado en todo el mundo durante los últimos 10 a 15 años. Se cree actualmente que esto es causado por la alteración en las técnicas de cultivo, tales como el incremento de conservación de suelo en lugar de emplear técnicas de labrado, rotación simplificada de cultivo con una alta fracción de cereales y maíz, así como el cambio climático.²⁷

2.2.3.1. Zearalenona y los metabolitos α-zearalenol, zearalanona y β-zearalenol.

La lactona 6-(10-hidroxi-6-oxo-trans-1-undecenil)-β-resorcílica ácida (zearalenona, ZEN), es una micotoxina no esteroidal estrogénica que es producida por numerosas especies de *Fusarium* en cereales pre o post-cosechados. Bajo condiciones ambientales favorables para el crecimiento fungicida, altos niveles de ZEN se encuentran con frecuencia en maíz y otros granos pequeños, tales como trigo y cebada. El grupo ceto en C-6' es reducido a un compuesto más estrogénico, α-zearalenol, y/o su homólogo estéreo isomérico β-zearalenol (el cual posee menor estrogenicidad que ZEN) por los varios microorganismos, incluyendo filtrados de levadura industrial y microbios intestinales animales. Estas micotoxinas tienen efectos de salud adversos en los varios animales que ingieren cereales infectados con moho y productos alimenticios derivados de cereales.

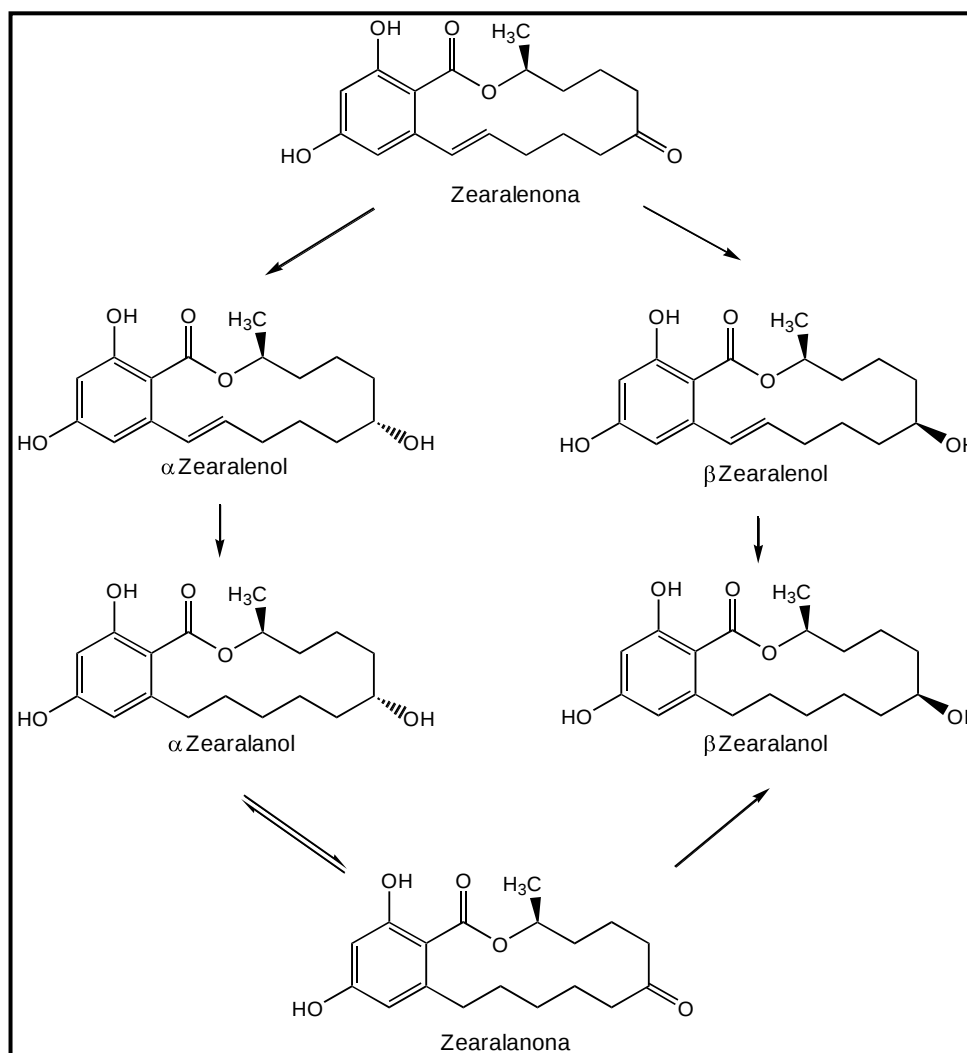


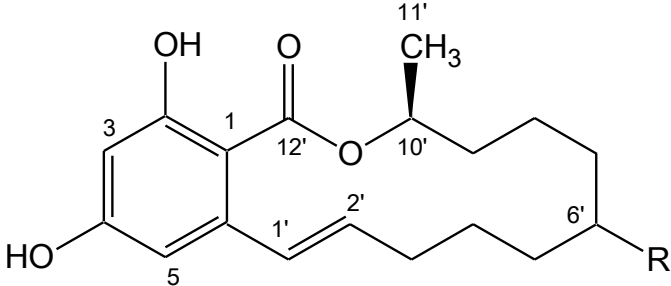
Figura 9. Ruta metabólica de la zearalenona, donde se observa la formación de los metabolitos α -zearalenol, α -zearalanol (zeranol), zearalanona y β -zearalanol (taleranol).

El α -zearalanol, también conocido como Zeranol, es una hormona xenobiótica y es un promotor de crecimiento altamente conocido por su efecto estrogénico. El zeranol muestra un metabolito primario, zearalanona, y un metabolito secundario, β -zearalanol (taleranol).

La ZEN causa desórdenes morfológicos y funcionales severos de órganos reproductivos en el ganado, especialmente cerdos hembra. En pruebas de alimentación con los cerdos hembra, se observaron síntomas clínicos claros (tales

como reducción en la eficiencia de la alimentación, cambios de peso de órganos, fertilidad reducida) cuando la dieta contuvo 1 a 5 µg de ZEN/g. Consistentes con los síntomas relacionados al crecimiento y reproducción, estudios fisiológicos celulares demostraron que la ZEN se enlaza a los receptores humanos recombinantes del estrógeno y estimula el crecimiento de células cancerosas de pecho en humanos. Además del efecto hormonal, en estudios a largo plazo de carcinogenicidad en ratones se observaron aumentos significativos de tumores en la pituitaria y adenomas hepatocelulares a dosis mucho mayores que las concentraciones de ZEN que tenían el efecto estrogénico.²⁸

Tabla 5. Estrogenicidad relativa de la zearalenona y metabolitos.²⁸

			
Sustrato	1',2'	R	Estrogenicidad relativa
Zearalenona	trans	CO	1
α-zearalenol	trans	H,α-OH	92
β-zearalenol	trans	H,β-OH	0.44
Zearalanona	dihidro	CO	2.5
α-zearalanol	dihidro	H,α-OH	18
β-zearalanol	dihidro	H,β-OH	3.5

La potencia estrogénica de sustancias contaminantes en alimentos tales como la micotoxina Zearalenona y algunos de sus metabolitos (zearalanona, α-zearalanol, β-zearalanol, α-zearalenol, β-zearalenol), particularmente el α-zearalenol, el cual es tan potente como el etinilestradiol y el dietilestilbestrol en la línea endometrial humana de la células de Ishikawa.

Para la micotoxina zearalenona y sus derivados, según lo observado en levaduras recombinantes, una gran gama de la actividad estrogénica fue medida en las células de Ishikawa. La actividad estrogénica encontrada, fue como sigue: α -zearalenol > α -zearalanol > zearalenona = zearalanona > β -zearalanol > β -zearalenol (Tabla 5). Aunque esta actividad resultó idéntica a las obtenidas con hER en levaduras recombinantes, algunos de estos compuestos parecieron ser estrógenos más poderosos. α -zearalenol fue 22 veces más estrogénico que 17β -estradiol y fue tan potente como el DES y 17α -etinilestradiol en este sistema. α -Zearalanol, zearalenona, zearalanona exhibieron 19, 9 y el 7% de actividad del etinilestradiol respectivamente y era 6, 3 y 2 veces más potentes que 17β -estradiol, respectivamente. El isómero β -zearalenol fue revelado como un pobre estrógeno (0.02% de actividad del etinilestradiol) en este sistema, así como en el sistema de levadura recombinante para rER y hER.

La zearalenona o sus derivados han sido asociados a desórdenes reproductivos en raciones de alimento por granos infectados con moho. Zearalenona ha sido encontrada en alimento para ganado en concentraciones entre 140 y 960 $\mu\text{g/kg}$ en cerdos con problemas reproductivos, se hallaron concentraciones de conjugados glucurónidos de zearalenona y α -zearalenol en bilis de hasta 40 y 66 $\mu\text{g/L}$. Por comparación, en animales tratados con α -zearalanol como promotor del crecimiento, el límite máximo aceptado del residuo para α -zearalanol en tejido comestible es de 2 $\mu\text{g/kg}$ en músculo y 10 $\mu\text{g/kg}$ en hígado.

La línea celular para el carcinoma endometrial humano, muestra que es altamente sensible a las micotoxinas estrogénicas. La EC_{50} en estas células fue de 5.8×10^{-11} mol/L para zearalenona, 6.6×10^{-12} mol/L para α -zearalenol y 3×10^{-11} mol/L para α -zearalanol. Estas concentraciones son equivalentes a 20, 2 y 10 ng/L respectivamente. Sin embargo, estas concentraciones están debajo de las concentraciones encontradas en piensos contaminados por micotoxinas y debajo del límite máximo de residuo en el tejido comestible de los animales tratados con α -zearalanol. En vista de estos resultados, hay una cierta preocupación por el límite de seguridad para estos productos químicos y un riesgo posible por la función reproductiva en seres humanos.²⁹

2.3. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE SUSTANCIAS ANABÓLICAS.

El control de residuos de compuestos anabólicos en la producción pecuaria ha sido sugerido por las organizaciones internacionales de la FAO y OMS desde 1973.^{30,31} Las limitaciones de las técnicas analíticas hasta la última década del siglo pasado, han restringido de manera considerable los estudios profundos sobre los efectos en la salud humana de los residuos de compuestos con actividad anabólica empleados para lograr una mayor eficiencia en la producción pecuaria, por medio de implantes y aditivos en las dietas animales.

Los datos analíticos y la evidencia científica han sido insuficientes para poder determinar el nivel en el cual la presencia residual en tejido, orina y suero, pueden tener una repercusión dañina en la salud humana, por lo que a nivel mundial aún no se ha definido un valor por debajo del cual sea seguro su uso.³²

Ante esto, los organismos mundiales han recomendado que en los países donde se realizan estas prácticas, su uso sea monitoreado de forma obligatoria, principalmente para constatar que se han cumplido los tiempos para el retiro de los implantes, y así asegurar que los niveles residuales han disminuido y que son de alguna forma inocuos para el consumo humano.

Tratando de tener un mayor control de los niveles residuales de los compuestos anabólicos se han ensayado muchas combinaciones analíticas,^{33,34,35} como el sistema Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas/Espectrometría de Masas (GC/MS/MS) para la familia de los Estilbenos,³⁶ el sistema Cromatografía Líquida/Espectroscopía Ultravioleta Visible/Detector de Arreglo de Diodos (LC/MS) para el presuntivo de trembolona;³⁷ para los β -agonistas el sistema Cromatografía de Líquidos/Espectrometría de Masas/Espectrometría de Masas (LC/MS/MS),³⁸ para las hormonas progesterona, testosterona y epi-testosterona por LC/MS/MS.³⁹

Los métodos reportados para el análisis de residuos anabólicos y compuestos hormonales en ganado bovino, han incorporado las técnicas instrumentales de alta resolución, y la implementación de procedimientos de extracción y limpieza de

muestras más eficientes, dependiendo del tipo de matriz involucrada. En el análisis de DES, Dienestrol, Hexestrol y Zeranól en orina de bovino,⁴⁰ se emplearon columnas de inmunoafinidad, minimizando los tiempos de tratamiento de la muestra. En esta determinación, se utilizó un sistema GC/MS por EI, la cuantificación de los compuestos anabólicos empleó estándares internos deuterados, y se tomaron las sumas de las áreas de los picos de interés y los isómeros cis y trans de DES y ZER. En un estudio de once compuestos anabólicos estilbénicos, esteroidales y lactonas resorcílicas ácidas,⁴¹ en la misma matriz, se realizó una comparación entre los sistemas GC/MS y GC/MS/MS con inyectores de vaporización con temperatura programable, PTV, sin embargo, las reacciones de derivatización propuestas para la cuantificación se realizaron fuera del puerto de inyección donde fue muy dependiente, de las condiciones ambientales, y el inyector fue programado bajo parámetros de operación estándar, siendo minimizado a un típico Split/splitless.

Para el caso de las matrices de tejidos destinados al consumo humano, se ha optado por el uso de sistemas espectrometría por etapas como el GC/MS/MS por ionización química negativa, NCI,⁴² en donde se llevaron a cabo digestiones enzimáticas y el uso de anhídrido heptafluorobutírico como derivatizante, para estudiar la contaminación de lactonas resorcílicas ácidas. Stolker *et al.* (2004),⁴³ realizó un estudio comparativo entre la GC/MS y LC/MS, y estudió la relación señal/ruido de los metabolitos de interés, la derivatización con anhídrido heptafluorobutírico se hizo fuera del puerto de inyección.

Dentro de los sistemas de inyección en los sistemas GC/MS, el PTV, es sin duda una de las innovaciones tecnológicas con muchas ventajas analíticas^{44,45} para el análisis de sub-ultratrazas (10^{-12} a 10^{-15}) g, donde es posible inyectar grandes volúmenes de muestra, además de una concentración adicional de la muestra analizada, todo esto sin degradar térmicamente el analito de interés. En estos sistemas de inyección indirecta, se retiene la muestra inyectada un lapso de tiempo antes de pasar al sistema cromatográfico, permitiendo inyecciones múltiples.

La técnica de silanización^{46,47,48} ha sido aplicada ampliamente con los inyectores tradicionales en caliente en los sistemas de cromatografía gaseosa con un procedimiento de inyección directa, la cual provoca problemas de descomposición

térmica y los mayores problemas radican en la repetibilidad y reproducibilidad analítica, pues se hace manualmente. En esta reacción el grupo hidroxilo (-OH) del analito se convierte en un grupo trialquilsililo (-OSiR₃) dando como origen a los derivados trimetilsilil (TMS), siendo el producto resultante más volátil y de baja polaridad, ideales para el análisis en los sistemas GC/MS.⁴⁸

CAPÍTULO III

DISEÑO DE LA PROPUESTA ANALÍTICA, Y

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

3. DISEÑO DE LA PROPUESTA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE COMPUESTOS ANABÓLICOS.

Con relación a los métodos analíticos reportados y considerando las pertinencias económicas de un sistema de cromatografía con acoplamiento a un espectrómetro de masas, en el presente trabajo se propone un sistema que consiste de un cromatógrafo de gases (CG), un automuestreador para la inyección de muestras, un inyector de vaporización con temperatura programable (PTV), y como detector un espectrómetro de masas (EM), con analizador cuadrupolo.

Una descripción de cada uno de los componentes de la configuración analítica CG/PTV/EM, se realiza a continuación.

3.1 CONFIGURACION DEL SISTEMA CG/PTV/EM.

3.1.1. CROMATÓGRAFO DE GASES (CG) CON AUTOMUESTREADOR.

La configuración típica de un cromatógrafo de gases consiste en la incorporación de un inyector para el calentamiento y volatilización de la muestra, conectado a una columna cromatográfica instalada dentro de un horno de calentamiento controlado (Figura 10). El proceso de la cromatografía inicia con la volatilización de la muestra a la corriente del gas de arrastre, que debe ser inerte, se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución de la muestra se produce con el flujo de fase móvil proporcionada por un gas inerte, por la diferencia de velocidades de migración de los componentes de una mezcla.⁴⁹



Figura 10. Configuración típica de un cromatógrafo de gases.

En la columna se produce la partición de las moléculas de la muestra entre dos fases: líquida y vapor. Suponiendo una mezcla con dos componentes A y B en la muestra, las moléculas de A en fase vapor tendrán mayor tendencia que las moléculas de B, también en fase vapor al disolverse en el relleno de la columna, como se muestra en la Figura 11. Por este efecto se tienen distintas velocidades de migración por la columna para el componente A y el B. El componente con mayor tendencia a disolverse A será más retenido por la columna y aparecerá a la salida antes que el componente B.

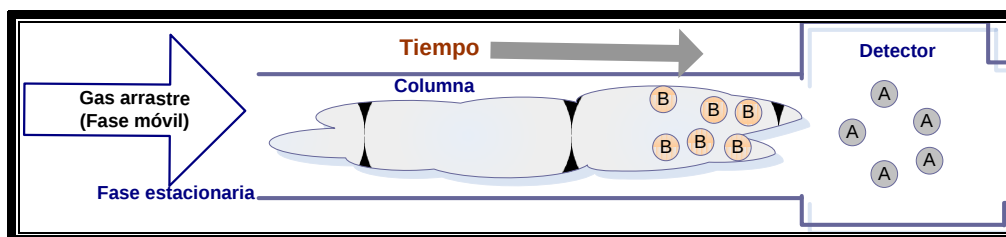


Figura 11. Principio de la separación cromatográfica gas-líquido.

A la salida de la columna, los componentes separados podrán ser detectados por medio de un dispositivo llamado detector, que ve los cambios en la composición

de las propiedades químicas de la fase móvil, de tal manera que si la fase móvil llega con algún componente diferente, este es detectado.

Al escogerse las condiciones adecuadamente, se logra una completa separación entre las moléculas de los componentes. El sistema de medición entrega una diferencia en el voltaje del detector llamada respuesta, el cual está en función de la concentración del componente. Se obtiene en forma de picos; al conjunto de picos se le llama cromatograma.

La cuantificación se realiza cuando se compara las respuestas de componentes de concentración conocida contra los componentes en la muestra desconocida, ya sea en forma directa o por medio de una curva de calibración.⁵⁰

3.1.2. INYECTOR DE VAPORIZACIÓN CON TEMPERATURA PROGRAMABLE (PTV).

El Inyector de vaporización con temperatura programable (PTV),⁵¹ además de los modos de inyección tradicionales empleados en la cromatografía de gases: split (con división), splitless (sin división) y sus respectivos modos pulsados, posee el modo de venteo de disolventes (solvent vent), el cual permite las inyecciones de grandes volúmenes (mayores de 1 μL), de forma individual o múltiple por análisis.

En el modo de inyección múltiple, PTV está diseñado para retener la muestra en el liner, hasta que ha sido inyectada por completo. Después el PTV se calienta rápidamente para transferir la muestra a la columna. Este proceso puede realizarse con una temperatura inicial, una sola rampa y otra temperatura al final del proceso de transferencia de la muestra. También pueden programarse dos rampas adicionales con los siguientes propósitos:

- Calentamiento del inyector a una temperatura alta para limpiar térmicamente el liner para el próximo análisis.
- Programación en modo descendente –fijando únicamente la temperatura final por debajo de la temperatura previa- para reducir la tensión térmica del inyector, preparándolo para el siguiente análisis, reduciendo el tiempo de ciclo para procesamiento de un mayor número de muestras.

El PTV puede inyectar muestras a bajas temperaturas en una cámara de refrigeración o de calentamiento. La temperatura inicial de la cámara se puede ajustar hasta -60 °C (con CO₂) o a -160 °C (con refrigeración de N₂ líquido), lo cual hace que el proceso de evaporación y eliminación del solvente se lleve a cabo sin degradar la muestra.

3.1.2.1. Distribución de flujo en el modo de venteo de disolventes (solvent vent).

Cuando la muestra es inyectada a bajas temperaturas y las condiciones de presión, flujo y venteo de purga, son las adecuadas, los analitos se depositan en el liner del inyector mientras el disolvente se evapora y es eliminado. Las inyecciones múltiples o de grandes volúmenes, se utilizan para concentrar la muestra en el inyector antes de transferirla a la columna para su análisis. Durante la etapa I de introducción de la muestra y eliminación del disolvente (Figura 12) la válvula solenoide permanece abierta. El inyector está a la temperatura inicial (*Init Temp*), al punto de ebullición del disolvente o por debajo del mismo. Los vapores del disolvente salen por la válvula de salida, mientras que la muestra se deposita en las paredes del liner o en el relleno.

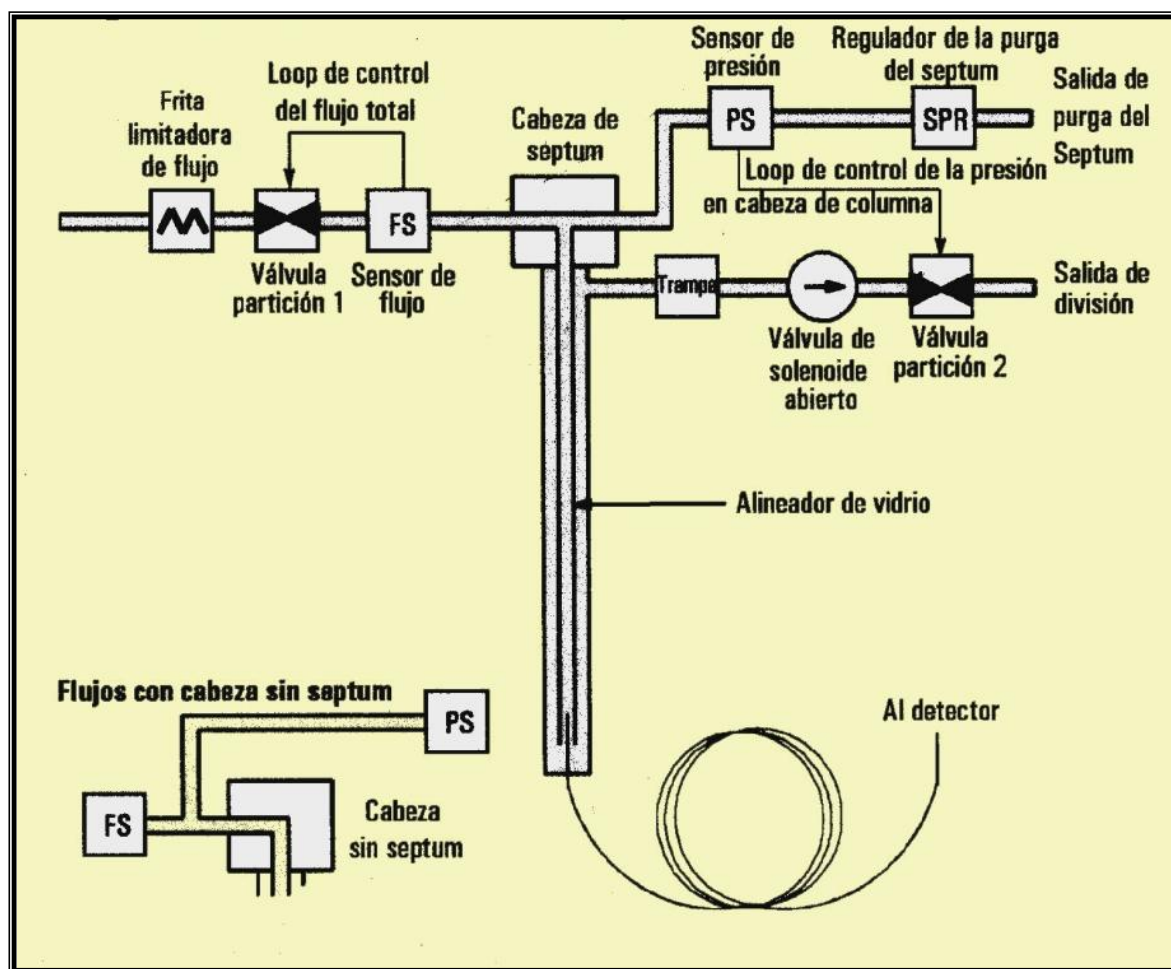


Figura 12. Etapa I, introducción de la muestra y eliminación del disolvente.

En la siguiente etapa, cuando finaliza la salida del disolvente, la válvula solenoide se cierra y el inyector se calienta hasta la temperatura final 1. La muestra se transfiere a la columna capilar. (Figura 13).

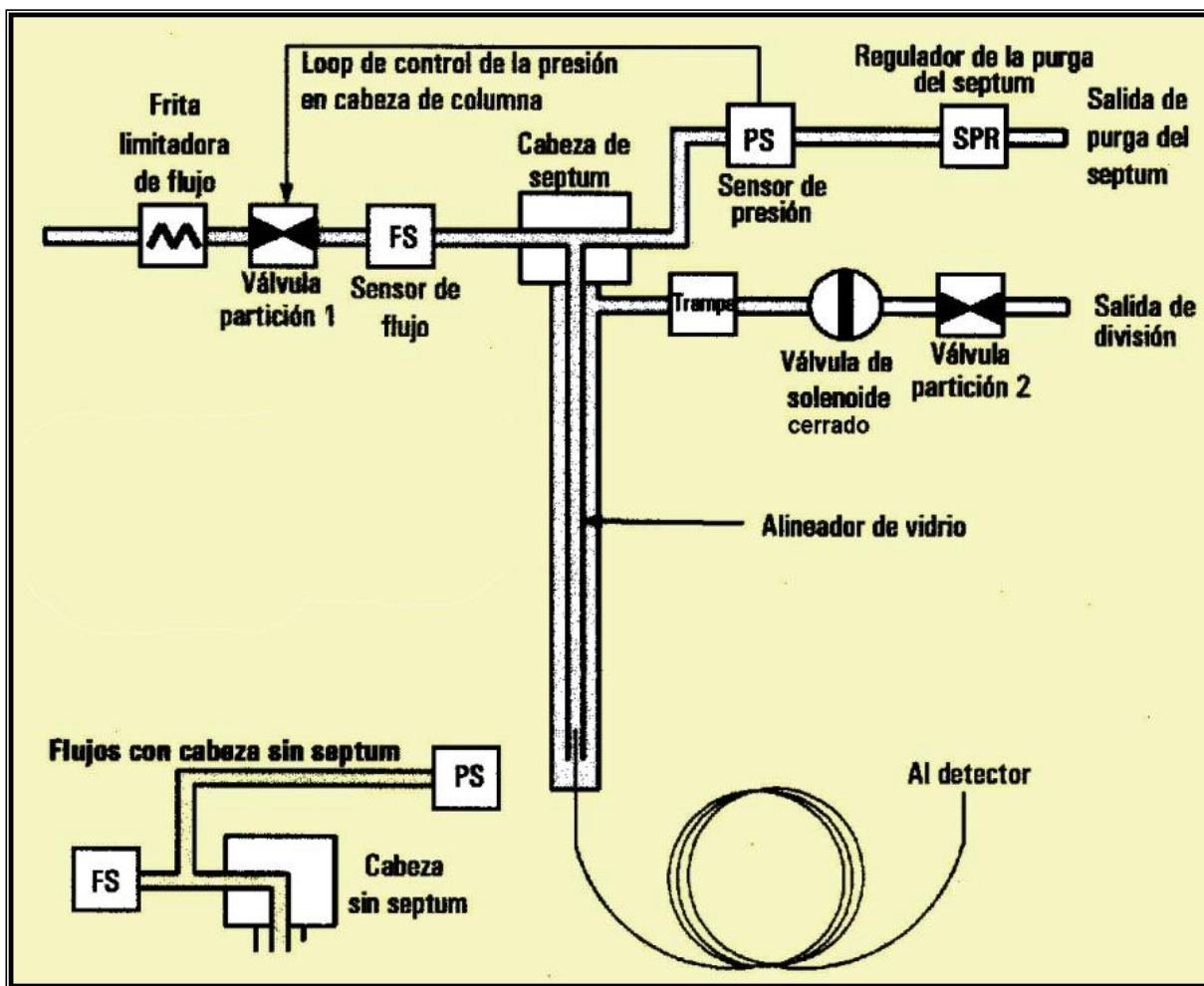


Figura 13. Etapa II, transferencia de la muestra.

Finalmente, La válvula solenoide se abre otra vez y el sistema vuelve a la configuración de la etapa I pero con valores diferentes. El PTV se limpia. Las rampas adicionales son necesarias para la limpieza térmica del inyector o para reducir la temperatura del inyector después de la transferencia de la muestra, permitiendo que se prolonguen las condiciones operativas del liner.

3.1.2.2. Consideraciones sobre la temperatura, presión y flujo.

El modo de venteo de disolvente pasa a través de tres estados distintos de la neumática: ventilación, transferencia de muestra y purga. La porción de salida permite el ajuste de la presión del inyector y el flujo de salida para optimizar la

eliminación del disolvente. El estado de transferencia simula la operación tradicional sin división (split) y lleva los analitos del liner a la columna. El modo de purga permite preparar el inyector para el próximo análisis.

Una dificultad fundamental con el modo de salida de disolvente es la posible pérdida de los analitos volátiles junto con el disolvente. Hay varias soluciones que permiten resolver esta problemática:

- Rellenar el liner del inyector con un material de mayor retención, como el Tenax. Esto mejora enormemente la recuperación de analitos volátiles pero puede impactar en la recuperación de materiales de mayor ebullición.
- Permitir que parte del disolvente se quede en el liner cuando comience la transferencia de la muestra. El disolvente residual actúa como fase estacionaria y retiene el material volátil pero a expensas de un pico de disolvente mayor.
- Reducir la temperatura del inyector, reduciendo así la presión de vapor de los analitos volátiles, permitiendo recuperaciones mayores.

La eliminación del disolvente se puede acelerar:

- Reduciendo la presión en el inyector durante la inyección de la muestra – parámetro *Vent pressure*.
- Aumentando el flujo a través del inyector –parámetro *Vent Flow*.
- Mientras todas estas posibilidades complican la utilización del PTV, proporcionan mayor flexibilidad para resolver problemas difíciles en diferentes tipos de muestras.

3.1.2.3. Secuencia de operaciones del PTV.

Es importante considerar que durante el proceso de inyección, el flujo a través de la columna es controlado por la presión del inyector. Durante la parte del análisis, se controla el valor del flujo o la presión o el programa introducido *para la columna*. La Tabla 6, resume los pasos de un análisis utilizando el modo de purga o eliminación de disolventes.

En la Tabla 7 se indican los valores aproximados para este mínimo a varios flujos de salida de helio. Presiones menores a las de la tabla no son posibles a menos que se reduzca el flujo.

Los tiempos de control deben estar en el orden mostrado: tiempo de finalización de la salida *antes* del tiempo de purga *antes* del tiempo de ahorro de gas. El tiempo de finalización de la salida debe transcurrir antes de que el inyector comience a calentarse y recuperar analitos. El tiempo de purga debe transcurrir antes de que el horno comience a calentarse y a mover la muestra a través de la columna.

En la figura 14, se muestran las relaciones de los tiempos que representan las diferentes etapas del proceso de inyección y las condiciones de operación del horno cromatográfico.

Cuando se realizan inyecciones múltiples por análisis utilizando un inyector automático, el inicio del análisis tiene lugar cuando el portador de la jeringa se mueve hacia abajo para realizar la primera inyección. No hay señales de inicio de corrida (*Start Run*) para el resto de las inyecciones.

Estas inyecciones adicionales tardan tiempo. Los programas de temperatura del horno e inyector, principalmente los valores *Init time*, se deben ajustar para permitir esto. Lo mismo ocurre con varios valores de tiempo que controla el funcionamiento del inyector. Los parámetros de control del inyector se describen en la tabla 8.

Tabla 6. Etapas en el proceso de inyección del PTV en el modo de purga o eliminación de disolventes.

Paso	Etapas	Parámetro	Valor
1	Antes de la inyección	Flujo en la salida de división Presión del inyector	Flujo de purga o flujo de ahorro Derivado del parámetro de la columna
	El sistema está en reposo, con flujo de purga (o flujo de ahorro, si está activado) a través del inyector.		
2	Al comienzo de la preparación del análisis	Flujo en la salida de división Presión del inyector	Valor del flujo de salida Valor de la presión de salida
	Los valores cambian para preparar la inyección. Cuando el CG está preparado, se inyecta la muestra. Comienza el programa de temperatura del horno y del inyector. Comienza la eliminación del disolvente y la captura de analitos.		
3	Cuando finaliza la eliminación	Flujo en la salida de división Presión del inyector	Ninguno, válvula solenoide cerrada Valor de la presión en columna
	Finaliza la eliminación de disolvente y comienza la transferencia de analitos mientras el inyector se calienta.		
4	En el momento de la purga	Flujo en la salida de división Presión del inyector	Valor del flujo de purga Valor de la presión en columna
	La transferencia de analitos finaliza y se purga el valor residual del inyector. Comienza el análisis.		
5	En el momento de ahorro	Flujo de salida de división Presión del inyector	Valor del flujo de ahorro Valor de la presión en columna
	El análisis finaliza, el flujo portador se reduce para ahorrar gas (si el ahorrador está activado).		

Tabla 7. Presiones mínimas factibles para el flujo de salida del Helio.

Flujo de salida (mL/min)	Presión de salida actual al valor "0" psig	Presión de salida actual al valor "0" kPa
50	0.7	5
100	1.3	10
200	2.6	18
500	6.4	44
1000	12.7	88

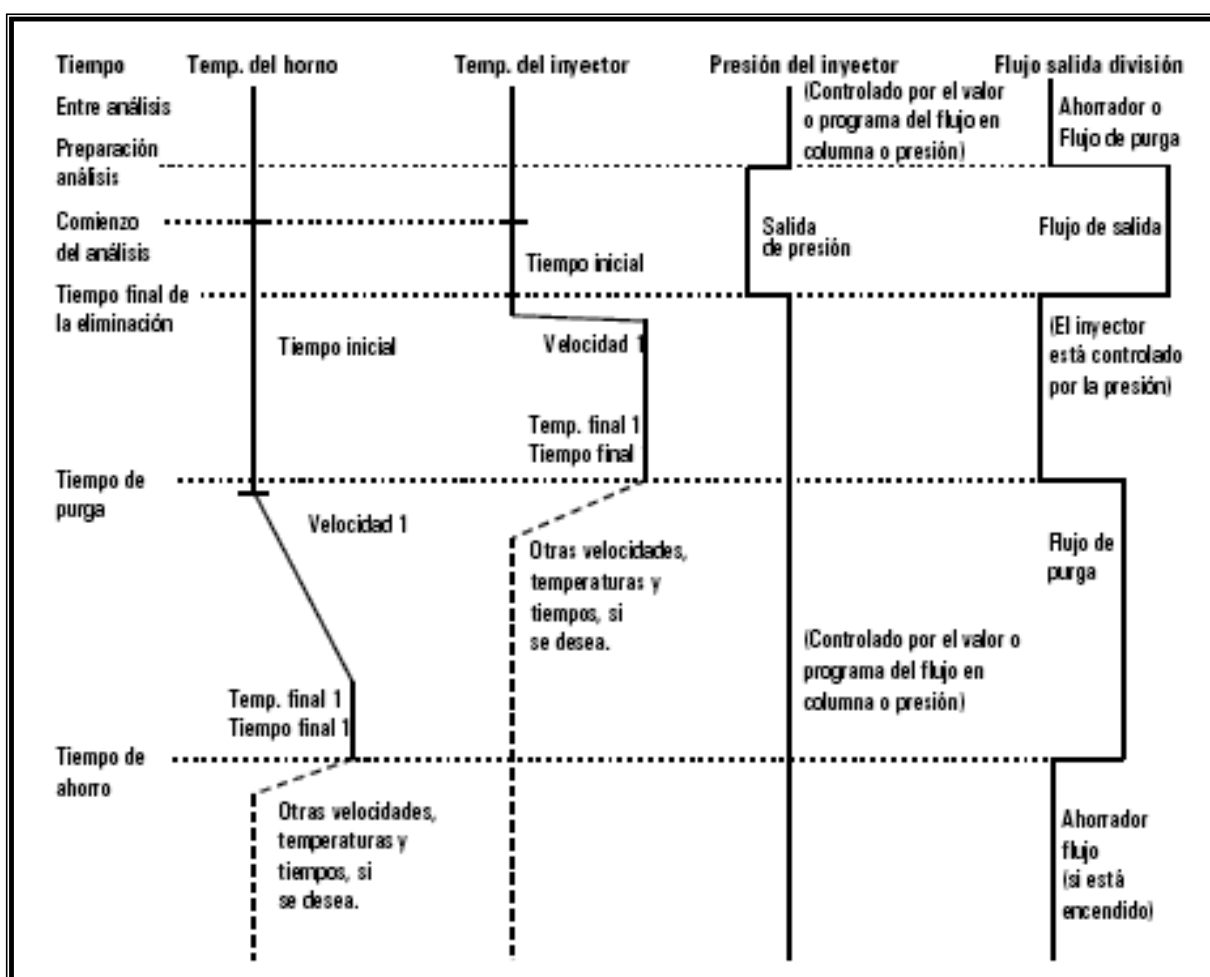


Figura 14. Relaciones de tiempo del proceso de análisis empleando el PTV en el modo de venteo de disolventes.

Tabla 8. Parámetros de la operación en el modo de venteo de disolventes.

Parámetro	Descripción
<i>Modo:</i>	Modo de operación actual - venteo de disolventes.
<i>Temp:</i>	Temperatura actual y seleccionada del inyector.
<i>Init time:</i>	Tiempo, medido desde el inicio del análisis, en que la temperatura inicial del inyector llega al final. Normalmente es mayor al <i>Vent end time</i> .
<i>Rate #:</i>	Velocidad del programa de temperatura para las rampas térmicas 1, 2 y 3 del inyector.
<i>Final temp #:</i>	Temperatura final del inyector para las rampas 1, 2 y 3.
<i>Final time #:</i>	Tiempo de espera a la temperatura final 1, 2 y 3. Es un tiempo transcurrido, no se mide desde el inicio del análisis.
<i>Pressure:</i>	Presión del inyector y valor establecido antes y después de la eliminación de disolvente. Fija el punto de inicio de la presión en la cabeza de la columna.
<i>Purge time:</i>	Tiempo, medido desde el inicio del análisis, cuando la transferencia de la muestra finaliza. Comienza en el <i>Vent end time</i> .
<i>Purge Flow:</i>	El flujo de gas portador en el inyector comienza en <i>Purge time</i> .
<i>Total Flow:</i>	El flujo total muestra el flujo en el inyector.
<i>Vent pressure:</i>	La presión del inyector durante el periodo de salida. Disminuyendo la presión del inyector, la eliminación del disolvente es más rápida. También, disminuye la cantidad de gas portador –y vapor del disolvente- que se introduce en la columna durante este tiempo. Normalmente se selecciona de 0 a 100 psig. Si se elige 0, el inyector utiliza la presión más baja posible al flujo de salida dado.
<i>Vent Flow:</i>	Flujo de gas portador que sale por modo con división durante el periodo de salida. Flujos mayores barren el liner más rápidamente y reducen el tiempo de eliminación del disolvente. Para la mayoría de las columnas, un flujo de purga de 100 mL/min elimina el disolvente a velocidad aceptable pero inserta un mínimo material en la columna.
<i>Vent end time:</i>	Tiempo, medido desde el inicio del análisis, cuando la salida del disolvente finaliza. Para inyecciones de volumen grande, este tiempo es normalmente superior al tiempo para que se complete la inyección.

3.1.2.4. Inyección de grandes volúmenes.

La mayoría de los inyectores de vaporización están diseñados para inyecciones líquidas en un rango de 1 a 5 μL . Con inyecciones mayores, la nube de vapor creada cuando la muestra se vaporiza puede saturar el inyector y los componentes no pueden separarse cromatográficamente de manera adecuada. Para el PTV, las capacidades líquidas nominales del liner se indican en la tabla 9.

Tabla 9. Capacidades del liner para la inyección de grandes volúmenes.

Liner	Capacidad líquida nominal	Inercia
Pantalla abierta	5 μL	Alta
Lana de vidrio empaquetada	25 μL	Baja, debido al área de superficie grande

En el modo de venteo de solventes, los analitos están térmicamente atrapados en el liner mientras que el disolvente se elimina. Cuando éste se haya eliminado, el liner se puede utilizar para otra inyección. La inyección se puede repetir varias veces para concentrar los analitos. Después de la inyección y la eliminación del disolvente, los analitos se transfieren a la columna. Esto puede sustituir la necesidad de concentración fuera de línea y minimizar la pérdida de muestra.

Se pueden realizar inyecciones múltiples de un muestreador automático en el PTV para alcanzar grandes volúmenes.

El software calcula y muestra:

En la pantalla del inyector: total Producto *X* (volumen por inyección) e *Y* (inyecciones por análisis).

En la pantalla del inyector: tiempo total estimado, en minutos, (*estimated total injection time*) para realizar inyecciones múltiples basadas en los parámetros introducidos y en el tiempo del ciclo mecánico del inyector. Incluye los tiempos de espera previos y posteriores al análisis y los retrasos de viscosidad (*Delay between injections*), como explican las Tablas 10 y 11.

Tabla 10. Parámetros de control. Inyector de grandes volúmenes.

Parámetro	Rango	Valor preconfigurado
Inyectar $X \mu\text{L}$ Y veces	X : 0,1 a 0,5 x volumen de la jeringa Y : 1 a 100	X : 0,1 x volumen de la jeringa Y : 1
Retraso entre inyecciones (<i>delay time</i>)	0 a 100 segundos	0
Lavados pre-inyección	0 a 15	0
Lavados post-inyección	0 a 15	0
Bombeos	0 a 15	0

Tabla 11. Descripción de los parámetros de operación del inyector de grandes volúmenes.

Parámetro	Descripción
<i>Inject $X \mu\text{L}$ Y times</i>	X es la cantidad a inyectar; Y el numero de inyecciones a realizar.
<i>Delay:</i>	Tiempo de pausa, en segundos entre inyecciones. Esto se añade al mínimo tiempo de ciclo del hardware.
<i>Preinjection washes:</i>	Número de veces que la jeringa se lava con disolvente y/o muestra antes de la primera inyección. No se realizan lavados antes del resto de inyecciones en una inyección múltiple.
<i>Postinjection washes:</i>	Número de veces que la jeringa se lava con disolvente después de la última inyección. No se realizan lavados después del resto de las inyecciones en una inyección múltiple.
<i>Preinjection pumps.</i>	Número de veces que se bombea el émbolo de la jeringa antes de tomar la muestra medida. El bombeo se realiza sólo después de la primera inyección en una inyección múltiple.

3.1.3. ESPECTRÓMETRO DE MASAS CUADRUPOLO (EM).

La espectrometría de masas está basada en el comportamiento que presentan los iones que se forman por los diferentes modos de ionización, estos después viajan a través de campos eléctricos y magnéticos, así dichos iones son separados en función de su relación m/z y detectado posteriormente.

El espectrómetro de masas cuadrupolo fue desarrollado originalmente como un separador para isótopos de uranio. Su uso como sistema de enriquecimiento comercial no fue una propuesta viable, pero se ha reconocido que ciertos factores hacen a este sistema el apropiado para trabajo GC/MS. Mecánicamente, el cuadrupolo es un dispositivo extremadamente simple, pero un completo entendimiento de la teoría cuadrupolar puede obtenerse solamente mediante un detallado y complejo estudio matemático. Realizando algunas pocas aproximaciones y suposiciones es posible explicar los principios de operación e identificar los parámetros críticos de los instrumentos.

El cuadrupolo consiste en cuatro varillas ordenadas como se muestra en la Figura 15. Los pares de varillas opuestos están eléctricamente conectados. A las varillas del eje x se le aplica un voltaje *positivo* consistente de los términos *dc* y *rf*.

$$V_x = +(V_{dc} + V_{rf} \cos \omega t) \quad (1)$$

Donde:

V_x = Voltaje en el eje x .

V_{dc} = Voltaje de la corriente continua.

V_{rf} = Voltaje de radiofrecuencia.

ωt = frecuencia t .

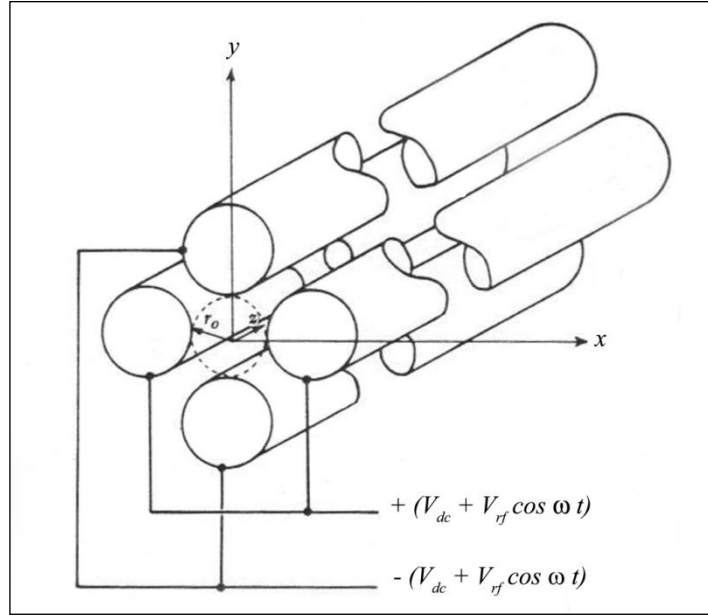


Figura 15. Filtro de masas cuadrupolo.

Hay que mencionar que el valor del pico del voltaje rf es mayor que el voltaje dc , de tal forma que durante la parte del ciclo rf , el valor V_x será negativo. No obstante, desde que la expresión para V_x se conduce con una señal positiva, las varillas del eje x son mencionadas a menudo como el *par de varillas positivo*. Un voltaje similar es administrado a las barras del eje y .

$$V_y = -(V_{dc} + V_{rf} \cos \omega t) \quad (2)$$

Donde:

V_y = Voltaje en el eje y .

V_{dc} = Voltaje de la corriente continua.

V_{rf} = Voltaje de radiofrecuencia.

ωt = frecuencia t .

El par de varillas del eje y son conocidos en ocasiones como el *par de varillas negativo*, aunque el voltaje V_y será positivo durante parte del ciclo rf .

El examen de los voltajes V_x y V_y muestra que los pares de barras son excitados con voltajes iguales pero con polaridad opuesta. Dejando aparte los términos de rf y dc , se podrían considerar los voltajes dc como iguales y opuestos en polaridad y los voltajes rf como 180° fuera de la fase. Los valores máximos típicos para los voltajes son V_{dc} , 500 V y V_{rf} , 6 kV pico a pico. La frecuencia rf se mantiene constante y tiene un valor típico en el rango de los 500 kHz a 3 MHz dependiendo del diseño. Se pueden considerar a los pares de varillas de forma independiente, esto es, asumiendo que el movimiento de los iones en la dirección x es independiente del movimiento y posición en la dirección y y viceversa.

Considerar ahora al par de varillas en el plan xz . No hay una selección de masas cuando solamente se aplica el voltaje dc (Figura 16a). Los iones positivos experimentarán una fuerza que los aleja de las varillas hacia la línea central del ensamble. La transmisión de estos iones a través de la entrada del cuadrupolo y las aperturas de salida para un voltaje dc dado estarán en dependencia de las condiciones de entrada iniciales así como de las masas. Aplicando tanto los voltajes dc como rf (Figura 16b) ocasionan que los iones sigan trayectorias oscilatorias complejas. Algunos iones pasarán a través de la apertura de salida. Para otros las oscilaciones se mantendrán hasta que los iones golpeen la superficie de la varilla y pierdan su carga. La teoría matemática predice un rango de parámetros representados por los coeficientes a y q , donde

$$a = \frac{8e / mV_{dc}}{r_0^2 \omega t} \quad (3)$$

y

$$q = \frac{4e / mV_{rf}}{r_0^2 \omega^2} \quad (4)$$

lo cual permite la transmisión.

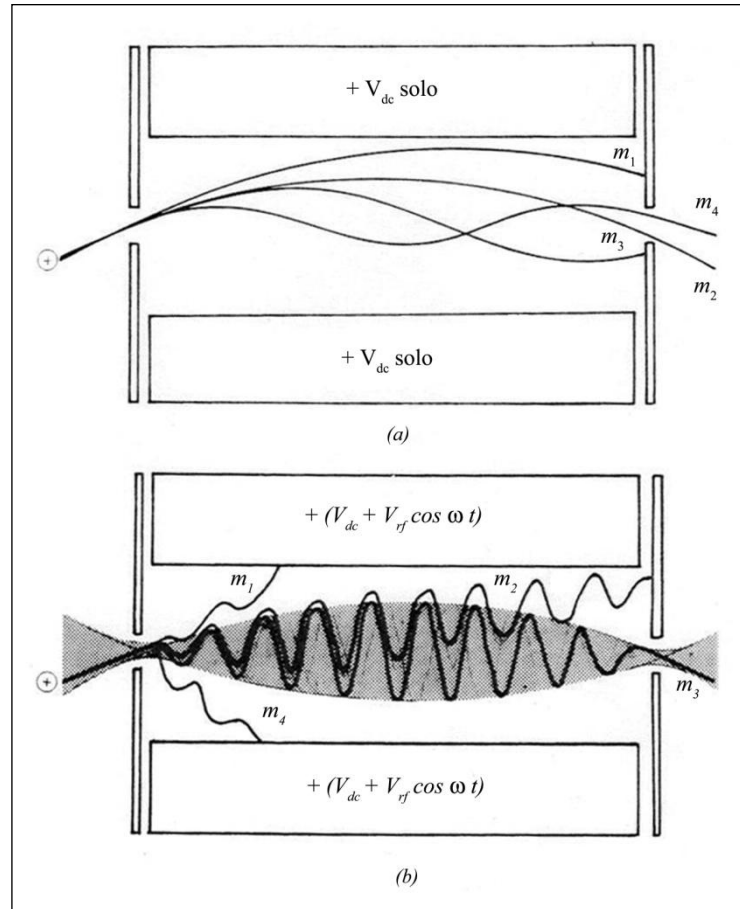


Figura 16. Características del par de varillas del eje x de un cuadrupolo. 16(a) Trayectorias de los iones con no voltaje rf . 16(b) Trayectorias de los iones con voltajes dc y rf .

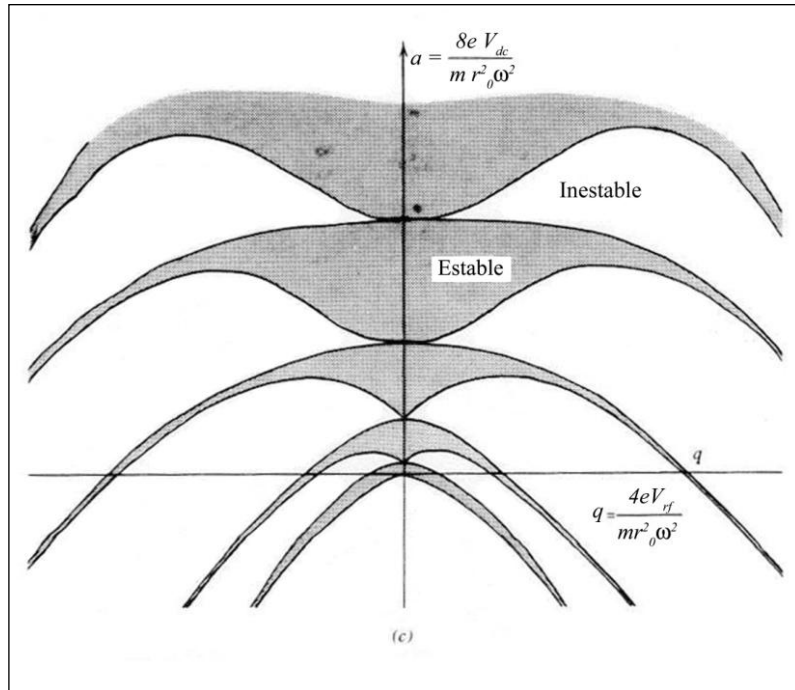


Figura 16(c) Áreas estables para los parámetros a y q .

Los valores aceptables para a y q se muestran en el diagrama de estabilidad de la Figura 16c. La investigación matemática de las trayectorias muestra que existe un cierto grado de selección de masas. Bajo circunstancias normales de operación del espectrómetro de masas, la fuente iónica presentará un gran número de iones de la misma masa con un rango de condiciones de entrada diferentes. No todos los iones serán aptos para pasar a través del espacio de la varilla, aún cuando pudiera tenerse la masa óptima para transmisión. De aquí, el desempeño del *par de varillas positivo* puede ser representado por un diagrama de atenuación (Figura 17). La masa óptima de máxima transmisión ocurre al punto de mínima atenuación. La atenuación asciende excesivamente para masas por arriba del óptimo que para masas por debajo del óptimo. El plano xz del par de varillas positivo puede por lo antes explicado, compararse a un filtro de paso de masas bajas.

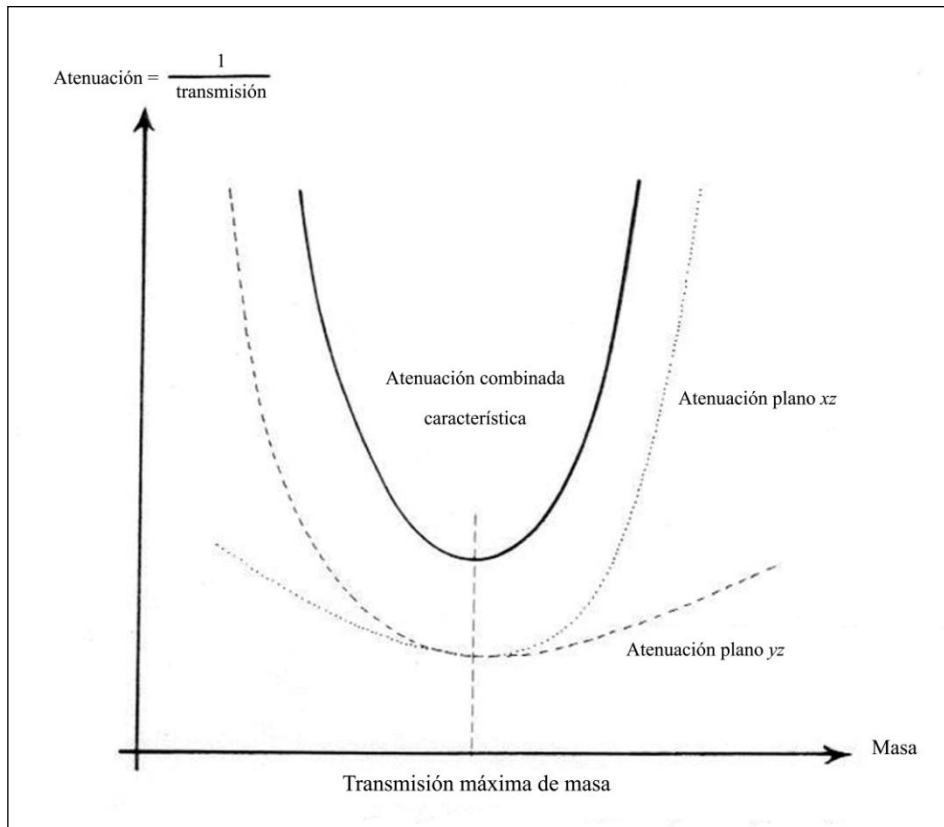


Figura 17. Características de transmisión para el filtro de masas de un cuadrupolo.

En términos de la selección de masas, el *par de varillas negativo* también puede ser representado por un diagrama de atenuación. La figura 17 muestra que ahí existe una masa óptima de máxima transmisión, con un ascenso en la atenuación más marcado para los iones de masas más bajas que para las masas altas. El plano *yz* del *par de varillas negativo* puede por lo tanto ser considerado como un filtro de paso de masas altas.

El plano *yz* del *par de varillas negativo* puede ser tratado de una manera similar. Con solamente el voltaje de la varilla *dc* negativa aplicada (Figura 18a), los iones positivos pueden ser fuertemente atraídos a la varilla más cercana tan pronto como se mueven fuera de la línea central del cuadrupolo.

Aquí no hay selección de masas. Aplicando un valor de voltaje de *rf* cuya amplitud es mayor que el voltaje de *dc* ocasionará que el voltaje de la varilla neto será positivo durante parte del ciclo *rf*. Esto tiene un efecto estabilizante para algunos

iones. Las trayectorias serán complejas (Figura 18b), pero algunos iones experimentarán oscilaciones de limitada o con saltos amplitud y pasarán a través de la apertura de salida. Las referencias a las matemáticas nuevamente proporciona un diagrama (Figura 18c) representando rangos aceptables de los coeficientes a y q para el par de varillas yz que generarán trayectorias estables.

En la práctica, todas las varillas del cuadrupolo se excitan simultáneamente. Un ion que se introduce al espacio entre las varillas se somete a las características de transmisión de ambos pares de varillas, positiva y negativa, al mismo tiempo. Esto puede ser representado sumando las curvas de atenuación para dar una curva combinada, la cual también se muestra en la Figura 17. En ella se indica que existe una masa de mínima atenuación. Los iones de esta masa mostrarán el máximo de transmisión, pero conviene mencionar que no todos los iones tendrán las condiciones correctas de entrada para franquear exitosamente los campos rf y dc . La atenuación a este punto óptimo representa la proporción de iones (asumiendo un número estadísticamente grande de iones entrando al cuadrupolo) que son rechazados y que no son referidos al tiempo de tránsito de aquellos seleccionados. El cuadrupolo no produce fuerzas en la dirección z , y una vez que los iones entran al espacio del cuadrupolo su componente z de movimiento permanecerá inalterado. De aquí que el cuadrupolo puede ser considerado como equivalente a un filtro de masas de banda de paso estrecha, las masas seleccionada es dependiente de los parámetros del instrumento.

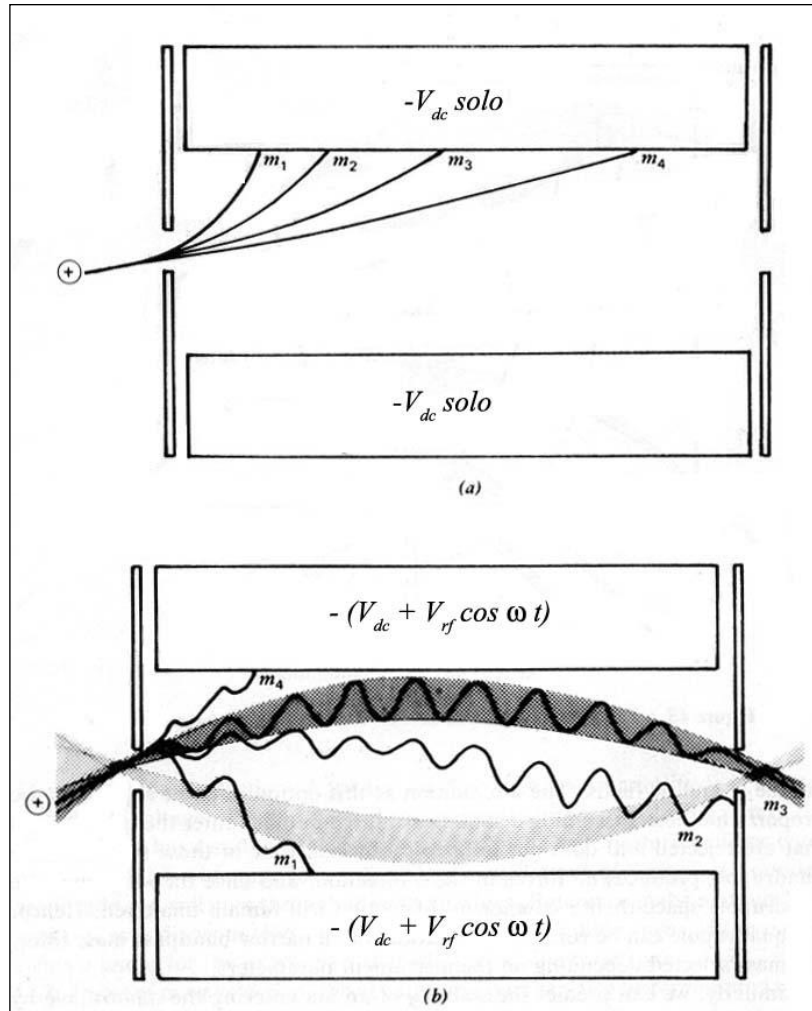


Figura 18. Características del par de varillas del eje y de un cuadrupolo. 18(a) Trayectorias de los iones con no voltaje rf . 18(b) Trayectorias de los iones con voltajes dc y rf .

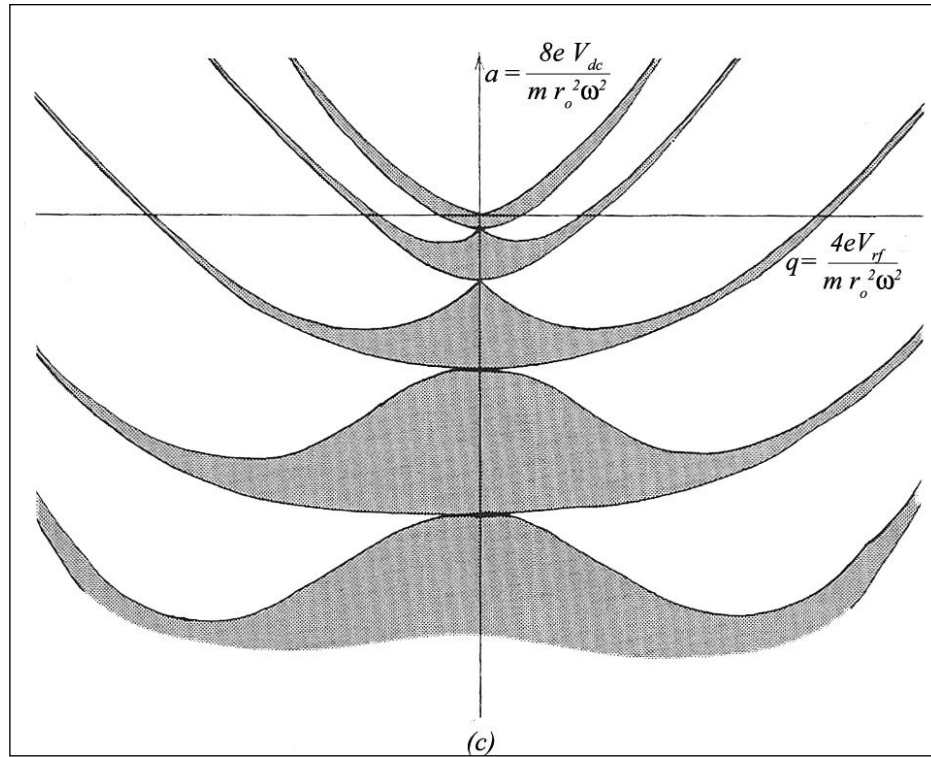


Figura 18(c). Valores estables para los parámetros a y q .

De forma similar, se puede predecir la estabilidad de un ion cuando entra al cuadrupolo por la combinación de los diagramas de estabilidad xz y yz . Esta combinación dará un número infinito de áreas de estabilidad total (Figura 19). Estas áreas se comportan matemáticamente con un patrón de campo hiperbólico, pero la mayoría de ellas no toman en cuenta los límites físicos impuestos por las propias varillas. Las trayectorias de los iones para algunas de estas regiones pudieran presentar oscilaciones con amplitudes mayores que la de la dimensión interna del cuadrupolo (r_o), la distancia desde el eje hasta la superficie de la varilla. Estos iones, junto con aquellos que tienen trayectorias inestables, golpearán las varillas y perderán su carga.

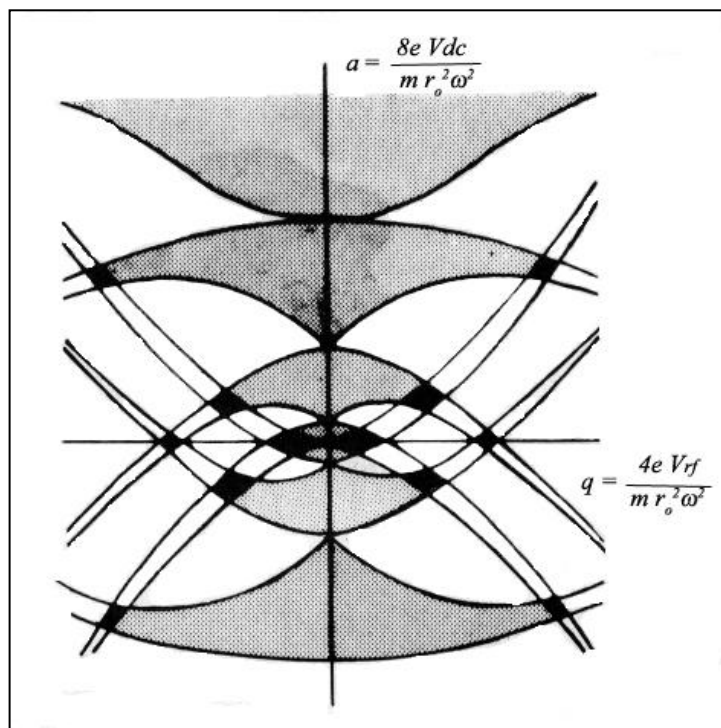


Figura 19. Áreas para los parámetros a y q que dan la estabilidad matemática tridimensional de los iones moviéndose en el cuadrupolo.

Las áreas válidas de estabilidad están limitadas a las cuatro áreas aproximadamente triangulares arregladas simétricamente desde el origen hasta el eje aq . La consideración de los coeficientes a y q muestran que estas cuatro áreas estables son manifestaciones matemáticas de la misma cosa. Es posible, por tanto, mover desde una zona a otra redefiniendo el eje del cuadrupolo o intercambiando las conexiones eléctricas de la varilla dc o incluso cambiando la fase rf . Se necesita considerar una zona para un completo entendimiento del significado de los coeficientes a y q . La figura 20 muestra una de estas regiones con detalle y es el diagrama que se emplea de más a menudo para explicar los principios de operaciones del espectrómetro de masas cuadrupolo bajo condiciones dinámicas.⁵²

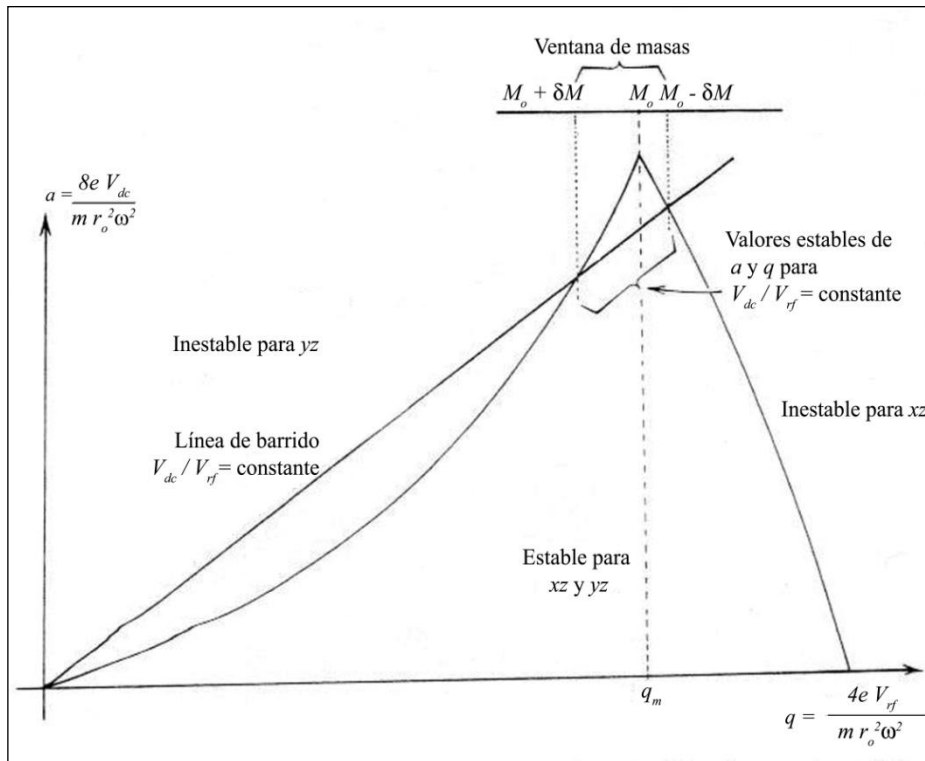


Figura 20. Diagrama práctico de estabilidad para un filtro de masas cuadrupolo.

3.2. MÉTODO DE DERIVATIZACIÓN.

3.2.1. GENERALIDADES DE LAS REACCIONES DE SILANIZACIÓN.

En la química analítica, la silanización ha sido usada desde 1950 en la cromatografía de gases y espectrometría de masas, para la formación de derivados de una gran variedad de productos y grupos funcionales. La silanización de un compuesto polar resulta en productos de polaridad reducida, aumentando la volatilidad y la estabilidad térmica, permitiendo el análisis por GC/MS de muchos compuestos que de otra forma serían poco volátiles e inestables para estas técnicas. El grupo trimetilsilil es el grupo más popular y versátil de los grupos silil para estos propósitos, y se han desarrollado una variedad de agentes trimetilsilanizantes con diferentes propiedades (concernientes a volatilidad, reactividad, selectividad, entre otros). El uso en la cromatografía de gases ha permitido obtener mejores separaciones y la aplicación de técnicas especiales de detección. En espectrometría de masas a menudo se producen más fragmentos característicos con mayor abundancia de iones.⁵³

3.2.2. MECANISMO GENERAL.

Los derivados silil se forman por el desplazamiento del protón activo en los grupos $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $=\text{NH}$, $-\text{NH}_2$, y $-\text{SH}$. La reacción general para la formación de los derivados trialquilsilil se muestra en la Figura 21.

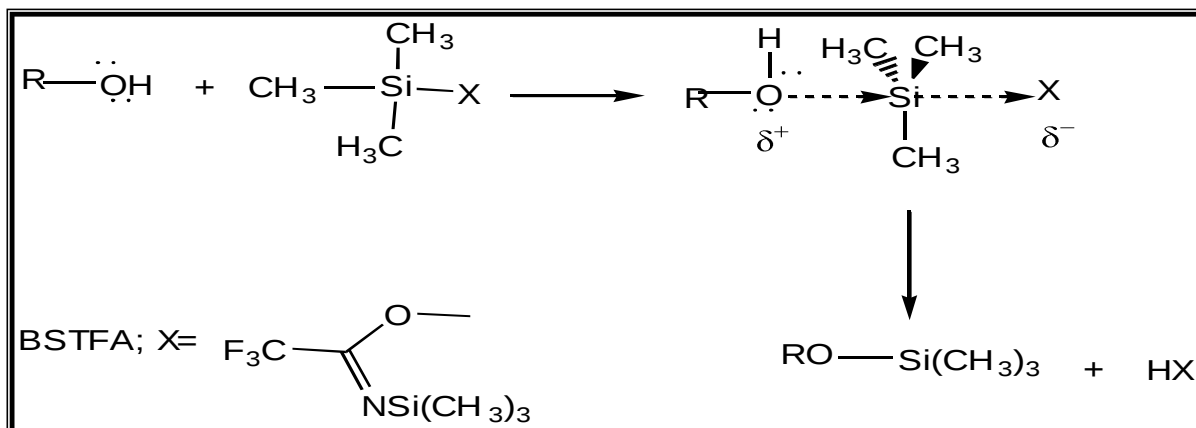


Figura 21. Reacción general para la formación de los derivados trialquilsilil.

La reacción se observa como un ataque nucleofílico sobre el átomo de silicio del grupo silil donante, produciendo un estado de transición bimolecular. El compuesto silil libera al grupo (X), el cual posee menor basicidad, la habilidad para estabilizar una carga negativa en el estado de transición y una pequeña o nula tendencia para formar un enlace $\pi(p-d)$ por la cara del grupo saliente entre el grupo y el átomo de silicio.

El grupo saliente (X) ideal de los compuestos silil debe tener una estructura que le permite ser transferido completamente en el estado de transición durante la reacción, pero a la vez poseer suficiente estabilidad química en combinación con el grupo alquilsilil para permitir el almacenamiento del agente derivatizante por tiempo prolongado.

Debido a que el estado de transición es reversible, la derivatización se llevará a cabo solamente si la basicidad del grupo saliente (X) excede del de Y.

El orden de derivatización para varios grupos funcionales para un agente derivatizante dado sigue el siguiente orden: alcohol > fenol > ácido carboxílico > amina > amida. Dentro de esta secuencia de reactividad, un reactivo de silanización particular puede influenciar también por el impedimento estérico, de aquí el orden de reactividad para los alcoholes sigue el orden: primario > secundario > terciario, y para las aminas: primario > secundario.⁵⁴

3.2.3. REACTIVOS DERIVATIZANTES PROPUESTOS.

3.2.3.1. BSTFA (N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida).

Es el derivatizante más empleado para la trimetilsililación de alcoholes, alcaloides, aminas y aminas biogénicas, ácidos carboxílicos, fenoles y esteroides.

Reacciona con un rango amplio de compuestos orgánicos polares, reemplazando los hidrógenos activos con un grupo trimetilsilil $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$. Los derivados trimetilsilil (TMS) son térmicamente estables pero mucho más susceptibles a la hidrólisis que los compuestos originales. El BSTFA y sus derivados (trimetilsililtrifluoroacetamida y trifluoroacetamida) son más volátiles que cualquier otro reactivo de silanización, por lo que las interferencias cromatográficas son menores.

Es muy soluble en la mayoría de los solventes empleados comúnmente para la silanización. Tiene buenas propiedades como solvente y puede funcionar como reactivo de silanización sin solventes adicionales. Reacciona de forma más rápida y completa que el BSA.

Para compuestos con impedimento moderado o compuestos de reactividad lenta, utilizar BSTFA con 1% o 10% de catalizador TMCS. El BSTFA puede ser mezclado con otros catalizadores (ácido trifluoroacético, ácido clorhídrico, acetato de potasio, piperidina, cloruro de o-metilhidroxilamina, piridina).⁵⁴

3.2.3.2. TMSI o TMSIM (N-trimetilsililimidazol).

Es el reactivo derivatizante más fuerte para grupos hidroxilos. Reacciona rápida y suavemente con grupos hidroxilos y ácidos carboxílicos impedidos y no impedidos. El TMSI es muy útil para la derivatización de muestras de azúcares húmedas, grupos hidroxilo impedidos en esteroides, y en combinación con agentes de acilación fluorados, aminoácidos. El TMSI normalmente se emplea sin catalizador. En algunos casos, sin embargo, la velocidad de silanización puede incrementarse adicionando un catalizador como el TMCS (para esteroides), cloruro de piridina (fenoles), o-metilhidroxilamina (compuestos con grupos hidroxilo estéricamente impedidos), piperidina (prostaglandina E metil ésteres), o acetato de potasio (ecdisterona).

Usado en la derivatización de alcoholes, hormonas, ácidos grasos y otros ácidos orgánicos, fenoles, prostaglandinas, esteroides, ácidos sulfónicos y tioles. Muy utilizado en esquemas de multiderivatización conteniendo grupos hidroxilo y amino. No reacciona con aminas alifáticas. Aminas menos básicas y amidas podrían reaccionar con TMSI. Derivatiza azúcares en presencia de pequeñas cantidades de agua. Los derivados TMS son térmicamente estables pero más susceptibles de hidrólisis que los compuestos padre u originales.

El procedimiento normal de silanización trabaja en piridina, en ocasiones en acetonitrilo, acetato de etilo y otros solventes, incluso sin solventes. La derivatización “on column” y la silanización en fase de vapor pueden llevarse a cabo utilizando este reactivo.

Los tiempos de derivatización son variables, dependiendo específicamente del compuesto o compuestos que se derivatizan. Muchos compuestos son completamente derivatizados tan pronto como estos se disuelven en el reactivo.

Si la derivatización no es completa, la adición de un catalizador, el uso de un solvente más apropiado, elevar la temperatura, tiempos prolongados y/o mayor concentración deben ser evaluados.

Los derivados TMS y los agentes silanizantes reaccionan con y son muy sensibles a los átomos de hidrógeno activos. Se recomienda utilizar fases estacionarias con siliconas, son muy útiles ya que proporcionan un estado inerte y estabilidad con excelentes características de separación para estos derivados. Fases de silicona no polar incluyen las columnas SPB-1 y SPB-5.⁵⁵

3.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

Para el cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio (BPL), es imprescindible realizar la validación de los métodos analíticos desarrollados, para cumplir con las regulaciones de los organismos nacionales e internacionales de acreditación; en México, esta actividad la realiza la entidad mexicana de acreditación, a. c. (ema).

A partir del criterio de que no existe un modelo único para validar y que los parámetros a evaluar cambian de acuerdo con los requisitos de cada laboratorio, el presente trabajo de tesis plantea una propuesta general de protocolo de validación para el método analítico, con la intención de cumplir con las normas oficiales mexicanas publicadas por SENASICA-SAGARPA, para el control de residuos anabólicos en las carnes de importación y exportación.

La validación puede realizarse a través de un estudio interlaboratorios, como se establecen en el Codex Alimentarius,⁵⁶ ISO 17145⁵⁷ o la IUPAC.⁵⁸ Se pueden elegir métodos alternativos como estudios en un solo laboratorio, o la validación interna. Esta parte se centra en los estudios en un solo laboratorio a través de un enfoque modular, que consiste en:

- 1) Un conjunto de características comunes de funcionamiento, independiente del modelo de validación empleado,
- 2) Procedimientos más específicos que dependen del modelo, tal como se presenta en este trabajo.

3.3.1 CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO DEL MODELO DE VALIDACIÓN ELEGIDO.

Al margen del enfoque de validación que se adopte, deben determinarse características de funcionamiento que aseguren la confiabilidad del método. Para minimizar los costos asociados al número y al tiempo para la realización de los experimentos, puede emplearse un planteamiento cuidadosamente diseñado y estadísticamente sólido para combinar los experimentos realizados con los propósitos del estudio.

En el marco de la evaluación de la conformidad, se entiende que el resultado de estos ensayos deben ser una declaración de conformidad o no conformidad con el requisito establecido por la Norma Oficial Mexicana para la Determinación de dietilestilbestrol, zeranol y taleranol en hígado y músculo de bovinos, equinos, porcinos, ovinos aves, caprinos, y cérvidos por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas.⁹ Estos resultados pueden estar dados por la medición de cada uno de los residuos anabólicos en tejido animal; teniendo presente la trazabilidad e incertidumbre del proceso analítico.

Para iniciar el proceso de validación, la calibración del Espectrómetro de Masas se realiza con el patrón de calibración PFTBA (Perflourotributilamina) usado como material de referencia certificado de calibración para todos los analizadores en los sistemas GC/MS en las autoafinaciones con los iones de referencia 31, 50, 69, 100, 131, 219, 264, 414, 464, 502, 576 y 604 u.m.a. La calibración constituye un elemento fundamental de la trazabilidad de las mediciones de anabólicos en tejido animal, que inicia en los patrones internacionales de medida para llegar a múltiples usuarios. En las actividades de la evaluación de la conformidad, el Centro Nacional de Metrología, los Laboratorios Primarios y los Laboratorios acreditados de calibración tienen la responsabilidad de extender la trazabilidad de las mediciones a los usuarios de la red de laboratorios autorizados por SENASICA-SAGARPA.

El objetivo de la evaluación de la validación del método en este trabajo es que pueda desempeñarse a un mismo nivel de rigor técnico, como el exigido a los laboratorios acreditados por la entidad mexicana de acreditación, a. c., considerando la documentación que permite homologar los resultados con los laboratorios de la red acreditados por ema y aprobados por CENAPA-SENASICA-SAGARPA.

La validación es un proceso que consiste en 4 etapas fundamentales:

- Validación de los programas analíticos.
- Validación de hardware de los instrumentos (fabricantes).
- Validación del método.
- Adecuación de los instrumentos de medición y equipos de apoyo.

Antes de comenzar la validación de los métodos analíticos es requisito asegurar:

1. La correcta instalación de los instrumentos.
2. Una operación correcta dentro de sus especificaciones.
3. La optimización de los parámetros de operación.

Un método es adecuado para la aplicación que se pretende, cuando se demuestra que es preciso mediante estudios de laboratorio sus características de funcionamiento realizando estudios estadísticos de los parámetros, que pueden incluir: Exactitud (sesgo), precisión (repetibilidad, reproducibilidad), selectividad/especificidad, intervalo de trabajo/rango, linealidad/función de respuesta, límite de detección, límite de cuantificación, límite de determinación, incertidumbre, robustez, y otros que sean necesarios para aplicaciones específicas.

La Tabla 12 muestra los parámetros de validación analítica para los ensayos que involucran mediciones analíticas que la ema exige para otorgar la acreditación de métodos de prueba en laboratorios de ensayo.⁵⁹

Tabla 12. Parámetros para la validación de un método que involucra mediciones analíticas, de acuerdo a los requisitos de la NMX-EC-17025-IMNC-2006/ ISO/IEC 17025:2006.

Ensayos que involucran mediciones analíticas	
1. Recuperación	7. Sesgo o error
2. Límite de detección	8. Incertidumbre
3. Límite de cuantificación	9. Sensibilidad
4. Intervalo lineal y de trabajo	10. Selectividad
5. Reproducibilidad	11. Robustez
6. Repetibilidad	

3.3.2. PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

A continuación, se presenta el protocolo de validación del desarrollo analítico para la determinación de residuos anabólicos por el sistema CG/PTV/EM. El alcance de este estudio es asegurar la confiabilidad analítica de los anabólicos Dietilestilbestrol (DES), Zeranol (ZER) y Taleranol (TAL), por ser los componentes de carácter normativo que analiza la NOM-034-ZOO-1996. Las etapas de evaluación de recuperación e intervalo de trabajo, se excluirán del protocolo porque implica el estudio del comportamiento del sistema analítico con muestras fortificadas, y que están excluidas de los objetivos de este trabajo de tesis.

De acuerdo con la NOM-034-ZOO-1996, se prepara una curva de calibración de tres puntos de concentración, teniendo para DES 0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 ng/mL; para ZER 0.0, 1.0, 2.0 y 4.00 ng/mL y para TAL 0.0, 2.0, 4.0 y 8.0 ng/mL. En la prueba homóloga de USDA-FSIS para la determinación y confirmación de dietilestilbestrol y zeranol por GC/MS⁶⁰, se monitorean a los mismos niveles, por lo cual, deben considerarse estas concentraciones, para la evaluación del método a desarrollar.

La evaluación de los parámetros estadísticos del método para asegurar su confiabilidad analítica, se realizarán en las etapas descritas en la Tabla 13.

Tabla 13. Protocolo de validación del método analítico para la determinación de DES, ZER, TAL por el sistema CG/PTV/EM.

Etapas	Parámetros a evaluar
Adecuabilidad del sistema	• Coeficiente de variación, $CV\%$
Linealidad del sistema	• Sensibilidad de calibración (pendiente), b. • Estimador de interferencia (intercepto), a • Ecuación de la recta $y = bx + a$ • Coeficiente de correlación, r. • Coeficiente de determinación, r^2. • Intervalo de confianza de la pendiente, IC_b. • Intervalo de confianza del intercepto, IC_a.
Precisión y exactitud del sistema (Cálculo del Factor de respuesta)	• Factor de respuesta promedio de la curva, $\overline{FR}$. • Desviación estándar ponderada, $S_{ponderada}$. • Coeficiente de variación de la señal de la curva, $CV\%$.
Repetibilidad del sistema (por punto de calibración calculado por Factor de respuesta)	• Media aritmética de la señal, $\bar{x}$. • Desviación estándar ponderada de la señal, $S_{ponderada}$. • Coeficiente de variación de la señal, $CV\%$.
Límite de detección y cuantificación del sistema (Límite de identificación y Límite de determinación)	• Desviación estándar residual. S_y. • Altura crítica, y_{crit}. • Límite de detección, DTC. • Límite de identificación, ID. • Límite de determinación, DTM.

3.3.2.1. Adecuabilidad del sistema.

1. Realizar 6 mediciones en modo SIM de una mezcla de estándares de los analitos: DES, ZER, TAL a una concentración de 1 ng/mL, correspondiendo a la escala media dentro del rango de trabajo de todos los compuestos.
2. Calcular, para las respuestas: tiempo de retención, ancho de pico, área y altura:
Señal promedio, $\bar{y}$.
Desviación estándar de las señales, s .
Coeficiente de variación de las señales, $CV\%$.
Utilizando las siguientes expresiones matemáticas (Tabla 14).

Tabla 14. Expresiones matemáticas para la evaluación de la adecuabilidad del sistema.

Parámetro	Expresión
Promedio	$\bar{y} = \frac{\sum y_i}{n}$
Desviación estándar	$s = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$
Coeficiente de variación	$CV\% = \frac{s}{\bar{y}} \times 100$

3. El criterio para la aceptación de la etapa es obtener $\%CV$ de 1-5% para las soluciones estándar.

3.3.2.2. Linealidad del sistema.

1. Preparar cinco diluciones de los estándares de DES, ZER y TAL a las siguientes concentraciones:
DES: 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 y 1.0 ng/mL (área/altura)
ZER: altura 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 ng/mL
Área 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 ng/mL
TAL: 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 ng/mL (área/altura)

2. Inyectar por triplicado en el CG/PTV/EM, la secuencia establecida en el CG debe de ir de menor a mayor concentración.
3. Con los resultados de altura de pico y área de los iones target:

DES: 412.

ZER: 538.

TAL: 538.

Construir una curva utilizando la ecuación de regresión lineal para las respuestas área y altura.

4. Analizar la curva de estándares, en dos ocasiones más, es decir en dos días diferentes.
5. Calcular la Sensibilidad de calibración de la recta, b ; el estimador de interferencia, a ; el coeficiente de correlación, r ; el coeficiente de determinación, r^2 ; la desviación estándar de la sensibilidad de calibración S_b y su intervalo de confianza IC_b ; la desviación estándar del estimador de interferencia S_a y su intervalo de confianza IC_a , y el Test de la t .
6. Expresiones matemáticas empleadas. (Tablas 15 y 16).

Tabla 15. Estimación de los parámetros de linealidad.

Parámetro	Expresión
Sensibilidad de calibración (pendiente)	$b = \frac{\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n}}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}$
Estimador de interferencia (intercepto)	$a = \frac{\sum y - b \sum x_i}{n}$
Coeficiente de Correlación	$r = \frac{\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n}}{\sqrt{\left(\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n} \right) \left(\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n} \right)}}$
Ecuación de la recta	$y = b x + a$
Coeficiente de determinación	$CD = r^2$ Error aleatorio de la regresión = $100 - (r^2 \times 100)$

Tabla 16. Estimadores de incertidumbre de la curva de calibración.

Estimadores de incertidumbre	
Test de t de correlación	$tr = \frac{ r \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$
Desviación Estándar de la sensibilidad de calibración	$sb = \sqrt{\frac{s^2_{xy}}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}}$
Varianza de la regresión	$s^2_{xy} = \frac{\sum y_i^2 - a \sum y_i - b \sum x_i y_i}{n-2}$
Intervalo de confianza de la sensibilidad de calibración	$IC_b = b \pm t_{\alpha, n-2} \cdot sb$ $\alpha = 95\% \text{ confianza}$
Desviación Estándar del Estimador de Interferencia	$sa = \sqrt{s_b^2 \frac{\sum x_i^2}{n}}$
Intervalo de confianza del Estimador de Interferencia	$IC_a = a \pm t_{\alpha, n-2} \cdot sa$ $\alpha = 95\% \text{ confianza, } n-2 \text{ g.l.}$
Test de la t	$t_{\text{tablas}} < t_{\text{calculada}}$

3.3.2.3. Cálculo de la repetibilidad del sistema con el Factor de Respuesta (FR).

1. Preparar una curva de calibración con los analitos de interés a las mismas concentraciones que en la linealidad del sistema.
2. Correr en el sistema CG/PTV/EM, en el modo SIM, un total de 3 réplicas por punto.
3. Calcular el factor de respuesta de las señales, tanto para area como altura, la relación concentración/señal.
4. Calcular los promedios, las desviaciones estándar y coeficientes de variación de la curva y para cada punto.
5. Expresiones matemáticas empleadas. (Tabla 17).

Tabla 17. Expresiones matemáticas para evaluar la repetibilidad con el factor de respuesta de una curva de calibración y por punto de calibración.

Parámetro	Expresión
Factor de respuesta	$FR = \frac{Ca}{Aa}$
Promedio	$\bar{y} = \frac{\sum yi}{n}$
Desviación estándar	$s = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$
Coeficiente de variación	$CV\% = \frac{s}{\bar{y}} \times 100$

3.3.2.4. Cálculo de la precisión por punto del sistema.

1. Preparar una curva de calibración con los analitos de interés a las mismas concentraciones que en la linealidad del sistema.
2. Correr en el sistema CG/PTV/EM, en el modo SIM, un total de 3 réplicas por punto.
3. Calcular las desviaciones estándar y coeficientes de variación de cada punto.
4. Calcular la desviación estándar ponderada.
5. Repetir las mediciones por dos días diferentes.
6. Expresiones matemáticas empleadas. (Tabla 18).

Tabla 18. Expresiones matemáticas para evaluar la precisión por punto de calibración.

Parámetro	Expresión
Promedio	$\bar{y} = \frac{\sum y_i}{n}$
Desviación estándar	$s = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$
Coefficiente de variación	$CV\% = \frac{s}{\bar{y}} \times 100$
Desviación Estándar ponderada	$S_{ponderada} = \sqrt{\frac{\sum (y_1 - \bar{y})^2 + \sum (y_2 - \bar{y})^2 + \sum (y_3 - \bar{y})^2 + \dots + \sum (y_n - \bar{y})^2}{n_1 + n_2 + n_3 + \dots + n - n_T}}$

3.3.2.5. Límite de detección, Límite de identificación y Límite de determinación del sistema.

Evaluar a partir de los datos obtenidos en las curvas de calibración, para la linealidad del sistema. Expresiones matemáticas empleadas. (Tabla 19).

1. Graficar respuesta contra concentración.
2. Calcular por regresión lineal, dando la línea de calibración del procedimiento analítico completo.
3. Cálculo de la línea de calibración del procedimiento analítico completo para el análisis del blanco.
4. Cálculo de la pendiente b de la línea de calibración. Cálculo del intercepto a de la línea de calibración.
5. Cálculo de la desviación estándar residual, S_y .
6. Cálculo de la altura de la señal crítica, y_{crit} .
7. Cálculo del límite de detección, LOD .
8. Cálculo del límite de identificación, ID .
9. Cálculo del límite de determinación, DTM .

Tabla 19. Expresiones matemáticas para calcular el límite de detección, límite de identificación y límite de determinación del sistema.

Expresión	Ecuación	Donde:
Línea de calibración	$y = a + bx$	y = valor de la señal a la concentración x. x = concentración de una sustancia en una muestra. a = intercepto de y. b = pendiente.
Pendiente b de la línea de calibración	$b = \frac{\sum_{i=1}^n y_i x_i - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{1}{n} \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2}$	x_i = concentración de fortificación de la muestra i. y_i = valor de la señal de la muestra i. n = número total de análisis de calibración. i = índice de análisis de calibración.
Intercepto a de la línea de calibración en el eje y .	$a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i - \frac{b}{n} \sum_{i=1}^n x_i$	x_i = concentración de fortificación de la muestra i. y_i = valor de la señal de la muestra i. n = número total de análisis de calibración. i = índice de análisis de calibración.

Tabla 19. Expresiones matemáticas para calcular el límite de detección, límite de identificación y límite de determinación del sistema. (Continuación).

Expresión	Ecuación	Donde:
Desviación estándar residual s_y	$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - (a + bx_i))^2}{n - 2}}$	$t_{f,\alpha}$ = valor de la distribución t (50%) para $f = n-2$ grados de libertad y una probabilidad del 95% (probabilidad de error $\alpha = 0.05$). $\bar{x}$ = valor promedio de las concentraciones de fortificación de todos los análisis de calibración.
Altura crítica de la señal y_{crit}	$y_{crit} = a + s_y t_{f,\alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$	$t_{f,\alpha}$ = valor de la distribución t (50%) para $f = n-2$ grados de libertad y una probabilidad del 95% (probabilidad de error $\alpha = 0.05$). $\bar{x}$ = valor promedio de las concentraciones de fortificación de todos los análisis de calibración.
Límite de detección, DTC	$DTC = \frac{(y_{crit} - a)}{b} = \frac{s_y}{b} t_{f,\alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$	
Límite de Identificación, ID	$ID = 2 \times DTC$	

Tabla 19. Expresiones matemáticas para calcular el límite de detección, límite de identificación y límite de determinación del sistema. (Continuación).

Expresión	Ecuación	Donde:
Límite de determinación Criterio 1	$y_{DTM1} = y + b(ID - \bar{x}) \pm s_y t_{f,\alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(ID - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$	$t_{f,\alpha}$ = valor de la distribución t (50%) para $f = n-2$ grados de libertad y una probabilidad del 95% (probabilidad de error $\alpha = 0.05$).
Cálculo de y_{DTM1}		$\bar{x}$ = valor promedio de las señales de todos los análisis de calibración.
Límite de determinación Criterio 1	$DTM1 = (y_{DTM1} - a) / b$	
Límite de determinación Criterio 2	$x_{fnd,fort} = a_{rec} + b_{rec} x_{fort}$ DTM 2: para obtener este criterio se calculan los valores de pendiente b e intercepto a y se comparan con la tabla de casos que indica la ecuación que corresponde con el comportamiento de estos valores.	x_{fort} = concentraciones de fortificación. $x_{fnd,fort}$ = concentraciones de fortificación encontradas. a_{rec} = intercepto y de la función de recuperación b_{rec} = pendiente de la función de recuperación
Límite de determinación Criterio 3	$Q = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2; D = (0.3b)^2 - \frac{(s_y t_{f,\alpha})^2}{Q}$ $DTM3 = \bar{x} - \frac{b \cdot 0.3^2}{D} y + \frac{s_y t_{f,\alpha}}{D} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right) D + \frac{0.3^2 y^2}{Q}}$	
Límite de determinación, DTM	Se comparan los valores obtenidos de DTM1, DTM2 y DTM3, y se considera el DTM como el valor numérico más alto.	

CAPÍTULO IV

PARTE EXPERIMENTAL

4. PARTE EXPERIMENTAL.

En el presente capítulo se muestra la relación de materiales y equipo utilizados en el desarrollo experimental, así como la descripción del procedimiento para la obtención del método analítico instrumental más idóneo para la detección de Hexestrol, Dietilestilbestrol (DES), Dienestrol, Estrona, 17- β Estradiol, Progesterona, Testosterona, α -zearalanol (ZER), β -zearalanol (TAL), Zearalanona y α -zearalenol en el sistema CG/PTV/EM por barrido total de iones (SCAN). También se explica la estrategia para realizar la optimización de los parámetros de la ionización por Impacto Electrónico, para el Monitoreo de Ion Selectivo (SIM) de cada uno de los compuestos.

El desarrollo experimental se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Toxicología Analítica del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, bajo la supervisión del Dr. Osvaldo Nicolás Rodríguez Valdés.

4.1. INSTRUMENTACIÓN, MATERIALES Y REACTIVOS.

4.1.1. INSTRUMENTOS.

- Agitador Vortex Genie 2.
- Balanza analítica Explorer OHAUS 4100 g.
- Balanza analítica OHAUS Analytical Plus AP210S.
- Campana de extracción Basic Hood 47 y/o Basic Hood 70.
- Refrigerador/Congelador Whirlpool.
- Evaporador de Nitrógeno modelo 116.
- Estufa VWR.
- Sistema GC/MS Agilent 6890/5973, con la siguiente configuración: automuestreador automático Agilent 7683, inyector de vaporización con temperatura programable (PTV) Agilent, Cromatógrafo de gases Agilent 6890; espectrómetro de masas con analizador cuadrupolo, Agilent 5973, modo de ionización por impacto electrónico.

- Columna capilar de bajo sangrado para uso en GC/MS DB-5MS (5% metil silicona), 25 m longitud, 0.25 mm D. I., grosor de película 0.25 μm . J&W Scientific, o equivalente.
- Liner de Vidrio para inyector PTV multi baffle, desactivado. Agilent, PN 5183-2037 (o equivalente).
- Septum Merlin microseal de alta presión y tuerca para Agilent 6890, PN 5182-3442 o Septum de bajo sangrado/temperatura optimizada 11 mm para inyector PTV Agilent, PN 5183-4757.

4.1.2. MATERIALES Y REACTIVOS.

Para la determinación de las hormonas esteroidales, estilbenos y lactonas resorcílicas ácidas, las manipulaciones tanto de los estándares y las mezclas de trabajo se realizaron en atmósfera abierta utilizando campanas de extracción, bajo condiciones normales de laboratorio de temperatura y humedad, (23-25 °C, >50% HR), la preparación de la mezcla de derivatización se realizó en campanas de extracción, evitando alguna condición que aumentase la humedad relativa cotidiana del laboratorio. A continuación se presenta la relación de material utilizado.

- Desecador con material desecante.
- Frascos de vidrio ámbar de 120 mL, con tapón rosca y tapa con cubierta de PTFE/teflón o PTFE/Silicona.
- Frascos de vidrio ámbar de 60 mL con tapa de rosca y tapa con cubierta de PTFE/teflón o PTFE/Silicona.
- Insertos de vidrio silanizados de 250 μL . Agilent PN 5183-2086.
- Jeringas hipodérmicas desechables 1 mL.
- Matraces volumétricos de 10 mL ámbar clase A.
- Matraces volumétricos de 10 mL clase A.
- Matraces volumétricos de 100 mL clase A.
- Microespátula.
- Micropipetas de 10-100 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL .
- Pipetas mohr de 5, 10 mL.

- Puntas para micropipeta de 10-200 μL , 100-1000 μL .
- Viales ámbar de 15 mL con tapa fenólica y septa de PTFE/Silicona.
- Viales de fondo plano ámbar para automuestreador Agilent 7683 (o equivalente) de 2 mL, con tapa de PTFE/Silicona (para inyecciones múltiples).
- Viales de microreacción de 5 mL, con tapa de válvula Mininert de 20 mm y septas de PTFE/Neopreno.

A menos que se especifique, todos los solventes empleados fueron grado cromatográfico (HPLC o pesticida), y fueron utilizados sin purificación o preparación previa, con excepción del acetato de etilo el cual se secó con sulfato de sodio anhidro.

- Acetato de etilo, grado cromatográfico, SPECTRUM, Omnisolv*.
- Acido Sulfúrico, Grado A. C. S., Fermont.
- Agente derivatizante BSTFA, (N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida). Supelco, 3-3027.
- Agente derivatizante TMSI, (N-Trimetilsililimidazol). Supelco, 33068-U.
- Agua desionizada.
- Dicromato de potasio, Grado A. C. S., Fermont.
- Metanol, grado Cromatográfico, SPECTRUM, Omnisolv*.
- Solución de limpieza extrán (sosa cáustica 10N).
- Sulfato de sodio anhidro, granular G. R.
- Sylon CT, (5% DMDCS (dimetildiclorosilano) en tolueno). Supelco, 33065-U.
- Tolueno, Grado A.C.S, Fisher Scientific.

* El grado cromatográfico indica que un solvente debe tener las características de pureza pertinentes para un análisis por cromatografía de gases/espectrometría de masas, por lo que pueden utilizarse solventes grado HPLC, pesticida, unisolv, omnisolv u otros que cubran este requisito.

Gases especiales

- Helio, grado Cromatográfico. (99.998% como mínimo de pureza).
- Nitrógeno, grado Cromatográfico. (99.998% como mínimo de pureza).

Estándares

- Dietilestilbestrol (DES), Sigma D4628, $\geq 99\%$ pureza.
- α -zearalanol (Zeranol), Sigma Z0292, $\geq 97\%$ pureza.
- β -zearalanol (Taleranol), Sigma Z0417, $\geq 98\%$ pureza.
- Dienestrol, Sigma D3253, $\geq 98\%$ pureza.
- Hexestrol, Sigma H7753, $\geq 98\%$ pureza.
- Progesterona, Sigma P8783, $\geq 99\%$ pureza.
- Epitestosterona, Sigma E5878, $\geq 98\%$ pureza.
- 17β -estradiol, Sigma E8875, $\geq 98\%$ pureza.
- Estrona, Sigma E9750, $\geq 99\%$ pureza.
- Zearalanona, Sigma Z0167, $\geq 98\%$ pureza.
- α -zearalenol, Sigma Z0166, $\geq 98\%$ pureza.

4.2. PREPARACIÓN DE MATERIAL DE VIDRIO. LAVADO Y DESACTIVACIÓN.

Los matraces volumétricos y los recipientes utilizados para el almacenamiento de las soluciones (viales y frascos) fueron sometidos a un proceso de limpieza que se describe a continuación. Los liners de vidrio empleados en el sistema de cromatografía de gases eran nuevos, reutilizándose de acuerdo a un procedimiento descrito en los puntos 4.2.2 y 4.2.3.

4.2.1. LAVADO DE MATERIAL DE VIDRIO.

El material de vidrio se sumergió en solución de extrán al 10% (sosa cáustica 10N) al menos 2 horas, (la solución se preparó con 100 mL de extrán por cada litro de agua). Después de transcurrido el tiempo, se lavó el material con la misma solución y se enjuagó con agua corriente, para eliminar los restos de la solución. Posteriormente se hizo un segundo lavado con agua destilada o desionizada. Para el ambientado de los matraces volumétricos se efectuó un lavado final del material limpio y seco con metanol.

El material metálico se lavó inmediatamente con la solución, puesto que es altamente corrosiva en contacto con estos materiales.

4.2.2. REUTILIZACIÓN DE LOS LINERS DE VIDRIO.

Los liners de vidrio, al ser reemplazados, pudieron recuperarse para utilizarse nuevamente, sumergiéndolos en mezcla crómica, hasta eliminar toda la materia orgánica. Una vez que se tuvo el material libre de residuos de materia orgánica y restos de septum, se lavó con agua común y posteriormente con agua desionizada o destilada. El material se secó en una estufa a 110 °C, hasta eliminar cualquier resto de humedad. Después de este procedimiento, se desactivó el material de vidrio, y se almacenó en tubos de ensayo con tapón de rosca lejos de la humedad y del aire.

4.2.3. DESACTIVACIÓN DEL MATERIAL DE VIDRIO (SILANIZACIÓN).

La desactivación del material de vidrio se llevó a cabo haciendo una reacción de silanización, para saturar los sitios activos con radicales Si-OH de la superficie de los liners de vidrio.

Para este efecto, el material a silanizar se enjuagó con 5-7 mL de Sylon CT (dimetildiclorosilano -DMDCS- al 5%), permaneciendo el material en contacto con el Sylon CT de 10 a 15 segundos cubriendo todas las superficies. El Sylon CT puede reusarse indefinidamente si es almacenado adecuadamente, para ello se recomienda el empleo de frascos ámbar, y protegerlo de la humedad. Pueden almacenarse en pequeñas porciones para poder reutilizar el excedente del reactivo.

Para eliminar los residuos de Sylon CT, se lavó la superficie del material con tolueno dos veces, después se enjuagó el material tres veces con metanol.

Se secó la superficie silanizada utilizando nitrógeno cromatográfico, (no es recomendable emplear líneas de aire comprimido, pues pueden contaminar el material con aceites y grasas, partículas de polvo, etc.). El material una vez silanizado se protegió de la humedad, guardándolos en áreas secas, en tubos de ensayo individuales con tapa, o sus contenedores originales, para una mejor manipulación.

4.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y SOLUCIONES ESTÁNDAR.

4.3.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

Durante la preparación de las soluciones, soluciones madre y soluciones de trabajo, se utilizó el siguiente equipo de protección personal: lentes de seguridad, guantes de nitrilo, bata de laboratorio, y se trabajó dentro de las campanas de seguridad, con excepción del pesado, que se realizó en el área de preparación de estándares del Laboratorio de Toxicología Analítica.

4.3.1.1 Acetato de etilo anhidro.

Depositar en un frasco ámbar de 60 mL con tapón rosca 5 g de sulfato de sodio G. R. previamente secado a 110 °C, acetato de etilo grado HPLC o Cromatográfico, agitar ligeramente para poner en contacto el solvente con el desecante, mantener el solvente anhidro en el recipiente bien cerrado para conservarse a temperatura ambiente, en un lugar ventilado y seco.

4.3.1.2 Solución derivatizante BSTFA/TMSI 2%.

Colocar 5 mL de BSTFA en un vial de microreacción de 5 mL cubierto con papel aluminio (la solución es fotosensible), y se adicionan 100 µL de TMSI, tapar el vial de microreacción con una tapa válvula mininert y septa de PTFE/Silicona, manteniendo en posición de cerrado el dispositivo para la introducción de la jeringa, mezclar en un agitador vórtex por aproximadamente 1 min. Almacenar en un desecador a temperatura ambiente. Proteger de la humedad y/o la exposición directa con agua o soluciones acuosas, así como también de la luz y calor.

4.3.1.3 Mezcla crómica.

Pesar 5 g de dicromato de potasio y agregar en 100 mL de agua desionizada. Añadir sobre esta disolución 100 mL de ácido sulfúrico concentrado cuidadosamente (siempre añadir el ácido sobre la solución acuosa) cuidando la emisión de vapores y el calentamiento excesivo de la disolución. Una vez preparada la solución, se recomienda almacenar en frascos ámbar, cuando esté a temperatura ambiente. La solución puede reutilizarse hasta que cambie la coloración a verde.

4.3.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES ESTÁNDAR.

Todas las soluciones madre y de trabajo, una vez preparadas, se almacenaron a temperaturas de congelación, en viales ámbar de 15 mL o recipientes ámbar de 120 mL. Las soluciones madre tuvieron un tiempo de viabilidad de un año, y las de trabajo de seis meses. A continuación se describe el procedimiento de preparación.

4.3.2.1. Solución madre de Dietilestilbestrol –DES– 100 mg/L.

Pesar 10 ± 0.1 mg (0.010 ± 0.001 g) en una balanza analítica OHAUS Analytical Plus y diluir a 100 mL en un matraz volumétrico clase A ámbar con metanol grado HPLC o Cromatográfico. Ajustar la concentración obtenida considerando la pureza del material de referencia.

4.3.2.2. Solución madre de α -zearalanol –Zeranol- 100 mg/L.

Disolver el contenido de la ampolla que contiene 1 mg con metanol grado HPLC o Cromatográfico (2-3 mL), transferir la solución a un matraz volumétrico de 10 mL clase A ámbar con ayuda de una jeringa hipodérmica desechable de 1 mL y aforar con metanol HPLC o Cromatográfico. Ajustar la concentración obtenida considerando la pureza del material de referencia.

4.3.2.3. Solución madre de β -zearalanol –Taleranol- 100 mg/L.

Disolver el contenido de la ampolla que contiene 1 mg con metanol grado HPLC o Cromatográfico (2-3 mL), transferir la solución a un matraz volumétrico de 10 mL clase A ámbar con ayuda de una jeringa hipodérmica desechable de 1 mL y aforar con metanol HPLC o Cromatográfico. Ajustar la concentración obtenida considerando la pureza del material de referencia.

4.3.2.4. Solución madre de Hexestrol 100 mg/L.

Pesar 10 ± 0.1 mg (0.010 ± 0.001 g) en una balanza analítica OHAUS Analytical Plus y diluir a 100 mL en un matraz volumétrico clase A con metanol grado HPLC o Cromatográfico. Ajustar la concentración obtenida considerando la pureza del material de referencia.

4.3.2.5 Solución madre de Dienestrol 100 mg/L.

Pesar 10 ± 0.1 mg (0.010 ± 0.001 g) en una balanza analítica OHAUS Analytical Plus y diluir a 100 mL en un matraz volumétrico clase A con metanol grado

HPLC o Cromatográfico. Ajustar la concentración obtenida considerando la pureza del material de referencia.

4.3.2.6. Solución madre de Epitestosterona 100 mg/L.

Pesar 10 ± 0.1 mg (0.010 ± 0.001 g) en una balanza analítica OHAUS Analytical Plus y diluir a 100 mL en un matraz volumétrico clase A con metanol grado HPLC o Cromatográfico. Ajustar la concentración obtenida considerando la pureza del material de referencia.

4.3.2.7. Solución madre de Estrona 100 mg/L.

Pesar 10 ± 0.1 mg (0.010 ± 0.001 g) en una balanza analítica OHAUS Analytical Plus y diluir a 100 mL en un matraz volumétrico clase A con metanol grado HPLC o Cromatográfico. Ajustar la concentración obtenida considerando la pureza del material de referencia.

4.3.2.8. Solución madre de 17β -estradiol 100 mg/L.

Pesar 10 ± 0.1 mg (0.010 ± 0.001 g) en una balanza analítica OHAUS Analytical Plus y diluir a 100 mL en un matraz volumétrico clase A con metanol grado HPLC o Cromatográfico. Ajustar la concentración obtenida considerando la pureza del material de referencia.

4.3.2.9. Solución madre de Progesterona 100 mg/L.

Pesar 10 ± 0.1 mg (0.010 ± 0.001 g) en una balanza analítica OHAUS Analytical Plus y diluir a 100 mL en un matraz volumétrico clase A con metanol grado HPLC o Cromatográfico. Ajustar la concentración obtenida considerando la pureza del material de referencia.

4.3.2.10. Solución madre de Zearalanona 100 mg/L.

Disolver el contenido de la ampolla que contiene 1 mg con metanol grado HPLC o Cromatográfico (2-3 mL), transferir la solución a un matraz volumétrico de 10 mL clase A ámbar con ayuda de una jeringa hipodérmica desechable de 1 mL y aforar con metanol HPLC o Cromatográfico. Ajustar la concentración obtenida considerando la pureza del material de referencia.

4.3.2.11. Solución Madre de α -zearalenol 100 mg/L.

Disolver el contenido de la ampolla que contiene 1 mg con metanol grado HPLC o Cromatográfico (2-3 mL), transferir la solución a un matraz volumétrico de 10

mL clase A ámbar con ayuda de una jeringa hipodérmica desechable de 1 mL y aforar con metanol HPLC o Cromatográfico. Ajustar la concentración obtenida considerando la pureza del material de referencia.

4.3.3. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO.

4.3.3.1. Solución de trabajo de DES 100 µg/L.

Tomar 10 µL de la solución madre de DES 100 mg/L y aforar en un matraz volumétrico de 10 mL clase A con metanol grado HPLC o Cromatográfico.

4.3.3.2. Solución de trabajo de Zeranol 100 µg/L.

Tomar 10 µL de la solución madre de Zeranol 100 mg/L y aforar en un matraz volumétrico de 10 mL clase A con metanol grado HPLC o Cromatográfico.

4.3.3.3. Solución de trabajo de Taleranol 100 µg/L.

Tomar 10 µL de la solución madre de Taleranol 100 mg/L y aforar en un matraz volumétrico de 10 mL clase A con metanol grado HPLC o Cromatográfico.

4.3.3.4. Solución de trabajo de Hexestrol 100 µg/L.

Tomar 10 µL de la solución madre de Hexestrol 100 mg/L y aforar en un matraz volumétrico de 10 mL clase A con metanol grado HPLC o Cromatográfico.

4.3.3.5. Solución de trabajo de Dienestrol 100 µg/L.

Tomar 10 µL de la solución madre de Dienestrol 100 mg/L y aforar en un matraz volumétrico de 10 mL clase A con metanol grado HPLC o Cromatográfico.

4.3.3.6. Solución de trabajo de Epitestosterona 100 µg/L.

Tomar 10 µL de la solución madre de Epitestosterona 100 mg/L y aforar en un matraz volumétrico de 10 mL clase A con metanol grado HPLC o Cromatográfico.

4.3.3.7. Solución de trabajo de Estrona 100 µg/L.

Tomar 10 µL de la solución madre de Estrona 100 mg/L y aforar en un matraz volumétrico de 10 mL clase A con metanol grado HPLC o Cromatográfico.

4.3.3.8. Solución de trabajo de 17β-estradiol 100 µg/L.

Tomar 10 µL de la solución madre de 17β-estradiol 100 mg/L y aforar en un matraz volumétrico de 10 mL clase A con metanol grado HPLC o Cromatográfico.

4.3.3.9. Solución de trabajo de Progesterona 100 µg/L.

Tomar 10 µL de la solución madre de Progesterona 100 mg/L y aforar en un matraz volumétrico de 10 mL clase A con metanol grado HPLC o Cromatográfico.

4.3.3.10. Solución de trabajo de Zearalanona 100 µg/L.

Tomar 10 µL de la solución madre de Zearalanona 100 mg/L y aforar en un matraz volumétrico de 10 mL clase A con metanol grado HPLC o Cromatográfico.

4.3.3.11. Solución de trabajo de α-zearalenol 100 µg/L.

Tomar 10 µL de la solución madre de α-zearalenol 100 mg/L y aforar en un matraz volumétrico de 10 mL clase A con metanol grado HPLC o Cromatográfico.

4.3.3.12. Solución de trabajo mezcla de anabólicos 1000 µg/L.

En un matraz volumétrico de 10 mL, preparar la solución de trabajo conforme a la tabla siguiente y aforar con metanol grado HPLC o Cromatográfico:

Tabla 20. Preparación de la solución de trabajo mezcla de anabólicos 1000 µg/L.

Compuesto	µL solución madre (100 mg/L) adicionados	Volumen final	Concentración de la solución de trabajo
DES, Zeranol, Taleranol, Hexestrol, Dienestrol, Epitestosterona, Estrona, 17β-estradiol, Zearalanona, Progesterona, α-zearalenol	100 µL de cada solución madre	10 mL	1000 µg/L

4.3.3.13. Solución de trabajo mezcla de anabólicos 100 µg/L.

En un matraz volumétrico de 10 mL, preparar la solución de trabajo conforme a la tabla siguiente y aforar con metanol grado HPLC o Cromatográfico:

Tabla 21. Preparación de la solución de trabajo mezcla de anabólicos 100 µg/L.

Compuesto	µL solución madre (100 mg/L) adicionados	Volumen final	Concentración de la solución de trabajo
DES, Zeranol, Taleranol, Hexestrol, Dienestrol, Epitestosterona Estrona, 17β-estradiol, Zearalanona, Progesterona, α-zearalenol	10 µL de cada solución madre	10 mL	100 µg/L

4.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

El procedimiento experimental para este desarrollo analítico, consistió de las siguientes etapas, considerando que los analitos de estudio, son productos de derivatización por silanización:

1. Obtención de los parámetros óptimos en el sistema CG/PTV/EM en SCAN considerando la relación concentración:respuesta a 5, 10 y 20 ng/mL, para los anabólicos derivatizados: DES, Zeranol, Taleranol, Hexestrol, Dienestrol, Epitestosterona, Estrona, 17 β -estradiol, Zearalanona, Progesterona, α -zearalenol.
2. Análisis de los espectros de masas obtenidos por SCAN para la selección de los iones target y qualified, y creación del método de identificación/cuantificación de iones por SIM, de los anabólicos derivatizados: DES, Zeranol, Taleranol, Hexestrol, Dienestrol, Epitestosterona, Estrona, 17 β -estradiol, Zearalanona, Progesterona, α -zearalenol.
3. Optimización del espectrómetro de masas, para realizar por medio del SIM, el análisis instrumental de los anabólicos derivatizados: DES, Zeranol, Taleranol, Hexestrol, Dienestrol, Epitestosterona, Estrona, 17 β -estradiol, Zearalanona, Progesterona, α -zearalenol.
4. La validación analítica del método instrumental CG/PTV/EM por SIM para los anabólicos DES, Zeranol, Taleranol, como productos derivatizados, evaluando los siguientes parámetros en respuestas de área y altura: Adecuabilidad, Linealidad, Precisión, Exactitud, Repetibilidad por factor de respuesta, Limite de detección, Limite de cuantificación, Limite de determinación.

4.4.1. PREPARACIÓN DE LAS MEZCLAS DE ANABÓLICOS-TMS PARA LA INYECCIÓN EN EL SISTEMA CG/PTV/EM, MODO SCAN.

En un vial ámbar de 2 mL, con un inserto de vidrio de 250 µL desactivado, se prepararon las siguientes mezclas de anabólicos a partir de una solución de trabajo de anabólicos de 1000 µg/L como se indica en la Tabla 22. El volumen de inyección de trabajo fue en todo el procedimiento de 15 µL, realizándose en tres inyecciones múltiples de 5 µL, con una demora de 3 segundos, por inyección automática.

Tabla 22. Preparación de las mezclas de anabólicos-TMS para monitoreo por SCAN.

Volumen (µL) de la solución de trabajo anabólicos 1000 µg/L	masa inyectada, ng (15 µL inyección)
200	20
100	10
50	5

Nota: Se aplicó el siguiente cálculo:

1000 ng/mL sol. trabajo (equivalentes a 1000 µg/L) x 0.2 mL (200 µL) de solución de trabajo = 200 ng/0.150 mL sol derivatizante-acetato de etilo x 0.015 mL de inyección = 20 ng inyectados, es decir;

$$1000 \frac{ng}{mL} \times 0.2 mL = \frac{200ng}{0.150mL} \times 0.015 mL = 20 ng$$

Evaporar hasta sequedad con corriente de nitrógeno en seco a temperatura ambiente.

Reconstituir el residuo seco y libre de humedad, con 80 µL de acetato de etilo anhidro y derivatizar con 70 µL de BSTFA/TMSI al 2%.

Tapar el vial y agitar aproximadamente por 30 segundos en el agitador vórtex. Iniciar el análisis instrumental de la muestra en el sistema CG/PTV/EM.

4.4.2 ANÁLISIS DE LOS DERIVADOS TMS DE LOS ANABÓLICOS: DES, ZERANOL, TALERANOL, HEXESTROL, DIENESTROL, EPITESTOSTERONA, ESTRONA, 17 β -ESTRADIOL, ZEARALANONA, PROGESTERONA, α -ZEARALENOL.

El análisis instrumental, se realizó a partir de mezclas de soluciones de estándares de anabólicos diluidos en metanol, las cuales se evaporaron en una corriente suave de nitrógeno para eliminación de la humedad y del disolvente, y posteriormente se llevó a cabo la reacción de silanización de los grupos hidroxilo de los compuestos con BSTFA/TMSI 2% y acetato de etilo anhidro como medio disolvente, e inyectándose de forma automatizada, por inyección múltiple con el modo de venteo de disolventes, mediante un programa de temperaturas que completó la reacción de la formación de derivados de compuestos con grupos trimetilsilil en el PTV, eliminando el exceso de derivatizante, permitiendo la introducción a la columna de mayor cantidad de analitos de forma concentrada; las mediciones se realizaron en el sistema de Cromatografía de Gases; con identificación de los analitos por Espectrometría de Masas (cuadrupolo) por impacto electrónico en modo de Monitoreo de Ion Selectivo. (CG/PTV/EM SIM).

El sistema CG/PTV/EM, antes de ser puesto en operación, se verificó que tuviera las condiciones de operación adecuadas, descritas a continuación por componente del sistema.

4.4.2.1 Consideraciones previas de operación. Automuestreador.

Estado de la jeringa: Se requería contar con una jeringa limpia, con movimiento libre del émbolo, de lo contrario, era evidencia de la presencia de residuos de derivatizante en el interior. Cuando no era utilizada por periodos mayores de tres días, se realizaba una limpieza continua por ultrasonido con metanol y después con acetato de etilo, por periodos de una hora.

Alineación del automuestreador: esta consideración era necesaria cuando se realizaba el cambio de jeringas y el reemplazo del liner de vidrio, ya que orientaba la jeringa en la posición adecuada a la entrada del inyector.

Verificación del nivel y limpieza de los solventes de enjuague del automuestreador, realizando el cambio cuando fuera necesario, para evitar la contaminación entre inyecciones.

4.4.2.2. Consideraciones previas de operación. PTV.

Ajuste del puerto de inyección, para asegurar que no existieran entradas de aire, sobre todo cuando se realizaba el cambio de septa y de liner, los cuales se realizaban al menos cada semana, o cuando se detectaban los iones comunes de un sangrado de columna o por contaminación de septum, (m/z 73, 147, 221, 281, 295, 355, 429) durante las mediciones por SCAN y la baja sensibilidad y aumento del ruido en el SIM.

4.4.2.3. Consideraciones previas de operación. Horno.

Revisión de las uniones inyector-columna (inyector/CG) y columna-línea de transferencia (CG/EM), para asegurar la hermeticidad del sistema, esto se realizaba sobre todo después de la limpieza de la fuente iónica, ya que durante este proceso, el sistema CG/EM se apaga y las uniones que se encuentran en las zonas calientes se condensan, lo cual ocasionalmente provocaba que las uniones se soltaran.

4.4.2.4. Consideraciones previas de operación. Espectrómetro de masas.

Se verificaba diariamente las condiciones de vacío: Valores menores o iguales a 70 mTorr, con valor óptimo 40 mTorr.

La relación Aire/Agua: 5% de abundancia relativa agua/masa baja PFTBA (18/69) como valor máximo; 5% de abundancia relativa nitrógeno/masa baja PFTBA (28/69) como valor máximo.

En la afinación automática (autotune): que se tuvieran valores normales del multiplicador de voltaje, menores de 3000 eV, valores de Repeller entre 19.90 como valor mínimo, valor máximo 30.0, y la relación de abundancias por autotune de la m/z 502 mayor del 3.00% de abundancia, con relación isotópica arriba del 9%.

CAPÍTULO V
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES INSTRUMENTALES PARA EL SISTEMA GC/MS/SCAN Y GC/MS/SIM PARA EL ANÁLISIS DE DIETILESTILBESTROL, HEXESTROL, DIENESTROL, ESTRONA, 17 β -ESTRADIOL, PROGESTERONA, TESTOSTERONA, ZERANOL, TALERANOL, ZEARALANONA Y α -ZEARALENOL.

En la experimentación del desarrollo para el análisis de las diferentes familias de compuestos anabólicos se realizaron tres inyecciones de 5 μ L, con intervalos de 3 segundos entre inyección e inyección, utilizando un automuestreador con un programa de limpieza de jeringa (Tabla 23). Los compuestos anabólicos se mezclaron con los agentes derivatizantes BSTFA y TMSI en un programa del inyector PTV para bloquear los grupos funcionales polares y las estructuras de estos compuestos pudieran ser analizadas en un sistema en fase gaseosa, sin la pérdida de los analitos por absorciones irreversibles en la columna y por los efectos del programa de temperatura del sistema. Las muestras en el interior del inyector se concentraron con un programa de temperatura que durante 4 minutos cortó el flujo hacia la columna, para permitir la formación de los derivados silanizados de los anabólicos y para eliminar la interferencia de estos reactivos a través de un flujo de venteo de 400 mL/min (Figura 12), en un programa de calentamiento rápido de dos minutos (60 °C a 300 °C). Con este procedimiento se llevó a cabo la reacción de derivatización en el puerto de inyección. (Figura 13). En esta etapa, la cantidad de muestra introducida se concentra en el liner del inyector donde los anabólicos se adhieren a las paredes y mediante un programa de temperatura el disolvente es eliminado por la válvula de escape.

La temperatura de vaporización requerida para poder utilizar el sistema de PTV y evitar las pérdidas de los compuestos anabólicos, debe en todos los casos tener una diferencia de temperatura mayor que el punto de vaporización del disolvente de 10 °C, de lo contrario sería una fuente de incertidumbre considerable del método. El programa de temperatura de inyección del método fue optimizado para la reacción de derivatización de los anabólicos.

Tabla 23. Condiciones instrumentales del Automuestreador en el sistema CG/PTV para el análisis de residuos de compuestos anabólicos, estilbenos y lactonas resorcílicas ácidas.

Modo de inyección:	Automático
Solventes de limpieza:	A: Metanol B: Acetato de etilo
Programa de limpieza de la jeringa:	Limpieza de la jeringa: 2 Bombeos de la jeringa en la inyección de muestra: 3 Limpieza Post Inyección del solvente A: 3 Limpieza Post Inyección del solvente B: 3

Los ensayos experimentales demostraron que la técnica de la derivatización en los modos del inyector PTV son eficientes porque eliminan los problemas de repetibilidad que se producen cuando estos tipos de reacciones se llevan a cabo en bloques de calentamiento, eliminando la degradación térmica de los anabólicos (Figura 22). En la NOM-034-ZOO-1996, este proceso se lleva a cabo a temperatura constante y sin control de la temperatura y humedad relativa del ambiente, y la inyección se realiza manualmente.

El inyector PTV tiene la gran ventaja de evitar la degradación térmica propia de los anabólicos en los inyectores split/splitless, que son programados a altas temperaturas, a diferencia del PTV, que puede trabajar con temperaturas criogénicas de hasta -160 °C.

Otra ventaja del método desarrollado es que permite la limpieza adicional de la muestra en el inyector eliminando pasos en la preparación de las muestras, el uso de las columnas de limpieza y el procesador automático de muestras XTRX4 empleado en la Norma Oficial Mexicana, disminuyendo también los costos y los tiempos de análisis.

El proceso de preparación y medición de las muestras se realiza en menor tiempo, lo cual hace el sistema más productivo.

Un punto muy importante en el diseño del experimento realizado, fue la sincronización de las etapas de operación del inyector PTV y el inicio del programa

de separación cromatográfica para que se realizaran simultáneamente: las fases de inyección múltiple de las muestras, la adhesión/evaporación del disolvente y el exceso de los agentes derivatizantes, la reacción de derivatización en el inyector, manteniendo las condiciones iniciales de calentamiento del horno a baja temperatura, para asegurar que al inicio del programa de calentamiento, se hubiera alcanzado el máximo de obtención del producto silanizado. (Figura 23).

En la Figura 24, se muestra el programa de inyección múltiple y el programa de separación cromatográfica.

File : D:\HPCHEM\1\DATA\HRPSM017.D
 Operator : VELAZQUEZ/RODRIGUEZ
 Acquired : 30 Sep 2002 16:09 using AcqMethod HOCTLSM2
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name: 10 ppb hormonas 30sept02
 Misc Info : SIM, REPETIBILIDAD
 Vial Number: 1

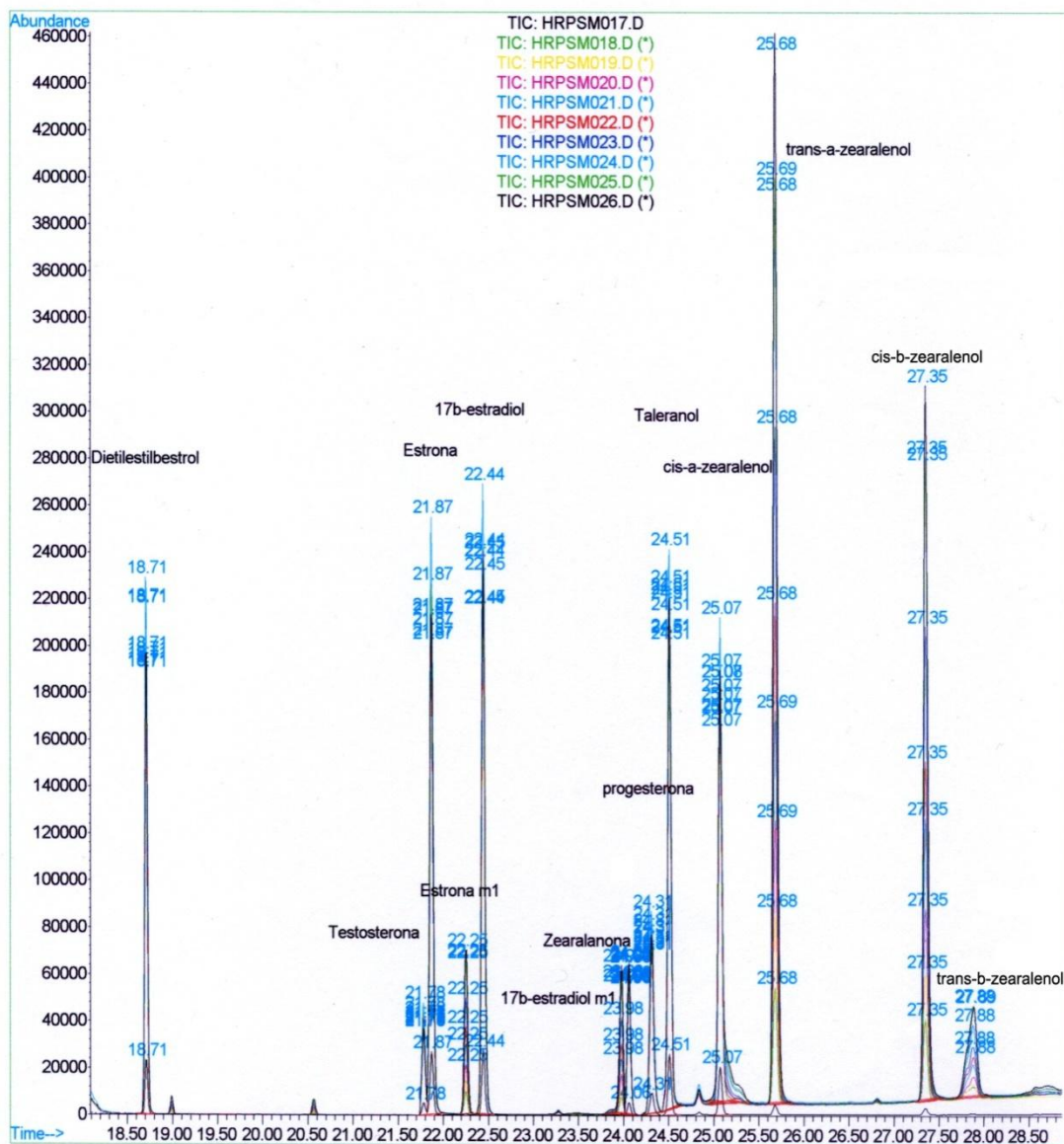


Figura 22. Cromatograma de separación de compuestos anabólicos y repetibilidad de los tiempos de retención.

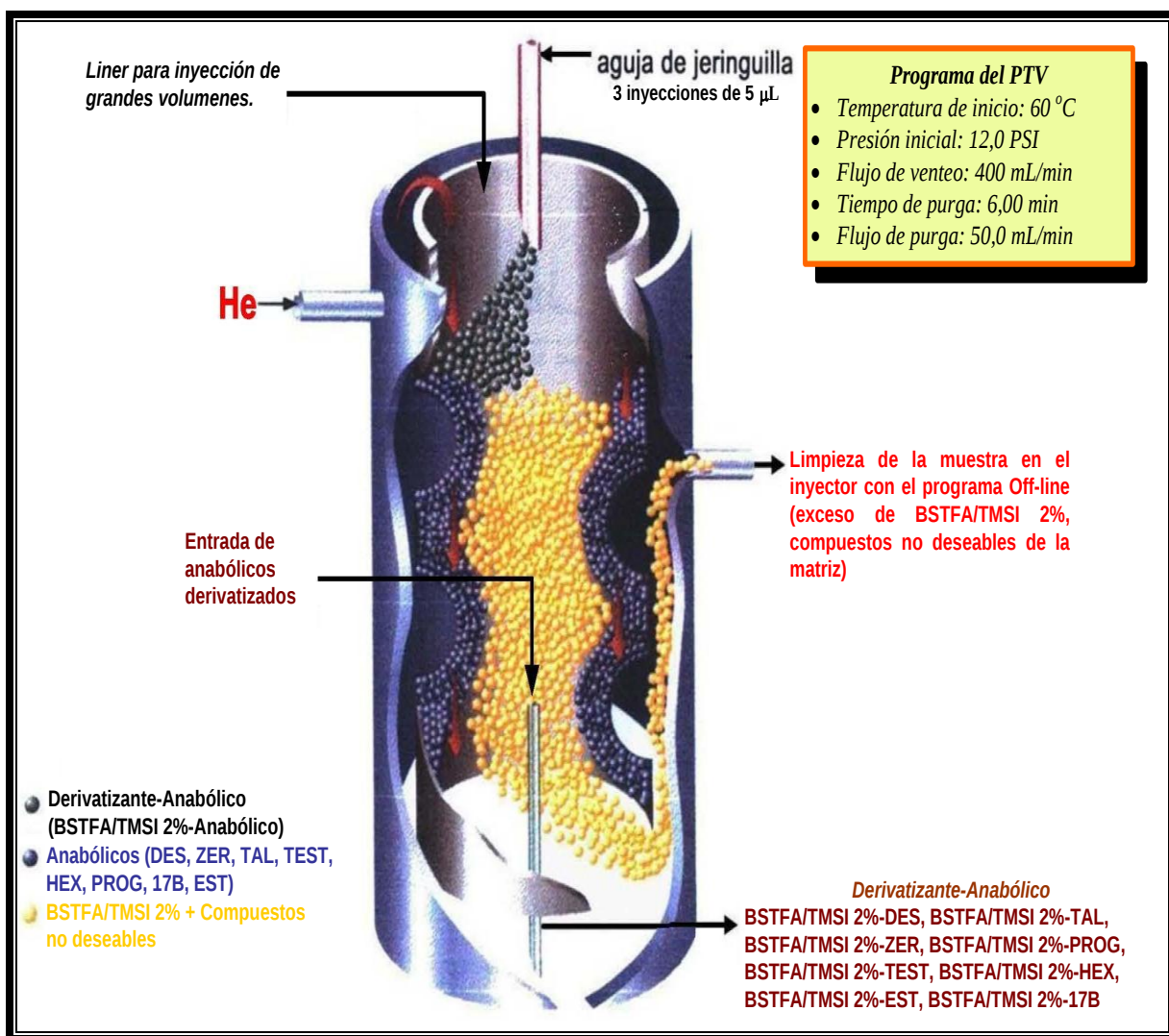


Figura 23. Proceso de formación de los derivados silanizados durante la inyección por PTV, modo venteo de disolventes.

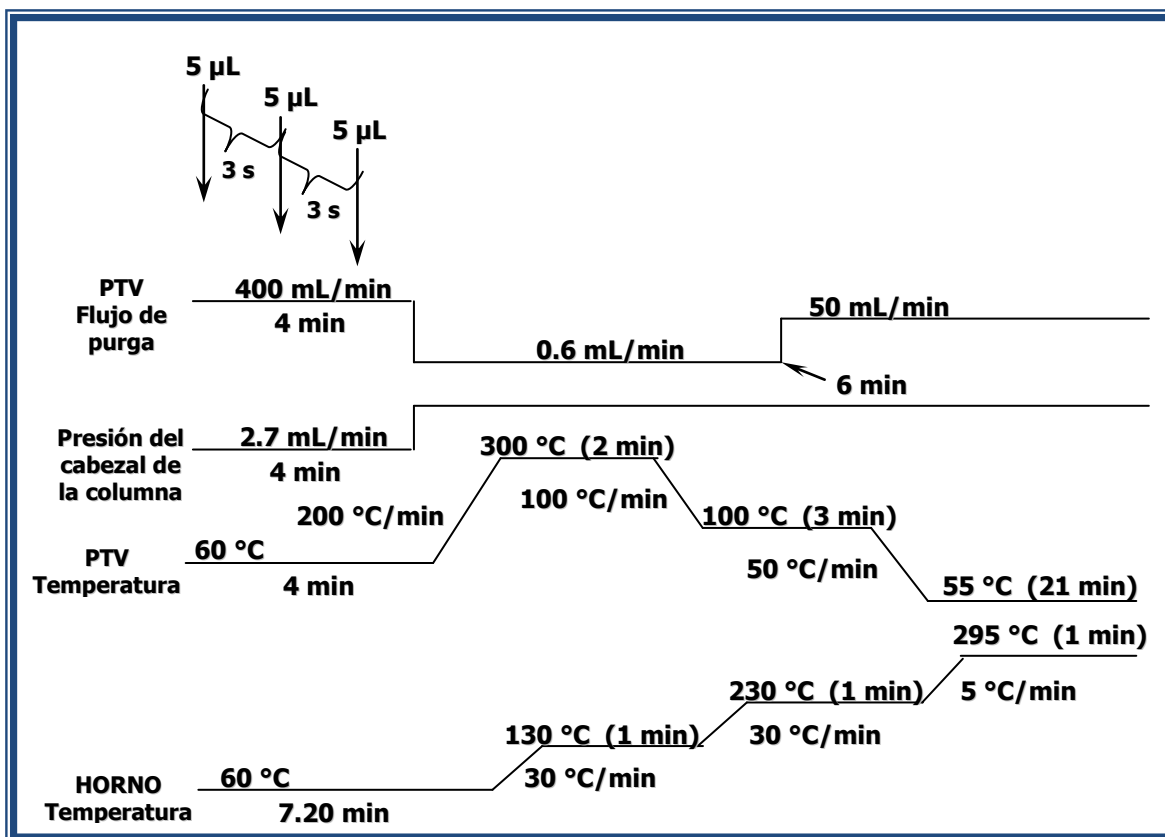


Figura 24. Programa del sistema de inyección múltiple por PTV y de separación cromatográfica (CG) desarrollado para el análisis de residuos de compuestos anabólicos.

El proceso de inyección en el modo de venteo de solventes, comienza con el cierre de la válvula solenoide del inyector y la caída de la presión del cabezal de la columna a un flujo mínimo de 2.7 mL/min, manteniendo condiciones de flujo de purga de 400 mL/min y una temperatura de 60 °C, misma que se designó como temperatura inicial al horno del sistema cromatográfico. A continuación, se lleva a cabo la inyección múltiple de 5 µL con un lapso de 3 segundos entre inyecciones. Una vez concluido este paso y al alcanzar los 4 minutos, aumenta la presión del cabezal, cae el flujo de purga, manteniendo el inyector las condiciones de baja temperatura, y es entonces cuando inicia el programa de calentamiento para volatilizar a los compuestos adheridos a las paredes del liner y asegurar que la reacción de derivatización se complete, alcanzando un máximo de 300 °C a los 7.20 minutos, tiempo en el que el horno se ha mantenido también a baja temperatura y

que a partir del cual inicia la separación de los compuestos en la columna cromatográfica, por separado, el inyector efectúa otro programa de calentamiento y enfriamiento para la limpieza y eliminación de interferencias de la muestra.

Los parámetros instrumentales del método desarrollado se detallan en las Tablas 23, 24, 25, 26 y 27 para cada uno de los componentes del sistema CG/PTV/EM.

En la optimización de los parámetros de la fuente de ionización, para obtener el máximo de sensibilidad en la relación señal/ruido, la relación m/z del ion 502 debe ser mayor de un 3% de abundancia relativa y el vacío del analizador de masas debe estar en 40 mTorr (Tabla 26).

La determinación de las condiciones de operación del sistema de Cromatografía de gases/espectrómetro de masas/barrido de iones (GC/MS/SCAN) se realizó mediante la optimización de la relación pico base/ion de caracterización de los analitos de estudio a concentraciones de 5, 10 y 20 ng/mL.

Para el análisis de Cromatografía de gases/Espectrometría de masas/monitoreo de ion selectivo (GC/MS/SIM), se analizaron los Cromatogramas Totales de Iones (TIC) y una vez caracterizada la fragmentación de iones para cada compuesto, y se dieron las condiciones iniciales para el análisis por SIM: tiempo de retención, tiempo de inicio de muestreo, tiempo de ventana (dwell time), ion de cuantificación (target ion), iones de confirmación (qualified ions), con las mismas condiciones cromatográficas que en el modo de SCAN.

En la Tabla 28 se resumen los parámetros de identificación y cuantificación de los compuestos anabólicos estudiados bajo el método desarrollado en el modo SIM, donde se indican los iones que se utilizaron para caracterizar a la estructura del anabólico derivatizado y los iones confirmatorios, y en las Tablas 29, 30 y 31 se describen las estructuras de las pérdidas características del ion molecular, cuyas intensidades son utilizadas para la confirmación de los compuestos investigados, en el tiempo de retención característico y el valor de ventana seleccionado en el tiempo de retención.

Tabla 24. Condiciones instrumentales del inyector PTV en el sistema GC/PTV para el análisis de residuos de compuestos anabólicos, estilbenos y lactonas resorcílicas ácidas.

Tipo de inyector:	PTV. Modo de inyección venteo de solventes
Volumen de inyección:	3 inyecciones de 5 μ L, con demora entre inyecciones de 3 segundos
Presión:	12.00 psi
Tiempo de venteo:	4 min
Flujo de venteo:	400.0 mL/min
Presión de venteo:	0.0 psi
Flujo de purga:	50.0 mL/min
Tiempo de purga:	6.00 min
Flujo total:	54.4 mL/min
Ahorro de gas:	Apagado
Flujo de ahorro de gas:	0 mL/min
Tiempo de inicio del ahorro de gas:	4.00 min
Gas acarreador:	Helio cromatográfico (99.998% pureza)
Programa de temperatura del inyector:	60 °C (4 min), incrementar 200 °C/min hasta 300 °C (2 min), disminuir 100 °C/min hasta 100 °C (3 min), disminuir 50 °C/min hasta 55 °C (21 min)
Programa criogénico:	Apagado

Tabla 25. Condiciones instrumentales del horno en el sistema CG/PTV para el análisis de residuos de compuestos anabólicos, estilbenos y lactonas resorcílicas ácidas.

Columna:	J&W Scientific DB-5MS (5% de metilsilicona), 25 m, D.I. 0.25 mm, grosor película de 0.25 μ m
Modo:	Presión constante
Presión:	12.00 psi
Flujo inicial nominal:	1.6 mL/min
Velocidad promedio:	51 cm/s Helio
Temperatura máxima de la columna:	325 °C
Programa de temperatura del horno:	60 °C (7.20 min), incrementar 30 °C/min hasta 130 °C (1 min), incrementar 30 °C/min hasta 230 °C (1 min), incrementar 5 °C/min hasta 295 °C (1 min)
Tiempo de equilibrio post corrida:	0.50 min
Tiempo de análisis:	28.87 min
Temperatura de calentamiento de la línea de transferencia al MS:	250 °C

En las Tablas 26 y 27 se presentan las condiciones de operación del espectrómetro de masas (EM), que permitieron una relación óptima concentración:respuesta.

Tabla 26. Parámetros de optimización de la fuente de ionización cuadrupolo.

Vacío:	Valores menores o iguales a 70 mTorr, valor óptimo 40 mTorr.
Repeller:	19.90 como valor mínimo, valor máximo 30.0
Relación de abundancias:	m/z 502 mayor del 3.00% de abundancia, relación isotópica arriba del 9%.
Air & water check:	5% de abundancia relativa agua/masa baja PFTBA (18/69) como valor máximo 5% de abundancia relativa nitrógeno/masa baja PFTBA (28/69) como valor máximo

Tabla 27. Condiciones instrumentales del EM para SCAN.

Modo de ionización:	Impacto electrónico
Calibración:	auto ajuste (autotune)
Energía del ionización:	70 eV
Temperatura del cuadrupolo:	150 °C
Temperatura de la fuente:	230 °C
Tiempo de demora para la salida del disolvente:	18.0 min
Encendido del detector:	17.50 min
Modo de adquisición SCAN	
Masa baja:	50 u. m. a.
Masa alta:	550 u. m. a.

Tabla 28. Parámetros optimizados para la identificación y cuantificación de residuos anabólicos en el sistema GC/PTV/MS/SIM.

Compuesto	Peso molecular	T(t _R)	Tiempo inicio del grupo de iones SIM	Tiempo de ventana	Ion molecular	Iones monitoreados			
		minutos TIC				Q1	Q2	Q3	Q4
Hexestrol-2TMS	414	18.30	18.25	64	414	207	414	399	73
DES-2TMS	412	18.40	18.38	23	412	412	397	383	-
Dienestrol-2TMS	410	18.42	18.40	32	410	410	395	205	-
Epitestosterona-TMS	360	21.62	21.60	42	360	360	345	103	-
Estrona-TMS	342	21.69	21.66	56	342	342	327	257	-
17 β -estradiol-2TMS	416	22.11	22.08	61	416	416	401	285	-
Zearalanona-2TMS	464	23.66	23.61	85	464	449	464	307	-
Zeranol-3TMS	538	23.86	23.82	68	538	538	433	73	307
Taleranol-3TMS	538	24.02	23.97	70	538	538	433	307	73
Progesterona	314	24.18	24.13	84	314	124	229	314	-
α -zearalenol-3TMS	536	25.59	24.54	60	536	536	431	73	-

Nota:

Q1 = Ion de cuantificación (ion target).

Q2, Q3, Q4 = Iones de confirmación (pérdidas de caracterización estructural).

Tabla 29. Principales fragmentaciones de los iones de caracterización y de confirmación de los estilbenos.

Anabólico	Ion de caracterización (Q1)	Primer Ion de confirmación (Q2)	Segundo Ion de confirmación (Q3)	Tercer Ion de confirmación (Q4)
Hexestrol-2TMS	207 $[M-C_{12}H_{19}OSi]^+$ M-207 (pico base)	414 $[C_{24}H_{38}O_2Si_2]^+$ (MW)	399 $[C_{23}H_{35}O_2Si_2]^+$ M-15 $[M-CH_3]^+$	73 $[(CH_3)_3Si]^+$
Dietilestilbestrol-2TMS	412 $[C_{24}H_{36}O_2Si_2]^+$ (MW) (Pico Base)	397 $[C_{23}H_{33}O_2Si_2]^+$ M-15 $[M-CH_3]^+$	383 $[C_{22}H_{31}O_2Si_2]^+$ M-29 $[M-C_2H_5]^+$	-
Dienestrol-2TMS	410 $[C_{24}H_{34}O_2Si_2]^+$ (MW)	395 $[C_{23}H_{31}O_2Si_2]^+$ M-15 $[M-CH_3]^+$	205 $[M-C_{12}H_{17}OSi]^+$ M-205	-

Tabla 30. Principales fragmentaciones de los iones de caracterización y de confirmación de hormonas esteroideas.

Anabólico	Ion de caracterización (Q1)	Primer Ion de confirmación (Q2)	Segundo Ion de confirmación (Q3)	Tercer Ion de confirmación (Q4)
Epitestosterona-TMS	360 $[C_{22}H_{36}SiO_2]^+$ (MW)	345 $[C_{21}H_{33}SiO_2]^+$ M-15 $[M-CH_3]^+$	103 $[CH_2SiO(CH_3)_3]^+$ M-257 $[M-C_{18}H_{25}O]^+$	-
Estrona-TMS	342 $[C_{21}H_{24}SiO_2]^+$ (MW) (Pico Base)	327 $[C_{20}H_{21}SiO_2]^+$ M-15 $[M-CH_3]^+$	257 $[C_{16}H_{21}SiO]^+$ 327-70 $[327-C_4H_7O]^+$	-
17 β -estradiol-2TMS	416 $[C_{24}H_{40}O_2Si_2]^+$ (MW) (Pico Base)	401 $[C_{23}H_{37}O_2Si_2]^+$ M-15 $[M-CH_3]^+$	285 $[C_{18}H_{25}SiO]^+$ M-131 $[M-C_6H_{15}SiO]^+$	-
Progesterona	124 $[C_8H_{12}O]^+$ M-190 $[M-C_{13}H_{18}O]^+$ (Pico Base)	299 $[C_{20}H_{27}O_2]^+$ M-15 $[M-CH_3]^+$	314 $[C_{21}H_{30}O_2]^+$ (MW)	-

Tabla 31. Principales fragmentaciones de los iones de caracterización y de confirmación de las lactonas resorcílicas ácidas.

Anabólico	Ion de caracterización (Q1)	Primer Ion de confirmación (Q2)	Segundo Ion de confirmación (Q3)	Tercer Ion de confirmación (Q4)
Zearalanona-2TMS	449 $[\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{Si}_2\text{O}_5]^+$ M-15 $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$	464 $[\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{Si}_2\text{O}_5]^+$ (MW)	307 $[\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{Si}_2\text{O}_3]^+$ M-157 $[\text{M}-\text{C}_9\text{H}_{17}\text{O}_2]^+$	-
Zeranol-3TMS	538 $[\text{C}_{27}\text{H}_{50}\text{Si}_3\text{O}_5]^+$ (MW)	433 $[\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{Si}_2\text{O}_4]^+$ M-15-90 $[\text{M}-\text{CH}_3-\text{HOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$	307 $[\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{Si}_2\text{O}_3]^+$ M-231 $[\text{M}-\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{O}_2\text{Si}]^+$	73 $[(\text{CH}_3)_3\text{Si}]^+$
Taleranol-3TMS	538 $[\text{C}_{27}\text{H}_{50}\text{Si}_3\text{O}_5]^+$ (MW)	433 $[\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{Si}_2\text{O}_4]^+$ M-15-90 $[\text{M}-\text{CH}_3-\text{HOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$	73 $[(\text{CH}_3)_3\text{Si}]^+$	307 $[\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{Si}_2\text{O}_3]^+$ M-231 $[\text{M}-\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{O}_2\text{Si}]^+$
α -zearalenol-3TMS	536 $[\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{Si}_3\text{O}_5]^+$ (MW)	431 $[\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{Si}_2\text{O}_4]^+$ M-15-90 $[\text{M}-\text{CH}_3-\text{HOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$	73 $[(\text{CH}_3)_3\text{Si}]^+$ (Pico Base)	-

En la figura 25 se muestra el TIC del método desarrollado, donde se observa la separación cromatográfica de los compuestos anabólicos Hexestrol-2TMS, Dietilestilbestrol-2TMS, Dienestrol-2TMS, Testosterona-TMS, Estrona-TMS, 17 β -estradiol-2TMS, Zearalanona-2TMS, Zeranol-3TMS, Taleranol-3TMS, Progesterona y α -zearalenol-3TMS, en el modo de barrido total en un tiempo de corrida de 28.50 minutos. En el caso de los estilbenos Dietilestilbestrol-2TMS y Dienestrol-2TMS, la resolución cromatográfica no fue suficiente, porque se empleó una columna no específica para compuestos de polaridades similares, lo cual se reflejó en la superposición de las abundancias y en el tiempo de retención. Como los pesos moleculares de estos compuestos difieren en dos unidades y el equipo donde se desarrolló el método es de baja resolución, al aplicar el método de iones seleccionados, cerrando los tiempos de ventana se incrementó la resolución donde fue posible ver separados el Dietilestilbestrol-2TMS y el Dienestrol-2TMS (Figura 26).

5.2 ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LOS DERIVADOS TMS DE LOS COMPUESTOS ANABÓLICOS.

5.2.1. ESTILBENOS.

En la Figura 27, se observan los iones principales de la fragmentación del Hexestrol-2TMS, donde la fragmentación del ion molecular m/z 414 procede a través de la ruptura homolítica en la posición alílica del enlace $C_{\alpha}-C_{\alpha}'$, formando la m/z 207 pérdida mas importante, también se aprecia la pérdida característica M-15, el cual origina el ion m/z 399.

En la Figura 28, se observan los iones de fragmentación característicos del Dietilestilbestrol-2TMS, La presencia del m/z 412 que corresponde al pico base, y también al ion molecular, la pérdida del radical metilo M-15, originando la m/z 397, y M-29, que es la pérdida del grupo etilo, m/z 383. Ruptura alílica en el enlace $C_{\alpha}-C_{\alpha}'$, a través de la fragmentación del enlace $C_{\beta}-H$ alílico con la correspondiente formación del doble enlace $C_{\alpha}=C_{\beta}$, que se observa con poca intensidad, el m/z 206.

En la Figura 29, se observa la separación de los isómeros cis-dietilestilbestrol-2TMS del trans-dietilestilbestrol-2TMS por SIM, en un análisis de repetibilidad en 14 inyecciones automatizadas. En la Figura 30, la derivatización en el puerto de inyección origina una estructura mas estable, que el espectro reportado en la librería NIST, con número de referencia #239113, donde se observa la diferencia en abundancia del m/z 412, el cual fue el pico base, a diferencia del reportado por NIST que corresponde al m/z 73.

En la Figura 31, se observa el espectro de masas por barrido total de iones del Dienestrol-2TMS, donde se producen las pérdidas M-15, y M-205, así como el ion molecular m/z 410. del fragmento 410, procede a través de la fragmentación del enlace C_β -H alílico con la correspondiente formación del doble enlace $C_\alpha=C_\beta$ y la ruptura del enlace $C_\alpha-C_\alpha'$ formando el m/z 205.

En la Figura 32, se hace una comparación entre los espectros obtenidos contra los de la librería NIST No. 236443.

File : E:\MASAS\HPCHEM\1\DATA\HSCN027.D
 Operator : VELAZQUEZ/RODRIGUEZ
 Acquired : 9 Dec 2003 20:51 using AcqMethod HORBS02
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name : 50 ppb Mix hormonas
 Misc Info : scan
 Vial Number : 1

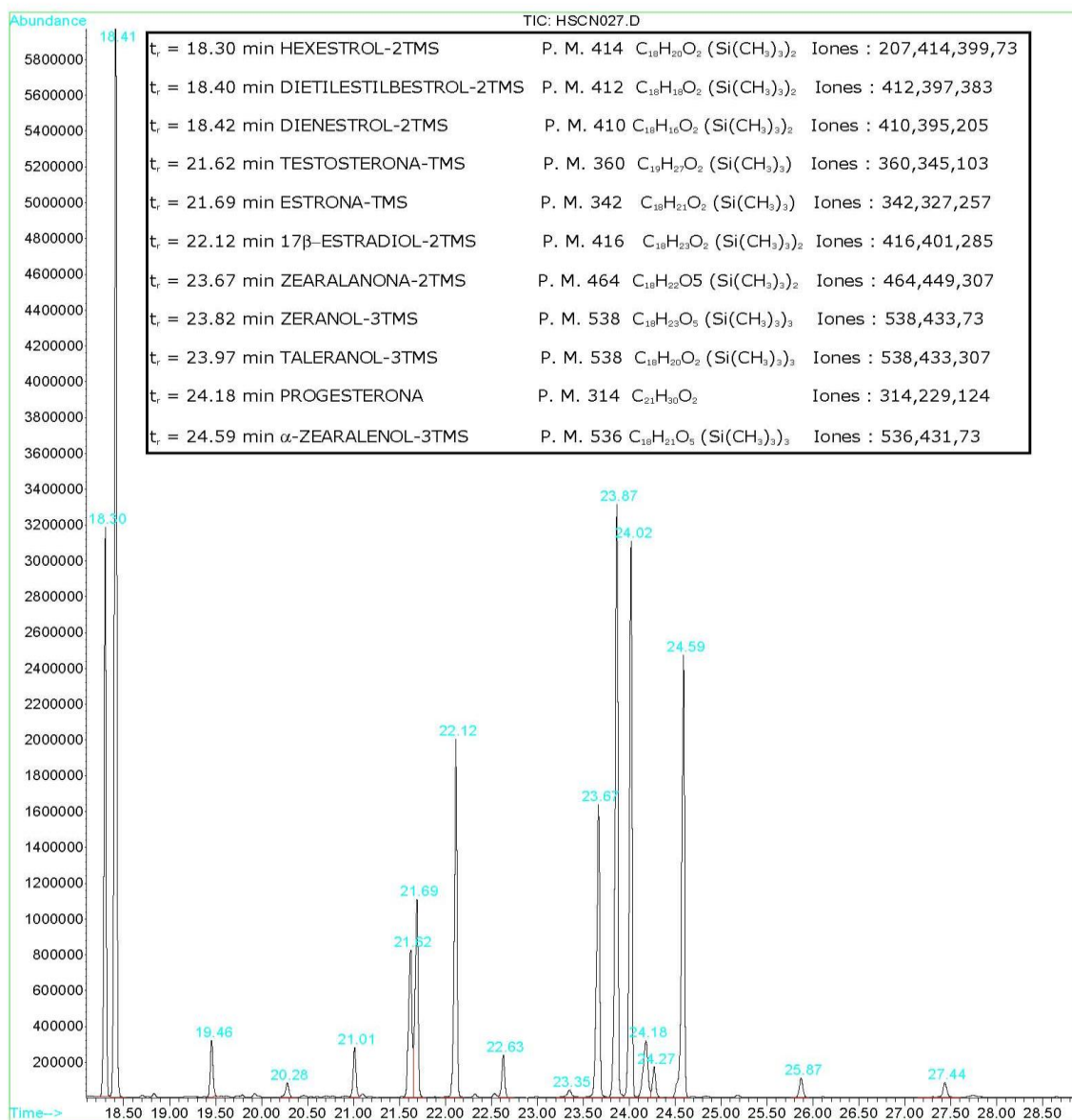


Figura 25. Cromatograma total de iones (TIC) de los compuestos anabólicos en el modo de barrido total.

File : E:\MASAS\HPCHEM\1\DATA\HSIMCT05.D
 Operator : VELAZQUEZ/RODRIGUEZ
 Acquired : 11 Dec 2003 9:12 using AcqMethod HOCTLSM3
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name : 50 ppb mix hormonas 26 nov 03
 Misc Info : metodo sim dwell control
 Vial Number: 1

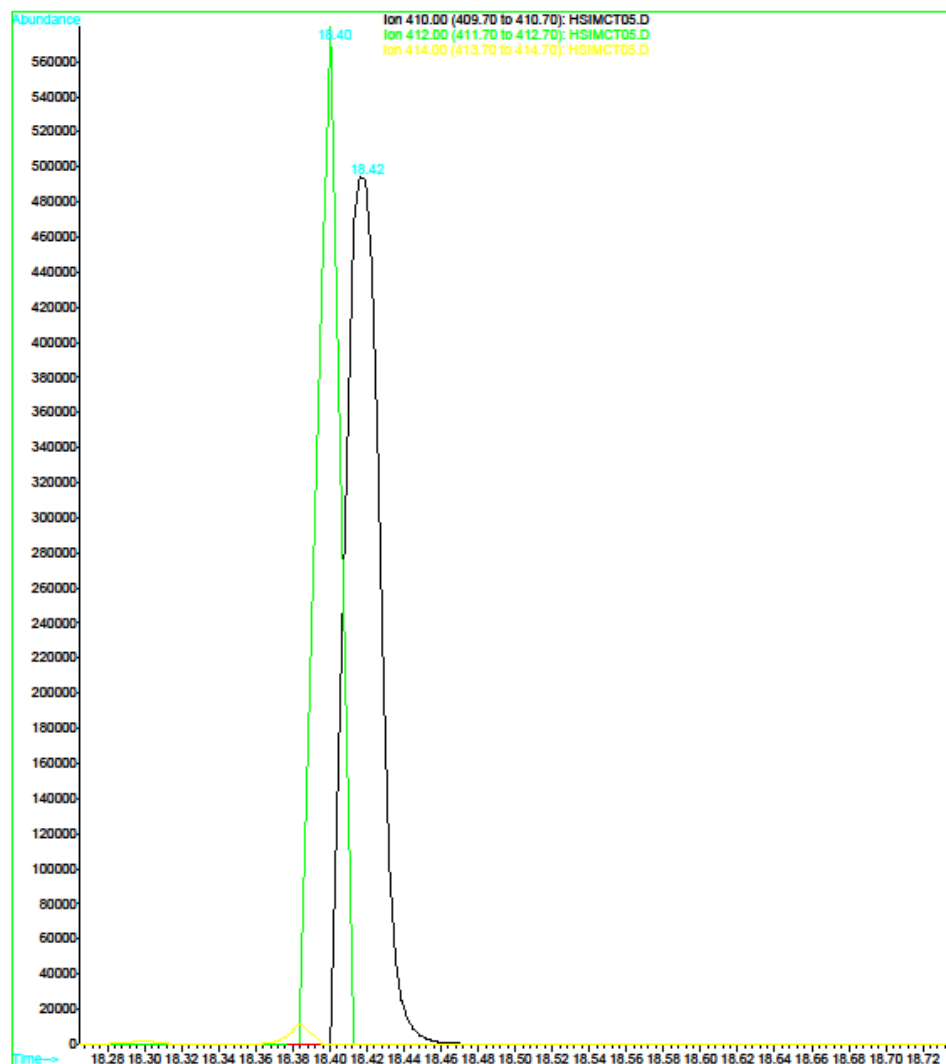


Figura 26. Identificación de Dietilestilbestrol-2TMS y Dienestrol-2TMS, en un pico superpuesto, por la técnica de búsqueda de iones de cuantificación por fragmentografía de masas.

File : D:\MSDCHEM\1\DATA\HORMONAS\HSCN027.D
 Operator : VELAZQUEZ/RODRIGUEZ
 Acquired : 9 Dec 2003 20:51 using AcqMethod HORBS02
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name : 50 ppb Mix hormonas
 Misc Info : scan
 Vial Number : 1

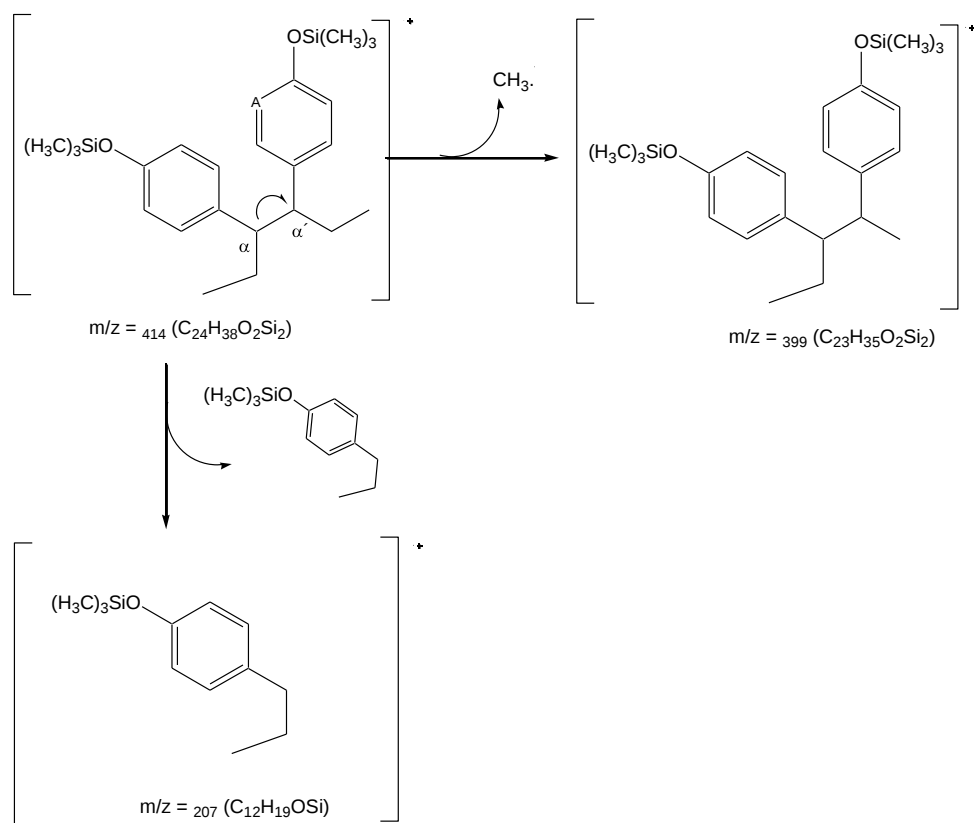
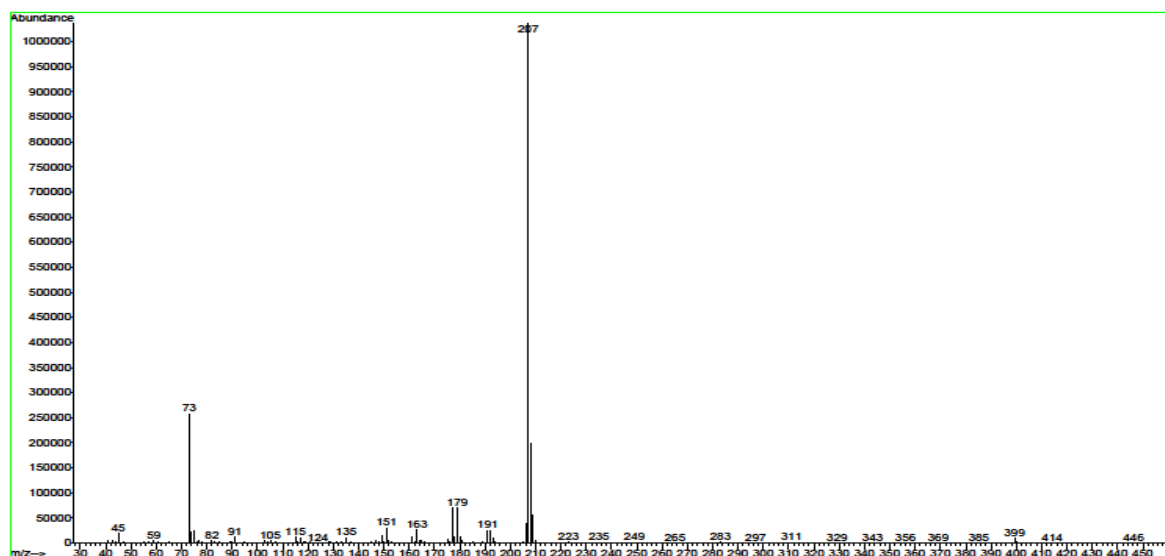


Figura 27. Espectro de masas de Hexestrol-2TMS, en el modo de barrido completo y fragmentos iónicos característicos.

File : D:\MSDCHEM\1\DATA\HORMONAS\HSCN027.D
 Operator : VELAZQUEZ/RODRIGUEZ
 Acquired : 9 Dec 2003 20:51 using AcqMethod HORBS02
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name : 50 ppb Mix hormonas
 Misc Info : scan
 Vial Number : 1

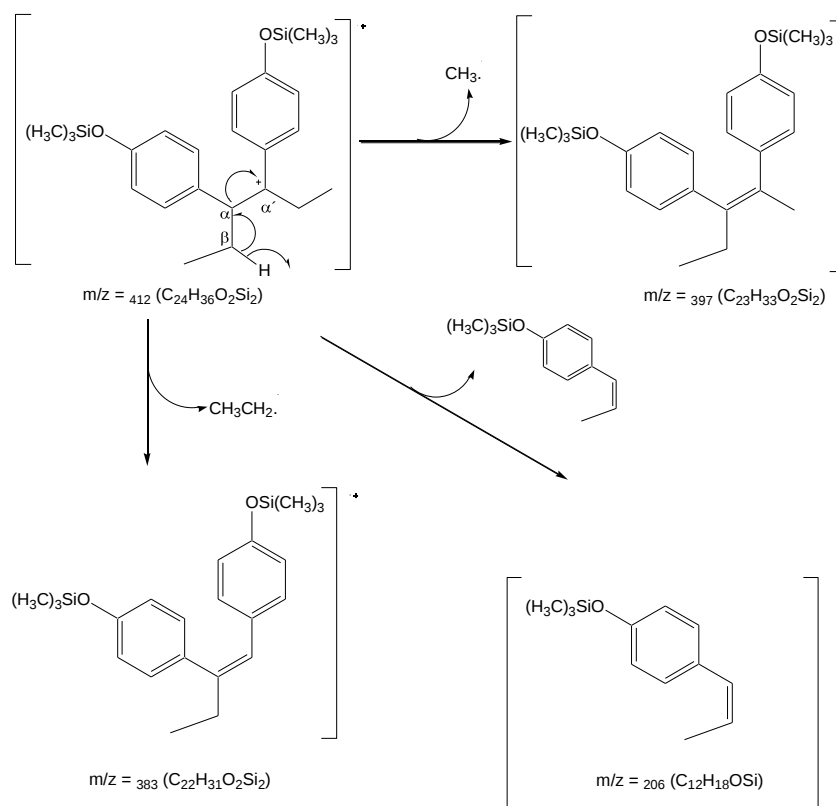
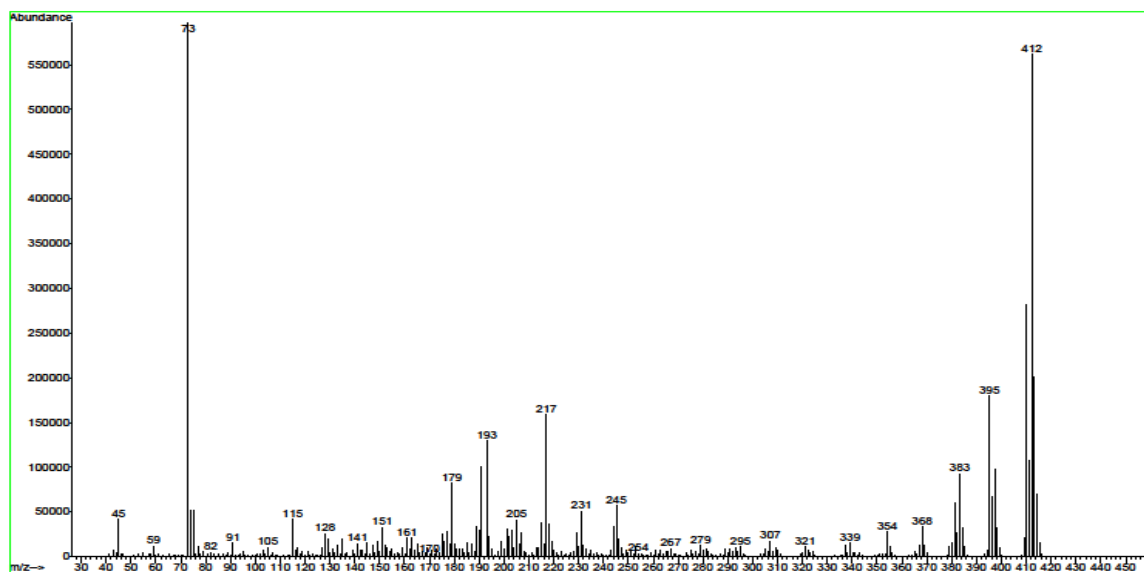


Figura 28. Espectro de masas de Dietilestilbestrol-2TMS, en modo de barrido completo y fragmentos iónicos característicos.

File : E:\MASAS\HPCHEM\1\DATA\HSIM004.D
 Operator : VELAZQUEZ/RODRIGUEZ
 Acquired : 11 Sep 2002 10:41 using AcqMethod HORSIM03
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name: 2.0 ppb DES, 2.0 ppb Taleranol
 Misc Info : SI: Estrona 1 ppb, zearalanona 2 ppb
 Vial Number: 2

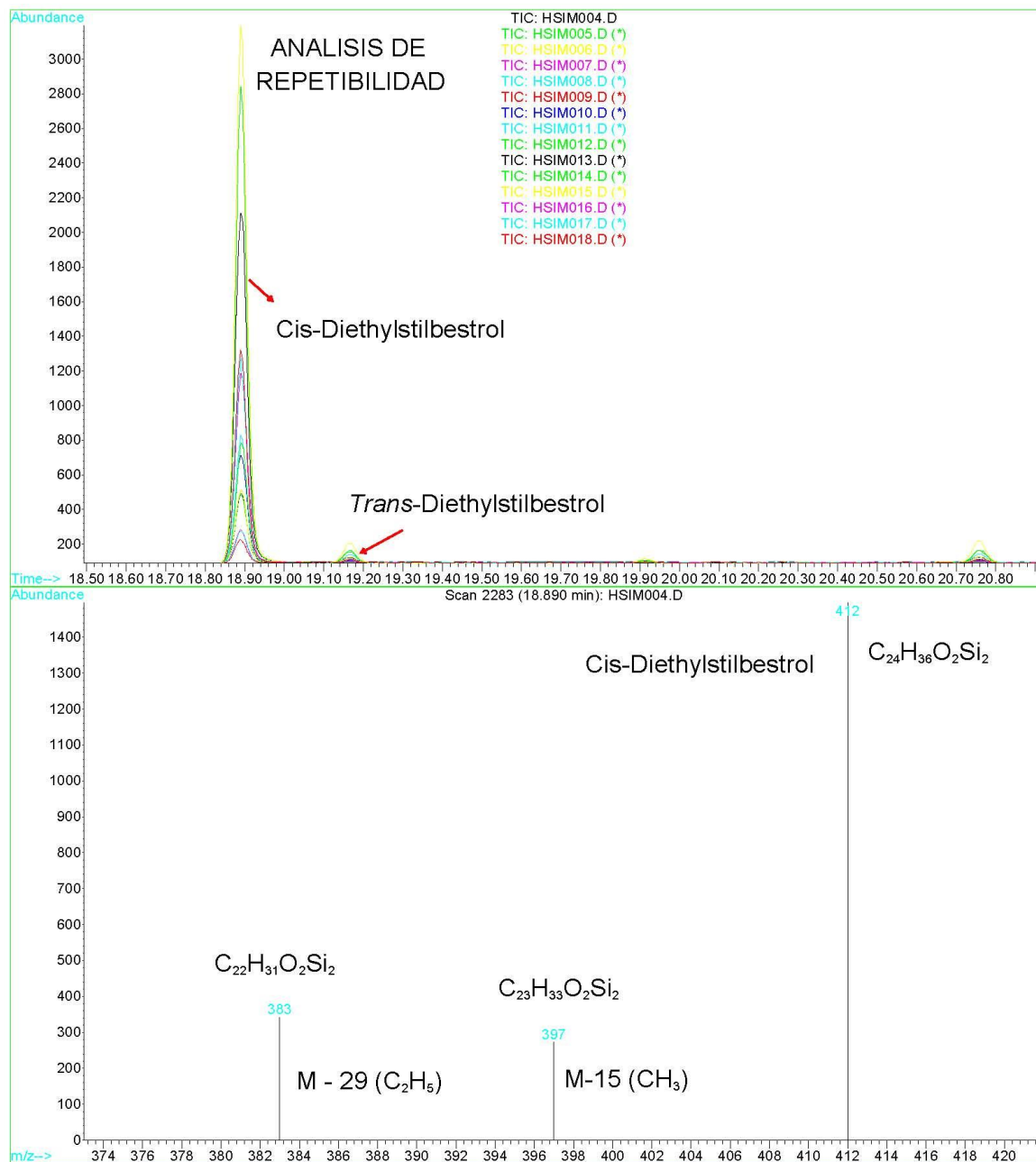


Figura 29. Espectro de masas de Cis-dietilestilbestrol-2TMS y Trans-dietilestilbestrol-2TMS, en el modo SIM. Fragmentos iónicos característicos y análisis de repetibilidad.

Library Searched : E:\MASAS\DATABASE\WILEY275.L
 Quality : 99
 ID : trans-Diethylstilbestrol ditms

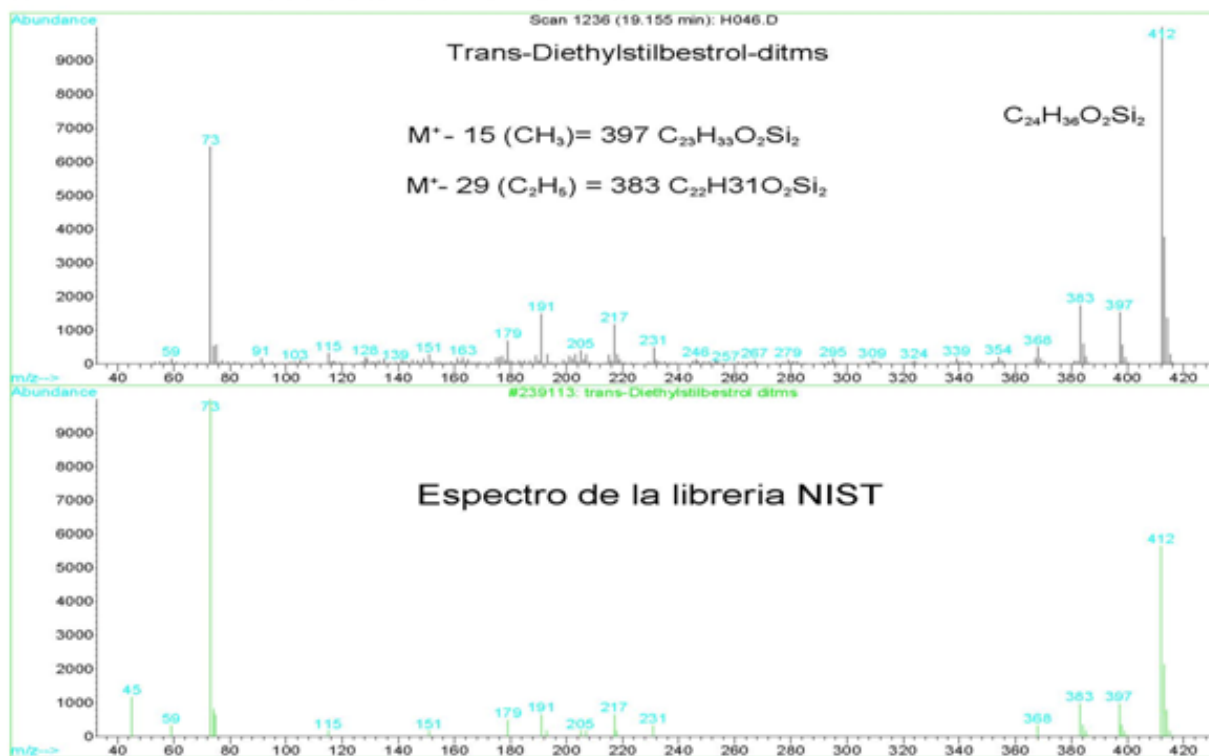


Figura 30. Comparación entre la información espectral del barrido completo del Trans-dietilestilbestrol-2TMS y la librería de espectros de la NIST.

File : D:\MSDCHEM\1\DATA\HORMONAS\HSCN027.D
 Operator : VELAZQUEZ/RODRIGUEZ
 Acquired : 9 Dec 2003 20:51 using AcqMethod HORBS02
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name : 50 ppb Mix hormonas
 Misc Info : scan
 Vial Number : 1

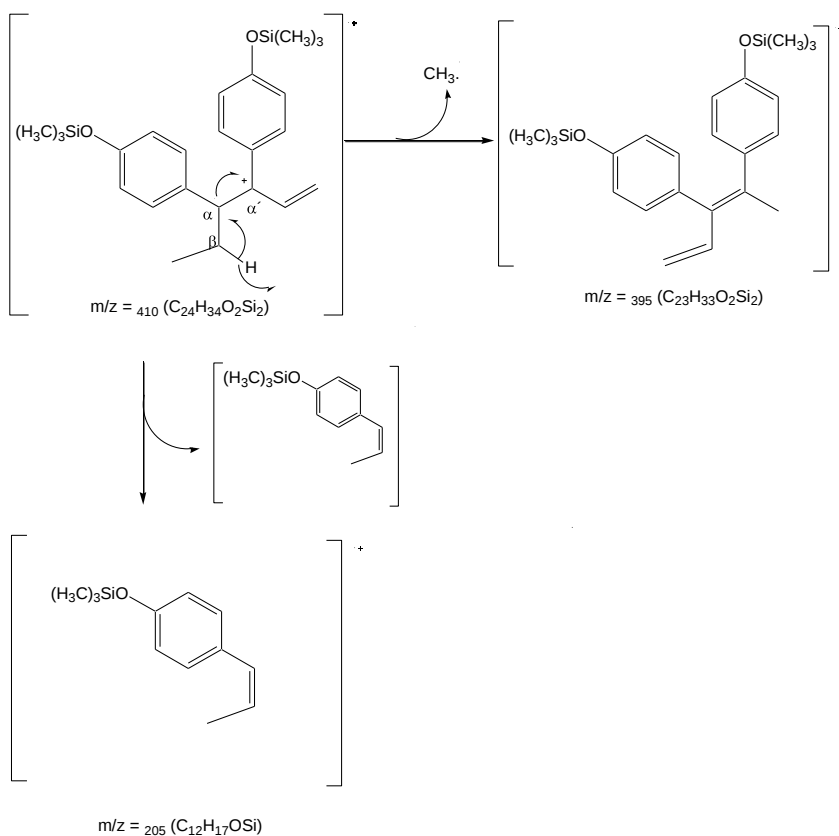
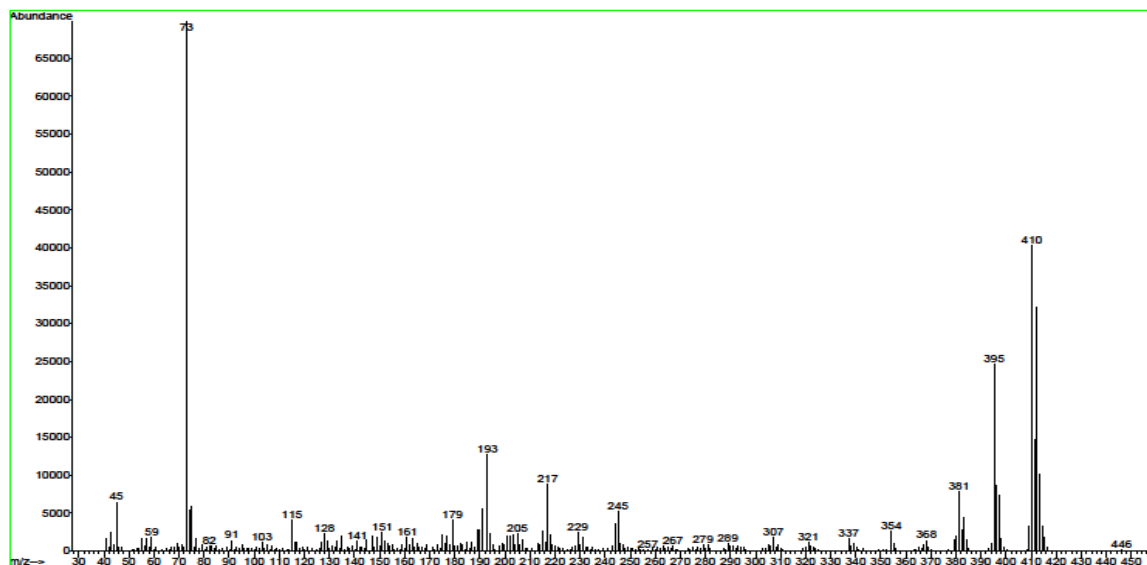


Figura 31. Espectro de masas de Dienestrol-2TMS, en modo de barrido completo y fragmentos iónicos característicos.



Figura 32. Comparación entre la información espectral en el barrido completo del Dienestrol-2TMS y la librería de espectros de la NIST.

5.2.2. HORMONAS ESTEROIDALES.

Los procesos por los que los hidrocarburos, aldehídos y cetonas esteroideas se fragmentan con frecuencia pueden ser bastante complejos y a veces no es posible predecir a priori, las rupturas de enlace de mayor prevalencia. Sin embargo, en marcado contraste, un estudio reciente del comportamiento de los estrógenos esteroides ha demostrado que la presencia de un anillo aromático en la molécula resulta consistentemente en claras divisiones de los enlaces bencílicos. Por lo tanto, existen correlaciones confiables entre la estructura y el patrón de fragmentación en esta clase de compuestos.

En la Figura 33, se muestra el espectro de masas por SCAN de la Testosterona-TMS, así como algunas fragmentaciones características. El ion molecular está presente ($m/z=360$), aunque no es el pico mas abundante, se observan las fragmentaciones típicas de los andrógenos M-15 ($m/z=345$), M-90 ($m/z=270$), y el pico base, $m/z=129$, que corresponde a la pérdida característica M-231, por ruptura del anillo D por retro Diels Alder.

Para la estrona y sus derivados, incluidos el 17β -estradiol, la mayoría de las pérdidas características del anillo aromático A de los esteroides suelen ser las que se describen en la Figura 34. Una característica sobresaliente es que el ion molecular, por lo general es el pico base en el espectro (M^+), lo que sugiere que la espectrometría de masas puede ser útil en el análisis bioquímico de estrógenos.⁶¹

La fragmentación de los estrógenos, se inicia por una ruptura bencílica inducida, con la correspondiente formación de cationes bencílicos. Por eso resulta común identificar tres picos fragmento intensos ($m/z = 160, 186$ y 199), los cuales se forman por procesos que involucran la fisión del enlace 9-11 en el ion molecular, como primera etapa, en la Figura 34, son ejemplos de esta ruptura la estructuras a, b, c, d. Posteriormente, ocurre una fragmentación inicializada por la ionización del grupo carbonilo, que cuyas estructuras corresponden a los incisos e, f, de la Figura 34.

File : D:\MSDCHEM\1\DATA\HORMONAS\HSCN027.D
 Operator : VELASQUEZ/RODRIGUEZ
 Acquired : 9 Dec 2003 20:51 using AcqMethod HORBS02
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name : 50 ppb Mix hormonas
 Misc Info : scan
 Vial Number : 1

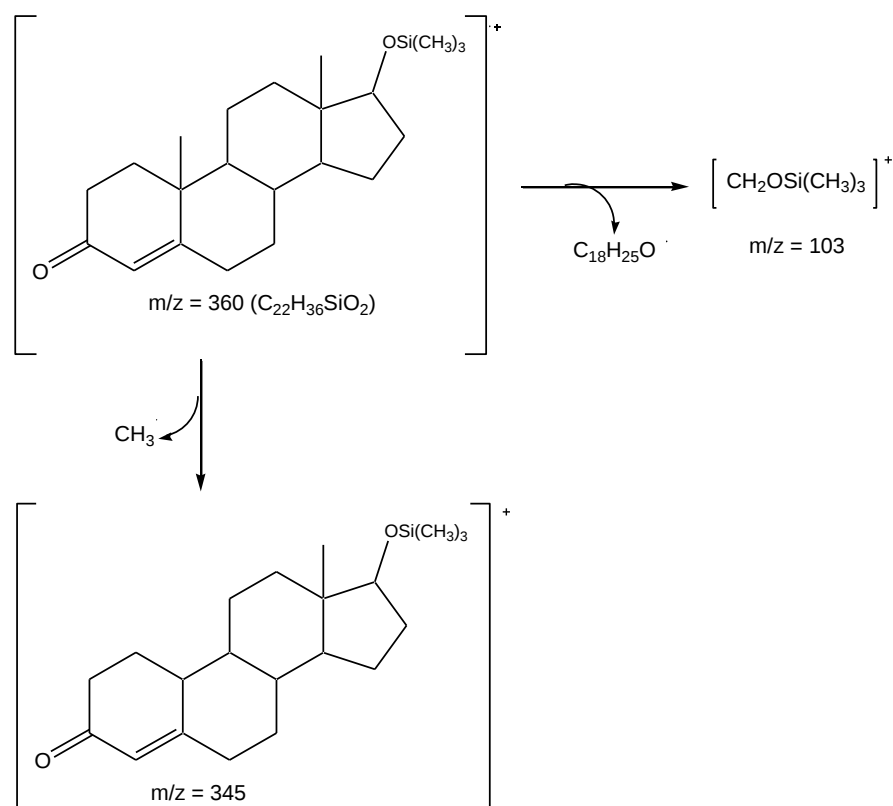
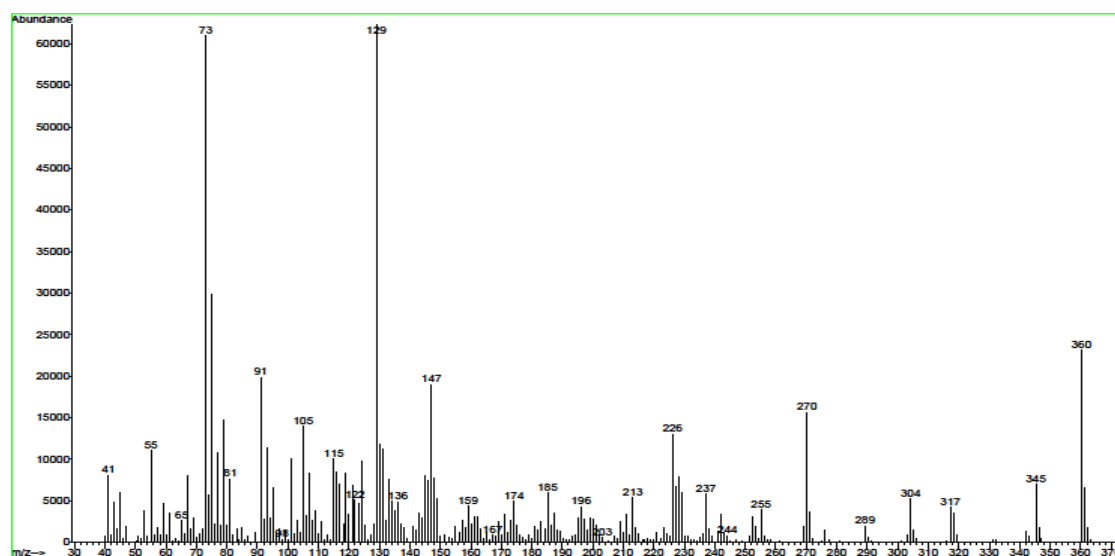


Figura 33. Espectro de masas de la Testosterona-TMS, en modo de barrido completo y fragmentos iónicos característicos.

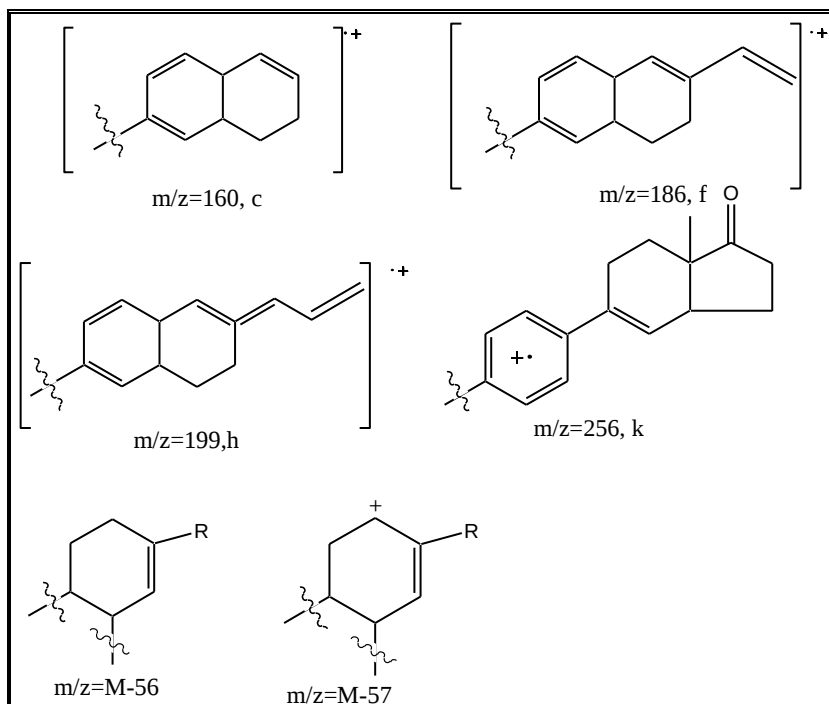


Figura 34. Fragmentaciones características de los estrógenos por ruptura bencílica y por ionización del grupo carbonilo.

En la Figura 35, se muestran algunas fragmentaciones características de la Estrona-TMS, así como el espectro de masas por SCAN. Se aprecia claramente la presencia del ion molecular m/z 342, que también es el pico base, y las pérdidas M-15, así como la $m/z=257$, típica de los estrógenos por la ruptura bencílica antes explicada.

En la Figura 36, se aprecia un análisis de repetibilidad para Estrona-TMS por SIM de 15 mediciones de una solución derivatizada a 1 ng/mL, en la cual se demuestra que los tiempos de retención son altamente reproducibles, los picos cromatográficos son estrechos y bien definidos y las áreas bajo la curva se mantienen con poca variación con respecto al tiempo, lo cual permite el estudio de la transformación de estrona-TMS a 17 β -estradiol-2TMS, en un futuro estudio metabólico.

Las rutas de fragmentación y el barrido total de iones del 17 β -estradiol-2TMS se muestran en las figuras 37 y 38, en donde se observan los mismos patrones de

fragmentación que la Estrona-TMS, $m/z=416$, pico base e ion molecular, M-15 ($m/z=401$) y M-131 ($m/z=285$).

```
File       : D:\MSDCHEM\1\DATA\HORMONAS\HSCN027.D
Operator   : VELAZQUEZ RODRIGUEZ
Acquired   : 9 Dec 2003 20:51 using AcqMethod HORBS02
Instrument  : GC/MS Ins
Sample Name: 50 ppb Mix hormonas
Misc Info  : scan
Vial Number: 1
```

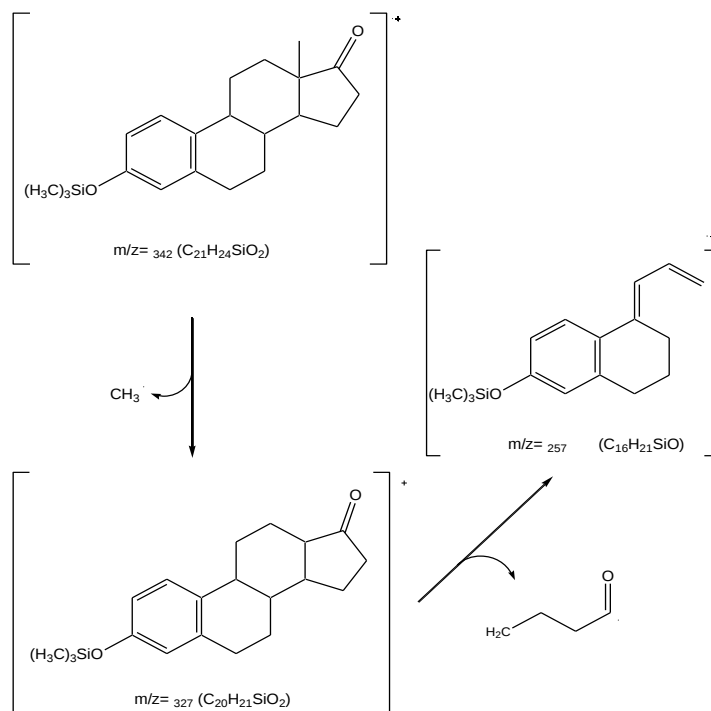
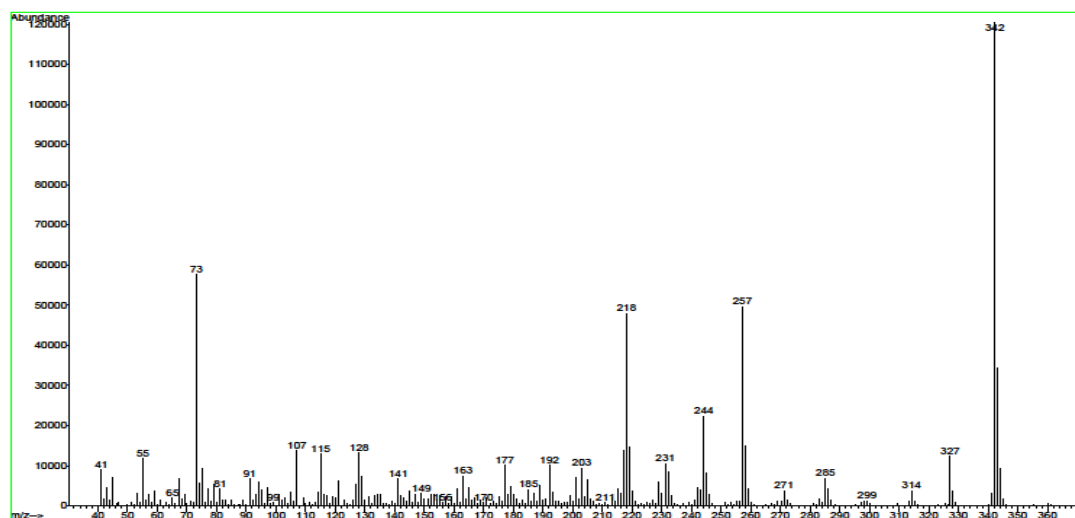


Figura 35. Espectro de masas de la Estrona-TMS, en modo de barrido completo y fragmentos iónicos característicos.

File : E:\MASAS\HPCHEM\1\DATA\HSIM004.D
 Operator : VELAZQUEZ/RODRIGUEZ
 Acquired : 11 Sep 2002 10:41 using AcqMethod HORSIM03
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name: 2.0 ppb DES, 2.0 ppb Taleranol
 Misc Info : SI: Estrona 1 ppb, zearalanona 2 ppb
 Vial Number: 2

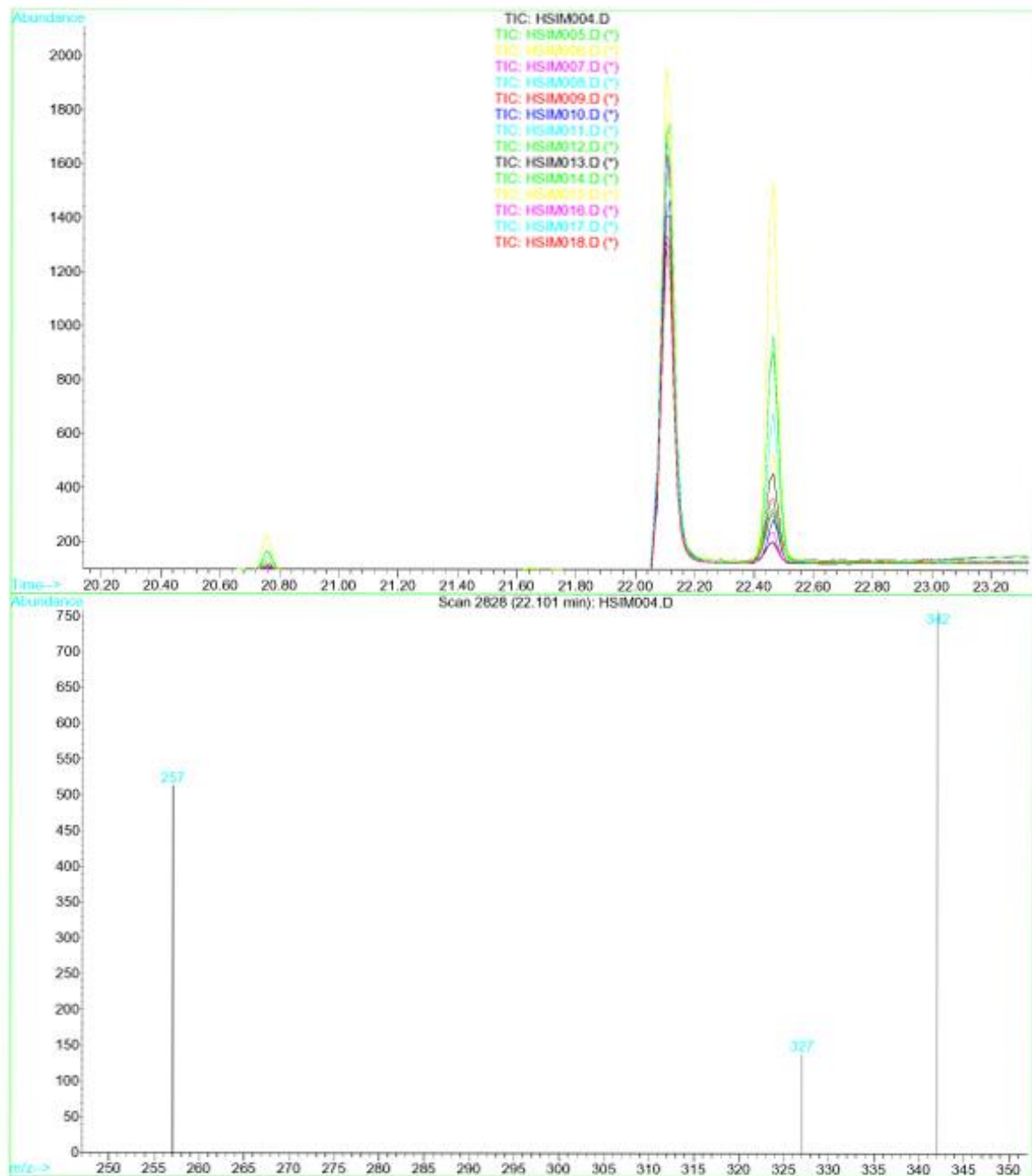


Figura 36. Espectro de masas de Estrona-TMS, en el modo SIM. Fragmentos iónicos característicos y análisis de repetibilidad.

RUTAS DE FRAGMENTACION DEL 17β-ESTRADIOL

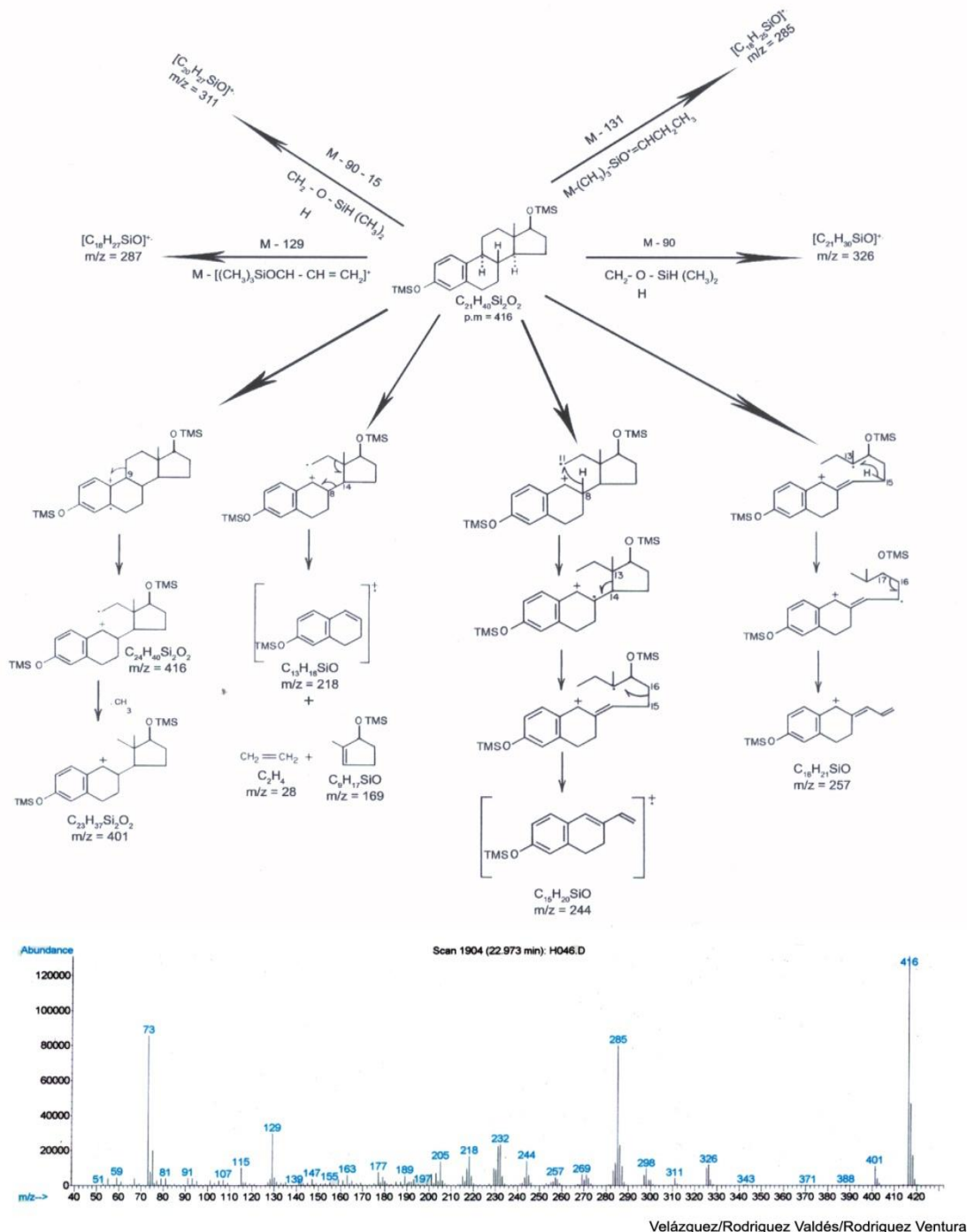


Figura 37. Espectro de masas del 17β-estradiol-2TMS, en modo de barrido completo y rutas de fragmentación características.

File : E:\MASAS\HPCHEM\1\DATA\H046.D
 Operator : VELAZQUEZ/RODRIGUEZ
 Acquired : 21 Jun 2002 13:46 using AcqMethod HORNOM01
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name: ESTEROIDES+BSTFA/TMSI
 Misc Info : prog,epitest,zer+metab,17b,DES,estrone,
 Vial Number: 2

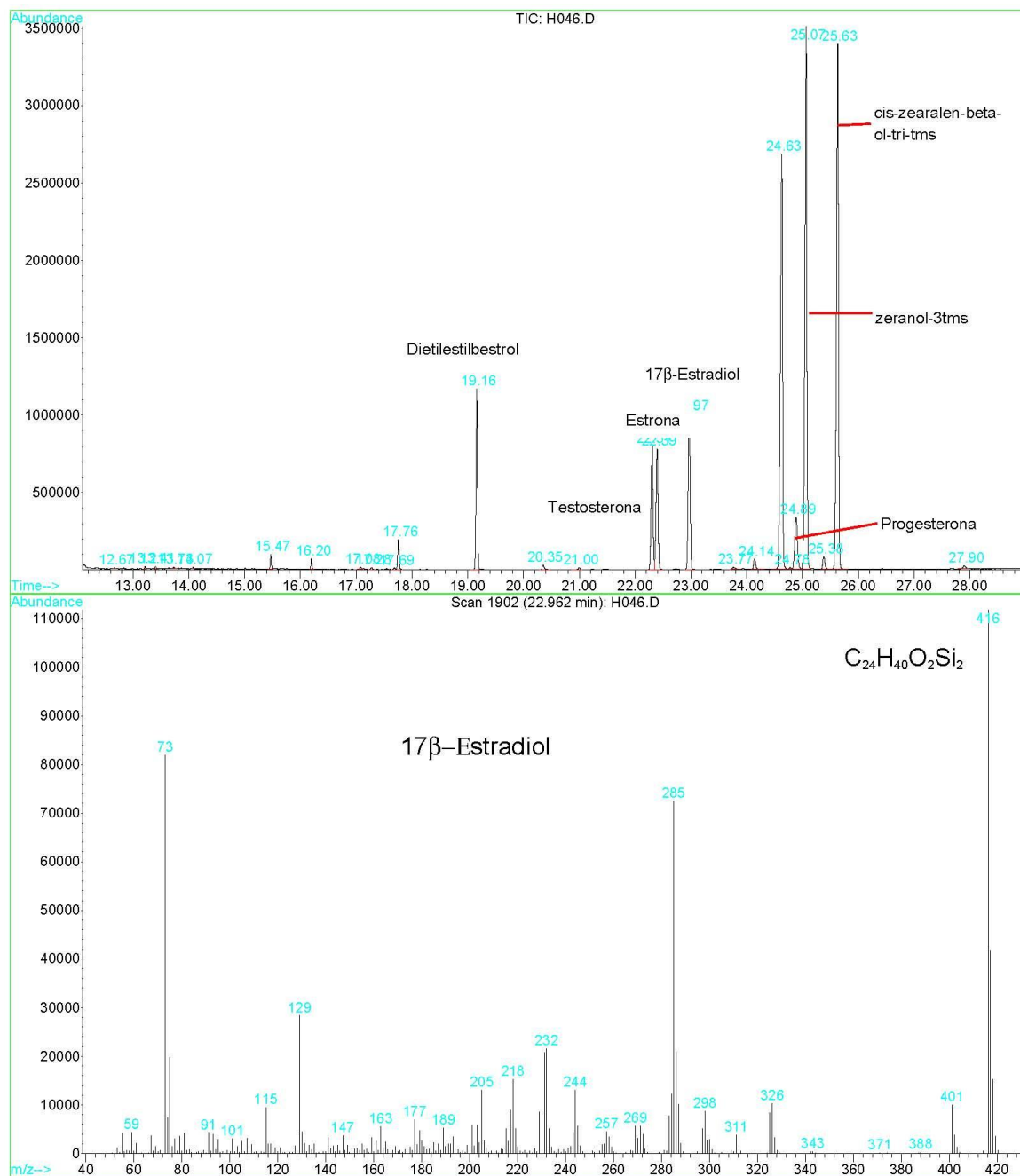
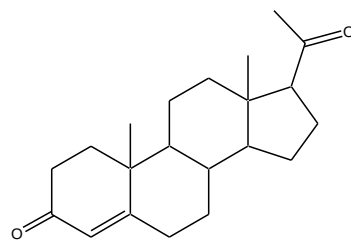
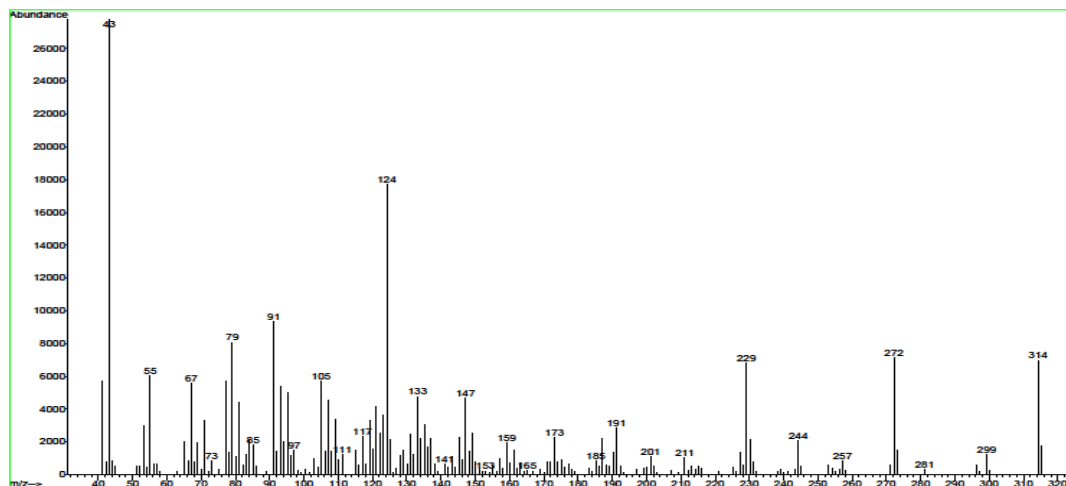
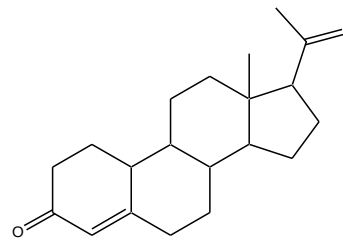


Figura 38. Espectro de masas del 17 β -estradiol-2TMS, en modo de barrido completo y fragmentos iónicos característicos.

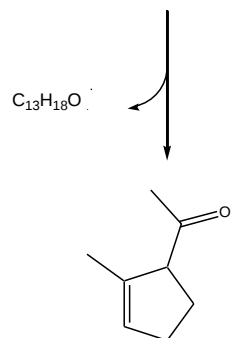
File : D:\MSDCHEM\1\DATA\HORMONAS\HSCN027.D
 Operator : VELAZQUEZ/RODRIGUEZ
 Acquired : 9 Dec 2003 20:51 using AcqMethod HORBS02
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name : 50 ppb Mix hormonas
 Misc Info : scan
 Vial Number : 1



$m/z = 314$ ($C_{21}H_{30}O_2$)



$m/z = 299$ ($C_{20}H_{27}O_2$)



$m/z = 124$ ($C_8H_{12}O$)

Figura 39. Espectro de masas de la progesterona, en modo de barrido completo y fragmentos iónicos característicos.

5.2.3. LACTONAS RESORCÍLICAS ÁCIDAS.

File : D:\MSDCHEM\1\DATA\HORMONAS\HSCN027.D
 Operator : VELAZQUEZ/RODRIGUEZ
 Acquired : 9 Dec 2003 20:51 using AcqMethod HORBS02
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name : 50 ppb Mix hormonas
 Misc Info : scan
 Vial Number : 1

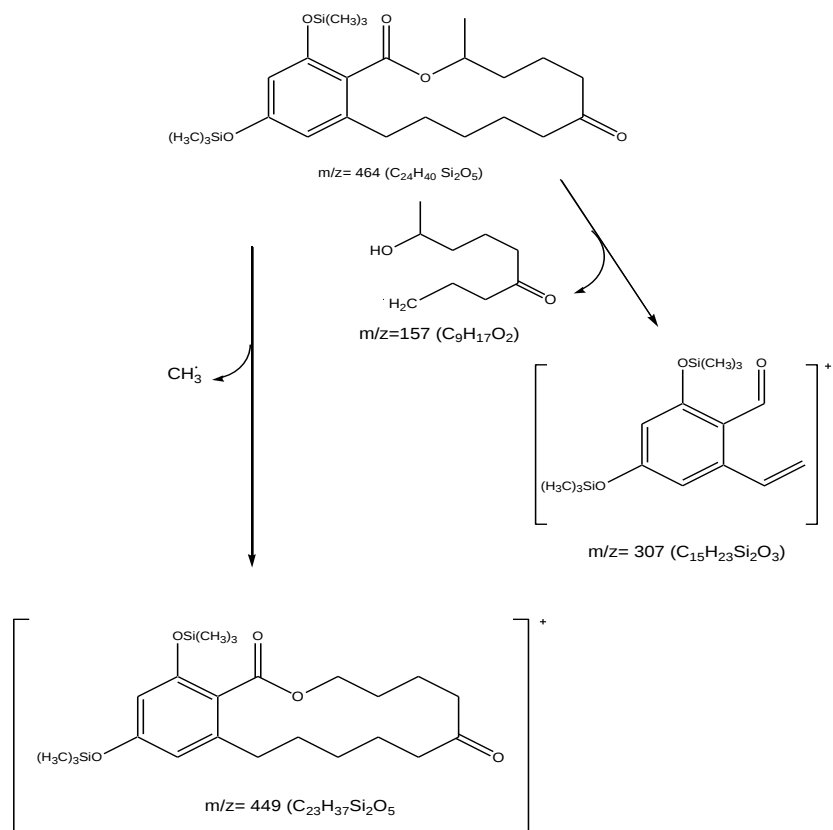
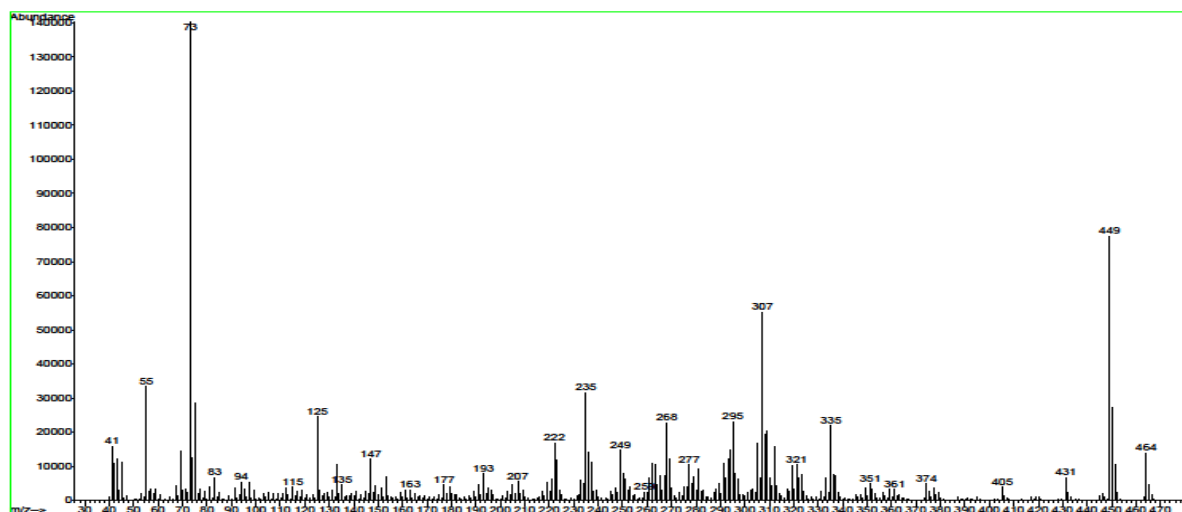


Figura 40. Espectro de masas de la Zearalanona-2TMS, en modo de barrido completo y fragmentos iónicos característicos.

File : E:\MASAS\HPCHEM\1\DATA\H046.D
 Operator : VELAZQUEZ/RODRIGUEZ
 Acquired : 21 Jun 2002 13:46 using AcqMethod HORNOM01
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name: ESTEROIDES+BSTFA/TMSI
 Misc Info : prog,epitest,zer+metab,17b,DES,estrona,
 Vial Number: 2

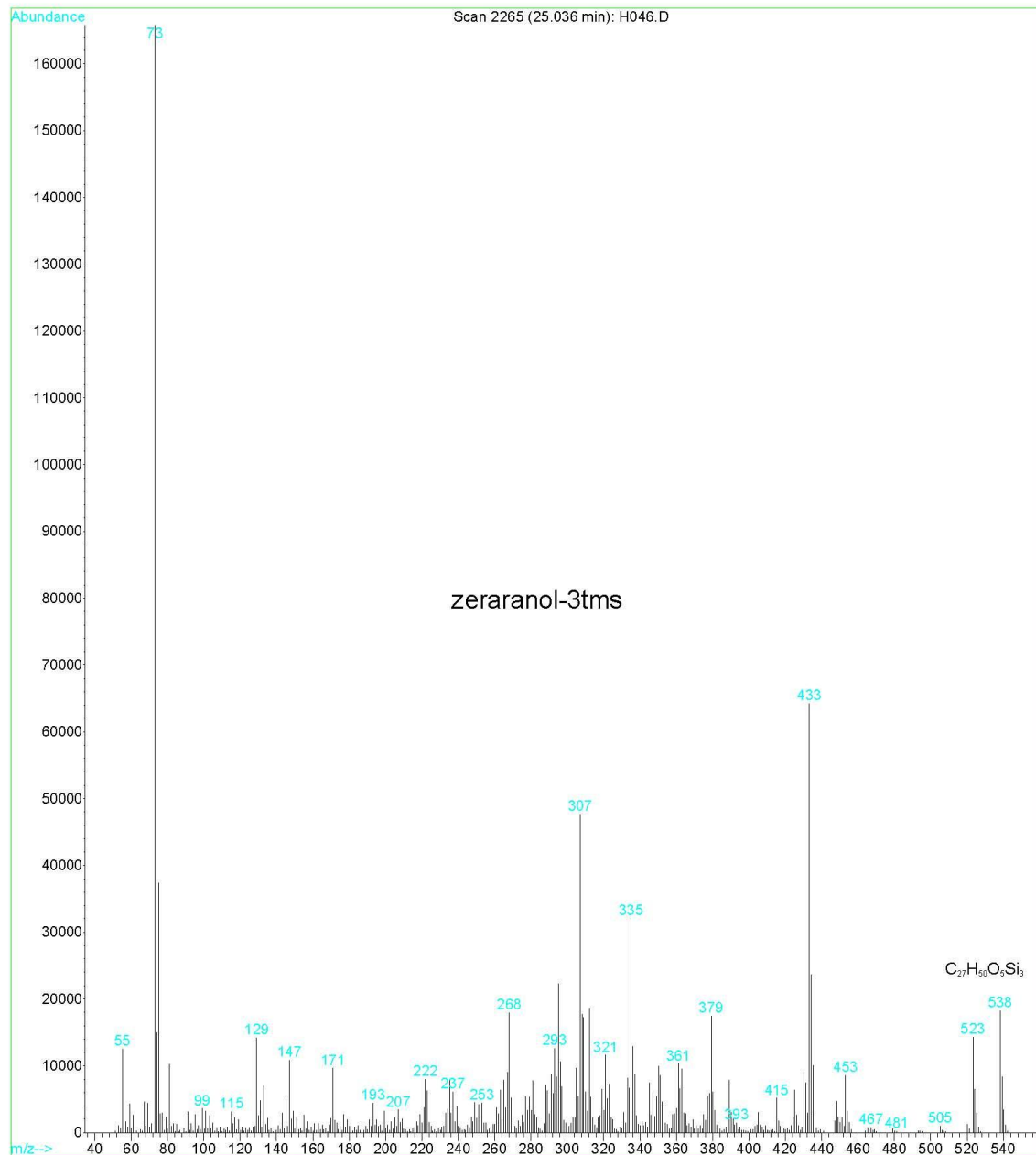


Figura 41. Barrido total de iones del α -zeارانول-3TMS (Zeranol-3TMS).

File : D:\HPCHEM\1\DATA\HSIM004.D
 Operator : VELAZQUEZ/RODRIGUEZ
 Acquired : 11 Sep 2002 10:41 using AcqMethod HORSIM03
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name: 2.0 ppb DES, 2.0 ppb Taleranol
 Misc Info : SI: Estrona 1 ppb, zearalanona 2 ppb
 Vial Number: 2

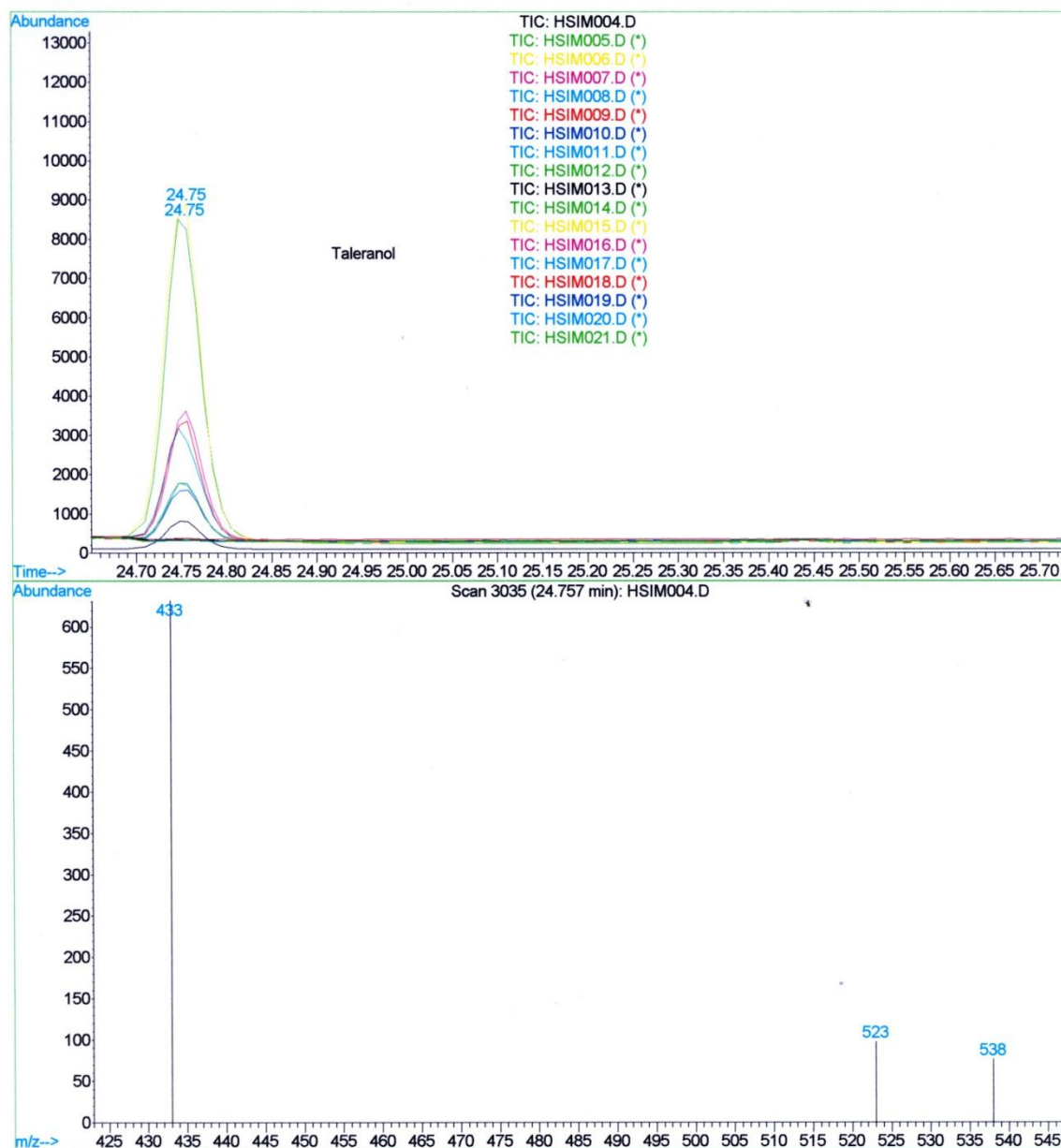


Figura 42. Espectro de masas de β -zearalanol-3TMS (Taleranol-3TMS), en modo SIM. Fragmentos iónicos característicos y análisis de repetibilidad.

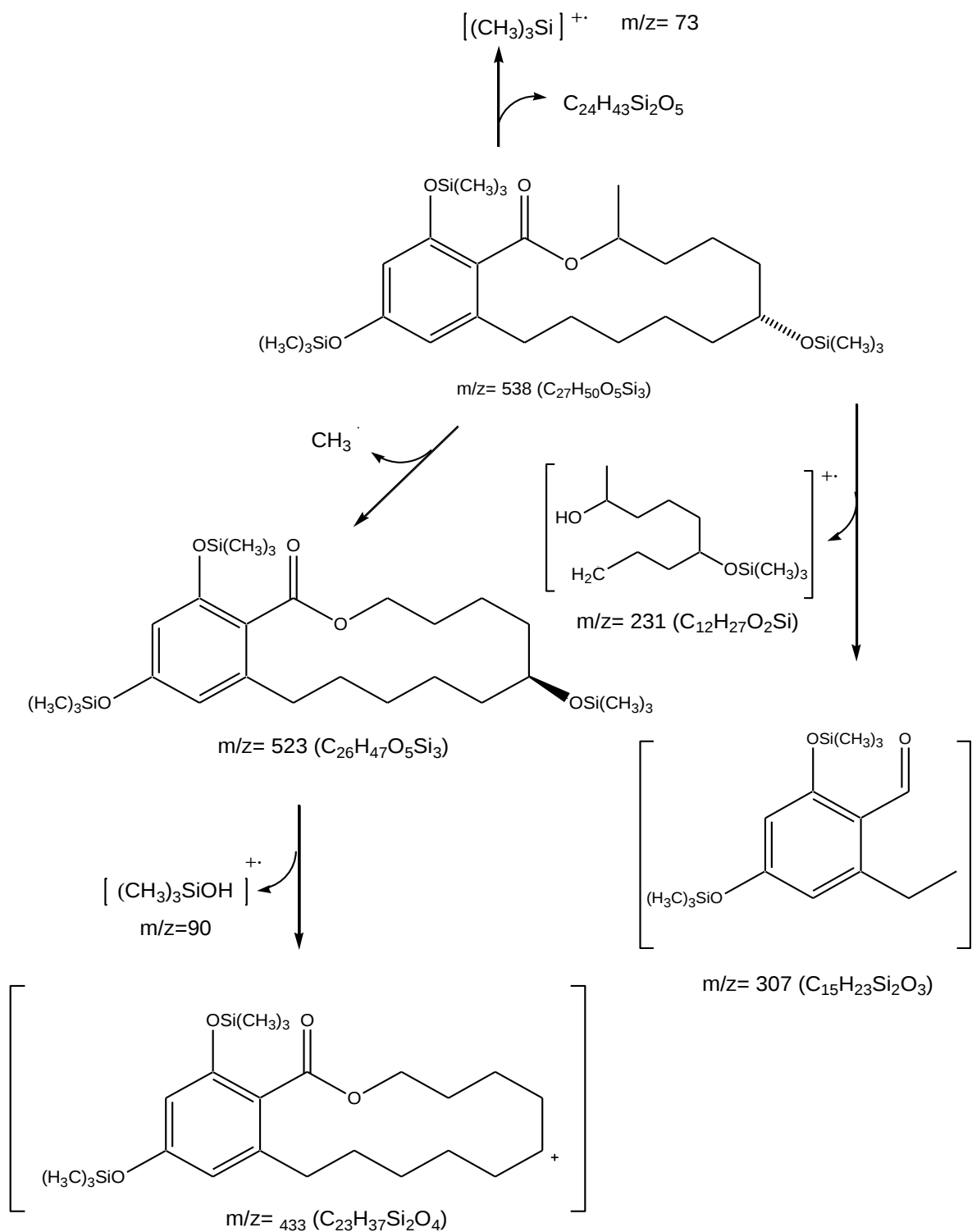


Figura 43. Patrones de fragmentación de algunas pérdidas características de la α -zearalanol-3TMS (Zeranol-3TMS) y β -zearalanol-3TMS (Taleranol-3TMS).

Library Searched : E:\MASAS\DATABASE\WILEY275.L
 Quality : 93
 ID : cis-Zearalen-.beta.-ol tri-TMS

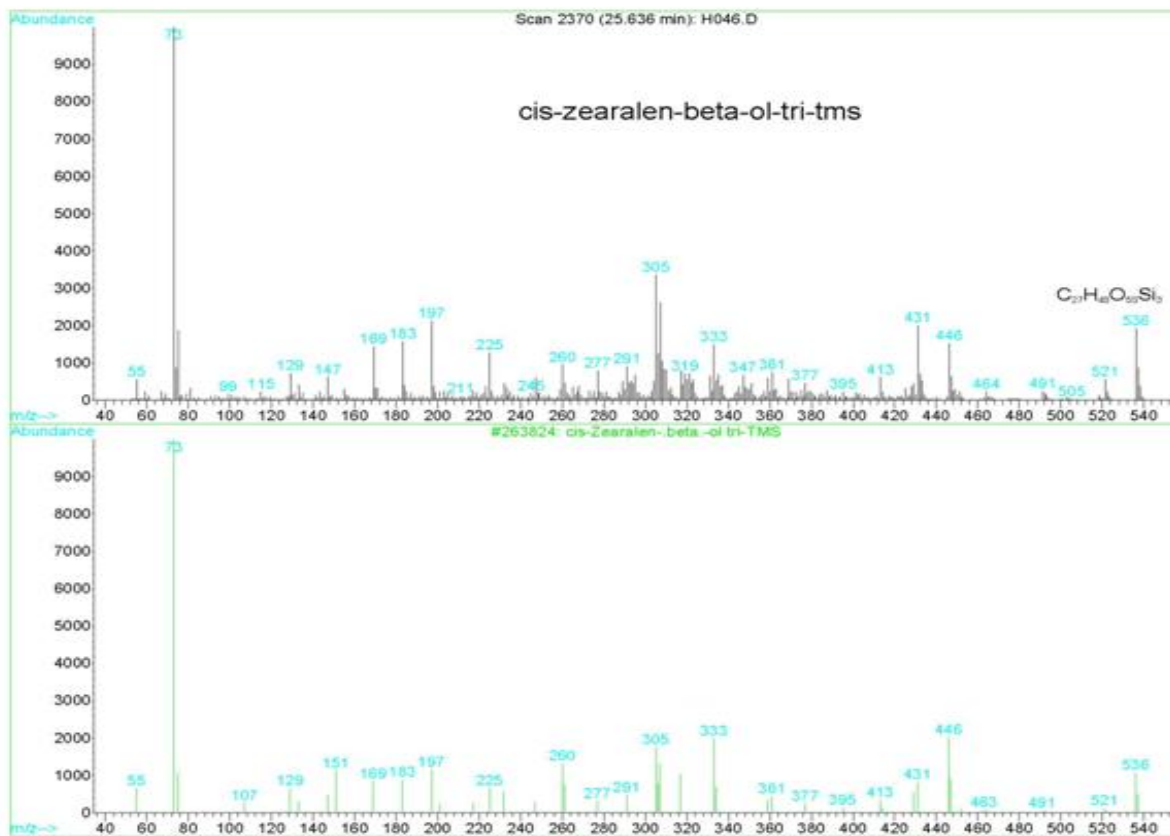


Figura 44. Comparación entre la información espectral del barrido completo del α -zearalenol-3TMS y la librería de espectros de la NIST.

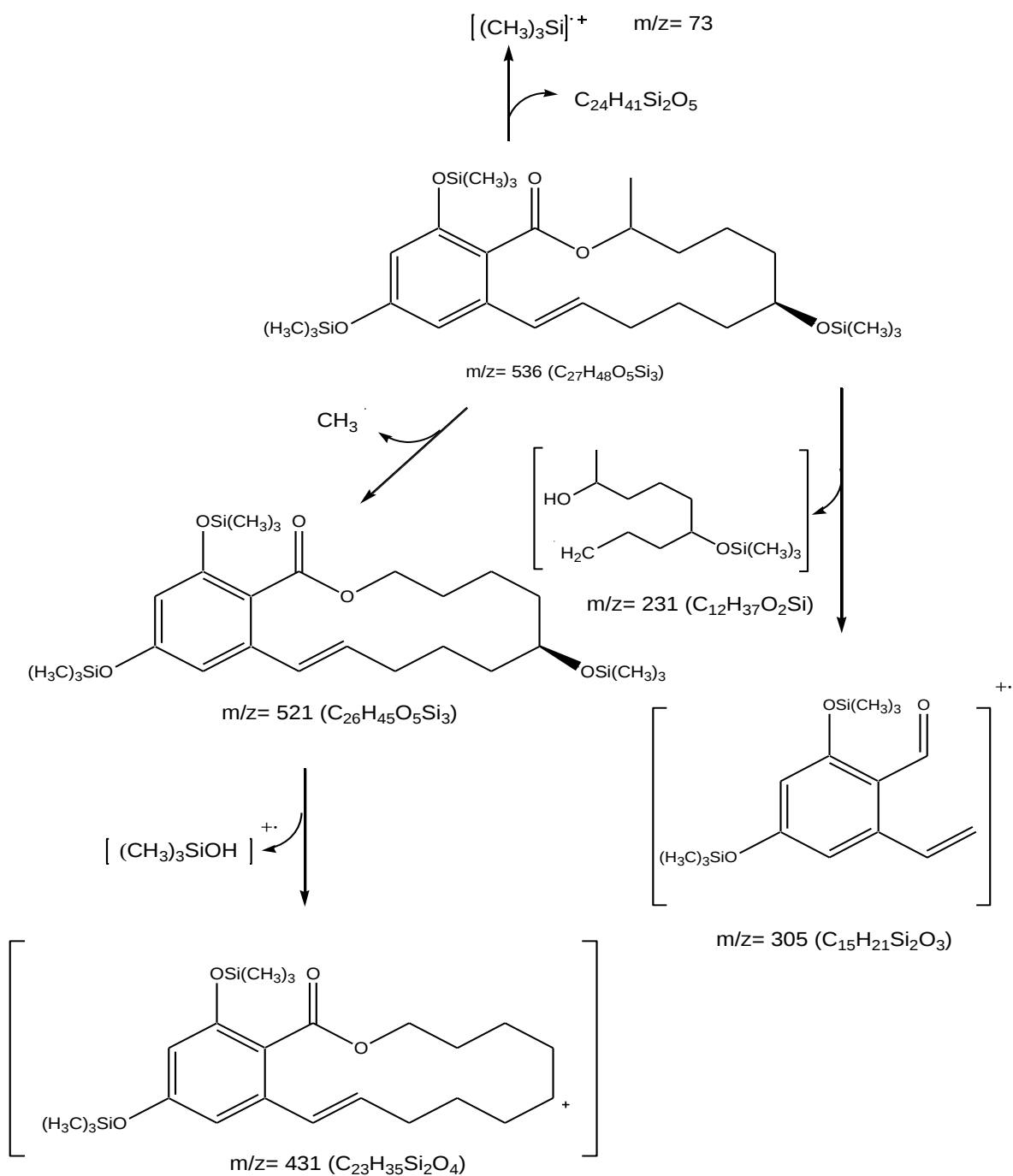


Figura 45. Patrón de fragmentación de algunas pérdidas características del α -zearalenol-3TMS.

5.3. RESULTADOS DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

En la evaluación de los parámetros de validación, se tomaron como datos las integraciones de las alturas y áreas bajo la curva de los analitos Dietilestilbestrol-2TMS (DES), α -zearalanol-3TMS (ZER) y β -zearalanol-3TMS (TAL).

5.3.1. ADECUABILIDAD DEL SISTEMA.

En esta fase se calculó la media y la desviación estándar de las señales, para posteriormente determinar el coeficiente de variación en 6 repeticiones de una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$, los resultados se muestran en la Tabla 32. De acuerdo con el criterio de aceptación para inyecciones automatizadas, el coeficiente de variación debe tener un valor menor o igual al 5%, el cual fue satisfactorio tanto para DES y TAL. En el caso del ZER, se obtuvo una variación de 5.40%, que se excede en la relación de alturas, y que puede atribuirse a la reintegración manual, ya que los picos del zeranol y del taleranol son muy cercanos. Los resultados mostraron que el método es adecuado para identificar y cuantificar satisfactoriamente la señal de concentración intermedia del rango de concentraciones de trabajo. (Ver tabla de cálculos en el anexo I).

Tabla 32. Resultados de la adecuabilidad del sistema.

Adecuabilidad del sistema			
<i>Resultados, CV%</i>			
Señal	DES	ZER	TAL
Altura	2.8396%	5.4094%	2.2506%
Área	4.4795%	3.8831%	3.0239%

5.3.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Se calculó la sensibilidad de calibración, el estimador de interferencia, el coeficiente de correlación, el coeficiente de determinación y la varianza de regresión

para obtener las desviaciones estándar de la sensibilidad y la interferencia, a tres replicas de cinco concentraciones, por tres días. Para la obtención de los resultados de la Tabla 33 se tomó el criterio de aceptar los valores menores obtenidos al comparar cada réplica, por ser estos los más indicativos de una correlación sensible y con poca interferencia del sistema. Siguiendo los criterios de la NOM-034-ZOO-1996 que establece como criterio de aceptación de la determinación una correlación de la curva estándar mayor o igual a 0.995, se tomó este valor como referencia para la aceptación de los resultados de esta fase. Los valores de los intervalos de confianza del intercepto (IC_a), intervalo de confianza de la pendiente (IC_b), además de indicar para cada anabólico validado, el coeficiente de correlación mínimo aceptado, pueden adoptarse como criterios de aceptación de correlación (resultados de las hojas de cálculo en el Anexo II).

5.3.3. PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO.

Se evaluó la relación de concentración/intensidad de la señal, de tres curvas de calibración durante tres días, convirtiendo la correlación en precisión, calculando la señal promedio de la curva, la desviación estándar ponderada y el coeficiente de variación de la curva. El criterio para tomar el valor más representativo de las tres curvas, fue considerando el coeficiente de variación mayor. En la Tabla 34 se indican los valores para cada anabólico sujeto a evaluación. Se obtuvieron coeficientes de variación para la precisión y la exactitud menores del 20%, cumpliendo con los criterios de aceptación de la fase.

Los coeficientes de variación obtenidos en esta fase, sustentan el principio del empleo del Factor de respuesta como método de cálculo para la obtención de la concentración de un compuesto, medido por espectrometría de masas en impacto electrónico, los factores de respuesta promedio podrían ser utilizados para calcular las concentraciones de los anabólicos presentes en las recuperaciones de muestras en futuras extracciones con matriz. (Resultados del Cálculo del Factor de respuesta, Anexo III)

Tabla 33. Resultados de la linealidad del sistema.

Linealidad del sistema				
<i>Pendiente de la curva de</i>	Señal	DES	ZER	TAL
<i>Regresión, b</i>	Altura	17489.8950	605.6064	743.5167
<i>(Sensibilidad de la calibración)</i>	Área	348039.6794	20332.5667	20656.5000
<i>Intercepto, a</i>	Altura	-27.4268	-59.7772	-179.3542
<i>(Estimador de interferencia)</i>	Área	1849.5218	-5140.0583	-5237.5750
<i>Coeficiente de correlación, r</i>	Altura	0.9951	0.9952	0.9948
	Área	0.9967	0.9961	0.9966
<i>Coeficiente de determinación, r²</i>	Altura	0.9903	0.9904	0.9896
	Área	0.9934	0.9922	0.9933
<i>Intervalo de confianza de la pendiente, IC_b</i>	Altura	17489.8950±395.2771	605.6064±15.9065	743.5167±11.6300
	Área	348039.6794±6463.7752	20332.5667±499.3362	20656.5000±469.7162
<i>Intervalo de confianza del intercepto, IC_a</i>	Altura	-27.4268±203.4814	-59.7772±16.4115	-179.3542±28.6354
	Área	1849.5218±3327.4319	-5140.0583±1229.4728	-5237.5750±1156.5421

Tabla 34. Resultados de la evaluación de precisión y exactitud del método. Cálculo del factor de respuesta.

Precisión y exactitud del Método (FR)				
Parámetro	Señal	DES	ZER	TAL
Factor de respuesta	Altura	5.2581×10^{-5}	1.3790×10^{-3}	1.0776×10^{-3}
promedio, FR_{prom}	Área	2.4805×10^{-6}	1.8696×10^{-5}	7.2809×10^{-6}
Desviación estándar	Altura	2.7513×10^{-6}	8.5813×10^{-5}	5.8791×10^{-5}
ponderada, $S_{ponderada}$	Área	1.2853×10^{-7}	1.0110×10^{-6}	3.6449×10^{-6}
Porcentaje del coeficiente	Altura	5.2325%	6.2230%	5.4559%
de variación, CV%	Área	5.1816%	5.4077%	5.0062%

5.3.4. REPETIBILIDAD DEL MÉTODO (FACTOR DE RESPUESTA).

Se calcularon la media aritmética de la señal, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los datos calculados por factor de respuesta obtenidos en tres curvas estándar corridas por triplicado, tomando las concentraciones baja, media y alta del rango de trabajo obtenido en la linealidad del sistema, en la Tabla 35, se muestra el resumen de los valores obtenidos. De acuerdo con el protocolo de validación del método analítico, el coeficiente de variación para la validación de repetibilidad y exactitud no debía exceder del 30%, por lo que se concluye que son satisfactorios.

Los coeficientes de variación por punto de las curvas por compuestos indican la variación de los datos para cada señal en días distintos, se concluye que la metodología de medición está dentro de los valores establecidos. (Cálculo del Factor de respuesta, Anexo IV).

Tabla 35. Resultados de la evaluación de la repetibilidad del método.

Repetibilidad del Método (Factor de respuesta)			
<i>Media aritmética de la señal</i>			
Señal	DES	DES	DES
	0.05 µg/mL	0.05 µg/mL	0.05 µg/mL
Altura	4.7074×10^{-5}	5.6060×10^{-5}	5.1744×10^{-5}
Área	2.8761×10^{-5}	3.8062×10^{-5}	3.4406×10^{-5}
	ZER	ZER	ZER
	0.1/0.25 µg/mL	0.5/1.0 µg/mL	0.5/1.0 µg/mL
Altura	1.9794×10^{-3}	1.4851×10^{-3}	1.3173×10^{-3}
Área	2.5447×10^{-5}	2.7006×10^{-5}	1.6874×10^{-5}
	TAL	TAL	TAL
	0.25 µg/mL	0.25 µg/mL	0.25 µg/mL
Altura	1.5991×10^{-3}	1.4487×10^{-3}	1.1195×10^{-3}
Área	6.2895×10^{-5}	5.3646×10^{-5}	4.1343×10^{-5}
<i>Desviación estándar ponderada de la señal, $S_{ponderada}$</i>			
	DES	DES	DES
	0.05 µg/mL	0.05 µg/mL	0.05 µg/mL
Altura	6.6709×10^{-6}	8.9301×10^{-7}	1.8310×10^{-6}
Área	1.6009×10^{-5}	2.1729×10^{-5}	1.9478×10^{-5}
	ZER	ZER	ZER
	0.1/0.25 µg/mL	0.5/1.0 µg/mL	0.5/1.0 µg/mL
Altura	3.4562×10^{-4}	2.2648×10^{-4}	1.9292×10^{-4}
Área	3.9972×10^{-6}	3.7083×10^{-6}	1.4348×10^{-6}
	TAL	TAL	TAL
	0.25 µg/mL	0.25 µg/mL	0.25 µg/mL
Altura	2.1781×10^{-4}	1.9605×10^{-4}	9.7922×10^{-5}
Área	9.9011×10^{-6}	7.3250×10^{-6}	3.2956×10^{-6}

Tabla 35. Resultados de la evaluación de la repetibilidad del método. (Continuación).

Repetibilidad del Método (Factor de respuesta)			
<i>Porcentaje del coeficiente de variación, CV%</i>			
Señal	DES	DES	DES
	0.05 µg/mL	0.05 µg/mL	0.05 µg/mL
Altura	14.1710%	1.5930%	3.5385%
Área	55.6610%	57.0873%	56.6117%
	ZER	ZER	ZER
	0.1/0.25 µg/mL	0.5/1.0 µg/mL	0.5/1.0 µg/mL
Altura	17.4612%	15.1292%	14.6448%
Área	15.7079%	13.7313%	8.5032%
	TAL	TAL	TAL
	0.25 µg/mL	0.25 µg/mL	0.25 µg/mL
Altura	13.6210%	13.5326%	8.7471%
Área	15.7423%	13.6542%	7.9715%

5.3.5. LÍMITE DE DETECCIÓN, LÍMITE DE IDENTIFICACIÓN Y LÍMITE DE DETERMINACIÓN.

Se analizaron tres curvas de calibración por triplicado. Se calcularon los parámetros correspondientes a la fase de validación, se consideró como valor más representativo para selección de los valores de aceptación los menores, ya que para el cálculo de los límites de detección, determinación e identificación se requiere que la señal de la altura crítica sea menor, pues esto indica mayor sensibilidad.

Los resultados obtenidos, proporcionaron la información acerca de la eficiencia del método con la finalidad de establecer los límites mínimos para reportar valores de concentración sin el sesgo de confundir la señal obtenida en la medición con ruido electrónico o de la matriz. (Resultados del Límite de detección, límite de identificación y límite de detección, Anexo V).

Tabla 36. Límite de detección, límite de identificación y límite de detección.

Límite de detección y cuantificación			
<i>Desviación estándar residual, S_y</i>			
Señal	DES	ZER	TAL
Altura	488.3861	42.3066	78.0161
Área	8693.7176	3636.4015	3150.9533
<i>Altura crítica de la señal, y_{crit}</i>			
	DES	ZER	TAL
Altura	1136.6033	46.5001	89.3548
Área	21956.3872	2567.1633	2012.4642
<i>Límite de detección, DTC</i>			
	DES	ZER	TAL
Altura	0.0647 $\mu\text{g/mL}$	0.1575 $\mu\text{g/mL}$	0.1694 $\mu\text{g/mL}$
Área	0.0578 $\mu\text{g/mL}$	0.3190 $\mu\text{g/mL}$	0.2972 $\mu\text{g/mL}$
<i>Límite de identificación, ID</i>			
	DES	ZER	TAL
Altura	0.1294 $\mu\text{g/mL}$	0.3149 $\mu\text{g/mL}$	0.3388 $\mu\text{g/mL}$
Área	0.1155 $\mu\text{g/mL}$	0.6381 $\mu\text{g/mL}$	0.5943 $\mu\text{g/mL}$
<i>Límite de determinación, DTM</i>			
	DES	ZER	TAL
Altura	0.2020 $\mu\text{g/mL}$	0.5185 $\mu\text{g/mL}$	0.6395 $\mu\text{g/mL}$
Área	0.1823 $\mu\text{g/mL}$	1.2981 $\mu\text{g/mL}$	1.0528 $\mu\text{g/mL}$

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

6. Conclusiones

En el desarrollo de esta Tesis de maestría se estudiaron a los compuestos silanizados de la familias de los estilbenos: Dietilestilbestrol, Hexestrol, Dienestrol; las hormonas esteroidales Estrona, 17b-estradiol, Progesterona y Testosterona y lactonas resorcílicas ácidas a-zearalanol, b zearalanol, zearalanona y a-zeralenol, cuyos los derivados silanizados con la mezcla de BSTFA/TMSI, fueron más estables térmicamente, al llevarse la reacción en el PTV, en un programa de calentamiento que logró una reacción completa, sin degradación ni pérdida de los analitos y con alta reproducibilidad, con resultados que cuando la reacción se lleva a cabo en los bloques de calentamiento externos, fuera del sistema de cromatografía gaseosa/espectrometría de masas.

Para el caso del DES, la diferencia en la información espectral encontrada fue muy significativa comparada con el espectro de masas de la NIST (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library with Search Program of The National Institute of Standards and Technologies) del ion molecular. Este mejoramiento conlleva a lograr límites de detección y cuantificación más bajos que los exigidos en la NOM-034-ZOO-1994.

La configuración sencilla con un cuadrupolo y el apoyo del inyector de vaporización con temperatura programable, fue capaz de llevar a este sistema a valores de detección y de cuantificación similares a los que se alcanzan con sistemas de alta resolución como GC/MS/MS y LC/MS.

El método que se propone derivatiza a estas familias de compuestos en el PTV en el modo PTV venteo de solventes, cuya función principal es lograr la estabilidad térmica de las moléculas y disminuir los pasos de tratamiento de la

muestra eliminando en el inyector el exceso de solventes y reactivos derivatizantes, así como de sustancias volátiles que se coextraen de las matrices, auxiliados con el programa de temperatura del inyector.

Los Límites de detección y cuantificación cumplen con las exigencias de la NOM, USDA-FSIS y la Unión Europea, al ser considerados los rangos de trabajo y los límites mínimos de funcionamiento exigido, para los residuos de compuestos anabólicos.

Las estructuras formadas de los derivados con la mezcla BSTFA/TMSI, tuvieron %CV menores del 30%, obteniéndose picos con una distribución normal evaluadas en diferentes días bajo diferentes condiciones.

La validación del método, se basó en el protocolo de validación P-VAL-TA del laboratorio de Toxicología Analítica, de la UABC, evaluándose los parámetros adecuabilidad, linealidad, repetibilidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de identificación y límite de determinación, los cuales cumplen con los criterios de aceptación de cada una de las etapas de validación, y con los requerimientos de la SENASICA-SAGARPA.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

7. RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con los protocolos de validación para los compuestos anabólicos identificados por el método.

Aplicar este método al estudio de residuos anabólicos en matrices biológicas y ambientales.

Estudiar la factibilidad de transferir el método a un sistema GC/MS con trampa iónica.

Profundizar los estudios de estabilidad de las familias de estos compuestos para su optimización en el puerto de inyección.

REFERENCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS

1. Sanchez Malagón, J. M. Contaminación y residuos tóxicos en la carne de bovinos en México. Available from URL: <http://www.cddhcu.gob.mx/camdip/comlvii/comeco/foro3/residuos.htm>
2. Torrano M. V. Cesar. Moduladores de crecimiento y control parasitario para incrementar la ganancia de peso. XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal, ULA –Trujillo. 2002.
3. Cardona, Iván; Sanclemente, Luis. Acción del undecilato de Boldenona (equipoise) mas un implante de estradiol-progesterona (Ganamax-m) en la ceba de novillos cebú comercial. Tesis. Universidad Nacional Sede Palmira. 1986.
4. Sathiah, A. Expertos en Salud de la UE han dicho que una hormona en ganado procedente de EEUU provoca cáncer. Associated Press. Bruselas, Bélgica, Mayo 03, 1999. Available from URL: <http://www.animalfreedom.org/espagnol/>
5. Montague, P. La Mala Semilla. Revista Electrónica Salud y Medio Ambiente No. 666. Septiembre 02, 1999. Available from URL: <http://biodiversidad.8m.com/documents14.html>
6. Norma Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994. Control de residuos tóxicos en carne, grasa, hígado y riñón de bovinos, equinos, porcinos y ovinos. Publicado por el Diario Oficial de la Federación. Noviembre 02, 1994.
7. Rosenstein, Emilio. Prontuario de especialidades veterinarias: farmacéuticas, biológicas y nutricionales. 18ª. Edición. Editorial. Thompson PLM. México, 1998.
8. Norma Oficial Mexicana NOM-064-ZOO-2000. Lineamientos para la clasificación y prescripción de los productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos. Publicado por el Diario Oficial de la Federación. Julio 13, 2004.
9. Norma Oficial Mexicana NOM-034-ZOO-1996. Determinación de Dietilestilbestrol, Zeranol y Taleranol en hígado y músculo de bovinos, equinos, porcinos, ovinos, aves, caprinos y cérvidos por cromatografía de gases-Espectrometría de masas. Publicado por el Diario Oficial de la Federación. Febrero 27, 1996.

10. Sanz Pérez Bernabé, López Lorenzo Pascual. Salud Humana y xenobióticos animales. Monografía XI. La Salud Prioridad en el VI Programa del Medio Ambiente de la Unión Europea. España. 2002.
11. INPPAZ OPS/OMS. Los principales residuos tóxicos. Anabólicos. 2001. Available from URL: <http://www.inppaz.org.ar/MENUPAL/paseo/lir/residuos/prresqui.htm>
12. Spotorino, Viviana G. Anabólicos en producción de carnes. Seguridad Alimentaria. Instituto Tecnología de Alimentos, INTA Castelar. Procesamiento y calidad de producto. IDIA XXI. pp. 175-179.
13. Running substance profiles. Diethylstilbestrol. First Listed in the First Annual Report on Carcinogens (1980). National Toxicology Program (NTP), United States. <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/eleventh/profiles/so71diet.pdf>
14. Kalyanaraman B., Sealy Roger C., Liehr Joachim G. Characterization of semiquinone free radicals formed from Stilbene Cathecol Estrogens. An ESR Spin Stabilization and spin trapping study. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 264. No. 19. July 5th, 1989. p.p. 11014-11019. USA.
15. Korach Kenneth S., Chaelun Levy Louis A, Duax William L. Sarver Pamela J. Diethylstilbestrol. Metabolites and analogs. Stereochemical probes for the estrogen receptor binding site. The Journal of Biological Chemistry. Vol 264, No.10. Issue April, 5th, 1989. pp. 5642-5647. USA.
16. INCHEM. OESTROGENS, NONSTEROIDAL (GROUP 1). Available from URL: <http://www.inchem.org/documents/iarc/iarc/iarc927.htm>
17. Deodutta Roy, Liehr, Joachim G. Temporary encrease in renal reductase activity induced by chronic administration of Estradiol to male Syrian Hamsters. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 263, No. 8. March 15th, 1988. pp. 3646~3651. USA.
18. Liehr JG, Ballatore AM, Dague BB, Ulubelen AA. Carcinogenicity and metabolic activation of hexestrol. Chem Biol Interact. 1985;55:157-76.
19. Haaf H, Metzler M. *In vitro* metabolism of diethylstilbestrol by hepatic, renal and uterine microsomes of rats and hamsters. Effects of difference inducers. Biochem Pharmacol. 1985;34:3107-15.

20. Blaich G, Gottlicher M, Cikryt P, Metzler M. Effects of various inducers on diethylstilbestrol metabolism, drug-metabolizing enzyme activities and the aromatic hydrocarbon (Ah) receptor in male Syrian golden hamster liver. *J Steroid Biochem.* 1990;35:201–4.
21. Metzler M, McLachlan JA. Oxidative metabolism of the synthetic estrogens hexestrol and dienestrol indicates reactive intermediates. *Adv Exp Med Biol.* 1981;136 Pt A:829–37.
22. Cavalieri, Ercole; Frenkel, Krystyna; Liehr, Joachim G.; Rogan, Eleanor; Roy, Deodutta. Chapter 4: Estrogens as Endogenous Genotoxic Agents—DNA Adducts and Mutations. [Journal of the National Cancer Institute Monographs. Volume 2000, Number 27](#), pp. 75-94. [Oxford Journals](#)
23. Jan ST, Devanesan PD, Stack DE, Ramanathan R, Byun J, Gross ML, et al. Metabolic activation and formation of DNA adducts of hexestrol, a synthetic nonsteroidal carcinogenic estrogen. *Chem Res Toxicol.* 1998;11:412–9.
24. Liehr JG, Ballatore AM, Dague BB, Ulubelen AA. Carcinogenicity and metabolic activation of hexestrol. *Chem Biol Interact.* 1985;55:157–76.
25. Lenhinger, Albert L. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función molecular. Segunda Edición. Ed. Omega. Barcelona. 1985.
26. Leighton J., Franceschi S., Boorman G., Gaylor D.W., McLean J.G. Estradiol-17 β , Progesterone, and Testosterone. Production Aids. First draft. International Programme on Chemical Safety/World Health Organization. Toxicological Evaluation of Certain Veterinary Drug Residues in Food. WHO Food Additives Series: 43. Fifty-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva, 2000.
27. Hartmann, Niccolo; Erbs Marianne; Wettstein, Felix E; Schwarzenbach, René P, Bucheli, Thomas D. Quantification of estrogenic mycotoxins at the ng/L level in aqueous environmental samples using deuterated internal standards. *Journal of Chromatography A.* [Volume 1138, Issues 1-2](#), pp.132-140. 5 January 2007.
28. Takahashi-Ando Naoko, Ohsato Shuichi, Shibata Takehiko, Hamamoto Hiroshi, Yamaguchi Isamu, Kimura Makoto. Metabolism of Zearalenone by Genetically Modified Organisms Expressing the Detoxification Gene from *Clonostachys*

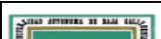
- rosea*. Applied and Environmental Microbiology. June 2004, pp. 3239-3245, Vol. 70, No. 6.
29. Le Guevel, Rémy; Pakdel, Farzad. Assessment of oestrogenic potency of chemicals used as growth promoter by in-vitro methods. Human Reproduction. 2001. Vol. 6. No. 5, pp. 1030~1036.
 30. OEI, Anabólicos en Producción Pecuaria Aspectos de salud pública: métodos de análisis y reglamentaciones. Simposio celebrado en la OEI. París, 15-17 de Febrero. 1983.
 31. Hanrahan, C. E. Carne tratada con hormonas. Prueba de las normas mundiales de seguridad alimentaria. Junio. 1996. Publicación electrónica de USIS. I:6.
 32. Food Safety and Inspection Service, Science FSIS-USDA. Determination and confirmation of Diethylstilbestrol/zeranol/Taleranol in Bovine and Ovine Tissues. Chemistry Laboratory Guidebook. Analytical Chemistry Laboratory Guidebook Residue Chemistry. 1991. United States Department of Agriculture. United States.
 33. Cunniff, J., Tiller, P., Land, A., Wakefield, M. Quantitative Analysis of Steroids in Complex Matrices by LC/MS/MS. Finnigan. Application Report # 250. Publication number CS #96-021/7-96. 1996.
 34. Brittain, R. D., Goodridge, R., Ehorn, C. Determination of Estradiol in Blood by GC/MSMS. Varian, Inc. GC/MS Application Note Number 46. 1992. Available from URL: <http://www.varianinc.com/csb/gcmsnote/gcms.html>
 35. Fang, X., Chen, J., Guo, D., Wang, G. Detection and Identification of Zeranol in Chicken or Rabbit Liver by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry. Journal of AOAC International. 2002. 85(4) 841-848.
 36. Daeseleire E., Vandeputte R., Van Peteghem C. Validation of multi-residue methods for the detection of anabolic steroids by GC-MS in muscle tissues and urine samples from cattle. Analyst. 1998. 123, 2595-2598.
 37. Stolker A. A. M., Stephany R. W., van Ginkel L. A. Identification of residues by LC/MS, the application of new EU guidelines. Analusis. 28, 947-951 (2000).

38. CLG-AGON1.02. Identification of beta-agonists by HPLC/MS/MS. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Services. 2007. 1-26.
39. Fedeniuk R. W., West M., Gedir R., Mizuno M., Neiser C., MacNeil J. D. Alternative methodology for the analysis of progesterone, testosterone and epitestosterone in bovine liver and veal muscle. AOAC International. 2006. 89 (2) 576-585.
40. Dickson L. C., MacNeil J. D., Reid J. Fesser C. E. A. (2003). Validation of screening method for residues of Diethylstilbestrol, Dienestrol, Hexestrol and Zeranol in bovine urine using Immunoaffinity Chromatography and gas Chromatography/mass spectrometry. Journal of AOAC International. 86, 4:631-639.
41. Aman C.S., Pastor A., Cighetti G., de la Guardia M. (2006). Development of a multianalyte method for the determination of anabolic hormones in bovine urine by isotope-dilution GC-MS/MS. Analytical & Bioanalytical Chemistry. 386:1869-1879.
42. Blokland M. H., Sterk S. S., Stephany R. W., Launay F. M., Kennedy D. G., van Ginkel L. A. (2006). Determination of resorcylic acid lactones in biological samples by GC-MS. Discrimination between illegal use and contamination with fusarium toxins. Analytical & Bioanalytical Chemistry. 384:1221-1227.
43. Stolker A. A. M., Linders S. H. M. A., van Ginkel L. A. Brinkman U. A. T. (2004). Application of the revised EU criteria for the contamination of anabolic steroids in meat using GC-MS. Analytical & Bioanalytical Chemistry. 378:1313-1321.
44. Wilson, B., Wylie, P. L., Klee, M. S. Large Volume Injection for Gas Chromatography using a PTV Inlet. Agilent Technologies, Inc. Gas Chromatography Application Note. 1997.
45. Wylie, P. L. Trace Level Pesticide Analysis by GC/MS Using Large-Volume Injection. Agilent Technologies, Inc. Gas Chromatography Application Note. 1997.
46. Supelco Guide to Derivatization Reagents for GC. Bulletin 909A. Sigma-Aldrich Co. Publication number T196909A. 1997.

47. Agilent Technologies. Steroid-TMS Derivatives with the Ultra-Low-Bleed HP-5MS. 1999. Available from URL: <http://www.chem.agilent.com/cag/peak3-9/article13.html>
48. Knapp. D. R. HandBook of Analytical Derivatization Reactions. John Wiley and Sons. New York. 1979. pp. 8-10.
49. Skoog, Douglas A., Holler, James F., Nieman Timothy A. Principios de Análisis Instrumental. Mc. Graw Hill. 5ta. Ed. pp. 759.
50. Centro Nacional de Metrología. “Guía Técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplean las técnicas de cromatografía de gases (CG) y cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). 2004. pp. 8-9.
51. Agilent Technologies Inc. Agilent 6890N GC User Information – Spanish. G1530-90210. pp.382, 385, 409-421.
52. Message, Gordon M. 1984. Practical aspects of gas chromatography/mass spectrometry. Ed John Wiley & Sons. pp. 79-88.
53. Fluka Chemie AG. Silylating Agents. ISBN 3-905617-07-2. Switzerland. 1995. pp. 11-13.
54. Supelco. BSTFA. Product Specification. Hoja de especificación de producto T496020B. Sigma-Aldrich Co. 1997.
55. Supelco. TMSI. Product Specification. Hoja de especificación de producto T496029A. Sigma-Aldrich Co. 1997.
56. Comision del Codex Alimentarius. CL1998/42-MAS. Validación Interna de Métodos. FAO-OMS. pp.49-51.
57. ISO/IEC Guide 43-1:1997 (E). Proficiency Testing by Interlaboratory Comparisons –Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes. 1997.
58. M. Thompson S.L.R. Ellison and R. Wood. Harmonized Guidelines for single-laboratory validation of method of analysis. Pure Appl. Chem. 74 (5) 835-855 (2002).
59. Entidad Mexicana de Acreditación, a. c. MP-FE005-05. Manual de procedimientos. Criterios de aplicación de la Norma NMX-EC-17025-IMNC-2006/ISO/IEC 17025:2005. Efectividad 2010-07-01- pp. 16-17.

60. CLG-ANA.02. Determination and confirmation of Diethylstilbestrol (DES) and Zeranól by GC/MS. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Services. 2004. 1-20.
61. Budzikiewicz H., Djerassi C., Williams D. H. Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry. Steroids, Terpenoids, Sugars. Holden Day. New York. 1964. (2). pp. 50-57.

ANEXO I. ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA ADECUABILIDAD DEL SISTEMA (ESPECTROMETRIA DE MASAS) DES, ION 412 1 ng/mL, SIM	
---	--	---

Data File	Conc, ng/mL x	Tr y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORM17.D	1	18.296	-8.3333E-04	6.9444E-07
VHORM18.D	1	18.296	-8.3333E-04	6.9444E-07
VHORM19.D	1	18.297	1.6667E-04	2.7778E-08
VHORM20.D	1	18.297	1.6667E-04	2.7778E-08
VHORM21.D	1	18.298	1.6667E-03	1.3611E-06
VHORM22.D	1	18.297	1.6667E-04	2.7778E-08
		$\Sigma = 109.7810$	$\Sigma =$	2.8333E-06

n =	6
$\bar{y} =$	18.2968
s =	0.0008
CV% =	0.0041

Data File	Conc, ng/mL x	Ancho y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORM17.D	1	0.030	-0.0013	1.7778E-06
VHORM18.D	1	0.031	-0.0003	1.1111E-07
VHORM19.D	1	0.031	-0.0003	1.1111E-07
VHORM20.D	1	0.031	-0.0003	1.1111E-07
VHORM21.D	1	0.032	0.0007	4.4444E-07
VHORM22.D	1	0.033	0.0017	2.7778E-06
		$\Sigma = 0.188$	$\Sigma =$	5.3333E-06

n =	6
$\bar{y} =$	0.0313
s =	0.0010
CV% =	3.2962

Data File	Conc, ng/mL x	Area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORM17.D	1	333802	-10328.6667	106681355.1111
VHORM18.D	1	343057	-1073.6667	1152760.1111
VHORM19.D	1	320315	-23815.6667	567185978.7778
VHORM20.D	1	348724	4593.3333	21098711.1111
VHORM21.D	1	362843	18712.3333	350151418.7778
VHORM22.D	1	356043	11912.3333	141903685.4444
		$\Sigma = 2064784$	$\Sigma =$	1.1882E+09

n =	6
$\bar{y} =$	344130.6667
s =	15415.4073
CV% =	4.4795

Data File	Conc, ng/mL x	Altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORM17.D	1	17020	160.1667	25653.3611
VHORM18.D	1	17165	305.1667	93126.6944
VHORM19.D	1	15930	-929.8333	864590.0278
VHORM20.D	1	16840	-19.8333	393.3611
VHORM21.D	1	17252	392.1667	153794.6944
VHORM22.D	1	16952	92.1667	8494.6944
		$\Sigma = 101159.00$	$\Sigma =$	1146052.8333

n =	6
$\bar{y} =$	16859.8333
s =	478.7594
CV% =	2.8396



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA
ADECUABILIDAD DEL SISTEMA (ESPECTROMETRIA DE MASAS)
ZERANOL, ION 538
1 ng/mL, SIM



Data File	Conc, ng/mL x	Tr y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORSM17.D	1	23.705	0.0060	3.6000E-05
VHORSM18.D	1	23.695	-0.0040	1.6000E-05
VHORSM19.D	1	23.698	-0.0010	1.0000E-06
VHORSM20.D	1	23.694	-0.0050	2.5000E-05
VHORSM21.D	1	23.702	0.0030	9.0000E-06
VHORSM22.D	1	23.700	0.0010	1.0000E-06
		$\Sigma =$ 142.194	$\Sigma =$ 8.8000E-05	

n =	6
$\bar{y}$ =	23.6990
s =	0.0042
CV% =	0.0177

Data File	Conc, ng/mL x	Area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORSM17.D	1	19616	-1105	1221025
VHORSM18.D	1	20486	-235	55225
VHORSM19.D	1	20121	-600	360000
VHORSM20.D	1	20994	273	74529
VHORSM21.D	1	21293	572	327184
VHORSM22.D	1	21816	1095	1199025
		$\Sigma =$ 124326	$\Sigma =$ 3236988	

n =	6
$\bar{y}$ =	20721.0000
s =	804.6102
CV% =	3.8831

Data File	Conc, ng/mL x	Ancho y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORSM17.D	1	0.048	0.0027	7.1111E-06
VHORSM18.D	1	0.042	-0.0033	1.1111E-05
VHORSM19.D	1	0.043	-0.0023	5.4444E-06
VHORSM20.D	1	0.046	0.0007	4.4444E-07
VHORSM21.D	1	0.046	0.0007	4.4444E-07
VHORSM22.D	1	0.047	0.0017	2.7778E-06
		$\Sigma =$ 0.2720	$\Sigma =$ 2.7333E-05	

n =	6
$\bar{y}$ =	0.0453
s =	0.0023
CV% =	5.1576

Data File	Conc, ng/mL x	Altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORSM17.D	1	685	-76.1667	5801.3611
VHORSM18.D	1	807	45.8333	2100.6944
VHORSM19.D	1	772	10.8333	117.3611
VHORSM20.D	1	753	-8.1667	66.6944
VHORSM21.D	1	777	15.8333	250.6944
VHORSM22.D	1	773	11.8333	140.0278
		$\Sigma =$ 4567	$\Sigma =$ 8476.8333	

n =	6
$\bar{y}$ =	761.1667
s =	41.1748
CV% =	5.4094



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA
ADECUABILIDAD DEL SISTEMA (ESPECTROMETRIA DE MASAS)
TALERANOL, ION 538
1 ng/mL, SIM



Data File	Conc, ng/mL x	Tr y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORMS17.D	1	23.855	-0.0010	1.0000E-06
VHORMS18.D	1	23.858	0.0020	4.0000E-06
VHORMS19.D	1	23.851	-0.0050	2.5000E-05
VHORMS20.D	1	23.854	-0.0020	4.0000E-06
VHORMS21.D	1	23.858	0.0020	4.0000E-06
VHORMS22.D	1	23.860	0.0040	1.6000E-05
$\Sigma =$		143.136	$\Sigma =$	5.4000E-05

n =	6
$\bar{y} =$	23.8560
s =	0.0033
CV% =	0.0138

Data File	Conc, ng/mL x	Area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORMS17.D	1	20387	-743	5.5254E+05
VHORMS18.D	1	21298	168	2.8112E+04
VHORMS19.D	1	20482	-648	4.2034E+05
VHORMS20.D	1	21577	447	1.9951E+05
VHORMS21.D	1	21000	-130	1.6987E+04
VHORMS22.D	1	22038	908	8.2386E+05
$\Sigma =$		126782	$\Sigma =$	2.0413E+06

n =	6
$\bar{y} =$	21130.3333
s =	638.9600
CV% =	3.0239

Data File	Conc, ng/mL x	Ancho y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORMS17.D	1	0.042	-0.0015	2.2500E-06
VHORMS18.D	1	0.044	0.0005	2.5000E-07
VHORMS19.D	1	0.043	-0.0005	2.5000E-07
VHORMS20.D	1	0.043	-0.0005	2.5000E-07
VHORMS21.D	1	0.043	-0.0005	2.5000E-07
VHORMS22.D	1	0.046	0.0025	6.2500E-06
$\Sigma =$		0.261	$\Sigma =$	9.5000E-06

n =	6
$\bar{y} =$	0.0435
s =	0.0014
CV% =	3.1687

Data File	Conc, ng/mL x	Altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORMS17.D	1	818	3.8333	14.6944
VHORMS18.D	1	805	-9.1667	84.0278
VHORMS19.D	1	800	-14.1667	200.6944
VHORMS20.D	1	845	30.8333	950.6944
VHORMS21.D	1	822	7.8333	61.3611
VHORMS22.D	1	795	-19.1667	367.3611
$\Sigma =$		4885	$\Sigma =$	1678.8333

n =	6
$\bar{y} =$	814.1667
s =	18.3239
CV% =	2.2506

ANEXO II. LINEALIDAD DEL SISTEMA

	UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA REGRESION LINEAL DES, ION 412 (ALTURA) LINEALIDAD DEL SISTEMA	
---	---	---

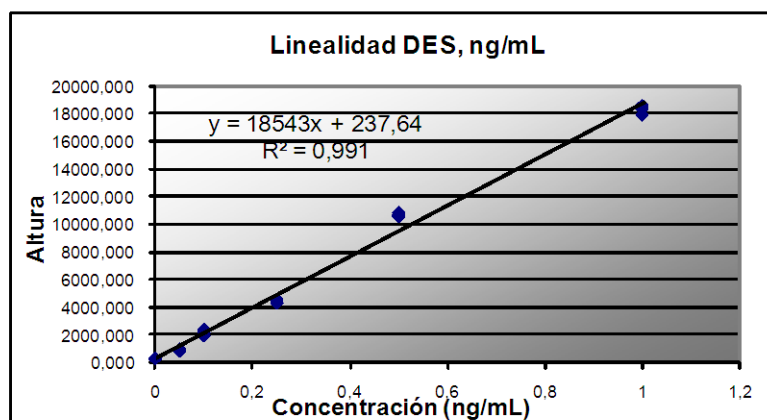
Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS01.S

Fecha: 11 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL	altura			
	x	y	xy	x ²	y ²
Intercepto	0	237.638			
VHORLS01.D	0.05	818	40.9	0.0025	669124
VHORLS02.D	0.05	867	43.35	0.0025	751689
VHORLS04.D	0.05	928	46.4	0.0025	861184
VHORLS05.D	0.10	2106	210.6	0.01	4435236
VHORLS06.D	0.10	1929	192.9	0.01	3721041
VHORLS07.D	0.10	2337	233.7	0.01	5461569
VHORLS08.D	0.25	4536	1134	0.0625	20575296
VHORLS09.D	0.25	4448	1112	0.0625	19784704
VHORLS10.D	0.25	4281	1070.25	0.0625	18326961
VHORLS11.D	0.50	10836	5418	0.25	117418896
VHORLS12.D	0.50	10656	5328	0.25	113550336
VHORLS13.D	0.50	10568	5284	0.25	111682624
VHORLS14.D	1.00	17932	17932	1	321556624
VHORLS15.D	1.00	18602	18602	1	346034404
VHORLS16.D	1.00	18413	18413	1	339038569
Σ	5.7000	109257.0000	75061.1000	3.9750	1423868257



Número de datos	n =	15
Sensibilidad de calibración (pendiente)	b =	18542.5318
Estimador de intererencia (intercepto)	a =	237.6379
Ecuación de la recta	(y = bx + a) =	18542.5318 x + 237.6379
Coefficiente de correlación (r)	r =	0.9951
Coefficiente de deteminación: (r ²)	r ² =	0.9903
Estimación de los valores de incertidumbre		
Incetidumbre de la calibración (100 - r ²) error aleatorio =		0.9683 %
Test t de correlación (t _r)	t _r =	36.4622
Varianza de la regresión (s ² _{xy})	s ² _{xy} =	467832.1542
Desviación estándar de la pendiente (s _b)	s _b =	508.5407
Desviación estándar del intercepto (s _a)	s _a =	261.7874
t _{95%} confianza, n-2 grados de libertad	t _{95%, n-2 g.l.} =	2.160
Intervalo de Confianza de la pendiente	b = b ± t.s _b	18542.5318 ± 1098.4480
Intervalo de Confianza del intercepto	a = a ± t.s _a	237.6379 ± 565.4607



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA
REGRESION LINEAL DES, ION 412 (ALTURA)
LINEALIDAD DEL SISTEMA



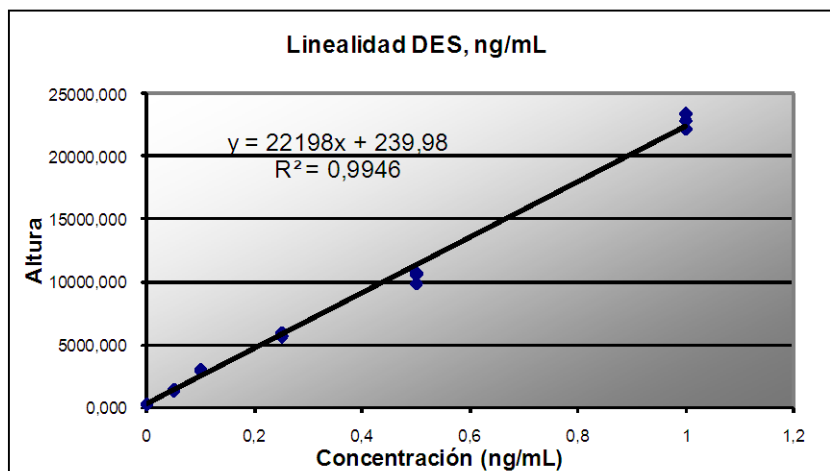
Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS02.S

Fecha: 13 Abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	xy	x ²	y ²
Intercepto	0	239.976			
VHORLS24.D	0.05	1439	71.95	0.0025	2070721
VHORLS25.D	0.05	1331	66.55	0.0025	1771561
VHORLS26.D	0.05	1393	69.65	0.0025	1940449
VHORLS27.D	0.10	2919	291.9	0.01	8520561
VHORLS28.D	0.10	2917	291.7	0.01	8508889
VHORLS29.D	0.10	3021	302.1	0.01	9126441
VHORLS30.D	0.25	5957	1489.25	0.0625	35485849
VHORLS31.D	0.25	5720	1430	0.0625	32718400
VHORLS32.D	0.25	5635	1408.75	0.0625	31753225
VHORLS33.D	0.50	10762	5381	0.25	115820644
VHORLS34.D	0.50	10600	5300	0.25	112360000
VHORLS35.D	0.50	9863	4931.5	0.25	97278769
VHORLS36.D	1.00	22886	22886	1	523768996
VHORLS37.D	1.00	23464	23464	1	550559296
VHORLS38.D	1.00	22219	22219	1	493683961
Σ	5.7000	130126.0000	89603.3500	3.9750	2.0254E+09



Número de datos	n =	15
Sensibilidad de calibración (pendiente)	b =	22197.6064
Estimador de intererencia (intercepto)	a =	239.9762
Ecuación de la recta	(y = bx + a) =	22197.6064 x + 239.9762
Coefficiente de correlación (r)	r =	0.9971
Coefficiente de determinación: (r ²)	r ² =	0.9942
Estimación de los valores de incertidumbre		
Incetidumbre de la calibración (100 - r ²)	error aleatorio =	0.5756 %
Test t de correlación (t _r)	t _r =	47.3851
Varianza de la regresión (s ² _{xy})	s ² _{xy} =	396978.3515
Desviación estándar de la pendiente (s _b)	s _b =	468.4510
Desviación estándar del intercepto (s _a)	s _a =	241.1499
t _{95%} confianza, n-2 grados de libertad	t _{95%, n-2 g.l.} =	2.160
Intervalo de Confianza de la pendiente	b = b ± t.s _b	22197.6064 ± 1011.8541
Intervalo de Confianza del intercepto	a = a ± t.s _a	239.9762 ± 520.8838



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA
REGRESION LINEAL DES, ION 412 (ALTURA)
LINEALIDAD DEL SISTEMA



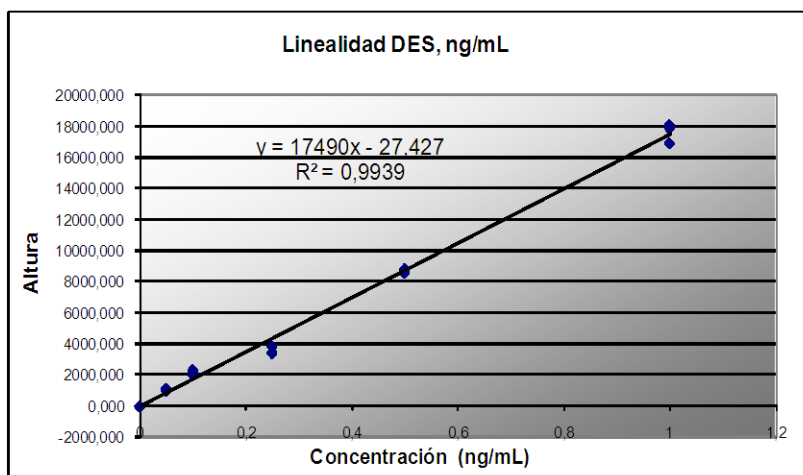
Método: HOCTL3M3.M

Secuencia: VALHORUNIS03.S

Fecha: 19 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL	altura			
	x	y	xy	x ²	y ²
Intercepto	0	-27.427			
VHORLS46.D	0.05	1109	55.45	0.0025	1229881
VHORLS47.D	0.05	1046	52.3	0.0025	1094116
VHORLS48.D	0.05	1002	50.1	0.0025	1004004
VHORLS49.D	0.10	2181	218.1	0.01	4756761
VHORLS50.D	0.10	2310	231	0.01	5336100
VHORLS51.D	0.10	2013	201.3	0.01	4052169
VHORLS52.D	0.25	3830	957.5	0.0625	14668900
VHORLS53.D	0.25	3394	848.5	0.0625	11519236
VHORLS54.D	0.25	3423	855.75	0.0625	11716929
VHORLS55.D	0.50	8577	4288.5	0.25	73564929
VHORLS56.D	0.50	8810	4405	0.25	77616100
VHORLS57.D	0.50	8767	4383.5	0.25	76860289
VHORLS58.D	1.00	17865	17865	1	319158225
VHORLS59.D	1.00	18063	18063	1	326271969
VHORLS60.D	1.00	16891	16891	1	285305881
Σ	5.7000	99281.0000	69366.0000	3.9750	1214155489.0000



Número de datos	n =	15
Sensibilidad de calibración (pendiente)	b =	17489.8950
Estimador de interferencia (intercepto)	a =	-27.4268
Ecuación de la recta	(y = bx + a) =	17489.8950 x + -27.4268
Coefficiente de correlación (r)	r =	0.9967
Coefficiente de determinación: (r ²)	r ² =	0.9934
Estimación de los valores de incertidumbre		
Incetidumbre de la calibración (100 - r ²) error aleatorio =		0.6596 %
Test t de correlación (t _r)	t _r =	44.2472
Varianza de la regresión (s ² _{xy})	s ² _{xy} =	282645.4010
Desviación estándar de la pendiente (s _b)	s _b =	395.2771
Desviación estándar del intercepto (s _a)	s _a =	203.4814
t _{95%} confianza, n-2 grados de libertad	t _{95%, n-2 g.l.} =	2.160
Intervalo de Confianza de la pendiente	b = b ± t.s _b	17489.8950 ± 853.7986
Intervalo de Confianza del intercepto	a = a ± t.s _a	-27.4268 ± 439.5197



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA
REGRESION LINEAL DES, ION 412 (AREA)
LINEALIDAD DEL SISTEMA



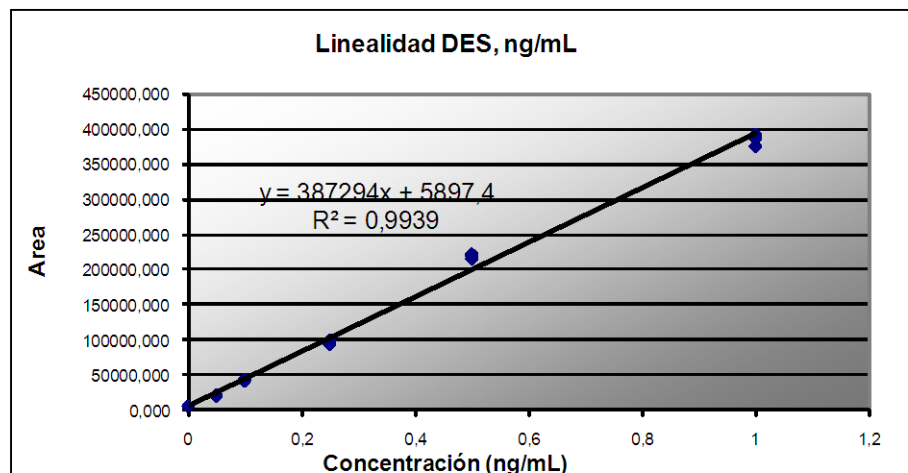
Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS01.S

Fecha: 11 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL	area			
	x	y	xy	x ²	y ²
Intercepto	0	5897.415			
VHORLS02.D	0.05	19718	985.9	0.0025	388799524
VHORLS03.D	0.05	21734	1086.7	0.0025	472366756
VHORLS04.D	0.05	20693	1034.65	0.0025	428200249
VHORLS05.D	0.10	43264	4326.4	0.01	1871773696
VHORLS06.D	0.10	41353	4135.3	0.01	1710070609
VHORLS07.D	0.10	44310	4431	0.01	1963376100
VHORLS08.D	0.25	99507	24876.75	0.0625	9901643049
VHORLS09.D	0.25	97399	24349.75	0.0625	9486565201
VHORLS10.D	0.25	94013	23503.25	0.0625	8838444169
VHORLS11.D	0.50	222420	111210	0.25	49470656400
VHORLS12.D	0.50	215880	107940	0.25	46604174400
VHORLS13.D	0.50	221033	110516.5	0.25	48855587089
VHORLS14.D	1.00	386726	386726	1	149556999076
VHORLS15.D	1.00	392468	392468	1	154031131024
VHORLS16.D	1.00	375518	375518	1	141013768324
Σ	5.7000	2296036.0000	1573108.2000	3.9750	624593555666.0000



Número de datos	n =	15
Sensibilidad de calibración (pendiente)	b =	387293.8198
Estimador de intererencia (intercepto)	a =	5897.4151
Ecuación de la recta	(y = bx +a) =	387293.8198 x+ 5897.4151
Coefficiente de correlación (r)	r =	0.9967
Coefficiente de determinación: (r ²)	r ² =	0.9934
Estimación de los valores de incertidumbre		
Incetidumbre de la calibración (100 - r ²) error aleatorio =		0.6582 %
Test t de correlación (t _r)	t _r =	44.2957
Varianza de la regresión (s ² _{xy})	s ² _{xy} =	138291881.6799
Desviación estándar de la pendiente (s _b)	s _b =	8743.3741
Desviación estándar del intercepto (s _a)	s _a =	4500.9273
t _{95%} confianza, n-2 grados de libertad	t _{95%, n-2 g.l.} =	2.160
Intervalo de Confianza de la pendiente	b =b ± t.s _b	387293.8198 ± 18885.6880
Intervalo de Confianza del intercepto	a =a ± t.s _a	5897.4151 ± 9722.0029



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA
REGRESION LINEAL DES, ION 412 (AREA)
LINEALIDAD DEL SISTEMA



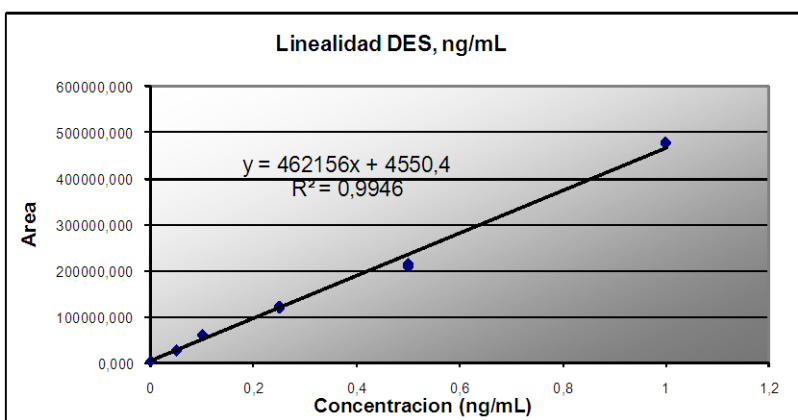
Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSI02.S

Fecha: 13 Abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL	area	xy	x ²	y ²
	x	y			
Intercepto	0	4550.418			
VHORLS24.D	0.05	28905	1445.25	0.0025	835499025
VHORLS25.D	0.05	27061	1353.05	0.0025	732297721
VHORLS26.D	0.05	28708	1435.4	0.0025	824149264
VHORLS27.D	0.10	60584	6058.4	0.01	3670421056
VHORLS28.D	0.10	62808	6280.8	0.01	3944844864
VHORLS29.D	0.10	61769	6176.9	0.01	3815409361
VHORLS30.D	0.25	123898	30974.5	0.0625	15350714404
VHORLS31.D	0.25	120959	30239.75	0.0625	14631079681
VHORLS32.D	0.25	119376	29844	0.0625	14250629376
VHORLS33.D	0.50	215835	107917.5	0.25	46584747225
VHORLS34.D	0.50	213809	106904.5	0.25	45714288481
VHORLS35.D	0.50	208913	104456.5	0.25	43644641569
VHORLS36.D	1.00	475252	475252	1	225864463504
VHORLS37.D	1.00	479228	479228	1	229659475984
VHORLS38.D	1.00	475442	475442	1	226045095364
Σ	5.7	2702547	1863008.55	3.975	8.75568E+11



Número de datos	n =	15
Sensibilidad de calibración (pendiente)	b =	462156.2687
Estimador de interferencia (intercepto)	a =	4550.4179
Ecuación de la recta	(y = bx + a) =	462156.2687 x + 4550.4179
Coefficiente de correlación (r)	r =	0.9971
Coefficiente de determinación: (r ²)	r ² =	0.9942
Estimación de los valores de incertidumbre		
Incetidumbre de la calibración (100 - r ²)	error aleatorio =	0.5838 %
Test t de correlación (t _r)	t _r =	47.0507
Varianza de la regresión (s ² _{xy})	s ² _{xy} =	174535281.7549
Desviación estándar de la pendiente (s _b)	s _b =	9822.5067
Desviación estándar del intercepto (s _a)	s _a =	5056.4448
t _{95%} confianza, n-2 grados de libertad	t _{95%, n-2 g.l.} =	2.160
Intervalo de Confianza de la pendiente	b = b ± t.s _b	462156.2687 ± 21216.6144
Intervalo de Confianza del intercepto	a = a ± t.s _a	4550.4179 ± 10921.9207



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA
REGRESION LINEAL DES, ION 412 (AREA)
LINEALIDAD DEL SISTEMA



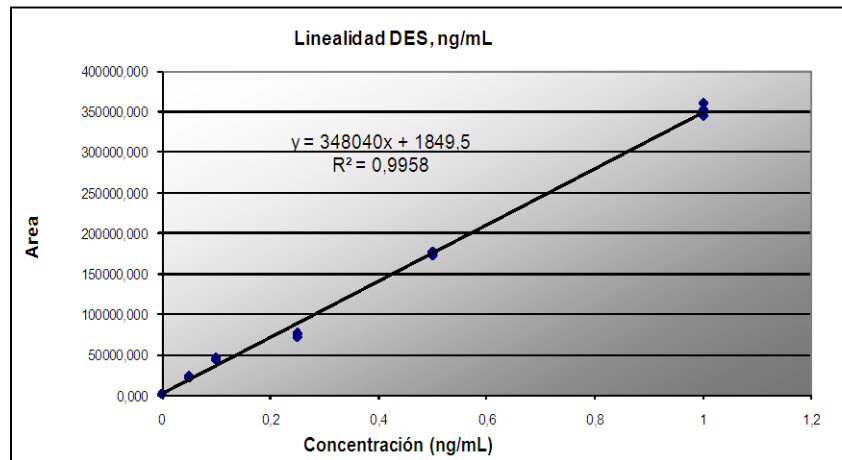
Método: HOCTSM 3.M

Secuencia: VALHORLINSIS03.S

Fecha: 19 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc. ng/mL x	area y	xy	x ²	y ²
Intercepto	0	1849.522			
VHORLS46.D	0.05	23955	1197.75	0.0025	573842025
VHORLS47.D	0.05	22468	1123.4	0.0025	504811024
VHORLS48.D	0.05	22041	1102.05	0.0025	485805681
VHORLS49.D	0.10	43904	4390.4	0.01	1927561216
VHORLS50.D	0.10	46057	4605.7	0.01	2121247249
VHORLS51.D	0.10	44552	4455.2	0.01	1984880704
VHORLS52.D	0.25	76827	19206.75	0.0625	5902387929
VHORLS53.D	0.25	72269	18067.25	0.0625	5222808361
VHORLS54.D	0.25	75730	18932.5	0.0625	5735032900
VHORLS55.D	0.50	172875	86437.5	0.25	29885765625
VHORLS56.D	0.50	175950	87975	0.25	30958402500
VHORLS57.D	0.50	176869	88434.5	0.25	31282643161
VHORLS58.D	1.00	352161	352161	1	124017369921
VHORLS59.D	1.00	360458	360458	1	129929969764
VHORLS60.D	1.00	345453	345453	1	119337775209
Σ	6.7000	2011569.0000	1394000.0000	3.9750	489870303269.0000



Número de datos	n =	15
Sensibilidad de calibración (pendiente)	b =	348039.6794
Estimador de intererencia (intercepto)	a =	1849.5218
Ecuación de la recta	(y = bx + a) =	348039.6794 x + 1849.5218
Coefficiente de correlación (r)	r =	0.9978
Coefficiente de determinación: (r ²)	r ² =	0.9955
Estimación de los valores de incertidumbre		
Incertidumbre de la calibración (100 - r ²)	error aleatorio =	0.4464 %
Test t de correlación (t _r)	t _r =	53.8446
Varianza de la regresión (s ² _{xy})	s ² _{xy} =	75580724.8780
Desviación estándar de la pendiente (s _b)	s _b =	6463.7752
Desviación estándar del intercepto (s _a)	s _a =	3327.4319
t _{95%} confianza, n-2 grados de libertad	t _{95%, n-2 g.l.} =	2.160
Intervalo de Confianza de la pendiente	b = b ± t _{s_b}	348039.6794 ± 13961.7544
Intervalo de Confianza del intercepto	a = a ± t _{s_a}	1849.5218 ± 7187.2530



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA
REGRESION LINEAL ZERANOL, ION 538 (ALTURA)
LINEALIDAD DEL SISTEMA



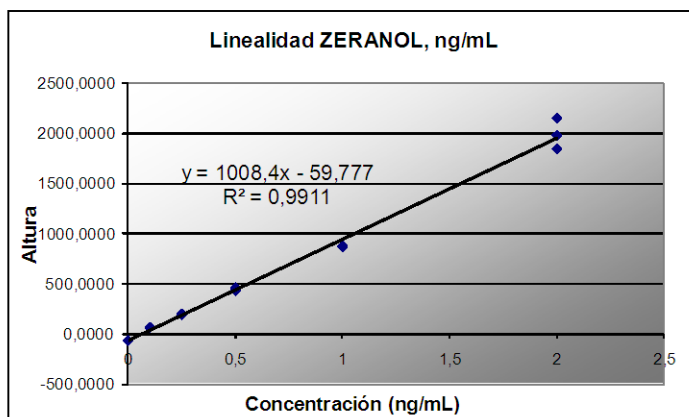
Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS01.S

Fecha: 11 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL	altura			
	x	y	xy	x ²	y ²
Intercepto	0	-59.7772			
VHORLS05.D	0.10	72	7.2	0.01	5184
VHORLS06.D	0.10	71	7.1	0.01	5041
VHORLS07.D	0.10	69	6.9	0.01	4761
VHORLS08.D	0.25	200	50	0.0625	40000
VHORLS09.D	0.25	204	51	0.0625	41616
VHORLS10.D	0.25	196	49	0.0625	38416
VHORLS11.D	0.50	464	232	0.25	215296
VHORLS12.D	0.50	440	220	0.25	193600
VHORLS13.D	0.50	437	218.5	0.25	190969
VHORLS14.D	1.00	879	879	1	772641
VHORLS15.D	1.00	869	869	1	755161
VHORLS16.D	1.00	877	877	1	769129
VHORLS17.D	2.00	1979	3958	4	3916441
VHORLS18.D	2.00	2149	4298	4	4618201
VHORLS19.D	2.00	1844	3688	4	3400336
Σ	11.5500	10750.0000	15410.7000	15.9675	14966792.0000



Número de datos	n =	15
Sensibilidad de calibración (pendiente)	b =	1008.3687
Estimador de intererencia (intercepto)	a =	-59.7772
Ecuación de la recta	(y = bx + a) =	1008.3687 x + -59.7772
Coefficiente de correlación (r)	r =	0.9952
Coefficiente de determinación: (r ²)	r ² =	0.9904
Estimación de los valores de incertidumbre		
Incetidumbre de la calibración (100 - r ² error aleatorio)	=	0.9601 %
Test t de correlación (t _r)	t _r =	36.6196
Varianza de la regresión (s ² _{xy})	s ² _{xy} =	5363.8391
Desviación estándar de la pendiente (s _b)	s _b =	27.5363
Desviación estándar del intercepto (s _a)	s _a =	28.4105
t _{95%} confianza, n-2 grados de libertad	t _{95%, n-2 g.l.} =	2.160
Intervalo de Confianza de la pendiente	b = b ± t.s _b	1008.3687 ± 59.4784
Intervalo de Confianza del intercepto	a = a ± t.s _a	-59.7772 ± 61.3666



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA
REGRESION LINEAL ZERANOL, ION 538 (ALTURA)
LINEALIDAD DEL SISTEMA



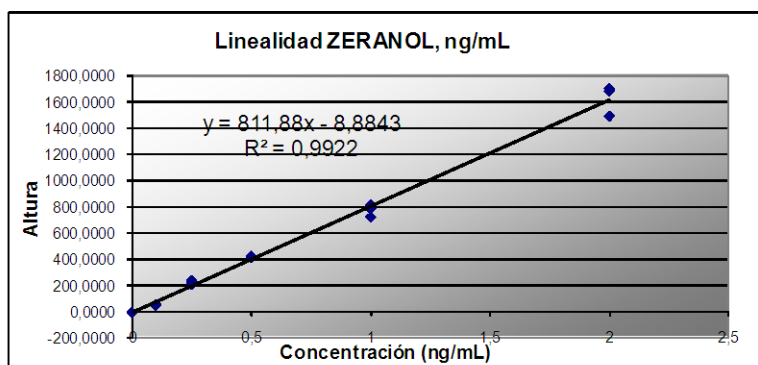
Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS02.S

Fecha: 13 Abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL	altura			
	x	y	xy	x ²	y ²
Intercepto	0	-8.8843			
VHORLS27.D	0.10	49	4.9	0.01	2401
VHORLS28.D	0.10	53	5.3	0.01	2809
VHORLS29.D	0.10	47	4.7	0.01	2209
VHORLS30.D	0.25	205	51.25	0.0625	42025
VHORLS31.D	0.25	220	55	0.0625	48400
VHORLS32.D	0.25	236	59	0.0625	55696
VHORLS33.D	0.50	412	206	0.25	169744
VHORLS34.D	0.50	412	206	0.25	169744
VHORLS35.D	0.50	422	211	0.25	178084
VHORLS35.D	1.00	814	814	1	662596
VHORLS37.D	1.00	784	784	1	614656
VHORLS38.D	1.00	720	720	1	518400
VHORLS39.D	2.00	1490	2980	4	2220100
VHORLS40.D	2.00	1681	3362	4	2825761
VHORLS41.D	2.00	1699	3398	4	2886601
Σ	11.5500	9244.0000	12861.1500	15.9675	10399226.0000



Número de datos	n =	15
Sensibilidad de calibración (pendiente)	b =	811.8844
Estimador de intererencia (intercepto)	a =	-8.8843
Ecuación de la recta	(y = bx + a) =	811.8844 x + -8.8843
Coefficiente de correlación (r)	r =	0.9958
Coefficiente de determinación: (r ²)	r ² =	0.9916
Estimación de los valores de incertidumbre		
Incetidumbre de la calibración (100 - r ²) error aleatorio =		0.8418 %
Test t de correlación (t _r)	t _r =	39.1317
Varianza de la regresión (s ² _{xy})	s ² _{xy} =	3045.0627
Desviación estándar de la pendiente (s _b)	s _b =	20.7475
Desviación estándar del intercepto (s _a)	s _a =	21.4061
t _{95%} confianza, n-2 grados de libertad	t _{95%, n-2 g.l.} =	2.160
Intervalo de Confianza de la pendiente	b = b ± t.s _b	811.8844 ± 44.8146
Intervalo de Confianza del intercepto	a = a ± t.s _a	-8.8843 ± 46.2373



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA
REGRESION LINEAL ZERANOL, ION 538 (ALTURA)
LINEALIDAD DEL SISTEMA



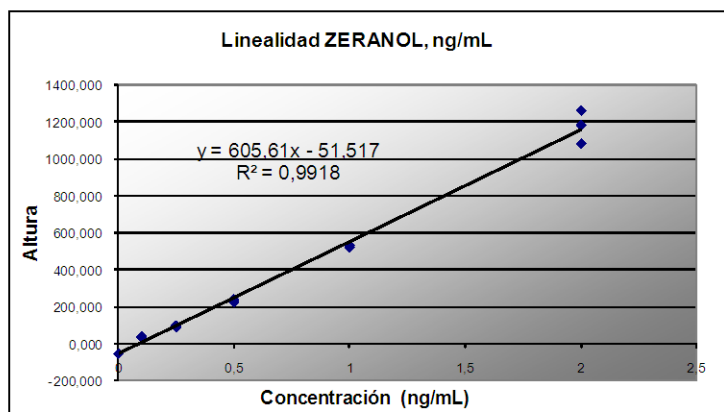
Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS03.S

Fecha: 19 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL	altura	xy	x ²	y ²
Intercepto	0	-51.517			
VHORLS49.D	0.10	40	4	0.01	1600
VHORLS50.D	0.10	42	4.2	0.01	1764
VHORLS51.D	0.10	38	3.8	0.01	1444
VHORLS52.D	0.25	101	25.25	0.0625	10201
VHORLS53.D	0.25	96	24	0.0625	9216
VHORLS54.D	0.25	91	22.75	0.0625	8281
VHORLS55.D	0.50	233	116.5	0.25	54289
VHORLS56.D	0.50	229	114.5	0.25	52441
VHORLS57.D	0.50	242	121	0.25	58564
VHORLS58.D	1.00	523	523	1	273529
VHORLS59.D	1.00	534	534	1	285156
VHORLS60.D	1.00	524	524	1	274576
VHORLS61.D	2.00	1183	2366	4	1399489
VHORLS62.D	2.00	1263	2526	4	1595169
VHORLS63.D	2.00	1083	2166	4	1172889
Σ	11.550	6222.000	9075.000	15.968	5198608.000



Número de datos	n =	15
Sensibilidad de calibración (pendiente)	b =	605.6064
Estimador de intererencia (intercepto)	a =	-51.5170
Ecuación de la recta	(y = bx + a) =	605.6064 x + -51.5170
Coefficiente de correlación (r)	r =	0.9955
Coefficiente de determinación: (r ²)	r ² =	0.9911
Estimación de los valores de incertidumbre		
Incetidumbre de la calibración (100 - r ²)	error aleatorio =	0.8889 %
Test t de correlación (t _r)	t _r =	38.0728
Varianza de la regresión (s ² _{xy})	s ² _{xy} =	1789.8499
Desviación estándar de la pendiente (s _b)	s _b =	15.9065
Desviación estándar del intercepto (s _a)	s _a =	16.4115
t _{95%} confianza, n-2 grados de libertad	t _{95%, n-2 g.l.} =	2.160
Intervalo de Confianza de la pendiente	b = b ± t _{s_b}	605.6064 ± 34.3581
Intervalo de Confianza del intercepto	a = a ± t _{s_a}	-51.5170 ± 35.4489



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA
REGRESION LINEAL ZERANOL, ION 538 (AREA)
LINEALIDAD DEL SISTEMA



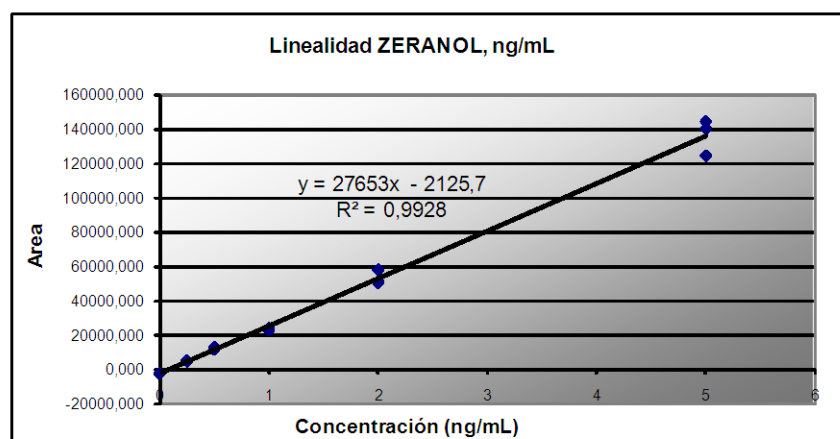
Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS01.S

Fecha: 11 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL	area			
	x	y	xy	x ²	y ²
Intercepto	0	-2125.686			
VHORLS08.D	0.25	5406	1351.5	0.0625	29224836
VHORLS09.D	0.25	5357	1339.25	0.0625	28697449
VHORLS10.D	0.25	5088	1272	0.0625	25887744
VHORLS11.D	0.50	13219	6609.5	0.25	174741961
VHORLS12.D	0.50	12058	6029	0.25	145395364
VHORLS13.D	0.50	12205	6102.5	0.25	148962025
VHORLS14.D	1.00	23009	23009	1	529414081
VHORLS15.D	1.00	24358	24358	1	593312164
VHORLS16.D	1.00	24195	24195	1	585398025
VHORLS17.D	2.00	51386	102772	4	2640520996
VHORLS18.D	2.00	58179	116358	4	3384796041
VHORLS19.D	2.00	50748	101496	4	2575359504
VHORLS20.D	5.00	144358	721790	25	20839232164
VHORLS21.D	5.00	124424	622120	25	15481331776
VHORLS22.D	5.00	140025	700125	25	19607000625
Σ	26.2500	694015.0000	2458926.7500	90.9375	66789274755.0000



Número de datos	n =	15
Sensibilidad de calibración (pendiente)	b =	27653.3444
Estimador de intererencia (intercepto)	a =	-2125.6861
Ecuación de la recta	(y = bx + a) =	27653.3444 x + -2125.6861
Coefficiente de correlación (r)	r =	0.9961
Coefficiente de determinación: (r ²)	r ² =	0.9923
Estimación de los valores de incertidumbre		
Incetidumbre de la calibración (100 - r ²)	error aleatorio =	0.7699 %
Test t de correlación (t _r)	t _r =	40.9339
Varianza de la regresión (s ² _{xy})	s ² _{xy} =	20537263.0765
Desviación estándar de la pendiente (s _b)	s _b =	675.5617
Desviación estándar del intercepto (s _a)	s _a =	1663.3778
t _{95%} confianza, n-2 grados de libertad	t _{95%, n-2 g.l.} =	2.160
Intervalo de Confianza de la pendiente	b = b ± t.s _b	27653.3444 ± 1459.2133
Intervalo de Confianza del intercepto	a = a ± t.s _a	-2125.6861 ± 3592.8961



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA
REGRESIÓN LINEAL ZERANOL, ION 538 (AREA)
LINEALIDAD DEL SISTEMA



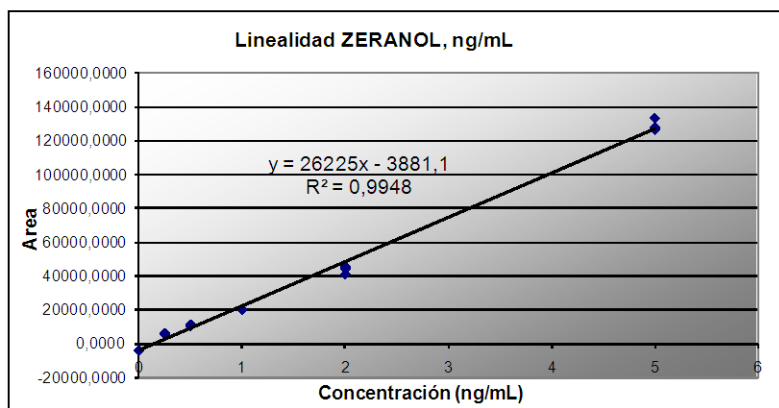
Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS02.S

Fecha: 13 Abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL	area			
	x	y	xy	x ²	y ²
Intercepto	0	-3881.0889			
VHORLS30.D	0.25	5577	1394.25	0.0625	31102929
VHORLS31.D	0.25	5575	1393.75	0.0625	31080625
VHORLS32.D	0.25	6201	1550.25	0.0625	38452401
VHORLS33.D	0.50	10547	5273.5	0.25	111239209
VHORLS34.D	0.50	11160	5580	0.25	124545600
VHORLS35.D	0.50	11336	5668	0.25	128504896
VHORLS35.D	1.00	20220	20220	1	408848400
VHORLS37.D	1.00	20460	20460	1	418611600
VHORLS38.D	1.00	20371	20371	1	414977641
VHORLS39.D	2.00	41088	82176	4	1688223744
VHORLS40.D	2.00	44355	88710	4	1967366025
VHORLS41.D	2.00	45452	90904	4	2065884304
VHORLS42.D	5.00	133284	666420	25	17764624656
VHORLS43.D	5.00	127954	639770	25	16372226116
VHORLS44.D	5.00	126621	633105	25	16032877641
Σ	26.2500	630201.0000	2282995.7500	90.9375	57598565787.0000



Número de datos	n =	15
Sensibilidad de calibración (pendiente)	b =	26225.4222
Estimador de interferencia (intercepto)	a =	-3881.0889
Ecuación de la recta	(y = bx + a) =	26225.4222 x + -3881.0889
Coefficiente de correlación (r)	r =	0.9972
Coefficiente de determinación: (r ²)	r ² =	0.9945
Estimación de los valores de incertidumbre		
Incertidumbre de la calibración (100 - r ²)	error aleatorio =	0.5524 %
Test t de correlación (t _r)	t _r =	48.3790
Varianza de la regresión (s ² _{xy})	s ² _{xy} =	13223416.1983
Desviación estándar de la pendiente (s _b)	s _b =	542.0827
Desviación estándar del intercepto (s _a)	s _a =	1334.7239
t _{95%} confianza, n-2 grados de libertad	t _{95%, n-2 g.l.} =	2.160
Intervalo de Confianza de la pendiente	b = b ± t.s _b	26225.4222 ± 1170.8987
Intervalo de Confianza del intercepto	a = a ± t.s _a	-3881.0889 ± 2883.0037



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA
REGRESION LINEAL ZERANOL, ION 538 (AREA)
LINEALIDAD DEL SISTEMA



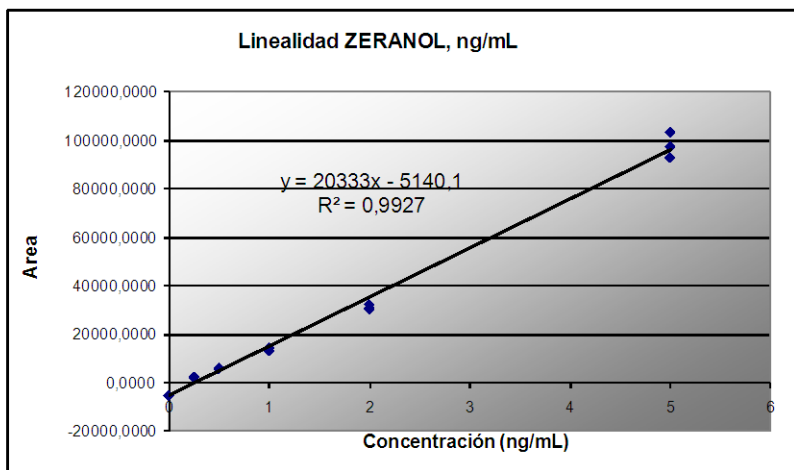
Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS03.S

Fecha: 19 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL	area	xy	x ²	y ²
Intercepto	0	-5140.0583			
VHORLS52.D	0.25	2557	639.25	0.0625	6538249
VHORLS53.D	0.25	2470	617.5	0.0625	6100900
VHORLS54.D	0.25	2462	615.5	0.0625	6061444
VHORLS55.D	0.50	5971	2985.5	0.25	35652841
VHORLS56.D	0.50	6102	3051	0.25	37234404
VHORLS57.D	0.50	6213	3106.5	0.25	38601369
VHORLS58.D	1.00	13351	13351	1	178249201
VHORLS59.D	1.00	14522	14522	1	210888484
VHORLS60.D	1.00	14476	14476	1	209554576
VHORLS61.D	2.00	30520	61040	4	931470400
VHORLS62.D	2.00	32429	64858	4	1051640041
VHORLS63.D	2.00	30992	61984	4	960504064
VHORLS64.D	5.00	97705	488525	25	9546267025
VHORLS65.D	5.00	93203	466015	25	8686799209
VHORLS66.D	5.00	103656	518280	25	10744566336
Σ	26.2500	456629.0000	1714066.2500	90.9375	32650128543.0000



Número de datos	n =	15
Sensibilidad de calibración (pendiente)	b =	20332.5667
Estimador de intererencia (intercepto)	a =	-5140.0583
Ecuación de la recta	(y = bx + a) =	20332.5667 x + -5140.0583
Coefficiente de correlación (r)	r =	0.9961
Coefficiente de determinación: (r ²)	r ² =	0.9922
Estimación de los valores de incertidumbre		
Incetidumbre de la calibración (100 - r ²)	error aleatorio =	0.7780 %
Test t de correlación (t _r)	t _r =	40.7192
Varianza de la regresión (s ² _{xy})	s ² _{xy} =	11220149.2679
Desviación estándar de la pendiente (s _b)	s _b =	499.3362
Desviación estándar del intercepto (s _a)	s _a =	1229.4728
t _{95%} confianza, n-2 grados de libertad	t _{95%, n-2 g.l.} =	2.160
Intervalo de Confianza de la pendiente	b = b ± t.s _b	20332.5667 ± 1078.5662
Intervalo de Confianza del intercepto	a = a ± t.s _a	-5140.0583 ± 2655.6613



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA
REGRESION LINEAL TALERANOL, ION 538 (ALTURA)
LINEALIDAD DEL SISTEMA



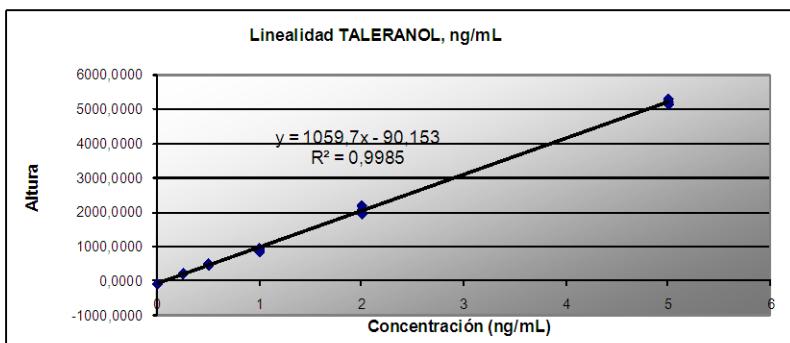
Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS01.S

Fecha: 11 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	xy	x ²	y ²
Intercepto	0	-90.1528			
VHORLS08.D	0.25	215	53.75	0.0625	46225
VHORLS09.D	0.25	197	49.25	0.0625	38809
VHORLS10.D	0.25	190	47.5	0.0625	36100
VHORLS11.D	0.50	497	248.5	0.25	247009
VHORLS12.D	0.50	457	228.5	0.25	208849
VHORLS13.D	0.50	447	223.5	0.25	199809
VHORLS14.D	1.00	841	841	1	707281
VHORLS15.D	1.00	873	873	1	762129
VHORLS16.D	1.00	940	940	1	883600
VHORLS17.D	2.00	1944	3888	4	3779136
VHORLS18.D	2.00	2191	4382	4	4800481
VHORLS19.D	2.00	2047	4094	4	4190209
VHORLS20.D	5.00	5291	26455	25	27994681
VHORLS21.D	5.00	5204	26020	25	27081616
VHORLS22.D	5.00	5132	25660	25	26337424
Σ	26.2500	26466.0000	94004.0000	90.9375	97313358.0000



Número de datos	n =	15
Sensibilidad de calibración (pendiente)	b =	1059.7444
Estimador de intererencia (intercepto)	a =	-90.1528
Ecuación de la recta	(y = bx + a) =	1059.7444 x + -90.1528
Coefficiente de correlación (r)	r =	0.9992
Coefficiente de determinación: (r ²)	r ² =	0.9984
Estimación de los valores de incertidumbre		
Incetidumbre de la calibración (100 - r ²)	error aleatorio =	0.1563 %
Test t de correlación (t _r)	t _r =	91.1220
Varianza de la regresión (s ² _{xy})	s ² _{xy} =	6086.5124
Desviación estándar de la pendiente (s _b)	s _b =	11.6300
Desviación estándar del intercepto (s _a)	s _a =	28.6354
t _{95%} confianza, n-2 grados de libertad	t _{95%, n-2 g.l.} =	2.160
Intervalo de Confianza de la pendiente	b = b ± t.s _b	1059.7444 ± 25.1207
Intervalo de Confianza del intercepto	a = a ± t.s _a	-90.1528 ± 61.8526



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA
REGRESION LINEAL TALERANOL, ION 538 (ALTURA)
LINEALIDAD DEL SISTEMA



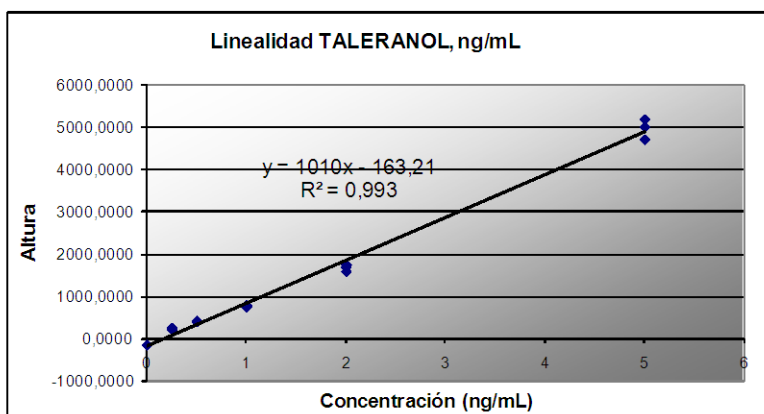
Método: HOCTL3M3.M

Secuencia: VALHORUNIS02.S

Fecha: 13 Abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL	altura			
	x	y	xy	x ²	y ²
Intercepto	0	-163.2139			
VHORLS30.D	0.25	209	52.25	0.0625	43681
VHORLS31.D	0.25	220	55	0.0625	48400
VHORLS32.D	0.25	239	59.75	0.0625	57121
VHORLS33.D	0.50	395	197.5	0.25	156025
VHORLS34.D	0.50	396	198	0.25	156816
VHORLS35.D	0.50	418	209	0.25	174724
VHORLS35.D	1.00	738	738	1	544644
VHORLS37.D	1.00	782	782	1	611524
VHORLS38.D	1.00	764	764	1	583696
VHORLS39.D	2.00	1576	3152	4	2483776
VHORLS40.D	2.00	1688	3376	4	2849344
VHORLS41.D	2.00	1739	3478	4	3024121
VHORLS42.D	5.00	5010	25050	25	25100100
VHORLS43.D	5.00	5184	25920	25	26873856
VHORLS44.D	5.00	4706	23530	25	22146436
Σ	26.2500	24064.0000	87561.5000	90.9375	84854264.0000



Número de datos	n =	15
Sensibilidad de calibración (pendiente)	b =	1009.9889
Estimador de intererencia (Intercepto)	a =	-163.2139
Ecuación de la recta	(y = bx + a) =	1009.9889 x + -163.2139
Coefficiente de correlación (r)	r =	0.9963
Coefficiente de determinación: (r ²)	r ² =	0.9925
Estimación de los valores de incertidumbre		
Incetidumbre de la calibración (100 - r ²)	error aleatorio =	0.7475 %
Test t de correlación (t _r)	t _r =	41.5474
Varianza de la regresión (s ² _{xy})	s ² _{xy} =	26592.3791
Desviación estándar de la pendiente (s _b)	s _b =	24.3093
Desviación estándar del intercepto (s _a)	s _a =	59.8547
t _{95%} confianza, n-2 grados de libertad	t _{95%, n-2 g.l.} =	2.160
Intervalo de Confianza de la pendiente	b = b ± t.s _b	1009.9889 ± 52.5081
Intervalo de Confianza del intercepto	a = a ± t.s _a	-163.2139 ± 129.2861



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA
REGRESION LINEAL TALERANOL, ION 538 (ALTURA)
LINEALIDAD DEL SISTEMA



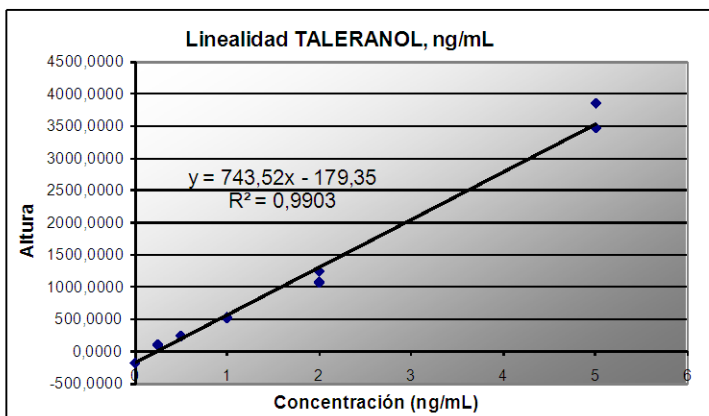
Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS03.S

Fecha: 19 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	xy	x ²	y ²
Intercepto	0	-179.3542			
VHORLS52.D	0.25	107	26.75	0.0625	11449
VHORLS53.D	0.25	99	24.75	0.0625	9801
VHORLS54.D	0.25	104	26	0.0625	10816
VHORLS55.D	0.50	238	119	0.25	56644
VHORLS56.D	0.50	242	121	0.25	58564
VHORLS57.D	0.50	238	119	0.25	56644
VHORLS58.D	1.00	518	518	1	268324
VHORLS59.D	1.00	527	527	1	277729
VHORLS60.D	1.00	535	535	1	286225
VHORLS61.D	2.00	1083	2166	4	1172889
VHORLS62.D	2.00	1245	2490	4	1550025
VHORLS63.D	2.00	1074	2148	4	1153476
VHORLS64.D	5.00	3476	17380	25	12082576
VHORLS65.D	5.00	3479	17395	25	12103441
VHORLS66.D	5.00	3862	19310	25	14915044
Σ	26.2500	16827.0000	62905.5000	90.9375	44013647.0000



Número de datos	n =	15
Sensibilidad de calibración (pendiente)	b =	743.5167
Estimador de intererencia (intercepto)	a =	-179.3542
Ecuación de la recta	(y = bx + a) =	743.5167 x + -179.3542
Coefficiente de correlación (r)	r =	0.9948
Coefficiente de determinación: (r ²)	r ² =	0.9896
Estimación de los valores de incertidumbre		
Incetridumbre de la calibración (100 - r ²) error aleatorio =		1.0357 %
Test t de correlación (t _r)	t _r =	35.2443
Varianza de la regresión (s ² _{xy})	s ² _{xy} =	20027.0683
Desviación estándar de la pendiente (s _b)	s _b =	21.0961
Desviación estándar del intercepto (s _a)	s _a =	51.9432
t _{95%} confianza, n-2 grados de libertad	t _{95%, n-2 g.l.} =	2.160
Intervalo de Confianza de la pendiente	b = b ± t.s _b	743.5167 ± 45.5676
Intervalo de Confianza del intercepto	a = a ± t.s _a	-179.3542 ± 112.1972



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA
REGRESION LINEAL TALERANOL, ION 538 (AREA)
LINEALIDAD DEL SISTEMA



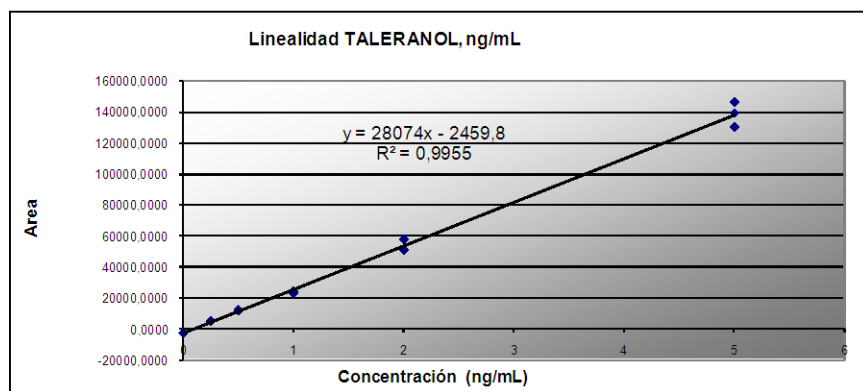
Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORUNSI01.S

Fecha: 11abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc. ng/mL	area	xy	x ²	y ²
	x	y			
Intercepto	0	-2459.7986			
VHORLS08.D	0.25	5488	1372	0.0625	30118144
VHORLS09.D	0.25	5337	1334.25	0.0625	28483569
VHORLS10.D	0.25	5223	1305.75	0.0625	27279729
VHORLS11.D	0.50	12694	6347	0.25	161137636
VHORLS12.D	0.50	12448	6224	0.25	154952704
VHORLS13.D	0.50	12280	6140	0.25	150798400
VHORLS14.D	1.00	23091	23091	1	533194281
VHORLS15.D	1.00	24226	24226	1	586899076
VHORLS16.D	1.00	24611	24611	1	605701321
VHORLS17.D	2.00	51196	102392	4	2621030416
VHORLS18.D	2.00	57779	115558	4	3338412841
VHORLS19.D	2.00	50849	101698	4	2585620801
VHORLS20.D	5.00	145845	729225	25	21270764025
VHORLS21.D	5.00	130027	650135	25	16907020729
VHORLS22.D	5.00	138947	694735	25	19306268809
Σ	26.2500	700041.0000	2488394.0000	90.9375	68307682481.0000



Número de datos	n =	15
Sensibilidad de calibración (pendiente)	b =	28073.8278
Estimador de intererencia (intercepto)	a =	-2459.7986
Ecuación de la recta	(y = bx + a) =	28073.8278 x + -2459.7986
Coefficiente de correlación (r)	r =	0.9976
Coefficiente de determinación: (r ²)	r ² =	0.9952
Estimación de los valores de incertidumbre		
Incetidumbre de la calibración (100 - r ²)	error aleatorio =	0.4795 %
Test t de correlación (t _r)	t _r =	51.9411
Varianza de la regresión (s ² _{xy})	s ² _{xy} =	13145981.6358
Desviación estándar de la pendiente (s _b)	s _b =	540.4932
Desviación estándar del intercepto (s _a)	s _a =	1330.8102
t _{95%} confianza, n-2 grados de libertad	t _{95%} n-2 g.l. =	2.160
Intervalo de Confianza de la pendiente	b = b ± t.s _b	28073.8278 ± 1167.4654
Intervalo de Confianza del intercepto	a = a ± t.s _a	-2459.7986 ± 2874.5501



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA
REGRESION LINEAL TALERANOL, ION 538 (AREA)
LINEALIDAD DEL SISTEMA



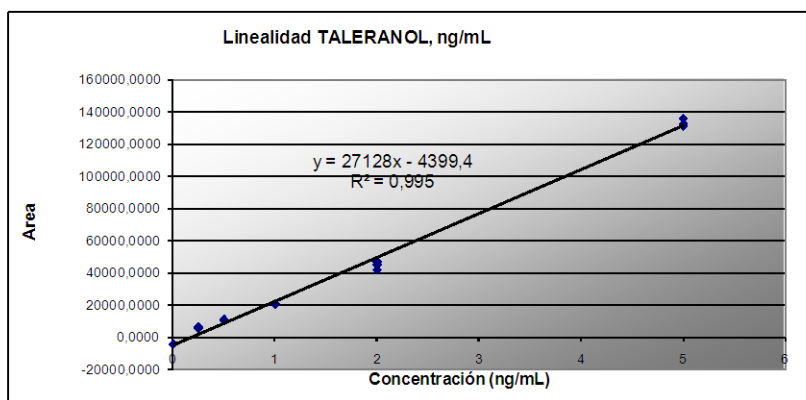
Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS02.S

Fecha: 13 Abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc. ng/mL	area	xy	x ²	y ²
	x	y			
Intercepto	0	-4399.4458			
VHORLS30.D	0.25	5520	1380	0.0625	30470400
VHORLS31.D	0.25	5689	1422.25	0.0625	32364721
VHORLS32.D	0.25	6321	1580.25	0.0625	39955041
VHORLS33.D	0.50	10372	5186	0.25	107578384
VHORLS34.D	0.50	11061	5530.5	0.25	122345721
VHORLS35.D	0.50	10950	5475	0.25	119902500
VHORLS36.D	1.00	20408	20408	1	416486464
VHORLS37.D	1.00	20798	20798	1	432556804
VHORLS38.D	1.00	20818	20818	1	433389124
VHORLS39.D	2.00	42021	84042	4	1765764441
VHORLS40.D	2.00	45024	90048	4	2027160576
VHORLS41.D	2.00	46974	93948	4	2206556676
VHORLS42.D	5.00	136065	680325	25	18513684225
VHORLS43.D	5.00	132725	663625	25	17615925625
VHORLS44.D	5.00	131385	656925	25	17262018225
Σ	26.2500	646131.0000	2351511.0000	90.9375	61126158927.0000



Número de datos	n =	15
Sensibilidad de calibración (pendiente)	b =	27128.4833
Estimador de intererencia (intercepto)	a =	-4399.4458
Ecuación de la recta	(y = bx + a) =	27128.4833 x + -4399.4458
Coefficiente de correlación (r)	r =	0.9974
Coefficiente de determinación: (r ²)	r ² =	0.9947
Estimación de los valores de incertidumbre		
Incetidumbre de la calibración (100 - r ²)	error aleatorio =	0.5282 %
Test t de correlación (t _c)	t _c =	49.4803
Varianza de la regresión (s ² _{xy})	s ² _{xy} =	13526945.4683
Desviación estándar de la pendiente (s _b)	s _b =	548.2689
Desviación estándar del intercepto (s _a)	s _a =	1349.9556
t _{95%} confianza, n-2 grados de libertad	t _{95%, n-2 g.l.} =	2.160
Intervalo de Confianza de la pendiente	b = b ± t s _b	27128.4833 ± 1184.2608
Intervalo de Confianza del intercepto	a = a ± t s _a	-4399.4458 ± 2915.9041



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA
REGRESION LINEAL TALERANOL, ION 538 (AREA)
LINEALIDAD DEL SISTEMA

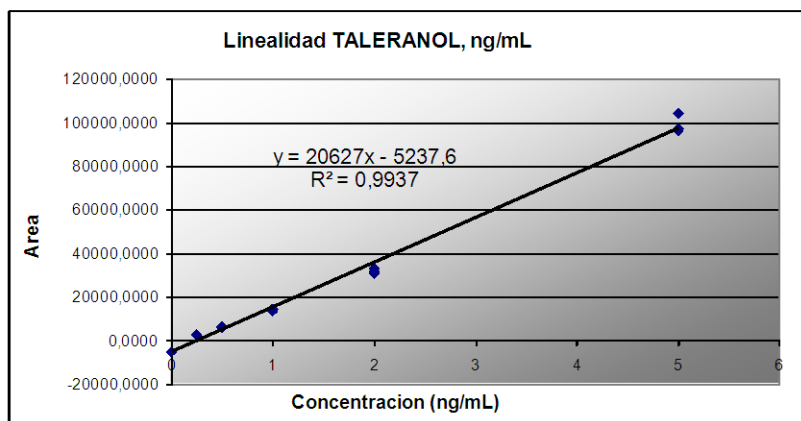


Método: HOCTLSM3.IV Secuencia: VALHORLINSIS03.S

Fecha: 19 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL	area	xy	x ²	y ²
Intercepto	0	-5237.5750			
VHORLS52.D	0.25	2664	666	0.0625	7096896
VHORLS53.D	0.25	2366	591.5	0.0625	5597956
VHORLS54.D	0.25	2572	643	0.0625	6615184
VHORLS55.D	0.50	5841	2920.5	0.25	34117281
VHORLS56.D	0.50	6385	3192.5	0.25	40768225
VHORLS57.D	0.50	6241	3120.5	0.25	38950081
VHORLS58.D	1.00	13614	13614	1	185340996
VHORLS59.D	1.00	14272	14272	1	203689984
VHORLS60.D	1.00	14501	14501	1	210279001
VHORLS61.D	2.00	30859	61718	4	952277881
VHORLS62.D	2.00	33060	66120	4	1092963600
VHORLS63.D	2.00	31886	63772	4	1016716996
VHORLS64.D	5.00	97482	487410	25	9502740324
VHORLS65.D	5.00	96519	482595	25	9315917361
VHORLS66.D	5.00	104620	523100	25	10945344400
Σ	26.2500	462882.0000	1738236.0000	90.9375	33558416166.0000



Número de datos	n =	15
Sensibilidad de calibración (pendiente)	b =	20626.5000
Estimador de intererencia (intercepto)	a =	-5237.5750
Ecuación de la recta	(y = bx + a) =	20626.5000 x + -5237.5750
Coefficiente de correlación (r)	r =	0.9966
Coefficiente de determinación: (r ²)	r ² =	0.9933
Estimación de los valores de incertidumbre		
Incetidumbre de la calibración (100 - r ²)	error aleatorio =	0.6696 %
Test t de correlación (t _r)	t _r =	43.9127
Varianza de la regresión (s ² _{xy})	s ² _{xy} =	9928500.2423
Desviación estándar de la pendiente (s _b)	s _b =	469.7162
Desviación estándar del intercepto (s _a)	s _a =	1156.5421
t _{95%} confianza, n-2 grados de libertad	t _{95%} , n-2 g.l. =	2.160
Intervalo de Confianza de la pendiente	b = b ± t _{s_b}	20626.5000 ± 1014.5871
Intervalo de Confianza del intercepto	a = a ± t _{s_a}	-5237.5750 ± 2498.1309

ANEXO III. PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA



CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN
POR PUNTO EN LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN DES, ION 412 (ALTURA)

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS01.S

Fecha: 11 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS01.D	0.05	818	-53.0000	2809.0000
VHORLS02.D	0.05	867	-4.0000	16.0000
VHORLS04.D	0.05	928	57.0000	3249.0000
		$\Sigma = 2613$	$\Sigma = 6074.0000$	

n =	3
$\bar{y}$ =	871
s =	55.1090
CV% =	6.3271

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS05.D	0.10	2106	-18.0000	324.0000
VHORLS06.D	0.10	1929	-195.0000	38025.0000
VHORLS07.D	0.10	2337	213.0000	45369.0000
		$\Sigma = 6372$	$\Sigma = 83718.0000$	

n =	3
$\bar{y}$ =	2124
s =	204.5947
CV% =	9.6325

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS08.D	0.25	4536	114.3333	13072.1111
VHORLS09.D	0.25	4448	26.3333	693.4444
VHORLS10.D	0.25	4281	-140.6667	19787.1111
		$\Sigma = 13265$	$\Sigma = 33552.6667$	

n =	3
$\bar{y}$ =	4421.666667
s =	129.5235
CV% =	2.9293

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS11.D	0.50	10836	149.3333	22300.4444
VHORLS12.D	0.50	10656	-30.6667	940.4444
VHORLS13.D	0.50	10568	-118.6667	14081.7778
		$\Sigma = 32060$	$\Sigma = 37322.6667$	

n =	3
$\bar{y}$ =	10686.66667
s =	136.6065
CV% =	1.2783

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS14.D	1.00	17932	-383.6667	147200.1111
VHORLS15.D	1.00	18602	286.3333	81986.7778
VHORLS16.D	1.00	18413	97.3333	9473.7778
		$\Sigma = 54947$	$\Sigma = 238660.6667$	

n =	3
$\bar{y}$ =	18315.66667
s =	345.4422
CV% =	1.8860



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA



CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN
POR PUNTO EN LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN DES, ION 412 (ALTURA)

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS02.S

Fecha: 05 Abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS24.D	0.05	1439	51.3333	2635.1111
VHORLS25.D	0.05	1331	-56.6667	3211.1111
VHORLS26.D	0.05	1393	5.3333	28.4444
$\Sigma =$		4163	$\Sigma =$	5874.6667

n =	3
$\bar{y} =$	1387.66667
s =	54.1972
CV% =	3.9056

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS27.D	0.10	2919	-33.3333	1111.1111
VHORLS28.D	0.10	2917	-35.3333	1248.4444
VHORLS29.D	0.10	3021	68.6667	4715.1111
$\Sigma =$		8857	$\Sigma =$	7074.6667

n =	3
$\bar{y} =$	2952.333333
s =	59.4755
CV% =	2.0145

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS30.D	0.25	5957	186.3333	34720.1111
VHORLS31.D	0.25	5720	-50.6667	2567.1111
VHORLS32.D	0.25	5635	-135.6667	18405.4444
$\Sigma =$		17312	$\Sigma =$	55692.6667

n =	3
$\bar{y} =$	5770.66667
s =	166.8722
CV% =	2.8917

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS33.D	0.50	10762	353.6667	125080.1111
VHORLS34.D	0.50	10600	191.6667	36736.1111
VHORLS35.D	0.50	9863	-545.3333	297388.4444
$\Sigma =$		31225	$\Sigma =$	459204.6667

n =	3
$\bar{y} =$	10408.3333
s =	479.1684
CV% =	4.6037

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS36.D	1.00	22886	29.6667	880.1111
VHORLS37.D	1.00	23464	607.6667	369258.7778
VHORLS38.D	1.00	22219	-637.3333	406193.7778
$\Sigma =$		68569	$\Sigma =$	776332.6667

n =	3
$\bar{y} =$	22856.33333
s =	623.0300
CV% =	2.7259



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA



CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN
POR PUNTO EN LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN DES, ION 412 (ALTURA)

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS03.S

Fecha: 19 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS46.D	0.05	1109	56.6667	3211.1111
VHORLS47.D	0.05	1046	-6.3333	40.1111
VHORLS48.D	0.05	1002	-50.3333	2533.4444
$\Sigma =$		3157	$\Sigma =$	5784.6667

n =	3
$\bar{y} =$	1052.333333
s =	53.7804
CV% =	5.1106

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS49.D	0.10	2181	13	169
VHORLS50.D	0.10	2310	142	20164
VHORLS51.D	0.10	2013	-155	24025
$\Sigma =$		6504	$\Sigma =$	44358

n =	3
$\bar{y} =$	2168
s =	148.9262
CV% =	6.8693

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS52.D	0.25	3830	158.6667	25175.1111
VHORLS53.D	0.25	3423	-248.3333	61669.4444
VHORLS54.D	0.25	3761	89.6667	8040.1111
$\Sigma =$		11014	$\Sigma =$	94884.6667

n =	3
$\bar{y} =$	3671.333333
s =	217.8126
CV% =	5.9328

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS55.D	0.50	8577	-141	19881
VHORLS56.D	0.50	8810	92	8464
VHORLS57.D	0.50	8767	49	2401
$\Sigma =$		26154	$\Sigma =$	30746

n =	3
$\bar{y} =$	8718
s =	123.9879
CV% =	1.4222

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS58.D	1.00	17865	258.6667	66908.4444
VHORLS59.D	1.00	18063	456.6667	208544.4444
VHORLS60.D	1.00	16891	-715.3333	511701.7778
$\Sigma =$		52819	$\Sigma =$	787154.6667

n =	3
$\bar{y} =$	17606.33333
s =	627.3574
CV% =	3.5632



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA



CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN
POR PUNTO EN LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN, DES, ION 412 (AREA)

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS01.S

Fecha: 11 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS02.D	0.05	19718	-997.0000	994009.0000
VHORLS03.D	0.05	21734	1019.0000	1038361.0000
VHORLS04.D	0.05	20693	-22.0000	484.0000
		$\Sigma = 62145$	$\Sigma = 2032854.0000$	

n =	3
$\bar{y} =$	20715
s =	1008.1800
CV% =	4.8669

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS05.D	0.10	43264	288.3333	83136.1111
VHORLS06.D	0.10	41353	-1622.6667	2633047.1111
VHORLS07.D	0.10	44310	1334.3333	1780445.4444
		$\Sigma = 128927$	$\Sigma = 4496628.6667$	

n =	3
$\bar{y} =$	42975.6667
s =	1499.4380
CV% =	3.4890

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS08.D	0.25	99507	2534.0000	6421156
VHORLS09.D	0.25	97399	426.0000	181476
VHORLS10.D	0.25	94013	-2960.0000	8761600
		$\Sigma = 290919$	$\Sigma = 15364232$	

n =	3
$\bar{y} =$	96973
s =	2771.6630
CV% =	2.8582

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS11.D	0.50	222420	2642.3333	6981925.4444
VHORLS12.D	0.50	215880	-3897.6667	15191805.4444
VHORLS13.D	0.50	221033	1255.3333	1575861.7778
		$\Sigma = 659333$	$\Sigma = 23749592.6667$	

n =	3
$\bar{y} =$	219777.6667
s =	3445.9826
CV% =	1.5679

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS14.D	1.00	386726	1822.0000	3319684.0000
VHORLS15.D	1.00	392468	7564.0000	57214096.0000
VHORLS16.D	1.00	375518	-9386.0000	88096996.0000
		$\Sigma = 1154712$	$\Sigma = 148630776.0000$	

n =	3
$\bar{y} =$	384904
s =	8620.6373
CV% =	2.2397



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA



CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN
POR PUNTO EN LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN, DES, ION 412 (AREA)

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS02.S

Fecha: 13 Abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS24.D	0.05	28905	680.3333	462853.4444
VHORLS25.D	0.05	27061	-1163.6667	1354120.1111
VHORLS26.D	0.05	28708	483.3333	233611.1111
$\Sigma = 84674$			$\Sigma = 2050584.6667$	

n = 3
 $\bar{y} = 28224.6667$
s = 1012.5672
CV% = 3.5875

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS27.D	0.10	60584	-1136.3333	1291253.4444
VHORLS28.D	0.10	62808	1087.6667	1183018.7778
VHORLS29.D	0.10	61769	48.6667	2368.4444
$\Sigma = 185161$			$\Sigma = 2476640.6667$	

n = 3
 $\bar{y} = 61720.33333$
s = 1112.7984
CV% = 1.8030

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS30.D	0.25	123898	2487	6185169
VHORLS31.D	0.25	120959	-452	204304
VHORLS32.D	0.25	119376	-2035	4141225
$\Sigma = 364233$			$\Sigma = 10530698$	

n = 3
 $\bar{y} = 121411$
s = 2294.6348
CV% = 1.8900

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS33.D	0.50	215835	2982.6667	8896300.4444
VHORLS34.D	0.50	213809	956.6667	915211.1111
VHORLS35.D	0.50	208913	-3939.3333	15518347.1111
$\Sigma = 638557$			$\Sigma = 25329858.6667$	

n = 3
 $\bar{y} = 212852.333$
s = 3558.7820
CV% = 1.6719

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS36.D	1.00	475252	-1388.6667	1928395.1111
VHORLS37.D	1.00	479228	2587.3333	6694293.7778
VHORLS38.D	1.00	475442	-1198.6667	1436801.7778
$\Sigma = 1429922$			$\Sigma = 10059490.6667$	

n = 3
 $\bar{y} = 476640.6667$
s = 2242.7094
CV% = 0.4705



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA



CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN
POR PUNTO EN LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN, DES, ION 412 (AREA)

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS03.S

Fecha: 19 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS46.D	0.05	23955	1133.6667	1285200.1111
VHORLS47.D	0.05	22468	-353.3333	124844.4444
VHORLS48.D	0.05	22041	-780.3333	608920.1111
		$\Sigma = 68464$	$\Sigma =$	2018964.6667

n =	3
$\bar{y} =$	22821.3333
s =	1004.7300
CV% =	4.4026

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS49.D	0.10	43904	-933.6667	871733.4444
VHORLS50.D	0.10	46057	1219.3333	1486773.7778
VHORLS51.D	0.10	44552	-285.6667	81605.4444
		$\Sigma = 134513$	$\Sigma =$	2440112.6667

n =	3
$\bar{y} =$	44837.66667
s =	1104.5616
CV% =	2.4635

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS52.D	0.25	76827	1885	3553225
VHORLS53.D	0.25	72269	-2673	7144929
VHORLS54.D	0.25	75730	788	620944
		$\Sigma = 224826$	$\Sigma =$	11319098

n =	3
$\bar{y} =$	74942
s =	2378.9807
CV% =	3.1744

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS55.D	0.50	172875	-2356.3333	5552306.7778
VHORLS56.D	0.50	175950	718.6667	516481.7778
VHORLS57.D	0.50	176869	1637.6667	2681952.1111
		$\Sigma = 525694$	$\Sigma =$	8750740.6667

n =	3
$\bar{y} =$	175231.333
s =	2091.7386
CV% =	1.1937

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS58.D	1.00	352161	-529.6667	280546.7778
VHORLS59.D	1.00	360458	7767.3333	60331467.1111
VHORLS60.D	1.00	345453	-7237.6667	52383818.7778
		$\Sigma = 1058072$	$\Sigma =$	112995832.6667

n =	3
$\bar{y} =$	352690.6667
s =	7516.5096
CV% =	2.1312



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA



CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN
POR PUNTO EN LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN ZERANOL, ION 538 (ALTURA)

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS01.S

Fecha: 11 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS05.D	0.10	72	1.3333	1.7778
VHORLS06.D	0.10	71	0.3333	0.1111
VHORLS07.D	0.10	69	-1.6667	2.7778
		$\Sigma = 212$	$\Sigma =$	4.6667

n =	3
$\bar{y} =$	70.6667
s =	1.5275
CV% =	2.1616

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS08.D	0.25	200	0.0000	0.0000
VHORLS09.D	0.25	204	4.0000	16.0000
VHORLS10.D	0.25	196	-4.0000	16.0000
		$\Sigma = 600$	$\Sigma =$	32.0000

n =	3
$\bar{y} =$	200
s =	4.0000
CV% =	2.0000

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS11.D	0.50	464	17.0000	289.0000
VHORLS12.D	0.50	440	-7.0000	49.0000
VHORLS13.D	0.50	437	-10.0000	100.0000
		$\Sigma = 1341$	$\Sigma =$	438.0000

n =	3
$\bar{y} =$	447
s =	14.7986
CV% =	3.3107

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS14.D	1.00	879	4.0000	16.0000
VHORLS15.D	1.00	869	-6.0000	36.0000
VHORLS16.D	1.00	877	2.0000	4.0000
		$\Sigma = 2625$	$\Sigma =$	56.0000

n =	3
$\bar{y} =$	875
s =	5.2915
CV% =	0.6047

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS17.D	2.00	1979	-11.6667	136.1111
VHORLS18.D	2.00	2149	158.3333	25069.4444
VHORLS19.D	2.00	1844	-146.6667	21511.1111
		$\Sigma = 5972$	$\Sigma =$	46716.6667

n =	3
$\bar{y} =$	1990.6667
s =	152.8343
CV% =	7.6775



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA



CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN
POR PUNTO EN LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN ZERANOL, ION 538 (ALTURA)

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS02.S

Fecha: 13 Abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS27.D	0.10	49	-0.6667	0.4444
VHORLS28.D	0.10	53	3.3333	11.1111
VHORLS29.D	0.10	47	-2.6667	7.1111
$\Sigma =$		149	$\Sigma =$	18.6667

n =	3
$\bar{y} =$	49.6667
s =	3.0551
CV% =	6.1511

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS30.D	0.25	205	-15.3333	235.111111
VHORLS31.D	0.25	220	-0.3333	0.11111111
VHORLS32.D	0.25	236	15.6667	245.444444
$\Sigma =$		661	$\Sigma =$	480.666667

n =	3
$\bar{y} =$	220.3333
s =	15.5027
CV% =	7.0360

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS33.D	0.50	412	-3.3333	11.1111
VHORLS34.D	0.50	412	-3.3333	11.1111
VHORLS35.D	0.50	422	6.6667	44.4444
$\Sigma =$		1246	$\Sigma =$	66.6667

n =	3
$\bar{y} =$	415.3333
s =	5.7735
CV% =	1.3901

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS35.D	1.00	814	41.3333	1708.4444
VHORLS37.D	1.00	784	11.3333	128.4444
VHORLS38.D	1.00	720	-52.6667	2773.7778
$\Sigma =$		2318	$\Sigma =$	4610.6667

n =	3
$\bar{y} =$	772.6667
s =	48.0139
CV% =	6.2140

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS39.D	2.00	1490	-133.3333	17777.7778
VHORLS40.D	2.00	1681	57.6667	3325.4444
VHORLS41.D	2.00	1699	75.6667	5725.4444
$\Sigma =$		4870	$\Sigma =$	26828.6667

n =	3
$\bar{y} =$	1623.3333
s =	115.8203
CV% =	7.1347



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA

CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN
POR PUNTO EN LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN ZERANOL, ION 538 (ALTURA)



Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS03.S

Fecha: 19 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS49.D	0.10	40	0.0000	0.0000
VHORLS50.D	0.10	42	2.0000	4.0000
VHORLS51.D	0.10	38	-2.0000	4.0000
$\Sigma =$		120	$\Sigma =$	8.0000

n =	3
$\bar{y} =$	40.0000
s =	2.0000
CV% =	5.0000

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS52.D	0.25	101	5.0000	25.0000
VHORLS53.D	0.25	96	0.0000	0.0000
VHORLS54.D	0.25	91	-5.0000	25.0000
$\Sigma =$		288	$\Sigma =$	50.0000

n =	3
$\bar{y} =$	96.0000
s =	5.0000
CV% =	5.2083

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS55.D	0.50	233	-1.6667	2.7778
VHORLS56.D	0.50	229	-5.6667	32.1111
VHORLS57.D	0.50	242	7.3333	53.7778
$\Sigma =$		704	$\Sigma =$	88.6667

n =	3
$\bar{y} =$	234.6667
s =	6.6583
CV% =	2.8374

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS58.D	1.00	523	-4.0000	16.0000
VHORLS59.D	1.00	534	7.0000	49.0000
VHORLS60.D	1.00	524	-3.0000	9.0000
$\Sigma =$		1581	$\Sigma =$	74.0000

n =	3
$\bar{y} =$	527.0000
s =	6.0828
CV% =	1.1542

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS61.D	2.00	1183	6.6667	44.4444
VHORLS62.D	2.00	1263	86.6667	7511.1111
VHORLS63.D	2.00	1083	-93.3333	8711.1111
$\Sigma =$		3529	$\Sigma =$	16266.6667

n =	3
$\bar{y} =$	1176.3333
s =	90.1850
CV% =	7.6666



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA



CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN
POR PUNTO EN LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN, ZERANOL, ION 538 (AREA)

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS01.S

Fecha: 11 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS08.D	0.25	5406	122.3333	14965.4444
VHORLS09.D	0.25	5357	73.3333	5377.7778
VHORLS10.D	0.25	5088	-195.6667	38285.4444
		$\Sigma = 15851$	$\Sigma =$	58628.6667

n =	3
$\bar{y} =$	5283.6667
s =	171.2143
CV% =	3.2404

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS11.D	0.50	13219	725.0000	525625.0000
VHORLS12.D	0.50	12058	-436.0000	190096.0000
VHORLS13.D	0.50	12205	-289.0000	83521.0000
		$\Sigma = 37482$	$\Sigma =$	799242.0000

n =	3
$\bar{y} =$	12494.0000
s =	632.1558
CV% =	5.0597

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS14.D	1.00	23009	-845.0000	714025.0000
VHORLS15.D	1.00	24358	504.0000	254016.0000
VHORLS16.D	1.00	24195	341.0000	116281.0000
		$\Sigma = 71562$	$\Sigma =$	1084322.0000

n =	3
$\bar{y} =$	23854
s =	736.3158
CV% =	3.0868

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS17.D	2.00	51386	-2051.6667	4209336.1111
VHORLS18.D	2.00	58179	4741.3333	22480241.7778
VHORLS19.D	2.00	50748	-2689.6667	7234306.7778
		$\Sigma = 160313$	$\Sigma =$	33923884.6667

n =	3
$\bar{y} =$	53437.6667
s =	4118.4879
CV% =	7.7071

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS20.D	5.00	144358	8089.0000	65431921.0000
VHORLS21.D	5.00	124424	-11845.0000	140304025.0000
VHORLS22.D	5.00	140025	3756.0000	14107536.0000
		$\Sigma = 408807$	$\Sigma =$	219843482.0000

n =	3
$\bar{y} =$	136269.0000
s =	10484.3570
CV% =	7.6939



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA



CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN
POR PUNTO EN LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN, ZERANOL, ION 538 (AREA)

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS02.S

Fecha: 13 Abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS30.D	0.25	5577	-207.3333	42987.1111
VHORLS31.D	0.25	5575	-209.3333	43820.4444
VHORLS32.D	0.25	6201	416.6667	173611.1111
		$\Sigma = 17353$	$\Sigma = 260418.6667$	

n =	3
$\bar{y} =$	5784.3333
s =	360.8453
CV% =	6.2383

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS33.D	0.50	10547	-467.33333	218400.4444
VHORLS34.D	0.50	11160	145.666667	21218.77778
VHORLS35.D	0.50	11336	321.666667	103469.4444
		$\Sigma = 33043$	$\Sigma = 343088.6667$	

n =	3
$\bar{y} =$	11014.3333
s =	414.1791
CV% =	3.7604

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS35.D	1.00	20220	-130.3333	16986.7778
VHORLS37.D	1.00	20460	109.6667	12026.7778
VHORLS38.D	1.00	20371	20.6667	427.1111
		$\Sigma = 61051$	$\Sigma = 29440.6667$	

n =	3
$\bar{y} =$	20350.3333
s =	121.3274
CV% =	0.5962

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS39.D	2.00	41088	-2543.6667	6470240.1111
VHORLS40.D	2.00	44355	723.3333	523211.1111
VHORLS41.D	2.00	45452	1820.3333	3313613.4444
		$\Sigma = 130895$	$\Sigma = 10307064.6667$	

n =	3
$\bar{y} =$	43631.6667
s =	2270.1393
CV% =	5.2030

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS42.D	5.00	133284	3997.6667	15981338.7778
VHORLS43.D	5.00	127954	-1332.3333	1775112.1111
VHORLS44.D	5.00	126621	-2665.3333	7104001.7778
		$\Sigma = 387859$	$\Sigma = 24860452.6667$	

n =	3
$\bar{y} =$	129286.3333
s =	3525.6526
CV% =	2.7270



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA



CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN
POR PUNTO EN LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN, ZERANOL, ION 538 (AREA)

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS03.S

Fecha: 19 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS52.D	0.25	2557	60.6667	3680.4444
VHORLS53.D	0.25	2470	-26.3333	693.4444
VHORLS54.D	0.25	2462	-34.3333	1178.7778
$\Sigma =$		7489	$\Sigma =$	5552.6667

n =	3
$\bar{y} =$	2496.3333
s =	52.6909
CV% =	2.1107

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS55.D	0.50	5971	-124.3333	15458.7778
VHORLS56.D	0.50	6102	6.6667	44.4444
VHORLS57.D	0.50	6213	117.6667	13845.4444
$\Sigma =$		18286	$\Sigma =$	29348.6667

n =	3
$\bar{y} =$	6095.3333
s =	121.1377
CV% =	1.9874

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS58.D	1.00	13351	-765.3333	585735.1111
VHORLS59.D	1.00	14522	405.6667	164565.4444
VHORLS60.D	1.00	14476	359.6667	129360.1111
$\Sigma =$		42349	$\Sigma =$	879660.6667

n =	3
$\bar{y} =$	14116.3333
s =	663.1971
CV% =	4.6981

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS61.D	2.00	30520	-793.6667	629906.7778
VHORLS62.D	2.00	32429	1115.3333	1243968.4444
VHORLS63.D	2.00	30992	-321.6667	103469.4444
$\Sigma =$		93941	$\Sigma =$	1977344.6667

n =	3
$\bar{y} =$	31313.6667
s =	994.3200
CV% =	3.1754

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS64.D	5.00	97705	-483.0000	233289.0000
VHORLS65.D	5.00	93203	-4985.0000	24850225.0000
VHORLS66.D	5.00	103656	5468.0000	29899024.0000
$\Sigma =$		294564	$\Sigma =$	54982538.0000

n =	3
$\bar{y} =$	98188.0000
s =	5243.2117
CV% =	5.3400



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA



CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN
POR PUNTO EN LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN TALERANOL, ION 538 (ALTURA)

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS01.S

Fecha: 11 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$	Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$	Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS08.D	0.25	215	14.3333	205.4444	VHORLS11.D	0.50	497	30.0000	900.0000	VHORLS14.D	1.00	841	-43.6667	1906.7778
VHORLS09.D	0.25	197	-3.6667	13.4444	VHORLS12.D	0.50	457	-10.0000	100.0000	VHORLS15.D	1.00	873	-11.6667	136.1111
VHORLS10.D	0.25	190	-10.6667	113.7778	VHORLS13.D	0.50	447	-20.0000	400.0000	VHORLS16.D	1.00	940	55.3333	3061.7778
		$\Sigma = 602$	$\Sigma = 332.6667$				$\Sigma = 1401$	$\Sigma = 1400.0000$				$\Sigma = 2654$	$\Sigma = 5104.6667$	

n =	3
$\bar{y} =$	200.6667
s =	12.8970
CV% =	6.4271

n =	3
$\bar{y} =$	467
s =	26.4575
CV% =	5.6654

n =	3
$\bar{y} =$	884.6666667
s =	50.5206
CV% =	5.7107

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$	Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS17.D	2.00	1944	-116.6667	13611.1111	VHORLS20.D	5.00	5291	82.0000	6724.0000
VHORLS18.D	2.00	2191	130.3333	16986.7778	VHORLS21.D	5.00	5204	-5.0000	25.0000
VHORLS19.D	2.00	2047	-13.6667	186.7778	VHORLS22.D	5.00	5132	-77.0000	5929.0000
		$\Sigma = 6182$	$\Sigma = 30784.6667$				$\Sigma = 15627$	$\Sigma = 12678.0000$	

n =	3
$\bar{y} =$	2060.666667
s =	124.0658
CV% =	6.0207

n =	3
$\bar{y} =$	5209
s =	79.6178
CV% =	1.5285



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA



CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN
POR PUNTO EN LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN TALERANOL, ION 538 (ALTURA)

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS02.S

Fecha: 13 Abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS30.D	0.25	209	-13.6667	186.7778
VHORLS31.D	0.25	220	-2.6667	7.1111
VHORLS32.D	0.25	239	16.3333	266.7778
$\Sigma =$		668	$\Sigma =$	460.6667

n =	3
$\bar{y} =$	222.6667
s =	15.1767
CV% =	6.8159

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS33.D	0.50	395	-8.0000	64.0000
VHORLS34.D	0.50	396	-7.0000	49.0000
VHORLS35.D	0.50	418	15.0000	225.0000
$\Sigma =$		1209	$\Sigma =$	338.0000

n =	3
$\bar{y} =$	403.0000
s =	13.0000
CV% =	3.2258

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS35.D	1.00	738	-23.3333	544.4444
VHORLS37.D	1.00	782	20.6667	427.1111
VHORLS38.D	1.00	764	2.6667	7.1111
$\Sigma =$		2284	$\Sigma =$	978.6667

n =	3
$\bar{y} =$	761.3333
s =	22.1209
CV% =	2.9055

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS39.D	2.00	1576	-91.6667	8402.7778
VHORLS40.D	2.00	1688	20.3333	413.4444
VHORLS41.D	2.00	1739	71.3333	5088.4444
$\Sigma =$		5003	$\Sigma =$	13904.6667

n =	3
$\bar{y} =$	1667.6667
s =	83.3807
CV% =	4.9998

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS42.D	5.00	5010	43.3333	1877.7778
VHORLS43.D	5.00	5184	217.3333	47233.7778
VHORLS44.D	5.00	4706	-260.6667	67947.1111
$\Sigma =$		14900	$\Sigma =$	117058.6667

n =	3
$\bar{y} =$	4966.6667
s =	241.9284
CV% =	4.8710



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA



CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN
POR PUNTO EN LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN TALERANOL, ION 538 (ALTURA)

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS03.S

Fecha: 19 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS52.D	0.25	107	3.6667	13.4444
VHORLS53.D	0.25	99	-4.3333	18.7778
VHORLS54.D	0.25	104	0.6667	0.4444
$\Sigma =$		310	$\Sigma =$	32.6667

n =	3
$\bar{y} =$	103.3333
s =	4.0415
CV% =	3.9111

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS55.D	0.50	238	-1.3333	1.7778
VHORLS56.D	0.50	242	2.6667	7.1111
VHORLS57.D	0.50	238	-1.3333	1.7778
$\Sigma =$		718	$\Sigma =$	10.6667

n =	3
$\bar{y} =$	239.3333
s =	2.3094
CV% =	0.9649

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS58.D	1.00	518	-8.6667	75.1111
VHORLS59.D	1.00	527	0.3333	0.1111
VHORLS60.D	1.00	535	8.3333	69.4444
$\Sigma =$		1580	$\Sigma =$	144.6667

n =	3
$\bar{y} =$	526.6667
s =	8.5049
CV% =	1.6149

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS61.D	2.00	1083	-51.0000	2601.0000
VHORLS62.D	2.00	1245	111.0000	12321.0000
VHORLS63.D	2.00	1074	-60.0000	3600.0000
$\Sigma =$		3402	$\Sigma =$	18522.0000

n =	3
$\bar{y} =$	1134.0000
s =	96.2341
CV% =	8.4863

Data File	Conc, ng/mL x	altura y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS64.D	5.00	3476	-129.6667	16813.4444
VHORLS65.D	5.00	3479	-126.6667	16044.4444
VHORLS66.D	5.00	3862	256.3333	65706.7778
$\Sigma =$		10817	$\Sigma =$	98564.6667

n =	3
$\bar{y} =$	3605.6667
s =	221.9962
CV% =	6.1569



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA



CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN
POR PUNTO EN LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN, TALERANOL, ION 538 (AREA)

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS01.S

Fecha: 11 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS08.D	0.25	5488	138.6667	19228.4444
VHORLS09.D	0.25	5337	-12.3333	152.1111
VHORLS10.D	0.25	5223	-126.3333	15960.1111
		$\Sigma = 16048$	$\Sigma = 35340.6667$	

n =	3
$\bar{y} =$	5349.333333
s =	132.9298
CV% =	2.4850

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS11.D	0.50	12694	220.0000	48400.0000
VHORLS12.D	0.50	12448	-26.0000	676.0000
VHORLS13.D	0.50	12280	-194.0000	37636.0000
		$\Sigma = 37422$	$\Sigma = 86712.0000$	

n =	3
$\bar{y} =$	12474
s =	208.2210
CV% =	1.6692

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS14.D	1.00	23091	-885.0000	783225.0000
VHORLS15.D	1.00	24226	250.0000	62500.0000
VHORLS16.D	1.00	24611	635.0000	403225.0000
		$\Sigma = 71928$	$\Sigma = 1248950.0000$	

n =	3
$\bar{y} =$	23976
s =	790.2373
CV% =	3.2960

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS17.D	2.00	51196	-2078.6667	4320855.1111
VHORLS18.D	2.00	57779	4504.3333	20289018.7778
VHORLS19.D	2.00	50849	-2425.6667	5883858.7778
		$\Sigma = 159824$	$\Sigma = 30493732.6667$	

n =	3
$\bar{y} =$	53274.6667
s =	3904.7236
CV% =	7.3294

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS20.D	5.00	145845	7572.0000	57335184.0000
VHORLS21.D	5.00	130027	-8246.0000	67996516.0000
VHORLS22.D	5.00	138947	674.0000	454276.0000
		$\Sigma = 414819$	$\Sigma = 125785976.0000$	

n =	3
$\bar{y} =$	138273
s =	7930.5099
CV% =	5.7354



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA
CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN
POR PUNTO EN LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN, TALERANOL, ION 538 (AREA)



Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS02.S

Fecha: 13 Abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS30.D	0.25	5520	-323.3333	104544.4444
VHORLS31.D	0.25	5689	-154.3333	23818.7778
VHORLS32.D	0.25	6321	477.6667	228165.4444
		$\Sigma = 17530$	$\Sigma =$	356528.6667

n =	3
$\bar{y} =$	5843.3333
s =	422.2136
CV% =	7.2256

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS33.D	0.50	10372	-422.3333	178365.4444
VHORLS34.D	0.50	11061	266.6667	71111.1111
VHORLS35.D	0.50	10950	155.6667	24232.1111
		$\Sigma = 32383$	$\Sigma =$	273708.6667

n =	3
$\bar{y} =$	10794.3333
s =	369.9383
CV% =	3.4272

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS35.D	1.00	20408	-266.6667	71111.1111
VHORLS37.D	1.00	20798	123.3333	15211.1111
VHORLS38.D	1.00	20818	143.3333	20544.4444
		$\Sigma = 62024$	$\Sigma =$	106866.6667

n =	3
$\bar{y} =$	20674.6667
s =	231.1565
CV% =	1.1181

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS39.D	2.00	42021	-2652.0000	7033104.0000
VHORLS40.D	2.00	45024	351.0000	123201.0000
VHORLS41.D	2.00	46974	2301.0000	5294601.0000
		$\Sigma = 134019$	$\Sigma =$	12450906.0000

n =	3
$\bar{y} =$	44673.0000
s =	2495.0858
CV% =	5.5852

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS42.D	5.00	136065	2673.3333	7146711.1111
VHORLS43.D	5.00	132725	-666.6667	444444.4444
VHORLS44.D	5.00	131385	-2006.6667	4026711.1111
		$\Sigma = 400175$	$\Sigma =$	11617866.6667

n =	3
$\bar{y} =$	133391.6667
s =	2410.1729
CV% =	1.8068



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA



CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN
POR PUNTO EN LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN, TALERANOL, ION 538 (AREA)

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS03.S

Fecha: 19 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS52.D	0.25	2664	130.0000	16900.0000
VHORLS53.D	0.25	2366	-168.0000	28224.0000
VHORLS54.D	0.25	2572	38.0000	1444.0000
$\Sigma =$ 7602			$\Sigma =$ 46568.0000	

n =	3
$\bar{y} =$	2534.0000
s =	152.5910
CV% =	6.0217

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS55.D	0.50	5841	-314.6667	99015.1111
VHORLS56.D	0.50	6385	229.3333	52593.7778
VHORLS57.D	0.50	6241	85.3333	7281.7778
$\Sigma =$ 18467			$\Sigma =$ 158890.6667	

n =	3
$\bar{y} =$	6155.6667
s =	281.8605
CV% =	4.5789

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS58.D	1.00	13614	-515.0000	265225.0000
VHORLS59.D	1.00	14272	143.0000	20449.0000
VHORLS60.D	1.00	14501	372.0000	138384.0000
$\Sigma =$ 42387			$\Sigma =$ 424058.0000	

n =	3
$\bar{y} =$	14129.0000
s =	460.4661
CV% =	3.2590

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS61.D	2.00	30859	-1076.0000	1157776.0000
VHORLS62.D	2.00	33060	1125.0000	1265625.0000
VHORLS63.D	2.00	31886	-49.0000	2401.0000
$\Sigma =$ 95805			$\Sigma =$ 2425802.0000	

n =	3
$\bar{y} =$	31935.0000
s =	1101.3178
CV% =	3.4486

Data File	Conc, ng/mL x	area y	$(y - \bar{y})$	$(y - \bar{y})^2$
VHORLS64.D	5.00	97482	-2058.3333	4236736.1111
VHORLS65.D	5.00	96519	-3021.3333	9128455.1111
VHORLS66.D	5.00	104620	5079.6667	25803013.4444
$\Sigma =$ 298621			$\Sigma =$ 39168204.6667	

n =	3
$\bar{y} =$	99540.3333
s =	4425.3929
CV% =	4.4458

ANEXO IV. REPETIBILIDAD DEL METODO



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA

**RESÚMEN DE LAS INCERTIDUMBRES DE LOS PUNTOS DE LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN,
MEDIANTE EL CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN
POR PUNTO EN LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN DES, ION 412 (ALTURA)**



Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS01.S

Fecha: 11 abril 05

Página 1 de 1

n	Concentración ng/mL (x)	Altura ($\bar{y}$)	$\sum (y - \bar{y})^2$	s	CV%
3	0.05	871.0000	6074.0000	55.1090	6.3271
3	0.10	2124.0000	83718.0000	204.5947	9.6325
3	0.25	4421.6667	33552.6667	129.5235	2.9293
3	0.50	10686.6667	37322.6667	136.6065	1.2783
3	1.00	18315.6667	238660.6667	345.4422	1.8860
$\Sigma =$	15	$\Sigma =$ 36419.0000	399328.0000		

número de serie de datos =	5
$S_{ponderada} =$	199.8319
$(\bar{y}) =$	7283.8000
CV% =	2.7435

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS02.S

Fecha: 13 Abril 05

Página 1 de 1

n	Concentración ng/mL (x)	Altura ($\bar{y}$)	$\sum (y - \bar{y})^2$	s	CV%
3	0.05	1387.6667	5874.6667	54.1972	3.9056
3	0.10	2952.3333	7074.6667	59.4755	2.0145
3	0.25	5770.6667	55692.6667	166.8722	2.8917
3	0.50	10408.3333	459204.6667	479.1684	4.6037
3	1.00	22856.3333	776332.6667	623.0300	2.7259
$\Sigma =$	15	$\Sigma =$ 43375.3333	1304179.3333		

número de serie de datos =	5
$S_{ponderada} =$	361.1342
$(\bar{y}) =$	8675.0667
CV% =	4.1629

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS03.S

Fecha: 19 abril 05

Página 1 de 1

n	Concentración ng/mL (x)	Altura ($\bar{y}$)	$\sum (y - \bar{y})^2$	s	CV%
3	0.05	1052.3333	5784.6667	53.7804	5.1106
3	0.10	2168.0000	44358.0000	148.9262	6.8693
3	0.25	3671.3333	94884.6667	217.8126	5.9328
3	0.50	8718.0000	30746.0000	123.9879	1.4222
3	1.00	17606.3333	787154.6667	627.3574	3.5632
$\Sigma =$	15	$\Sigma =$ 33216.0000	962928.0000		

número de serie de datos =	5
$S_{ponderada} =$	310.3108
$(\bar{y}) =$	6643.2000
CV% =	4.6711



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA



RESÚMEN DE LAS INCERTIDUMBRES DE LOS PUNTOS DE LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN,
MEDIANTE EL CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN
POR PUNTO EN LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN DES, ION 412 (AREA)

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS01.S

Fecha: 11 abril 05

Página 1 de 1

n	Concentración ng/mL (x)	Area (y)	$\sum (y - \bar{y})^2$	s	CV%
3	0.05	20715.0000	2032854.0000	1008.1800	4.8669
3	0.10	42975.6667	4496628.6667	1499.4380	3.4890
3	0.25	96973.0000	15364232.0000	2771.6630	2.8582
3	0.50	219777.6667	23749592.6667	3445.9826	1.5679
3	1.00	384904.0000	148630776.0000	8620.6373	2.2397
$\Sigma =$	15	$\Sigma =$ 765345.3333	194274083.3333		

número de serie de datos =	5
$S_{ponderada} =$	4407.6534
$(\bar{y}) =$	153069.0667
CV% =	2.8795

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS02.S

Fecha: 13 Abril 05

Página 1 de 1

n	Concentración ng/mL (x)	Area (y)	$\sum (y - \bar{y})^2$	s	CV%
3	0.05	28224.6667	2050584.6667	1012.5672	3.5875
3	0.10	61720.3333	2476640.6667	1112.7984	1.8030
3	0.25	121411.0000	10530698.0000	2294.6348	1.8900
3	0.50	212852.3333	25329858.6667	3558.7820	1.6719
3	1.00	476640.6667	10059490.6667	2242.7094	0.4705
$\Sigma =$	15	$\Sigma =$ 900849.0000	50447272.6667		

número de serie de datos =	5
$S_{ponderada} =$	2246.0470
$(\bar{y}) =$	180169.8000
CV% =	1.2466

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS03.S

Fecha: 19 abril 05

Página 1 de 1

n	Concentración ng/mL (x)	Area (y)	$\sum (y - \bar{y})^2$	s	CV%
3	0.05	22821.3333	2018964.6667	1004.7300	4.4026
3	0.10	44837.6667	2440112.6667	1104.5616	2.4635
3	0.25	74942.0000	11319098.0000	2378.9807	3.1744
3	0.50	175231.3333	8750740.6667	2091.7386	1.1937
3	1.00	352690.6667	112995832.6667	7516.5096	2.1312
$\Sigma =$	15	$\Sigma =$ 670523.0000	137524748.6667		

número de serie de datos =	5
$S_{ponderada} =$	3708.4329
$(\bar{y}) =$	134104.6000
CV% =	2.7653



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA



RESÚMEN DE LAS INCERTIDUMBRES DE LOS PUNTOS DE LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN,
MEDIANTE EL CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN
POR PUNTO EN LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN ZERANOL, ION 538 (ALTURA)

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS01.S

Fecha: 11 abril 05

Página 1 de 1

n	Concentración ng/mL (x)	Altura ($\bar{y}$)	$\sum (y - \bar{y})^2$	s	CV%
3	0.1	70.6667	4.6667	1.5275	2.1616
3	0.25	200.0000	32.0000	4.0000	2.0000
3	0.50	447.0000	438.0000	14.7986	3.3107
3	1.00	875.0000	56.0000	5.2915	0.6047
3	2.00	1990.6667	46716.6667	152.8343	7.6775
$\Sigma =$	15	$\Sigma =$ 3583.3333	47247.3333		

número de serie de datos =	5
$S_{ponderada} =$	68.7367
$(\bar{y}) =$	716.6667
CV% =	9.5912

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS02.S

Fecha: 13 Abril 05

Página 1 de 1

n	Concentración ng/mL (x)	Altura ($\bar{y}$)	$\sum (y - \bar{y})^2$	s	CV%
3	0.1	49.6667	18.6667	3.0551	6.1511
3	0.25	220.3333	480.6667	15.5027	7.0360
3	0.50	415.3333	66.6667	5.7735	1.3901
3	1.00	772.6667	4610.6667	48.0139	6.2140
3	2.00	1623.3333	26828.6667	115.8203	7.1347
$\Sigma =$	15	$\Sigma =$ 3081.3333	32005.3333		

número de serie de datos =	5
$S_{ponderada} =$	56.5733
$(\bar{y}) =$	616.2667
CV % =	9.1800

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS03.S

Fecha: 19 abril 05

Página 1 de 1

n	Concentración ng/mL (x)	Altura ($\bar{y}$)	$\sum (y - \bar{y})^2$	s	CV%
3	0.1	40.0000	8.0000	2.0000	5.0000
3	0.25	96.0000	50.0000	5.0000	5.2083
3	0.50	234.6667	88.6667	6.6583	2.8374
3	1.00	527.0000	74.0000	6.0828	1.1542
3	2.00	1176.3333	16266.6667	90.1850	7.6666
$\Sigma =$	15	$\Sigma =$ 2074.0000	16487.3333		

número de serie de datos =	5
$S_{ponderada} =$	40.6046
$(\bar{y}) =$	414.8000
CV% =	9.7890



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA



RESÚMEN DE LAS INCERTIDUMBRES DE LOS PUNTOS DE LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN,
MEDIANTE EL CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN
POR PUNTO EN LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN ZERANOL, ION 538 (AREA)

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS01.S

Fecha: 11 abril 05

Página 1 de 1

n	Concentración ng/mL (x)	Area ($\bar{y}$)	$\sum (y - \bar{y})^2$	s	CV%
3	0.25	5283.6667	58628.6667	171.2143	3.2404
3	0.50	12494.0000	799242.0000	632.1558	5.0597
3	1.00	23854.0000	1084322.0000	736.3158	3.0868
3	2.00	53437.6667	33923884.6667	4118.4879	7.7071
3	5.00	136269.0000	219843482.0000	10484.3570	7.6939
$\Sigma =$	15	$\Sigma =$ 231338.3333	255709559.3333		

número de serie de datos =	5
$S_{ponderada} =$	5056.7733
$(\bar{y}) =$	46267.6667
CV% =	10.9294

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS02.S

Fecha: 13 Abril 05

Página 1 de 1

n	Concentración ng/mL (x)	Area ($\bar{y}$)	$\sum (y - \bar{y})^2$	s	CV %
3	0.25	5784.3333	260418.6667	360.8453	6.2383
3	0.50	11014.3333	343088.6667	414.1791	3.7604
3	1.00	20350.3333	29440.6667	121.3274	0.5962
3	2.00	43631.6667	10307064.6667	2270.1393	5.2030
3	5.00	129286.3333	24860452.6667	3525.6526	2.7270
$\Sigma =$	15	$\Sigma =$ 210067.0000	35800465.3333		

número de serie de datos =	5
$S_{ponderada} =$	1892.1011
$(\bar{y}) =$	42013.4000
CV% =	4.5036

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS03.S

Fecha: 19 abril 05

Página 1 de 1

n	Concentración ng/mL (x)	Area ($\bar{y}$)	$\sum (y - \bar{y})^2$	s	CV%
3	0.25	2496.3333	5552.6667	52.6909	2.1107
3	0.50	6095.3333	29348.6667	121.1377	1.9874
3	1.00	14116.3333	879660.6667	663.1971	4.6981
3	2.00	31313.6667	1977344.6667	994.3200	3.1754
3	5.00	98188.0000	54982538.0000	5243.2117	5.3400
$\Sigma =$	15	$\Sigma =$ 152209.6667	57874444.6667		

número de serie de datos =	5
$S_{ponderada} =$	2405.7108
$(\bar{y}) =$	30441.9333
CV% =	7.9026



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA



RESÚMEN DE LAS INCERTIDUMBRES DE LOS PUNTOS DE LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN,
MEDIANTE EL CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN
POR PUNTO EN LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN TALERANOL, ION 538 (ALTURA)

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS01.S

Fecha: 11 abril 05

Página 1 de 1

n	Concentración ng/mL (x)	Altura ($\bar{y}$)	$\sum (y - \bar{y})^2$	s	CV%
3	0.25	200.6667	332.6667	12.8970	6.4271
3	0.50	467.0000	1400.0000	26.4575	5.6654
3	1.00	884.6667	5104.6667	50.5206	5.7107
3	2.00	2060.6667	30784.6667	124.0658	6.0207
3	5.00	5209.0000	12678.0000	79.6178	1.5285
$\Sigma =$	15	$\Sigma =$ 8822.0000	50300.0000		

número de serie de datos =	5
$S_{ponderada} =$	70.9225
$(\bar{y}) =$	1764.4000
CV% =	4.0196

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS02.S

Fecha: 13 Abril 05

Página 1 de 1

n	Concentración ng/mL (x)	Altura ($\bar{y}$)	$\sum (y - \bar{y})^2$	s	CV%
3	0.25	222.6667	460.6667	15.1767	6.8159
3	0.50	403.0000	338.0000	13.0000	3.2258
3	1.00	761.3333	978.6667	22.1209	2.9055
3	2.00	1667.6667	13904.6667	83.3807	4.9998
3	5.00	4966.6667	117058.6667	241.9284	4.8710
$\Sigma =$	15	$\Sigma =$ 8021.3333	132740.6667		

número de serie de datos =	5
$S_{ponderada} =$	115.2131
$(\bar{y}) =$	1604.2667
CV% =	7.1817

Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS03.S

Fecha: 19 abril 05

Página 1 de 1

n	Concentración ng/mL (x)	Altura ($\bar{y}$)	$\sum (y - \bar{y})^2$	s	CV%
3	0.25	103.3333	32.6667	4.0415	3.9111
3	0.50	239.3333	10.6667	2.3094	0.9649
3	1.00	526.6667	144.6667	8.5049	1.6149
3	2.00	1134.0000	18522.0000	96.2341	8.4863
3	5.00	3605.6667	98564.6667	221.9962	6.1569
$\Sigma =$	15	$\Sigma =$ 5609.0000	117274.6667		

número de serie de datos =	5
$S_{ponderada} =$	108.2934
$(\bar{y}) =$	1121.8000
CV% =	9.6535



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
UNIDAD DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA ANALÍTICA



RESÚMEN DE LAS INCERTIDUMBRES DE LOS PUNTOS DE LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN,
MEDIANTE EL CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y COEFICIENTE DE VARIACIÓN
POR PUNTO EN LA LÍNEA DE CALIBRACIÓN TALERANOL, ION 538 (AREA)

Método: HOCTL3M3.M

Secuencia: VALHORLINSIS01.S

Fecha: 11 abril 05

Página 1 de 1

n	Concentración ng/mL(x)	Area ($\bar{y}$)	$\sum (y - \bar{y})^2$	s	CV%
3	0.25	5349.3333	35340.6667	132.9298	2.4850
3	0.50	12474.0000	86712.0000	208.2210	1.6692
3	1.00	23976.0000	1248950.0000	790.2373	3.2960
3	2.00	53274.6667	30493732.6667	3904.7236	7.3294
3	5.00	138273.0000	125785976.0000	7930.5099	5.7354
$\Sigma =$	15	$\Sigma =$ 233347.0000	157650711.3333		

número de serie de datos =	5
$S_{ponderada} =$	3970.5253
$(\bar{y}) =$	46669.4000
CV% =	8.5078

Método: HOCTL3M3.M

Secuencia: VALHORLINSIS02.S

Fecha: 13 Abril 05

Página 1 de 1

n	Concentración ng/mL (x)	Area ($\bar{y}$)	$\sum (y - \bar{y})^2$	s	CV%
3	0.25	5843.3333	356528.6667	422.2136	7.2256
3	0.50	10794.3333	273708.6667	369.9383	3.4272
3	1.00	20674.6667	106866.6667	231.1565	1.1181
3	2.00	44673.0000	12450906.0000	2495.0858	5.5852
3	5.00	133391.6667	11617866.6667	2410.1729	1.8068
$\Sigma =$	15	$\Sigma =$ 215377.0000	24805876.6667		

número de serie de datos =	5
$S_{ponderada} =$	1574.9881
$(\bar{y}) =$	43075.4000
CV% =	3.6564

Método: HOCTL3M3.M

Secuencia: VALHORLINSIS03.S

Fecha: 19 abril 05

Página 1 de 1

n	Concentración ng/mL (x)	Area ($\bar{y}$)	$\sum (y - \bar{y})^2$	s	CV%
3	0.25	2534.0000	46568.0000	152.5910	6.0217
3	0.50	6155.6667	158890.6667	281.8605	4.5789
3	1.00	14129.0000	424058.0000	460.4661	3.2590
3	2.00	31935.0000	2425802.0000	1101.3178	3.4486
3	5.00	99540.3333	39168204.6667	4425.3929	4.4458
$\Sigma =$	15	$\Sigma =$ 154294.0000	42223523.3333		

número de serie de datos =	5
$S_{ponderada} =$	2054.8363
$(\bar{y}) =$	30858.8000
CV% =	6.6588

ANEXO V. LÍMITE DE DETECCIÓN, LÍMITE DE IDENTIFICACIÓN Y LÍMITE DE DETERMINACIÓN



CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR RESIDUAL, ALTURA CRÍTICA LÍMITE DE DETECCIÓN, LÍMITE DE IDENTIFICACIÓN Y LÍMITE DE DETERMINACIÓN DES, ION 412 (ALTURA)



Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS01.S

Fecha: 11 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL (x)	altura (y)	y-(a+bx)	(y-(a+bx)) ²	(x - $\bar{x}$)	(x - $\bar{x}$) ²
VHORLS01.D	0.05	818	-347	120246	-0.33	0.11
VHORLS02.D	0.05	867	-298	88664	-0.33	0.11
VHORLS04.D	0.05	928	-237	56057	-0.33	0.11
VHORLS05.D	0.10	2106	14	199	-0.28	0.08
VHORLS06.D	0.10	1929	-163	26534	-0.28	0.08
VHORLS07.D	0.10	2337	245	60078	-0.28	0.08
VHORLS08.D	0.25	4536	-337	113752	-0.13	0.02
VHORLS09.D	0.25	4448	-425	180855	-0.13	0.02
VHORLS10.D	0.25	4281	-592	350785	-0.13	0.02
VHORLS11.D	0.50	10836	1327	1761184	0.12	0.01
VHORLS12.D	0.50	10656	1147	1315830	0.12	0.01
VHORLS13.D	0.50	10568	1059	1121685	0.12	0.01
VHORLS14.D	1.00	17932	-848	719392	0.62	0.38
VHORLS15.D	1.00	18602	-178	31744	0.62	0.38
VHORLS16.D	1.00	18413	-367	134814	0.62	0.38
?	5.7000	109257.0000	?	6081818.0044	?	1.8090
media =	0.3800	7283.8000				
media ² =	0.1444	53053742.4400				

$$a = 237.6379$$

$$b = 18542.5318$$

$$n = 15$$

$$1/n = 0.0667$$

desv. std. residual

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - (a + bx_i))^2}{n - 2}}$$

altura crítica

$$S_y = 683.9826$$

$$y_{crit} = a + s_y t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$t_{95\%, n-2 \text{ g. l.}} = 2.1600$$

$$S_{yt \ 95\%} = 1477.4023$$

$$y_{crit \ 95\%} = 1819.5556$$

Límite de detección

LOD

$$DTC = \frac{(y_{crit} - a)}{b} = \frac{s_y t_{f, \alpha}}{b} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTC_{95\%} = 0.0853 \text{ ng/mL}$$

Límite de identificación

LOQ

$$ID = 2 \times DTC$$

$$ID_{95\%} = 0.1706 \text{ ng/mL}$$

Límite de determinación

$$y_{DTM1} = \bar{y} + b (ID - \bar{x}) + s_y t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(ID - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTM1 = (y_{DTM1} - a)/b$$

$$y_{DTM1 \ 95\%} = 4927.5998$$

$$DTM1_{95\%} = 0.2529 \text{ ng/mL}$$

$$DTM3 = \bar{x} - \frac{b 0.3^2}{D} \bar{y} + \frac{s_y t_{f, \alpha}}{D} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right) D + \frac{0.3^2 \bar{y}^2}{Q}}$$

$$Q = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

$$D = (0.3b)^2 - \frac{(s_y t_{f, \alpha})^2}{Q}$$

$$Q = 1.8090$$

$$DTM3_{95\%} = 0.2625 \text{ ng/mL}$$

$$D_{95\%} = 29737705.6479$$

$$S_{yt \ 95\%} = 4.9681E-05$$

$$D_{95} = 0.3^2 = 0.0900$$

$$y_{media} * ((b * 0.3^2) / D_{95\%}) = 0.4088$$



**CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR RESIDUAL, ALTURA CRÍTICA
LÍMITE DE DETECCIÓN, LÍMITE DE IDENTIFICACIÓN
Y LÍMITE DE DETERMINACIÓN
DES, ION 412 (ALTURA)**



Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS02.S

Fecha: 13 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL (x)	altura (y)	y-(a+bx)	(y-(a+bx)) ²	(x - $\bar{x}$)	(x - $\bar{x}$) ²
VHORLS24.D	0.05	1439	89	7947	-0.3300	0.1089
VHORLS25.D	0.05	1331	-19	356	-0.3300	0.1089
VHORLS26.D	0.05	1393	43	1861	-0.3300	0.1089
VHORLS27.D	0.10	2919	459	210923	-0.2800	0.0784
VHORLS28.D	0.10	2917	457	209090	-0.2800	0.0784
VHORLS29.D	0.10	3021	561	315016	-0.2800	0.0784
VHORLS30.D	0.25	5957	168	28097	-0.1300	0.0169
VHORLS31.D	0.25	5720	-69	4813	-0.1300	0.0169
VHORLS32.D	0.25	5635	-154	23833	-0.1300	0.0169
VHORLS33.D	0.50	10762	-577	332675	0.1200	0.0144
VHORLS34.D	0.50	10600	-739	545795	0.1200	0.0144
VHORLS35.D	0.50	9863	-1476	2177925	0.1200	0.0144
VHORLS36.D	1.00	22886	448	201078	0.6200	0.3844
VHORLS37.D	1.00	23464	1026	1053533	0.6200	0.3844
VHORLS38.D	1.00	22219	-219	47778	0.6200	0.3844
Σ =	5.7000	130126.0000		5160718.5691		1.8090
media =	0.3800	8675.0667				
media ² =	0.1444	75256781.6711				

$$a = \frac{239.9762}{22197.6064}$$

$$n = 15$$

$$1/n = 0.0667$$

desv.std. residual

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - (a + bx_i))^2}{n - 2}}$$

altura crítica

$$y_{crit} = a + s_y t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$s_y = 630.0622$$

$$t_{95\%, n-2 \text{ g. l.}} = 2.1600$$

$$s_{yt \ 95\%} = 1360.9343$$

$$y_{crit \ 95\%} = 1697.1866$$

Límite de detección

LOD

$$DTC = \frac{(y_{crit} - a)}{b} = \frac{s_y}{b} t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTC_{95\%} = 0.0656 \text{ ng/mL}$$

Límite de identificación

LOQ

$$ID = 2 \times DTC$$

$$ID_{95\%} = 0.1313 \text{ ng/mL}$$

Límite de determinación

$$y_{DTM1} = \bar{y} + b (ID - \bar{x}) + s_y t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(ID - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTM1 = (y_{DTM1} - a)/b$$

$$y_{DTM1 \ 95\%} = 4560.0265$$

$$DTM1_{95\%} = 0.1946 \text{ ng/mL}$$

$$DTM3 = \bar{x} - \frac{b 0.3^2}{D} \bar{y} + \frac{s_y t_{f, \alpha}}{D} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right) D + \frac{0.3^2 \bar{y}^2}{Q}}$$

$$Q = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

$$D = (0.3b)^2 - \frac{(s_y t_{f, \alpha})^2}{Q}$$

$$Q = \frac{\sum (x - x_{media})^2}{1.8090}$$

$$D_{95\%} = 43322187.0957$$

$$DTM3_{95\%} = 0.2020 \text{ ng/mL}$$

$$s_{yt \ 95\%} = 3.1414E-05$$

$$D_{95} = 0.3^2 = 0.0900$$

$$y_{media} * ((b * 0.3^2) / D_{95\%}) = 0.4000$$



**CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR RESIDUAL, ALTURA CRÍTICA
LÍMITE DE DETECCIÓN, LÍMITE DE IDENTIFICACIÓN
Y LÍMITE DE DETERMINACIÓN
DES, ION 412 (ALTURA)**



Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS03.S

Fecha: 19 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL (x)	altura (y)	y-(a+bx)	(y-(a+bx)) ²	(x - $\bar{x}$)	(x - $\bar{x}$) ²
VHORLS46.D	0.05	1109	229	52332	-0.3300	0.1089
VHORLS47.D	0.05	1046	166	27477	-0.3300	0.1089
VHORLS48.D	0.05	1002	122	14826	-0.3300	0.1089
VHORLS49.D	0.10	2181	428	182830	-0.2800	0.0784
VHORLS50.D	0.10	2310	557	309788	-0.2800	0.0784
VHORLS51.D	0.10	2013	260	67385	-0.2800	0.0784
VHORLS52.D	0.25	3830	-543	294786	-0.1300	0.0169
VHORLS53.D	0.25	3423	-950	902390	-0.1300	0.0169
VHORLS54.D	0.25	3761	-612	374473	-0.1300	0.0169
VHORLS55.D	0.50	8577	-162	26187	0.1200	0.0144
VHORLS56.D	0.50	8810	71	5066	0.1200	0.0144
VHORLS57.D	0.50	8767	28	794	0.1200	0.0144
VHORLS58.D	1.00	17865	394	155565	0.6200	0.3844
VHORLS59.D	1.00	18063	592	350958	0.6200	0.3844
VHORLS60.D	1.00	16891	-580	335917	0.6200	0.3844
$\Sigma =$	5.7000	99648.0000		3100773.1694	$\Sigma =$	1.8090
media =	0.3800	6643.2000				
media ² =	0.1444	44132106.2400				

$$a = \frac{7.0619}{17463.5213}$$

$$n = \frac{15}{0.0667}$$

$$\text{desv.std. residual } s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - (a + bx_i))^2}{n - 2}}$$

altura crítica

$$y_{crit} = a + s_y t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$t_{95\%, n-2 \text{ g. l.}} = 2.1600$$

$$s_{yt 95\%} = 1054.9140$$

$$y_{crit 95\%} = 1136.6033$$

Límite de detección
LOD

$$DTC = \frac{(y_{crit} - a)}{b} = \frac{s_y}{b} t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTC_{95\%} = 0.0647 \text{ ng/mL}$$

Límite de identificación
LOQ

$$ID = 2 \times DTC$$

$$ID_{95\%} = 0.1294 \text{ ng/mL}$$

Límite de determinación

$$y_{DTM1} = \bar{y} + b (ID - \bar{x}) + s_y t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(ID - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTM1 = (y_{DTM1} - a)/b$$

$$y_{DTM1 95\%} = 3355.7192 \quad DTM1_{95\%} = 0.1918 \text{ ng/mL}$$

$$DTM3 = \bar{x} - \frac{b 0.3^2}{D} \bar{y} + \frac{s_y t_{f, \alpha}}{D} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right) D + \frac{0.3^2 \bar{y}^2}{Q}}$$

$$S_y = 488.3861$$

$$Q = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad D = (0.3b)^2 - \frac{(s_y t_{f, \alpha})^2}{Q}$$

$$Q = \frac{\sum (x - x_{media})^2}{1.8090} \quad DTM3_{95\%} = 0.2091 \text{ ng/mL}$$

$$D_{95\%} = 26832541.1898$$

$$S_{yt 95\%} = 3.9315E-05$$

$$D_{95} = 0.3^2 = 0.0900$$

$$y_{media} * ((b * 0.3^2) / D_{95\%}) = 0.3891$$



**CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR RESIDUAL, ALTURA CRÍTICA
LÍMITE DE DETECCIÓN, LÍMITE DE IDENTIFICACIÓN
Y LÍMITE DE DETERMINACIÓN
DES, ION 412 (AREA)**



Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS01.S

Fecha: 11 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL (x)	area (y)	y-(a+bx)	(y-(a+bx)) ²	(x - $\bar{x}$)	(x - $\bar{x}$) ²
VHORLS01.D	0.05	17197	-7490	56092859	-0.3300	0.1089
VHORLS02.D	0.05	19718	-4969	24686157	-0.3300	0.1089
VHORLS04.D	0.05	20693	-3994	15948175	-0.3300	0.1089
VHORLS05.D	0.10	43264	-829	686561	-0.2800	0.0784
VHORLS06.D	0.10	41353	-2740	7505352	-0.2800	0.0784
VHORLS07.D	0.10	44310	217	47267	-0.2800	0.0784
VHORLS08.D	0.25	99507	-2804	7861348	-0.1300	0.0169
VHORLS09.D	0.25	97399	-4912	24125873	-0.1300	0.0169
VHORLS10.D	0.25	94013	-8298	68853644	-0.1300	0.0169
VHORLS11.D	0.50	222420	23079	532632127	0.1200	0.0144
VHORLS12.D	0.50	215880	16539	273532706	0.1200	0.0144
VHORLS13.D	0.50	221033	21692	470535238	0.1200	0.0144
VHORLS14.D	1.00	386726	-6676	44567751	0.6200	0.3844
VHORLS15.D	1.00	392468	-934	872185	0.6200	0.3844
VHORLS16.D	1.00	375518	-17884	319834174	0.6200	0.3844
$\Sigma =$	5.7000	2291499.0000		$\Sigma =$ 1847781416.1180	$\Sigma =$ 1.8090	
media =	0.3800	152766.6000				
media ² =	0.1444	23337634075.5600				

a = 5280.4433
b = 388121.4649

n = 15
1/n = 0.0667

desv.std. residual

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - (a + bx_i))^2}{n - 2}}$$

altura crítica

$S_y =$ 11922.1236

$$y_{crit} = a + Syt_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$t_{95\%, n-2 \text{ g. l.}} =$ 2.1600

$S_{yt \ 95\%} =$ 25751.7871

$y_{crit \ 95\%} =$ 32853.9795

Límite de detección

LOD

$$DTC = \frac{(y_{crit} - a)}{b} = \frac{s_y}{b} t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

DTC_{95%} = 0.0710 ng/mL

Límite de identificación

LOQ

$$ID = 2 \times DTC$$

ID_{95%} = 0.1421 ng/mL

Límite de determinación

$$y_{DTM1} = \bar{y} + b (ID - \bar{x}) + s_y t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(ID - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTM1 = (y_{DTM1} - a)/b$$

$y_{DTM1 \ 95\%} =$ 87023.8838

DTM1_{95%} = 0.2106 ng/mL

$$DTM3 = \bar{x} - \frac{b 0.3^2}{D} \bar{y} + \frac{Sy t_{f, \alpha}}{D} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right) D + \frac{0.3^2 \bar{y}^2}{Q}}$$

$$Q = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad D = (0.3b)^2 - \frac{(Sy t_{f, \alpha})^2}{Q}$$

$Q =$ 1.8090 $DTM3_{95\%} =$ 0.2164 ng/mL
 $D_{95\%} =$ 13190858180.6035

$S_{y \ 95\%} =$ 1.9522E-06
D₉₅ = 0.3² = 0.0900

$y \text{ media } * ((b * 0.3^2) / D_{95\%}) =$ 0.4045



**CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR RESIDUAL, ALTURA CRÍTICA
LÍMITE DE DETECCIÓN, LÍMITE DE IDENTIFICACIÓN
Y LÍMITE DE DETERMINACIÓN
DES, ION 412 (AREA)**



Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS02.S

Fecha: 13 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL (x)	area (y)	y-(a+bx)	(y-(a+bx)) ²	(x - $\bar{x}$)	(x - $\bar{x}$) ²
VHORLS24.D	0.05	28905	1247	1554432	-0.33	0.11
VHORLS25.D	0.05	27061	-597	356685	-0.33	0.11
VHORLS26.D	0.05	28708	1050	1102014	-0.33	0.11
VHORLS27.D	0.10	60584	9818	96392245	-0.28	0.08
VHORLS28.D	0.10	62808	12042	145008686	-0.28	0.08
VHORLS29.D	0.10	61769	11003	121065024	-0.28	0.08
VHORLS30.D	0.25	123898	3809	14504786	-0.13	0.02
VHORLS31.D	0.25	120959	870	756056	-0.13	0.02
VHORLS32.D	0.25	119376	-713	509061	-0.13	0.02
VHORLS33.D	0.50	215835	-19794	391784710	0.12	0.01
VHORLS34.D	0.50	213809	-21820	476092860	0.12	0.01
VHORLS35.D	0.50	208913	-26716	713720731	0.12	0.01
VHORLS36.D	1.00	475252	8545	73022382	0.62	0.38
VHORLS37.D	1.00	479228	12521	156783290	0.62	0.38
VHORLS38.D	1.00	475442	8735	76305701	0.62	0.38
Σ =	5.7000	2702547.0000		Σ = 2268958662.8134		Σ = 1.8090
media =	0.3800	180169.8000				
media ² =	0.1444	32461156832.0400				

$$a = \frac{4550.4179}{462156.2687}$$

$$n = 15$$

$$1/n = 0.0667$$

desv.std. residual

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - (a + bx_i))^2}{n - 2}}$$

altura crítica

$$y_{crit} = a + s_y t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_y = 13211.1802$$

$$t_{95\%, n-2, l.} = 2.1600$$

$$S_{yt \ 95\%} = 28536.1492$$

$$y_{crit \ 95\%} = 35105.2893$$

Límite de detección
LOD

$$DTC = \frac{(y_{crit} - a)}{b} = \frac{s_y}{b} t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTC_{95\%} = 0.0661 \text{ ng/mL}$$

Límite de identificación
LOQ

$$ID = 2 \times DTC$$

$$ID_{95\%} = 0.1322 \text{ ng/mL}$$

Límite de determinación

$$y_{DTM1} = \bar{y} + b (\bar{x} - \bar{x}) + s_y t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{x} - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTM1 = (y_{DTM1} - a)/b$$

$$y_{DTM1 \ 95\%} = 95133.3003 \quad DTM1_{95\%} = 0.1960 \text{ ng/mL}$$

$$DTM3 = \bar{x} - \frac{b 0.3^2}{D} \bar{y} + \frac{s_y t_{f, \alpha}}{D} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right) D + \frac{0.3^2 \bar{y}^2}{Q}}$$

$$Q = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad D = (0.3b)^2 - \frac{(s_y t_{f, \alpha})^2}{Q}$$

$$Q = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{1.8090} \quad D_{95\%} = 18772812772.6076 \quad DTM3_{95\%} = 0.2044 \text{ ng/mL}$$

$$S_{yt \ 95\%} = 1.5201E-06$$

$$D_{95} = 0.3^2 = 0.0900$$

$$y_{media} * ((b * 0.3^2) / D_{95\%}) = 0.3992$$



**CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR RESIDUAL, ALTURA CRÍTICA
LÍMITE DE DETECCIÓN, LÍMITE DE IDENTIFICACIÓN
Y LÍMITE DE DETERMINACIÓN
DES, ION 412 (AREA)**



Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS03.S

Fecha: 19 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL (x)	area (y)	y-(a+bx)	(y-(a+bx)) ²	(x - $\bar{x}$)	(x - $\bar{x}$) ²
VHORLS46.D	0.05	23955	4703	22122858	-0.3300	0.1089
VHORLS47.D	0.05	22468	3216	10345835	-0.3300	0.1089
VHORLS48.D	0.05	22041	2789	7781278	-0.3300	0.1089
VHORLS49.D	0.10	43904	7251	52569899	-0.2800	0.0784
VHORLS50.D	0.10	46057	9404	88426005	-0.2800	0.0784
VHORLS51.D	0.10	44552	7899	62386464	-0.2800	0.0784
VHORLS52.D	0.25	76827	-12032	144779653	-0.1300	0.0169
VHORLS53.D	0.25	72269	-16590	275242755	-0.1300	0.0169
VHORLS54.D	0.25	75730	-13129	172382239	-0.1300	0.0169
VHORLS55.D	0.50	172875	-2994	8966201	0.1200	0.0144
VHORLS56.D	0.50	175950	81	6503	0.1200	0.0144
VHORLS57.D	0.50	176869	1000	999277	0.1200	0.0144
VHORLS58.D	1.00	352161	2272	5161070	0.6200	0.3844
VHORLS59.D	1.00	360458	10569	111699508	0.6200	0.3844
VHORLS60.D	1.00	345453	-4436	19679881	0.6200	0.3844
Σ =	5.7000	2011569.0000		Σ = 982549423.4140	Σ =	1.8090
media =	0.3800	134104.6000				
media ² =	0.1444	17984043741.1600				

$$a = \frac{1849.5218}{348039.6794}$$

$$n = 15$$

$$1/n = 0.0667$$

desv. std. residual

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - (a + bx_i))^2}{n - 2}}$$

altura crítica

$$y_{crit} = a + s_y t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

t_{95%, n-2 g. l.} = 2.1600

S_{yt 95%} = 18778.4299

y_{crit 95%} = 21956.3872

Límite de detección
LOD

$$DTC = \frac{(y_{crit} - a)}{b} = \frac{s_y}{b} t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

DTC_{95%} = 0.0578 ng/mL

Límite de identificación
LOQ

$$ID = 2 \times DTC$$

ID_{95%} = 0.1155 ng/mL

Límite de determinación

$$y_{DTM1} = \bar{y} + b (ID - \bar{x}) + s_y t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(ID - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTM1 = (y_{DTM1} - a)/b$$

y_{DTM1 95%} = 61461.7158

DTM1_{95%} = 0.1713 ng/mL

$$DTM3 = \bar{x} - \frac{b \cdot 0.3^2}{D} \bar{y} + \frac{s_y t_{f, \alpha}}{D} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right) D + \frac{0.3^2 \bar{y}^2}{Q}}$$

$$Q = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad D = (0.3b)^2 - \frac{(s_y t_{f, \alpha})^2}{Q}$$

Q = $\frac{\Sigma(x - x_{media})^2}{1.8090}$ DTM3_{95%} = 0.1823 ng/mL

D_{95%} = 10706915072.1647

S_{yt 95%} = 1.7539E-06

D₉₅ = 0.3² = 0.0900

y media * ((b*0.3²)/D_{95%}) = 0.3923



**CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR RESIDUAL, ALTURA CRÍTICA
LÍMITE DE DETECCIÓN, LÍMITE DE IDENTIFICACIÓN
Y LÍMITE DE DETERMINACIÓN
ZERANOL, ION 538 (ALTURA)**



Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS01.S

Fecha: 11 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL (x)	altura (y)	y-(a+bx)	(y-(a+bx)) ²	(x - $\bar{x}$)	(x - $\bar{x}$) ²
VHORLS05.D	0.10	72	31	957	-0.6700	0.4489
VHORLS06.D	0.10	71	30	896	-0.6700	0.4489
VHORLS07.D	0.10	69	28	781	-0.6700	0.4489
VHORLS08.D	0.25	200	8	59	-0.5200	0.2704
VHORLS09.D	0.25	204	12	137	-0.5200	0.2704
VHORLS10.D	0.25	196	4	14	-0.5200	0.2704
VHORLS11.D	0.50	464	20	384	-0.2700	0.0729
VHORLS12.D	0.50	440	-4	19	-0.2700	0.0729
VHORLS13.D	0.50	437	-7	55	-0.2700	0.0729
VHORLS14.D	1.00	879	-70	4843	0.2300	0.0529
VHORLS15.D	1.00	869	-80	6335	0.2300	0.0529
VHORLS16.D	1.00	877	-72	5125	0.2300	0.0529
VHORLS17.D	2.00	1979	22	486	1.2300	1.5129
VHORLS18.D	2.00	2149	192	36879	1.2300	1.5129
VHORLS19.D	2.00	1844	-113	12760	1.2300	1.5129
$\Sigma =$	11.5500	10750.0000		69729.9078	$\Sigma =$	7.0740
media =	0.7700	716.6667				
media ² =	0.5929	513611.1111				

$$a = -59.7772$$

$$b = 1008.3687$$

$$n = 15$$

$$1/n = 0.0667$$

desv.std. residual

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - (a + bx_i))^2}{n - 2}}$$

altura crítica

$$y_{crit} = a + sytf, \alpha \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$s_y = 73.2382$$

$$t_{95\%, n-2 \text{ g. l.}} = 2.1600$$

$$s_{yt \ 95\%} = 158.1946$$

$$y_{crit \ 95\%} = 109.9030$$

Límite de detección

LOD

$$DTC = \frac{(y_{crit} - a)}{b} = \frac{s_y}{b} t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTC_{95\%} = 0.1683 \text{ ng/mL}$$

Límite de identificación

LOQ

$$ID = 2 \times DTC$$

$$ID_{95\%} = 0.3365 \text{ ng/mL}$$

Límite de determinación

$$y_{DTM1} = \bar{y} + b (ID - \bar{x}) + sytf, \alpha \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(ID - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTM1 = (y_{DTM1} - a)/b$$

$$y_{DTM1 \ 95\%} = 443.6759$$

$$DTM1_{95\%} = 0.4993 \text{ ng/mL}$$

$$DTM3 = \bar{x} - \frac{b0.3^2}{D} \bar{y} + \frac{sytf, \alpha}{D} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right) D + \frac{0.3^2 \bar{y}^2}{Q}}$$

$$Q = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad D = (0.3b)^2 - \frac{(sytf, \alpha)^2}{Q}$$

$$Q = \sum (x - x_{media})^2 = 7.0740 \quad DTM3_{95\%} = 0.6004 \text{ ng/mL}$$

$$D_{95\%} = 87974.9874$$

$$s_{yt \ 95\%} = 1.7982E-03$$

$$D_{95} = 0.3^2 = 0.0900$$

$$y_{media} * ((b * 0.3^2) / D_{95\%}) = 0.7393$$



**CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR RESIDUAL, ALTURA CRÍTICA
LÍMITE DE DETECCIÓN, LÍMITE DE IDENTIFICACIÓN
Y LÍMITE DE DETERMINACIÓN
ZERANOL, ION 538 (ALTURA)**



Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS02.S

Fecha: 13 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL (x)	altura (y)	y-(a+bx)	(y-(a+bx)) ²	(x - $\bar{x}$)	(x - $\bar{x}$) ²
VHORLS27.D	0.10	49	-23	543	-0.6700	0.4489
VHORLS28.D	0.10	53	-19	373	-0.6700	0.4489
VHORLS29.D	0.10	47	-25	640	-0.6700	0.4489
VHORLS30.D	0.25	205	11	119	-0.5200	0.2704
VHORLS31.D	0.25	220	26	671	-0.5200	0.2704
VHORLS32.D	0.25	236	42	1757	-0.5200	0.2704
VHORLS33.D	0.50	412	15	223	-0.2700	0.0729
VHORLS34.D	0.50	412	15	223	-0.2700	0.0729
VHORLS35.D	0.50	422	25	622	-0.2700	0.0729
VHORLS35.D	1.00	814	11	121	0.2300	0.0529
VHORLS37.D	1.00	784	-19	361	0.2300	0.0529
VHORLS38.D	1.00	720	-83	6889	0.2300	0.0529
VHORLS39.D	2.00	1490	-125	15596	1.2300	1.5129
VHORLS40.D	2.00	1681	66	4371	1.2300	1.5129
VHORLS41.D	2.00	1699	84	7075	1.2300	1.5129
$\Sigma =$	11.5500	9244.0000		$\Sigma =$ 39585.8147	$\Sigma =$	7.0740
media =	0.7700	616.2667				
media ² =	0.5929	379784.6044				

$$a = \frac{-8.8843}{811.8844}$$

$$n = 15$$

$$1/n = 0.0667$$

$$\text{desv. std. residual } s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - (a + bx_i))^2}{n - 2}}$$

altura crítica

$$y_{crit} = a + s_y t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$s_y = 55.1821$$

$$t_{95\%, n-2 \text{ g. l.}} = 2.1600$$

$$s_{yt \ 95\%} = 119.1933$$

$$y_{crit \ 95\%} = 118.9630$$

Límite de detección

LOD

$$DTC = \frac{(y_{crit} - a)}{b} = \frac{s_y}{b} t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTC_{95\%} = 0.1575 \text{ ng/mL}$$

Límite de identificación

LOQ

$$ID = 2 \times DTC$$

$$ID_{95\%} = 0.3149 \text{ ng/mL}$$

Límite de determinación

$$y_{DTM1} = \bar{y} + b (ID - \bar{x}) + s_y t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(ID - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTM1 = (y_{DTM1} - a)/b$$

$$y_{DTM1 \ 95\%} = 370.5412$$

$$DTM1_{95\%} = 0.4673 \text{ ng/mL}$$

$$DTM3 = \bar{x} - \frac{b \cdot 0.3^2}{D} \bar{y} + \frac{s_y t_{f, \alpha}}{D} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right) D + \frac{0.3^2 \bar{y}^2}{Q}}$$

$$Q = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad D = (0.3b)^2 - \frac{(s_y t_{f, \alpha})^2}{Q}$$

$$Q = \frac{\sum (x - x_{media})^2}{7.0740} \quad D_{95\%} = 57315.7134 \quad DTM3_{95\%} = 0.5185 \text{ ng/mL}$$

$$S_{yt \ 95\%} = 2.0796E-03$$

$$D_{95} = 0.3^2 = 0.0900$$

$$y_{media} * ((b \cdot 0.3^2) / D_{95\%}) = 0.7857$$



**CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR RESIDUAL, ALTURA CRÍTICA
LÍMITE DE DETECCIÓN, LÍMITE DE IDENTIFICACIÓN
Y LÍMITE DE DETERMINACIÓN
ZERANOL, ION 538 (ALTURA)**



Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS03.S

Fecha: 19 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL (x)	altura (y)	y-(a+bx)	(y-(a+bx)) ²	(x - $\bar{x}$)	(x - $\bar{x}$) ²
VHORLS49.D	0.10	40	31	958	-0.6700	0.4489
VHORLS50.D	0.10	42	33	1086	-0.6700	0.4489
VHORLS51.D	0.10	38	29	838	-0.6700	0.4489
VHORLS52.D	0.25	101	1	1	-0.5200	0.2704
VHORLS53.D	0.25	96	-4	15	-0.5200	0.2704
VHORLS54.D	0.25	91	-9	79	-0.5200	0.2704
VHORLS55.D	0.50	233	-18	334	-0.2700	0.0729
VHORLS56.D	0.50	229	-22	497	-0.2700	0.0729
VHORLS57.D	0.50	242	-9	86	-0.2700	0.0729
VHORLS58.D	1.00	523	-31	967	0.2300	0.0529
VHORLS59.D	1.00	534	-20	404	0.2300	0.0529
VHORLS60.D	1.00	524	-30	905	0.2300	0.0529
VHORLS61.D	2.00	1183	23	543	1.2300	1.5129
VHORLS62.D	2.00	1263	103	10672	1.2300	1.5129
VHORLS63.D	2.00	1083	-77	5882	1.2300	1.5129
Σ =	11.5500	6222.0000		Σ = 23268.0483		Σ = 7.0740
media =	0.7700	414.8000				
media ² =	0.5929	172059.0400				

$$a = -51.5170$$

$$b = 605.6064$$

$$n = 15$$

$$1/n = 0.0667$$

$$\text{desv.std. residual } s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - (a + bx_i))^2}{n - 2}}$$

altura crítica

$$y_{\text{crit}} = a + s_y t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$s_y = 42.3066$$

$$t_{95\%, n-2 \text{ g. l.}} = 2.1600$$

$$s_{yt \ 95\%} = 91.3823$$

$$y_{\text{crit } 95\%} = 46.5001$$

Límite de detección

LOD

$$DTC = \frac{(y_{\text{crit}} - a)}{b} = \frac{s_y}{b} t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTC_{95\%} = 0.1618 \text{ ng/mL}$$

Límite de identificación

LOQ

$$ID = 2 \times DTC$$

$$ID_{95\%} = 0.3237 \text{ ng/mL}$$

Límite de determinación

$$y_{DTM1} = \bar{y} + b (ID - \bar{x}) + s_y t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(ID - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTM1 = (y_{DTM1} - a)/b$$

$$y_{DTM1 \ 95\%} = 239.3485$$

$$DTM1_{95\%} = 0.4803 \text{ ng/mL}$$

$$DTM3 = \bar{x} - \frac{b 0.3^2}{D} \bar{y} + \frac{s_y t_{f, \alpha}}{D} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right) D + \frac{0.3^2 \bar{y}^2}{Q}}$$

$$Q = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

$$D = (0.3b)^2 - \frac{(s_y t_{f, \alpha})^2}{Q}$$

$$Q = \sum (x - x_{\text{media}})^2 = 7.0740$$

$$D_{95\%} = 31827.8439$$

$$DTM3_{95\%} = 0.6055 \text{ ng/mL}$$

$$s_{yt \ 95\%} = 2.8711E-03$$

$$D_{95}$$

$$0.3^2 = 0.0900$$

$$y_{\text{media}} * ((b * 0.3^2) / D_{95\%}) = 0.7103$$



**CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR RESIDUAL, ALTURA CRÍTICA
LÍMITE DE DETECCIÓN, LÍMITE DE IDENTIFICACIÓN
Y LÍMITE DE DETERMINACIÓN
ZERANOL, ION 538 (AREA)**



Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS01.S

Fecha: 11 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ppb (x)	area (y)	y-(a+bx)	(y-(a+bx)) ²	(x - $\bar{x}$)	(x - $\bar{x}$) ²
VHORLS08.D	0.25	5406	618	382357	-1.5000	2.2500
VHORLS09.D	0.25	5357	569	324159	-1.5000	2.2500
VHORLS10.D	0.25	5088	300	90210	-1.5000	2.2500
VHORLS11.D	0.50	13219	1518	2304366	-1.2500	1.5625
VHORLS12.D	0.50	12058	357	127459	-1.2500	1.5625
VHORLS13.D	0.50	12205	504	254030	-1.2500	1.5625
VHORLS14.D	1.00	23009	-2519	6343640	-0.7500	0.5625
VHORLS15.D	1.00	24358	-1170	1368101	-0.7500	0.5625
VHORLS16.D	1.00	24195	-1333	1775978	-0.7500	0.5625
VHORLS17.D	2.00	51386	-1795	3222035	0.2500	0.0625
VHORLS18.D	2.00	58179	4998	24979976	0.2500	0.0625
VHORLS19.D	2.00	50748	-2433	5919503	0.2500	0.0625
VHORLS20.D	5.00	144358	8217	67518496	3.2500	10.5625
VHORLS21.D	5.00	124424	-11717	137288935	3.2500	10.5625
VHORLS22.D	5.00	140025	3884	15085175	3.2500	10.5625
Σ =	26.2500	694015.0000		Σ = 266984419.9944	Σ =	45.0000
media =	1.7500	46267.6667				
media ² =	3.0625	2140696978.7778				

$$a = -2125.6861$$

$$b = 27653.3444$$

$$n = 15$$

$$1/n = 0.0667$$

$$\text{desv. std. residual } s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - (a + bx_i))^2}{n - 2}}$$

altura crítica

$$y_{\text{crit}} = a + s_y t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$s_y = 4531.8057$$

$$t_{95\%, n-2 \text{ g. l.}} = 2.1600$$

$$s_{yt \ 95\%} = 9788.7004$$

$$y_{\text{crit } 95\%} = 8301.5646$$

Límite de detección

LOD

$$DTC = \frac{(y_{\text{crit}} - a)}{b} = \frac{s_y}{b} t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTC_{95\%} = 0.3771 \text{ ng/mL}$$

Límite de identificación

LOQ

$$ID = 2 \times DTC$$

$$ID_{95\%} = 0.7541 \text{ ng/mL}$$

Límite de determinación

$$y_{DTM1} = \bar{y} + b (ID - \bar{x}) + s_y t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(ID - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTM1 = (y_{DTM1} - a)/b$$

$$y_{DTM1 \ 95\%} = 29384.9220$$

$$DTM1_{95\%} = 1.1395 \text{ ng/mL}$$

$$DTM3 = \bar{x} - \frac{b 0.3^2}{D} \bar{y} + \frac{s_y t_{f, \alpha}}{D} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right) D + \frac{0.3^2 \bar{y}^2}{Q}}$$

$$Q = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

$$D = (0.3b)^2 - \frac{(s_y t_{f, \alpha})^2}{Q}$$

$$Q = \sum (x - \bar{x})^2 = 45.0000$$

$$D_{95\%} = 66694367.8709$$

$$DTM3_{95\%} = 1.2981 \text{ ng/mL}$$

$$s_{yt \ 95\%} = 1.4677E-04$$

$$D_{95} =$$

$$0.3^2 = 0.0900$$

$$y_{\text{media}} * ((b * 0.3^2) / D_{95\%}) = 1.7265$$



**CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR RESIDUAL, ALTURA CRÍTICA
LÍMITE DE DETECCIÓN, LÍMITE DE IDENTIFICACIÓN
Y LÍMITE DE DETERMINACIÓN
ZERANOL, ION 538 (AREA)**



Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS02.S

Fecha: 13 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL (x)	area (y)	y-(a+bx)	(y-(a+bx)) ²	(x - $\bar{x}$)	(x - $\bar{x}$) ²
VHORLS30.D	0.25	5577	2902	8420056	-1.50	2.25
VHORLS31.D	0.25	5575	2900	8408453	-1.50	2.25
VHORLS32.D	0.25	6201	3526	12430796	-1.50	2.25
VHORLS33.D	0.50	10547	1315	1730219	-1.25	1.56
VHORLS34.D	0.50	11160	1928	3718641	-1.25	1.56
VHORLS35.D	0.50	11336	2104	4428406	-1.25	1.56
VHORLS35.D	1.00	20220	-2124	4512792	-0.75	0.56
VHORLS37.D	1.00	20460	-1884	3550712	-0.75	0.56
VHORLS38.D	1.00	20371	-1973	3894044	-0.75	0.56
VHORLS39.D	2.00	41088	-7482	55976666	0.25	0.06
VHORLS40.D	2.00	44355	-4215	17764164	0.25	0.06
VHORLS41.D	2.00	45452	-3118	9720400	0.25	0.06
VHORLS42.D	5.00	133284	6038	36457176	3.25	10.56
VHORLS43.D	5.00	127954	708	501233	3.25	10.56
VHORLS44.D	5.00	126621	-625	390653	3.25	10.56
Σ =	26.2500	630201.0000		Σ = 171904410.5778		Σ = 45.0000
media =	1.7500	42013.4000				
media ² =	3.0625	1765125779.5600				

a = -3881.0889
b = 26225.4222

n = 15
1/n = 0.0667

desv.std. residual
$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - (a + bx_i))^2}{n - 2}}$$

altura crítica

$$y_{crit} = a + s_y t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

S_y = 3636.4015

$t_{95\%, n-2 \text{ g. l.}}$ = 2.1600

$S_{yt \ 95\%}$ = 7854.6273

$y_{crit \ 95\%}$ = 4485.9226

Límite de detección

LOD

$$DTC = \frac{(y_{crit} - a)}{b} = \frac{s_y}{b} t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

DTC_{95%} = 0.3190 ng/mL

Límite de identificación

LOQ

$$ID = 2 \times DTC$$

ID_{95%} = 0.6381 ng/mL

Límite de determinación

$$y_{DTM1} = \bar{y} + b (ID - \bar{x}) + s_y t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(ID - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTM1 = (y_{DTM1} - a)/b$$

$y_{DTM1 \ 95\%}$ = 21447.5055

DTM1_{95%} = 0.9658 ng/mL

$$DTM3 = \bar{x} - \frac{b 0.3^2}{D} \bar{y} + \frac{s_y t_{f, \alpha}}{D} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right) D + \frac{0.3^2 \bar{y}^2}{Q}}$$

$$Q = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

$$D = (0.3b)^2 - \frac{(s_y t_{f, \alpha})^2}{Q}$$

$$Q = \frac{\sum (x - x_{media})^2}{45.0000} \quad DTM3_{95\%} = \frac{60528545.5746}{45.0000} = \underline{1.1825 \text{ ng/mL}}$$

$S_{yt \ 95\%} = 1.2977E-04$

D₉₅

$$0.3^2 = 0.0900$$

$y_{media} * ((b * 0.3^2) / D_{95\%})$ = 1.6383



**CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR RESIDUAL, ALTURA CRÍTICA
LÍMITE DE DETECCIÓN, LÍMITE DE IDENTIFICACIÓN
Y LÍMITE DE DETERMINACIÓN
ZERANOL, ION 538 (AREA)**



Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS03.S

Fecha: 19 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL(x)	area (y)	y-(a+bx)	(y-(a+bx)) ²	(x - $\bar{x}$)	(x - $\bar{x}$) ²
VHORLS52.D	0.25	2557	2614	6832560	-1.5000	2.2500
VHORLS53.D	0.25	2470	2527	6385308	-1.5000	2.2500
VHORLS54.D	0.25	2462	2519	6344941	-1.5000	2.2500
VHORLS55.D	0.50	5971	945	892600	-1.2500	1.5625
VHORLS56.D	0.50	6102	1076	1157292	-1.2500	1.5625
VHORLS57.D	0.50	6213	1187	1408435	-1.2500	1.5625
VHORLS58.D	1.00	13351	-1842	3391153	-0.7500	0.5625
VHORLS59.D	1.00	14522	-671	449581	-0.7500	0.5625
VHORLS60.D	1.00	14476	-717	513384	-0.7500	0.5625
VHORLS61.D	2.00	30520	-5005	25050776	0.2500	0.0625
VHORLS62.D	2.00	32429	-3096	9585680	0.2500	0.0625
VHORLS63.D	2.00	30992	-4533	20548769	0.2500	0.0625
VHORLS64.D	5.00	97705	1182	1397656	3.2500	10.5625
VHORLS65.D	5.00	93203	-3320	11020906	3.2500	10.5625
VHORLS66.D	5.00	103656	7133	50882899	3.2500	10.5625
$\Sigma =$	26.2500	456629.0000		$\Sigma =$ 145861940.4833	$\Sigma =$	45.0000
media =	1.7500	30441.9333				
media ² =	3.0625	926711305.0711				

$$a = -5140.0583$$

$$b = 20332.5667$$

$$n = 15$$

$$1/n = 0.0667$$

desv. std. residual

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - (a + bx_i))^2}{n - 2}}$$

altura crítica

$$y_{crit} = a + s_y t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$t_{95\%, n-2 \text{ g. l.}} = 2.1600$$

$$s_{yt \ 95\%} = 7235.2421$$

$$y_{crit \ 95\%} = 2567.1633$$

Límite de detección

LOD

$$DTC = \frac{(y_{crit} - a)}{b} = \frac{s_y}{b} t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTC_{95\%} = 0.3791 \text{ ng/mL}$$

Límite de identificación

LOQ

$$ID = 2 \times DTC$$

$$ID_{95\%} = 0.7581 \text{ ng/mL}$$

Límite de determinación

$$y_{DTM1} = \bar{y} + b (ID - \bar{x}) + s_y t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(ID - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTM1 = (y_{DTM1} - a)/b$$

$$y_{DTM1 \ 95\%} = 18149.4094$$

$$DTM1_{95\%} = 1.1454 \text{ ng/mL}$$

$$DTM3 = \bar{x} - \frac{b 0.3^2}{D} \bar{y} + \frac{s_y t_{f, \alpha}}{D} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right) D + \frac{0.3^2 \bar{y}^2}{Q}}$$

$$Q = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad D = (0.3b)^2 - \frac{(s_y t_{f, \alpha})^2}{Q}$$

$$Q = \sum (x - x_{media})^2 = 45.0000 \quad DTM3_{95\%} = 1.4788 \text{ ng/mL}$$

$$D_{95\%} = 36043888.9768$$

$$s_{yt \ 95\%} = 2.0073E-04$$

$$D_{95}$$

$$0.3^2 = 0.0900$$

$$y_{media} * ((b * 0.3^2) / D_{95\%}) = 1.5455$$



**CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR RESIDUAL, ALTURA CRÍTICA
LÍMITE DE DETECCIÓN, LÍMITE DE IDENTIFICACIÓN
Y LÍMITE DE DETERMINACIÓN
TALERANOL, ION 538 (ALTURA)**



Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS01.S

Fecha: 11 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL (x)	altura (y)	y -(a+bx)	(y -(a+bx)) ²	(x - $\bar{x}$)	(x - $\bar{x}$) ²
VHORLS08.D	0.25	215	40	1617	-1.5000	2.2500
VHORLS09.D	0.25	197	22	494	-1.5000	2.2500
VHORLS10.D	0.25	190	15	232	-1.5000	2.2500
VHORLS11.D	0.50	497	57	3281	-1.2500	1.5625
VHORLS12.D	0.50	457	17	299	-1.2500	1.5625
VHORLS13.D	0.50	447	7	53	-1.2500	1.5625
VHORLS14.D	1.00	841	-129	16536	-0.7500	0.5625
VHORLS15.D	1.00	873	-97	9330	-0.7500	0.5625
VHORLS16.D	1.00	940	-30	876	-0.7500	0.5625
VHORLS17.D	2.00	1944	-85	7282	0.2500	0.0625
VHORLS18.D	2.00	2191	162	26135	0.2500	0.0625
VHORLS19.D	2.00	2047	18	312	0.2500	0.0625
VHORLS20.D	5.00	5291	82	6795	3.2500	10.5625
VHORLS21.D	5.00	5204	-5	21	3.2500	10.5625
VHORLS22.D	5.00	5132	-77	5863	3.2500	10.5625
$\Sigma =$	26.2500	26466.0000		$\Sigma =$ 79124.6611		$\Sigma =$ 45.0000
media =	1.7500	1764.4000				
media ² =	3.0625	3113107.3600				

$$a = -90.1528$$

$$b = 1059.7444$$

$$n = 15$$

$$1/n = 0.0667$$

$$\text{desv.std. residual } s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - (a + bx_i))^2}{n - 2}}$$

altura crítica

$$y_{\text{crit}} = a + s_y t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_y = 78.0161$$

$$t_{95\%, n-2 \text{ g. l.}} = 2.1600$$

$$S_{yt \ 95\%} = 168.5148$$

$$y_{\text{crit } 95\%} = 89.3548$$

Límite de detección
LOD

$$DTC = \frac{(y_{\text{crit}} - a)}{b} = \frac{s_y}{b} t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTC_{95\%} = 0.1694 \text{ ng/mL}$$

Límite de identificación
LOQ

$$ID = 2 \times DTC$$

$$ID_{95\%} = 0.3388 \text{ ng/mL}$$

Límite de determinación

$$y_{DTM1} = \bar{y} + b (ID - \bar{x}) + s_y t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(ID - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTM1 = (y_{DTM1} - a)/b$$

$$y_{DTM1 \ 95\%} = 455.8702$$

$$DTM1_{95\%} = 0.5152 \text{ ng/mL}$$

$$DTM3 = \bar{x} - \frac{b 0.3^2}{D} \bar{y} + \frac{s_y t_{f, \alpha}}{D} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right) D + \frac{0.3^2 \bar{y}^2}{Q}}$$

$$Q = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

$$D = (0.3b)^2 - \frac{(s_y t_{f, \alpha})^2}{Q}$$

$$Q = \sum (x - x_{\text{media}})^2 = 45.0000$$

$$D_{95\%} = 100444.1963$$

$$DTM3_{95\%} = 0.6395 \text{ ng/mL}$$

$$S_{yt \ 95\%} = 1.6777E-03$$

$$D_{95} = 0.3^2 = 0.0900$$

$$y_{\text{media}} * ((b * 0.3^2) / D_{95\%}) = 1.6754$$



CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR RESIDUAL, ALTURA CRÍTICA LÍMITE DE DETECCIÓN, LÍMITE DE IDENTIFICACIÓN Y LÍMITE DE DETERMINACIÓN TALERANOL, ION 538 (ALTURA)



Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS02.S

Fecha: 13 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL (x)	altura (y)	y-(a+bx)	(y-(a+bx)) ²	(x - $\bar{x}$)	(x - $\bar{x}$) ²
VHORLS30.D	0.25	209	120	14332	-1.5000	2.2500
VHORLS31.D	0.25	220	131	17087	-1.5000	2.2500
VHORLS32.D	0.25	239	150	22415	-1.5000	2.2500
VHORLS33.D	0.50	395	53	2832	-1.2500	1.5625
VHORLS34.D	0.50	396	54	2940	-1.2500	1.5625
VHORLS35.D	0.50	418	76	5809	-1.2500	1.5625
VHORLS35.D	1.00	738	-109	11832	-0.7500	0.5625
VHORLS37.D	1.00	782	-65	4196	-0.7500	0.5625
VHORLS38.D	1.00	764	-83	6882	-0.7500	0.5625
VHORLS39.D	2.00	1576	-281	78828	0.2500	0.0625
VHORLS40.D	2.00	1688	-169	28481	0.2500	0.0625
VHORLS41.D	2.00	1739	-118	13868	0.2500	0.0625
VHORLS42.D	5.00	5010	123	15195	3.2500	10.5625
VHORLS43.D	5.00	5184	297	88369	3.2500	10.5625
VHORLS44.D	5.00	4706	-181	32664	3.2500	10.5625
Σ	26.2500	24064.0000		345700.9278		45.0000
media =	1.7500	1604.2667				
media ² =	3.0625	2573671.5378				

$$a = -163.2139$$

$$b = 1009.9889$$

$$n = 15$$

$$1/n = 0.0667$$

$$\text{desv.std. residual } s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - (a + bx_i))^2}{n - 2}}$$

altura crítica

$$y_{\text{crit}} = a + s_y t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$t_{95\%, n-2 \text{ g. l.}} = 2.1600$$

$$S_{yt \ 95\%} = 352.2349$$

$$y_{\text{crit } 95\%} = 211.9985$$

Límite de detección

LOD

$$DTC = \frac{(y_{\text{crit}} - a)}{b} = \frac{s_y}{b} t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTC_{95\%} = 0.3715 \text{ ng/mL}$$

Límite de identificación

LOQ

$$ID = 2 \times DTC$$

$$ID_{95\%} = 0.7430 \text{ ng/mL}$$

Límite de determinación

$$y_{DTM1} = \bar{y} + b (ID - \bar{x}) + s_y t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(ID - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTM1 = (y_{DTM1} - a)/b$$

$$y_{DTM1 \ 95\%} = 970.8435$$

$$DTM1_{95\%} = 1.1228 \text{ ng/mL}$$

$$DTM3 = \bar{x} - \frac{b 0.3^2}{D} \bar{y} + \frac{s_y t_{f, \alpha}}{D} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right) D + \frac{0.3^2 \bar{y}^2}{Q}}$$

$$Q = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

$$D = (0.3b)^2 - \frac{(s_y t_{f, \alpha})^2}{Q}$$

$$Q = \sum (x - x_{\text{media}})^2 = 45.0000$$

$$D_{95\%} = 89049.8822$$

$$DTM3_{95\%} = 1.3641 \text{ ng/mL}$$

$$S_{yt \ 95\%} = 3.9555E-03$$

$$D_{95} = 0.3^2 = 0.0900$$

$$y_{\text{media}} * ((b * 0.3^2) / D_{95\%}) = 1.6376$$



CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR RESIDUAL, ALTURA CRÍTICA LÍMITE DE DETECCIÓN, LÍMITE DE IDENTIFICACIÓN Y LÍMITE DE DETERMINACIÓN TALERANOL, ION 538 (ALTURA)



Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS03.S

Fecha: 19 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL(x)	altura (y)	y-(a+bx)	(y-(a+bx)) ²	(x - $\bar{x}$)	(x - $\bar{x}$) ²
VHORLS52.D	0.25	107	100	10095	-1.5000	2.2500
VHORLS53.D	0.25	99	92	8552	-1.5000	2.2500
VHORLS54.D	0.25	104	97	9501	-1.5000	2.2500
VHORLS55.D	0.50	238	46	2079	-1.2500	1.5625
VHORLS56.D	0.50	242	50	2460	-1.2500	1.5625
VHORLS57.D	0.50	238	46	2079	-1.2500	1.5625
VHORLS58.D	1.00	518	-46	2131	-0.7500	0.5625
VHORLS59.D	1.00	527	-37	1381	-0.7500	0.5625
VHORLS60.D	1.00	535	-29	850	-0.7500	0.5625
VHORLS61.D	2.00	1083	-225	50481	0.2500	0.0625
VHORLS62.D	2.00	1245	-63	3929	0.2500	0.0625
VHORLS63.D	2.00	1074	-234	54606	0.2500	0.0625
VHORLS64.D	5.00	3476	-62	3872	3.2500	10.5625
VHORLS65.D	5.00	3479	-59	3508	3.2500	10.5625
VHORLS66.D	5.00	3862	324	104828	3.2500	10.5625
Σ =	26.2500	16827.0000		Σ = 260351.8875		Σ = 45.0000
media =	1.7500	1121.8000				
media ² =	3.0625	1258435.2400				

$$a = -179.3542$$

$$b = 743.5167$$

$$n = 15$$

$$1/n = 0.0667$$

$$\text{desv.std. residual } s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - (a + bx_i))^2}{n - 2}}$$

altura crítica

$$y_{\text{crit}} = a + sy_{tf, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_y = 141.5170$$

$$t_{95\%, n-2 \text{ g. l.}} = 2.1600$$

$$S_{yt \ 95\%} = 305.6768$$

$$y_{\text{crit } 95\%} = 146.2629$$

Límite de detección

LOD

$$DTC = \frac{(y_{\text{crit}} - a)}{b} = \frac{s_y}{b} t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTC_{95\%} = 0.4379 \text{ ng/mL}$$

Límite de identificación

LOQ

$$ID = 2 \times DTC$$

$$ID_{95\%} = 0.8759 \text{ ng/mL}$$

Límite de determinación

$$y_{DTM1} = \bar{y} + b (ID - \bar{x}) + sy_{tf, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(ID - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTM1 = (y_{DTM1} - a)/b$$

$$y_{DTM1 \ 95\%} = 802.9320$$

$$DTM1_{95\%} = 1.3211 \text{ ng/mL}$$

$$DTM3 = \bar{x} - \frac{bQ3^2}{D} \bar{y} + \frac{s_y t_{f, \alpha}}{D} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right) D + \frac{0.3 \bar{y}^2}{Q}}$$

$$Q = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

$$D = (0.3b)^2 - \frac{(s_y t_{f, \alpha})^2}{Q}$$

$$Q = \sum (x - x^{\text{media}})^2 = 45.0000$$

$$D_{95\%} = 47677.1266$$

$$DTM3_{95\%} = 1.6567 \text{ ng/mL}$$

$$S_{yt \ 95\%} = 6.4114E-03$$

$$D_{95} = 0.3^2 = 0.0900$$

$$y_{\text{media}} * ((b * 0.3^2) / D_{95\%}) = 1.5745$$



**CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR RESIDUAL, ALTURA CRÍTICA
LÍMITE DE DETECCIÓN, LÍMITE DE IDENTIFICACIÓN
Y LÍMITE DE DETERMINACIÓN
TALERANOL, ION 538 (AREA)**



Método: HOCTLMS3.M

Secuencia: VALHORLINSIS01.S

Fecha: 11 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL (x)	area (y)	y-(a+bx)	(y-(a+bx)) ²	(x - $\bar{x}$)	(x - $\bar{x}$) ²
VHORLS08.D	0.25	5488	929	863676	-1.5000	2.2500
VHORLS09.D	0.25	5337	778	605816	-1.5000	2.2500
VHORLS10.D	0.25	5223	664	441350	-1.5000	2.2500
VHORLS11.D	0.50	12694	1117	1247431	-1.2500	1.5625
VHORLS12.D	0.50	12448	871	758440	-1.2500	1.5625
VHORLS13.D	0.50	12280	703	494047	-1.2500	1.5625
VHORLS14.D	1.00	23091	-2523	6365676	-0.7500	0.5625
VHORLS15.D	1.00	24226	-1388	1926625	-0.7500	0.5625
VHORLS16.D	1.00	24611	-1003	1006068	-0.7500	0.5625
VHORLS17.D	2.00	51196	-2492	6209351	0.2500	0.0625
VHORLS18.D	2.00	57779	4091	16737452	0.2500	0.0625
VHORLS19.D	2.00	50849	-2839	8059109	0.2500	0.0625
VHORLS20.D	5.00	145845	7936	62974695	3.2500	10.5625
VHORLS21.D	5.00	130027	-7882	62131288	3.2500	10.5625
VHORLS22.D	5.00	138947	1038	1076738	3.2500	10.5625
Σ =	26.2500	700041.0000		Σ = 170897761.2653		Σ = 45.0000
media =	1.7500	46669.4000				
media ² =	3.0625	2178032896.3600				

$$a = \frac{-2459.7986}{28073.8278}$$

$$n = 15$$

$$1/n = 0.0667$$

$$\text{desv.std. residual } s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - (a + bx_i))^2}{n - 2}}$$

altura crítica

$$y_{\text{crit}} = a + sytf_{\alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_y = 3625.7388$$

$$t_{95\%, n-2 \text{ g. l.}} = 2.1600$$

$$S_{yt \ 95\%} = 7831.5957$$

$$y_{\text{crit } 95\%} = 5882.6788$$

Límite de detección
LOD

$$DTC = \frac{(y_{\text{crit}} - a)}{b} = \frac{sy}{b} tf_{\alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTC_{95\%} = 0.2972 \text{ ng/mL}$$

Límite de identificación
LOQ

$$ID = 2 \times DTC$$

$$ID_{95\%} = 0.5943 \text{ ng/mL}$$

Límite de determinación

$$y_{DTM1} = \bar{y} + b (ID - \bar{x}) + sytf_{\alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(ID - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTM1 = (y_{DTM1} - a)/b$$

$$y_{DTM1 \ 95\%} = 22811.5360 \quad DTM1_{95\%} = 0.9002 \text{ ng/mL}$$

$$DTM3 = \bar{x} - \frac{b0.3^2}{D} \bar{y} + \frac{sytf_{\alpha}}{D} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right) D + \frac{0.3^2 \bar{y}^2}{Q}}$$

$$Q = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad D = (0.3b)^2 - \frac{(sytf_{\alpha})^2}{Q}$$

$$Q = \frac{\sum (x - x_{\text{media}})^2}{45.0000} \quad DTM3_{95\%} = 1.0528 \text{ ng/mL}$$

$$D_{95\%} = 69569607.1727$$

$$S_{yt \ 95\%} = 1.1257E-04$$

$$D_{95} = 0.3^2 = 0.0900$$

$$y \text{ media } * ((b * 0.3^2) / D_{95\%}) = 1.6949$$



**CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR RESIDUAL, ALTURA CRÍTICA
LÍMITE DE DETECCIÓN, LÍMITE DE IDENTIFICACIÓN
Y LÍMITE DE DETERMINACIÓN
TALERANOL, ION 538 (AREA)**



Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS02.S

Fecha: 13 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL (x)	area (y)	y-(a+bx)	(y-(a+bx)) ²	(x - $\bar{x}$)	(x - $\bar{x}$) ²
VHORLS30.D	0.25	5520	3137	9842808	-1.50	2.25
VHORLS31.D	0.25	5689	3306	10931785	-1.50	2.25
VHORLS32.D	0.25	6321	3938	15510404	-1.50	2.25
VHORLS33.D	0.50	10372	1207	1457342	-1.25	1.56
VHORLS34.D	0.50	11061	1896	3595590	-1.25	1.56
VHORLS35.D	0.50	10950	1785	3186954	-1.25	1.56
VHORLS35.D	1.00	20408	-2321	5387215	-0.75	0.56
VHORLS37.D	1.00	20798	-1931	3728906	-0.75	0.56
VHORLS38.D	1.00	20818	-1911	3652064	-0.75	0.56
VHORLS39.D	2.00	42021	-7837	61411059	0.25	0.06
VHORLS40.D	2.00	45024	-4834	23362924	0.25	0.06
VHORLS41.D	2.00	46974	-2884	8314692	0.25	0.06
VHORLS42.D	5.00	136065	4822	23251965	3.25	10.56
VHORLS43.D	5.00	132725	1482	2196410	3.25	10.56
VHORLS44.D	5.00	131385	142	20172	3.25	10.56
$\Sigma =$	26.2500	646131.0000		$\Sigma =$ 175850291.0875	$\Sigma =$	45.0000
media =	1.7500	43075.4000				
media ² =	3.0625	1855490085.1600				

$$a = -4399.4458$$

$$b = 27128.4833$$

$$n = 15$$

$$1/n = 0.0667$$

$$\text{desv.std. residual } s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - (a + bx_i))^2}{n - 2}}$$

altura crítica

$$y_{crit} = a + sytf, \alpha \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$t_{95\%, n-2 \text{ g. l.}} = 2.1600$$

$$S_{yt 95\%} = 7944.2631$$

$$y_{crit 95\%} = 4063.0487$$

Límite de detección

LOD

$$DTC = \frac{(y_{crit} - a)}{b} = \frac{sy}{b} tf, \alpha \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTC_{95\%} = 0.3119 \text{ ng/mL}$$

Límite de identificación

LOQ

$$ID = 2 \times DTC$$

$$ID_{95\%} = 0.6239 \text{ ng/mL}$$

Límite de determinación

$$y_{DTM1} = \bar{y} + b(ID - \bar{x}) + sytf, \alpha \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(ID - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTM1 = (y_{DTM1} - a)/b$$

$$y_{DTM1 95\%} = 21223.7640$$

$$DTM1_{95\%} = 0.9445 \text{ ng/mL}$$

$$DTM3 = \bar{x} - \frac{b 0.3^2}{D} \bar{y} + \frac{sytf, \alpha}{D} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right) D + \frac{0.3^2 \bar{y}^2}{Q}}$$

$$S_y = 3677.8996$$

$$Q = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

$$D = (0.3b)^2 - \frac{(sytf, \alpha)^2}{Q}$$

$$Q = \sum (x - x_{media})^2 = 45.0000$$

$$D_{95\%} = 64833441.0109$$

$$DTM3_{95\%} = 1.1738 \text{ ng/mL}$$

$$S_{yt 95\%} = 1.2253E-04$$

D 95

$$0.3^2 = 0.0900$$

$$y_{media} * ((b * 0.3^2) / D_{95\%}) = 1.6222$$



**CÁLCULO DE LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR RESIDUAL, ALTURA CRÍTICA
LÍMITE DE DETECCIÓN, LÍMITE DE IDENTIFICACIÓN
Y LÍMITE DE DETERMINACIÓN
TALERANOL, ION 538 (AREA)**



Método: HOCTLSM3.M

Secuencia: VALHORLINSIS03.S

Fecha: 19 abril 05

Página 1 de 1

Data File	Conc, ng/mL (x)	area (y)	y-(a+bx)	(y-(a+bx)) ²	(x - $\bar{x}$)	(x - $\bar{x}$) ²
VHORLS52.D	0.25	2664	2745	7534751	-1.5000	2.2500
VHORLS53.D	0.25	2366	2447	5987564	-1.5000	2.2500
VHORLS54.D	0.25	2572	2653	7038144	-1.5000	2.2500
VHORLS55.D	0.50	5841	765	585722	-1.2500	1.5625
VHORLS56.D	0.50	6385	1309	1714332	-1.2500	1.5625
VHORLS57.D	0.50	6241	1165	1357982	-1.2500	1.5625
VHORLS58.D	1.00	13614	-1775	3150359	-0.7500	0.5625
VHORLS59.D	1.00	14272	-1117	1247521	-0.7500	0.5625
VHORLS60.D	1.00	14501	-888	788411	-0.7500	0.5625
VHORLS61.D	2.00	30859	-5156	26588719	0.2500	0.0625
VHORLS62.D	2.00	33060	-2955	8734537	0.2500	0.0625
VHORLS63.D	2.00	31886	-4129	17052151	0.2500	0.0625
VHORLS64.D	5.00	97482	-413	170507	3.2500	10.5625
VHORLS65.D	5.00	96519	-1376	1893170	3.2500	10.5625
VHORLS66.D	5.00	104620	6725	45226634	3.2500	10.5625
Σ =	26.2500	462882.0000		Σ = 129070503.1500	Σ =	45.0000
media =	1.7500	30858.8000				
media ² =	3.0625	952265537.4400				

$$a = -5237.5750$$

$$b = 20626.5000$$

$$n = 15$$

$$1/n = 0.0667$$

desv.std. residual

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - (a + bx_i))^2}{n - 2}}$$

altura crítica

$$y_{crit} = a + sytf, \alpha \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{x^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$t_{95\%, n-2 \text{ g. l.}} = 2.1600$$

$$S_{yt \ 95\%} = 6806.0569$$

$$y_{crit \ 95\%} = 2012.4642$$

Límite de detección

LOD

$$DTC = \frac{(y_{crit} - a)}{b} = \frac{s_y}{b} t_{f, \alpha} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{x^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTC_{95\%} = 0.3515 \text{ ng/mL}$$

Límite de identificación

LOQ

$$ID = 2 \times DTC$$

$$ID_{95\%} = 0.7030 \text{ ng/mL}$$

Límite de determinación

$$y_{DTM1} = \bar{y} + b (ID - \bar{x}) + sytf, \alpha \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(ID - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$DTM1 = (y_{DTM1} - a)/b$$

$$y_{DTM1 \ 95\%} = 16688.2356$$

$$DTM1_{95\%} = 1.0630 \text{ ng/mL}$$

$$DTM3 = \bar{x} - \frac{b 0.3^2}{D} \bar{y} + \frac{sytf, \alpha}{D} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right) D + \frac{0.3^2 \bar{y}^2}{Q}}$$

$$Q = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad D = (0.3b)^2 - \frac{(sytf, \alpha)^2}{Q}$$

$$Q = \frac{\sum (x - x^{media})^2}{45.0000} \quad DTM3_{95\%} = 1.3914 \text{ ng/mL}$$

$$D_{95\%} = 37261338.2974$$

$$S_{yt \ 95\%} = 1.8266E-04$$

$$D_{95} = 0.3^2 = 0.0900$$

$$y_{media} * ((b * 0.3^2) / D_{95\%}) = 1.5374$$

PUBLICACIONES