



**OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR
ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR
ULTRAVIOLETA PARA LA DETERMINACIÓN DE VITAMINA D₃ EN
SUPLEMENTOS DE CALCIO**

**Pedro Matheus¹, Evelia Arévalo¹, Mayra Contreras¹, Norma Triana¹, Olga Belandria¹,
Daniela Lisi¹**

**1. Laboratorio de Análisis Instrumental. Departamento de Análisis y Control.
Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida.
Venezuela.**

Correspondencia: Facultades de Farmacia, Prolongación de la Avenida Humberto Tejera,
detrás del Hospital Universitario De Los Andes Teléfono: 0274-2403438.

E-mail: pmateus@ula.ve

RESUMEN

Se realizó la validación de un método por Espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta, para la determinación de vitamina D₃ en suplementos de Calcio, pertenecientes a distintas casas comerciales que expresaban concentraciones que

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013



oscilaban entre 200 y 300 UI (unidades internacionales). Se optimizaron los parámetros tales como estabilidad, temperatura, pH y solubilidad, y se procedió a la validación del método utilizando Colecalciferol de referencia (99,9% de pureza). Se estimaron los parámetros que determinan el rendimiento del método como son: selectividad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud y precisión. Se demostró que el método validado cumple con los niveles de aceptación establecidos por las normas nacionales e internacionales relacionadas con la calidad en el laboratorio, y aseguran que el método es adecuado para su aplicación en la determinación de vitamina D₃ contenida en suplementos de Calcio.

PALABRAS CLAVE: validación; espectrofotometría ultravioleta; vitamina D₃; suplementos de Calcio.

**OPTIMIZATION AND VALIDATION OF A METHOD FOR ULTRAVIOLET
MOLECULAR ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY FOR THE
DETERMINATION OF VITAMIN D₃ IN CALCIUM SUPPLEMENTS.**

ABSTRACT

We performed the validation of a method for ultraviolet molecular absorption spectrophotometry for the determination of vitamin D₃ on calcium supplements, from different business houses expressing concentrations ranging between 200 and 300

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013



IU. Parameters were optimized such as stability, temperature, pH and solubility and proceeded to validate the method using reference Cholecalciferol (99.9% purity). We estimated the parameters that determine the performance of the method as: selectivity, linearity, limit of detection, limit of quantification, accuracy and precision. It was demonstrated that the validated method meets the acceptance levels set by national and international standards related to quality in the laboratory, and ensure that the method is suitable for application in the determination of vitamin D₃ contained in calcium supplements.

KEY WORDS: validation, ultraviolet spectrophotometry, vitamin D₃, calcium supplements.

INTRODUCCIÓN

Las vitaminas comprenden un grupo de nutrientes orgánicos esenciales para la vida, aunque su requerimiento es pequeño, su función es de gran importancia puesto que desempeñan un papel muy importante en la digestión y el metabolismo, actuando como cofactores de muchas enzimas

necesarias para diversas reacciones metabólicas; su carencia puede generar una serie de reacciones adversas para los seres humanos (1). Es importante mencionar el interés que tiene la industria farmacéutica en asegurar la calidad y seguridad de sus productos, garantizando la máxima calidad de los productos desde la etapa del diseño. La

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013



calidad de los activos y excipientes que componen las formas farmacéuticas es un aspecto prioritario en su producción. Los laboratorios de control de calidad deben disponer de herramientas analíticas adecuadas para la identificación y cuantificación de los componentes terapéuticos y de las impurezas relacionadas o no, en el orden de trazas. Para ello es necesario tener en cuenta una serie de aspectos dentro de los cuales destaca la validación de las técnicas analíticas empleadas. Evidentemente, el desarrollo de un método analítico conlleva un proceso de validación para demostrar su idoneidad. La validación puede definirse como el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas y demostrativas de que

un método de análisis es lo suficientemente fiable y reproducible para arrojar el resultado previsto dentro de intervalos definidos, lo que constituye el primer paso de todo modelo de gestión de calidad(2,3). Dentro de las técnicas analíticas que pueden utilizarse para los análisis en la industria farmacéutica se encuentra la Espectrofotometría de Absorción Molecular (EAM). Esta investigación se fundamenta en el uso de la Espectrofotometría de Absorción Molecular Ultravioleta para la detección y cuantificación de vitamina D₃ en tres diferentes suplementos de Calcio, para lo cual se validó un método que permite la determinación de esta vitamina, dando así un aporte valedero para el control de calidad de estos

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013



medicamentos, demostrando con ello, que el método cumple con niveles de aceptación establecidos por las Normas Nacionales e Internacionales para medir la calidad de un laboratorio.

METODOLOGIA

Se utilizaron reactivos de grado analítico: Vitamina D₃, (colecalfiferol de referencia) con 99,9% de pureza, de la casa comercial *Glaxo Wellcomey*. Etanol con una pureza entre 96–98% (Científica Andina). Agua desionizada (*Millipore*) con una resistividad específica de 18 Ω.cm. Papel de filtro (*Double Rings*) de grado número 2 (11 cm). Celdas de cuarzo de 3 mL de capacidad. El material de vidrio fue previamente lavado con solución sulfocrómica (20 g. de K₂Cr₂O₇

disueltos en 180 mL de agua y 720 mL de ácido sulfúrico); debe tenerse extremo cuidado al manipular esta solución. Seguidamente el material fue lavado con abundante agua destilada y finalmente con agua desionizada (*Millipore*) con una resistividad específica de 18 Ω.cm.

Equipos: Espectrofotómetro de absorción molecular (JENWAY 6405)

Muestreo: Se seleccionaron de manera aleatoria 3 casas comerciales que preparan suplementos de Calcio, cuyos envases especifican la presencia de vitamina D₃ y sus cantidades respectivas. Estos suplementos fueron denominados A, B y C (ver tabla 1). Para que el análisis de cada muestra

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013

fuera representativo del total, se determinó el tamaño de la muestra que se debía tomar de cada uno de los suplementos, basándonos en fundamentos estadísticos y asumiendo una población finita en donde $N=30$,

determinándose que una muestra representativa de los suplementos A y C debe tener un tamaño mínimo de 11 unidades y del suplemento B de 14 unidades. Las características de dichos suplementos se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Características de los Suplementos de Calcio analizados.

Suplemento	Presentación	Contenido de citrato de calcio (mg)	Contenido de vitamina D ₃ (UI)	Unidades por frasco
A	Tabletas recubiertas	1.500	200	30
B	Tabletas recubiertas	1.500	300	30
C	Tabletas recubiertas	1.500	200	30

UI: Unidades internacionales (1UI de vitamina D₃ equivale a 0,000025 mg).

Tratamiento de las muestras: Se trituraron y pulverizaron, por separado, 11 tabletas de los suplementos A y C, y 14 tabletas del suplemento B. Se pesó con exactitud el equivalente a la masa

promedio para cada uno de ellos, obteniendo para el suplemento A: 1,727 g, para el suplemento B: 1,701 g y para el suplemento C: 1,639 g. Posterior a las pesadas, se disolvió cada tableta con 10

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013



mL de etanol y se llevó, con el mismo disolvente, hasta 25 mL en matraz aforado. Se agitó vigorosamente durante un minuto, luego se filtraron las soluciones en papel de filtro (*Double Rings*) de grado número 2 (11 cm) y posteriormente se hizo pasar el filtrado a través de un embudo de Gogh de 3 cm de diámetro, estimulando la filtración con un sistema de succión con bomba de agua para asegurar una máxima obtención de la vitamina D₃.

Determinación analítica: Las determinaciones de vitamina D₃ se realizaron en un espectrofotómetro de absorción molecular (JENWAY 6405) a una longitud de onda analítica de 265 nm (seleccionada después de un barrido espectral), para lo cual se utilizaron 3

mL de solución de cada suplemento y se leyeron en celdas de cuarzo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Optimización de parámetros: Los parámetros fundamentales de una validación analítica comprenden la selectividad, linealidad y rango, precisión y los límites de detección y cuantificación (4). Antes de determinar estos parámetros se hicieron estudios para determinar la solubilidad de la vitamina D₃ y la estabilidad de las respectivas soluciones. En cuanto a la *solubilidad*, inicialmente se realizaron pruebas con algunos solventes orgánicos como cloroformo y etanol a diferentes % de pureza, obteniéndose mejores resultados en etanol al 96-98% de pureza, por tanto, este fue el solvente

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013

elegido para nuestro estudio (tiene la ventaja de ser menos tóxico). La *estabilidad* es un parámetro de importancia en los estudios de validación de métodos, puesto que a través de ésta se puede demostrar como los factores externos (temperatura, luz, oxígeno, pH, etc.) generan variaciones de la concentración del analito de interés en función del tiempo (5). Para el estudio de la estabilidad inicialmente se midió la solución de colecalciferol de

referencia (vitamina D pura) durante 48 horas, realizando lecturas a las 0, 3, 6, 9, 12, 24 y 48 horas; dichas soluciones fueron almacenadas en matraces aforados protegidos de la luz. De igual forma se aplicó el mismo procedimiento a las soluciones preparadas de los tres suplementos de Calcio (A, B y C), obteniendo diferentes absorbancias a lo largo del tiempo. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Datos obtenidos en el estudio de la estabilidad de la vitamina D₃.

Tiempo (horas)	Absorbancia del colecalciferol de referencia	Absorbancia del Suplemento A	Absorbancia del Suplemento B	Absorbancia del Suplemento C
0	0,227	0,230	0,397	0,234
3	0,228	0,238	0,399	0,236
6	0,230	0,240	0,340	0,240

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013

9	0,230	0,244	0,340	0,246
12	0,231	0,249	0,342	0,250
24	0,232	0,252	0,344	0,253
48	0,234	0,300	0,369	0,301

Los promedios obtenidos para las absorbancia a las 48 horas muestran que el colecalciferol de referencia presenta un valor de 0,23029, el suplemento A: 0,25043, el suplemento B: 0,36157 y el suplemento C: 0,25143 (ver figura 1).

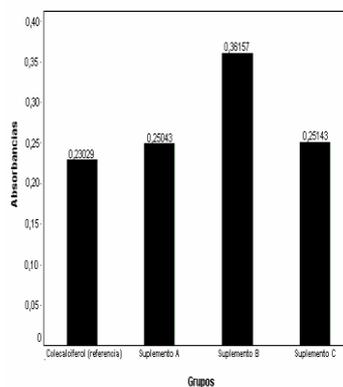


Figura 1. Promedios de absorbancias de solución de referencia y suplementos de Calcio.

Las absorbancias se midieron durante 48 horas para cada grupo, las desviaciones estándar obtenidas muestran la variabilidad de las mediciones con respecto al valor medio de cada grupo. El grupo de referencia o control (colecalciferol) muestra una desviación de 0,00236 de absorbancia, lo que indica que los valores registrados estuvieron cercanos a su media; de los tres suplementos estudiados, se tiene que el suplemento C presentó la menor variabilidad durante las 48 horas ubicándose su desviación estándar en 0,02296 de absorbancia, lo que indica que sus valores fueron más homogéneos

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013

con respecto a la media; seguidamente se tiene al suplemento A con 0,02304 de El resultado anterior permitió establecer los intervalos de confianza del 95% para la media de cada grupo bajo estudio, esto con el fin de determinar la amplitud de los intervalos.

absorbancia y el suplemento B con 0,02688 (ver figura 2).

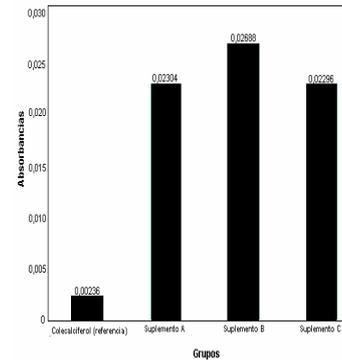


Figura 2. Desviación estándar de solución referencia y suplementos de Ca

Tabla 3. Intervalos de confianza 95% de solución referencial y suplementos de Calcio.

	Colecalciferol	Suplemento A	Suplemento B	Suplemento C
Absorbancia inferior	0,22810	0,22912	0,33687	0,23019
Absorbancia Superior	0,23247	0,27173	0,38643	0,27267
Desviación Estándar	0,00236	0,02304	0,02688	0,02296

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013



Como se observa en la tabla 3, el colecalciferol de referencia presenta límites, inferior y superior, muy parecidos (0,22810 y 0,23247, respectivamente) debido a su poca variabilidad durante las 48 horas; posteriormente se tiene el suplemento C, el cual presenta un intervalo de absorbancia desde 0,23019 a 0,27267. Este intervalo, producto de su dispersión (0,02296), es como se dijo anteriormente, más homogéneo con respecto a su media. En el suplemento A, el intervalo tiene como límites de absorbancia 0,22912 y 0,27173 y el suplemento B 0,33687 y 0,38643.

También se determinó la existencia de diferencias significativas entre los valores promedios de absorbancias del grupo control (colecalciferol) contra los suplementos de Calcio. Se empleó el Análisis de Varianza (ANOVA) utilizando el método estadístico *Dunnett* para comparar grupo control; el nivel de significación establecido en la prueba es de 0,05. Los resultados obtenidos indican con P (0,0000) que existen diferencias significativas entre los valores promedios de colecalciferol y el suplemento B; no se observaron diferencias entre el grupo control y los suplementos A y C (ver tabla 4).

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013

Tabla 4. Varianza de Grupo control (colecalfiferol) contra los suplementos de Calcio.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P
Inter-grupos	0,0745	3	0,02483	55,628	0,000
Intra-grupos	0,0107	24	0,00045		
Total	0,0852	27			

gl: Grados de libertad; F: Varianza.

A través de estas pruebas (protegiendo las muestras de la luz), las soluciones patrones de colecalfiferol de referencia fueron estables durante el tiempo de medición luego de su preparación durante 48 horas, es decir, conservaron sus propiedades físico-químicas, y sus absorbancias iniciales no variaron considerablemente. En los suplementos de Calcio, los valores de absorbancia

encontrados fueron algo mayores con relación a los del colecalfiferol. Esta diferencia podría ser atribuida al tratamiento previo realizado a las muestras de los suplementos debido a la complejidad de la matriz, aunque también mantuvieron cierta estabilidad, salvo el caso del suplemento B, donde se observó menos homogeneidad con respecto a su media. Es importante

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013



mencionar que las diferentes soluciones de vitamina D₃ fueron preparadas y leídas a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) mostrando ser estables a dicha temperatura durante el estudio. Con respecto a la estabilidad a diferentes pH, la reacción obtenida utilizando tiras de pH fue una reacción alcalina (arrojando un pH de 8,3), bastante cercano al valor de pH reportado por Strohecker (6) quien reportó un pH de 8,7.

Determinación de las características del desempeño del método.

Se determinó la selectividad del método analítico a fin de conocer en que grado, la respuesta del método, es únicamente proporcionada por el analito sin interferencias de otras sustancias

relacionadas con él. De acuerdo con el objetivo del ensayo y cuando se trata por ejemplo, de un método para el control de calidad rutinario, basta con comparar con una sustancia de referencia o confirmar con un grado de seguridad aceptable que el producto se corresponde con lo esperado. En nuestro caso, se realizó una prueba de adición de estándar para conocer la presencia de posibles efectos de matriz; se compararon estadísticamente los valores de las pendientes de la curva de calibración acuosa con la curva de adición de estándar mediante análisis estadístico (prueba *t-student*). En la tabla 5 se reportan los resultados obtenidos para ambas curvas. Los resultados obtenidos mostraron que no existe diferencia significativa entre las

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013

pendientes, ya que la *t-student* calculada es bastante menor que la *t-student* crítica, a un nivel de confianza del 95%. Esto indica que no existen interferencias causadas por la matriz en la

determinación de las pendientes y en consecuencia, es posible utilizar una curva de calibración con patrones acuosos para estas determinaciones.

Tabla 5. Prueba de significación entre las pendientes de la curva de calibración acuosa y la curva de adición de estándar.

Pendiente (m) de la curva de calibración acuosa	Pendiente (m) de la curva de Adición de Estándar	<i>t-student</i> (calculada)	<i>t-student</i> (crítica)
59,123	77,070	0,0073	2,9200

Linealidad. A fin de comprobar la capacidad del método espectrofotométrico para generar resultados directamente proporcionales a la concentración de la vitamina D₃ en los suplementos de Calcio dentro de un

rango establecido, se determinó el intervalo de concentraciones en el cual el sistema cumplía con la ley de Beer. Para ello se procedió a construir la curva de Ringbom (ver figura 3), preparando una serie de soluciones

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013

patrones con concentraciones desde 0,0025 mg/mL (100 UI) hasta 0,0200 mg/mL (800 UI). Estos patrones se calcularon y prepararon de manera que sus concentraciones fueran equivalentes a las concentraciones de vitamina D₃ en los suplementos de Calcio, usando como solvente etanol (96-98% de pureza). De acuerdo con la Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, APVMA (7) en el 2004, la linealidad debe ser establecida mediante una inspección visual, por lo que corresponde observar el comportamiento de la respuesta analítica en función de la concentración del analito. La parte lineal de la gráfica (línea continua), permite obtener el intervalo de concentraciones óptimo. Al evaluar la curva de Ringbom (línea

cortada), se puede observar que el comportamiento lineal se limita hasta una concentración de aproximadamente 0,0175 mg/mL (700 UI), tal como se observa en la figura 3. Tomando en consideración el resultado obtenido en la curva de Ringbom y las concentraciones reflejadas en los suplementos de Calcio, así como las recomendaciones de las Normas ICH (8), que señalan utilizar concentraciones entre el 70% a 130% del contenido teórico, se procedió a elaborar una curva de calibración midiendo la señal de la respuesta para una serie de soluciones patrones del analito con las siguientes concentraciones: 0,0025 mg/mL (100 UI); 0,0040 mg/mL (160 UI); 0,0055 mg/mL (220 UI); 0,0070 mg/mL (280 UI); 0,0085 mg/mL (340

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013

UI) y 0,0100 mg/mL (400 UI). Estas soluciones se prepararon y leyeron por triplicado. A partir de estos datos se realizó la curva de calibración y se trazó la mejor línea recta a través de los calibración ajustada que se muestra en la figura 4.

puntos generados por las soluciones patrones utilizando la regresión lineal (o método de los mínimos cuadrados), de manera que se obtuvo la curva de

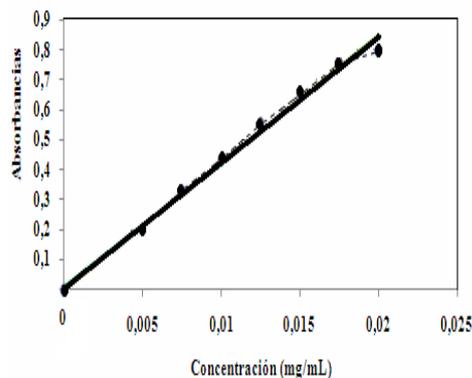


Figura 4. Curva de Ringbom para la determinación de vitamina D₃ en suplementos de Calcio por EAM.

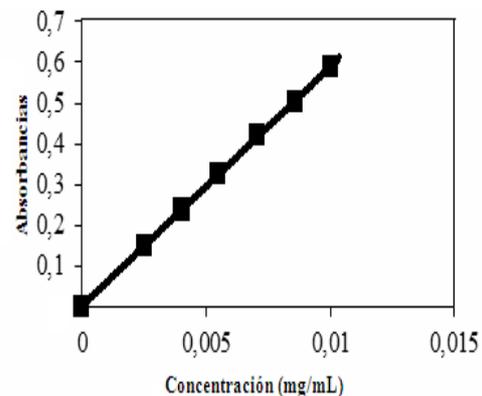


Figura 5. Curva de calibración para la determinación de vitamina D₃ en suplementos de Calcio por EAM.

Coefficiente de correlación y coeficiente de determinación: Para analizar el

grado de relación existente entre las variables concentración (X) y

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013



absorbancia (Y), se cuantificó la intensidad de la relación lineal entre estas variables utilizando la ecuación del coeficiente de correlación lineal de Pearson; se utilizó como criterio de aceptación el valor recomendado por la AEFI (4) para el caso de métodos utilizados en la industria farmacéutica: *valor igual o mayor a 0,999*.

El resultado obtenido, utilizando el programa estadístico de Microsoft Excel 2007 fue de 0,999. Este resultado indica que el modelo ajustado es capaz de explicar la respuesta (en nuestro caso, absorbancia) a partir del uso de la variable concentración, de manera que el intervalo de concentración comprendido entre 0,0025 mg/mL y 0,0100 mg/mL, satisface las condiciones de linealidad del método

analítico, ya que se cumplen los requerimientos de un coeficiente de correlación igual o mayor a 0,999. Debido a que la información obtenida mediante el cálculo de r es limitada y no justifica por si sola la linealidad, y siendo el coeficiente de determinación (r^2) el que aporta una mayor significación estadística (ya que expresa la proporción de la variación total de la absorbancia explicada por el modelo), se determinó dicho coeficiente obteniéndose un valor para r^2 igual a 0,9998, lo que explica un 99,98% de las variaciones de las absorbancias a través del ajuste por medio de las concentraciones.

Ecuación de la recta: Una vez preparada la gráfica, a partir de la recta

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013

obtenida se estimaron el intercepto ($b = 0,0001429$) y la pendiente [$m = 59,123$ (mg/mL^{-1})]. De acuerdo con esto, la ecuación de la recta ajustada es $Y = 59,123X + 0,0001429$. El análisis de varianza (ver Tabla 6) permite

determinar que el valor F calculado es mayor que el valor F crítico, indicando que el modelo lineal se ajusta para la relación entre absorbancia y concentración con un nivel de significancia del 5%.

Tabla 6. Análisis de varianza.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor Crítico de F
Regresión	1	0,13764023	0,13764023	11211,9659	4,7701E-08
Residuos	4	4,9105E-05	1,2276E-05		
Total	5	0,13768933			

F: Tasa entre variación entre los grupos y variación dentro de los grupos.

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013

También se comprobó la significación del intercepto con respecto al cero a través de la prueba de *t-student*. El intercepto de la recta de ajuste está cercano a cero, al aplicársele la prueba de *t-student* se obtuvo un valor de t_{exp} menor que el valor de t tabulado ($t_{exp}=0,0378773$; $t_{tab.}=0,978123153$) para una probabilidad del 95% y 5 grados de libertad, lo que permitió establecer que no existen diferencias estadísticamente significativas, quedando así demostrada la proporcionalidad del sistema. Mediante la prueba de linealidad se calculó el coeficiente de variación total ($C.V = \frac{DS}{\bar{X}} \times 100$) de los factores de respuesta, el cual fue inferior al 5% (0,9933%), estableciéndose como límite indicativo de linealidad. Esto muestra que la pendiente es distinta de cero e

indica la acertada linealidad en el intervalo de trabajo estudiado. Estos resultados también mostraron una media para el factor de frecuencia (Y/X) igual a $59,183 \text{ (mg/mL)}^{-1}$ y una desviación estándar promedio de 0,5879. Las concentraciones utilizadas oscilan entre 0,0025 y 0,0100 mg/mL.

En conclusión podemos decir que todos los datos y test estadísticos anteriormente expuestos, reflejan que el método puesto en práctica es lineal en el rango establecido.

Límite de Detección y Límite de Cuantificación. El límite de detección (LOD), es la cantidad o el contenido de un analito que corresponde a la señal de medición más baja que con cierta confianza estadística puede ser

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013

interpretada como un indicador de que el analito está presente en la solución, pero no necesariamente permitiendo su exacta cuantificación. El límite de cuantificación (LOQ) de un procedimiento analítico, es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con cierta confianza, a este límite también se le llama límite de determinación. Para la determinación del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) se prepararon 20 muestras blanco, realizando por triplicado las respectivas lecturas en absorbancia. Utilizando la pendiente de la curva de regresión para los respectivos cálculos, se obtuvieron los siguientes resultados:

Media (\bar{X}) = -0,0020; Pendiente =

$59,123 \text{ (mg/mL)}^{-1}$;

DS = 0,00058; LOD = 0,00003 mg/mL;

LOQ = 0,0001 mg/mL.

Exactitud y precisión. Para determinar la exactitud y la precisión se tomaron en consideración los criterios y definiciones establecidos en normas internacionales y nacionales tales como el International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology, VIM (9), la Norma Venezolana COVENIN 2552:1999⁽¹⁰⁾ y la Guía ISO 3534-1:1993⁽¹¹⁾. En este trabajo se empleó el método de adición-recuperación, el cual consiste en calcular la exactitud como el porcentaje de analito recuperado (% de recuperación). Este método fue aplicado debido a que ha mostrado ser confiable

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013

en distintos estudios de validación (12). Para la determinación de la precisión de un método, la International Conference on Harmonization (ICH)(8) en 1995, recomienda llevar a cabo un total de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado en el procedimiento. Para ello se trabajan tres niveles diferentes de concentración (80, 100 y 120%) con tres muestras independientes de cada nivel. De acuerdo a lo antes señalado, para los estudios de exactitud y precisión se analizó por duplicado tres veces un material de prueba típico (suplemento de Calcio C) por el método que fue objeto de validación para realizar la determinación del contenido promedio del analito; estos ensayos fueron realizados bajo condiciones de

repetibilidad y reproducibilidad. Una vez conocido el contenido promedio de vitamina D₃ en el suplemento de Calcio C, se procedió a enriquecer la muestra con el analito de interés a diversas concentraciones, empleando para ello soluciones patrones de concentraciones iguales a 0,0003124 mg/mL (80%), 0,0003905 mg/mL (100%) y 0,0004689 mg/mL (120%). Para preparar estas soluciones se mantuvo constante la cantidad de muestra inicial y se agregaban cantidades variables de la solución patrón (volúmenes establecidos de acuerdo a las concentraciones requeridas), es decir, se prepararon tres soluciones por triplicado, que contenían cada una 1 mL de muestra previamente tratada conforme al método analítico en estudio

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013



y se les adicionó soluciones patrones de vitamina D₃ con las concentraciones antes señaladas. Los resultados del análisis del método en estudio para el suplemento C, muestran una recuperación media alcanzada de 98,16%, un coeficiente de variación promedio (CV) de 2,44% y una Desviación Estándar Promedio (DS) de 0,000019, lo que indica que el método propuesto presenta la exactitud necesaria para considerarlo adecuado para las determinaciones de vitamina D₃ en suplementos de Calcio. Cuando la recuperación obtenida se encuentra en el rango 80-110%, generalmente es suficiente ensayar el procedimiento anterior tres veces, tal como hemos hecho en esta investigación. Las determinaciones deben efectuarse

durante un período de tiempo limitado. Todas las muestras se leyeron en celdas de cuarzo a 265 nm en el espectrofotómetro JENWAY 6405 y el procedimiento se repitió tres veces en diferentes días y fue realizado por distintos analistas en el mismo laboratorio, es decir, para estudiar condiciones de repetibilidad y reproducibilidad. En este estudio se realizó una evaluación en tres niveles distintos de concentración (80%, 100% y 120%, de patrón añadido). Para el Analista 1, el porcentaje de recuperación de las 3 muestras fue: 98,0%, 98,2% y 98,3% respectivamente, y desviación estándar de: $5,7 \times 10^{-7}$, $3,3 \times 10^{-5}$ y $2,6 \times 10^{-5}$ respectivamente. Para el Analista 2 el porcentaje de recuperación de las 3

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013

muestras fue: 101,4%, 102,4% y 100,8% respectivamente, y desviación estándar de: $4,5 \times 10^{-6}$, $1,1 \times 10^{-5}$ y $1,6 \times 10^{-5}$ respectivamente.

Determinación de vitamina D₃ en suplementos de Calcio. El método antes validado se aplicó para la determinación de vitamina D₃ en 3 suplementos de Calcio de diferentes casas comerciales, que fueron llamados suplemento A, suplemento B y suplemento C. Para ello se seleccionó, basándonos en fundamentos estadísticos, el tamaño de la muestra, de tal forma que el análisis sobre dichas muestras fuera representativo del total. Así, para el suplemento A y C se analizaron 11 tabletas y para el suplemento B, 14 tabletas. A todas las

muestras se les realizaron los procesos de: trituración, pulverización, pesada, dilución, extracción y filtración (previamente establecido en la metodología diseñada para este estudio) (13). Finalmente se procedió a realizar las respectivas lecturas (por triplicado), de cada uno de los suplementos disueltos en etanol. Los resultados obtenidos indican que los suplementos estudiados muestran concentraciones de vitamina D₃ muy similares a las reportadas por las industrias fabricantes, lo que permite confirmar la especificidad y confiabilidad del método. Según lo observado en la tabla 7, las pequeñas diferencias de concentración de vitamina D₃ con respecto al valor real reportado en los suplementos de Calcio, pudiera

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013

atribuirse a mínimas pérdidas en el laborioso procedimiento de filtración. Según lo presentado en esta tabla y los parámetros estadísticos anteriormente validados, se puede decir que el método

es lo suficientemente preciso y exacto para la determinación de vitamina D₃ en suplementos de Calcio por el método de Espectrofotometría de Absorción Molecular.

Tabla 7. Resultados obtenidos de la medición de los suplementos de Calcio.

	Suplemento A (11 tabletas)	Suplemento B (14 tabletas)	Suplemento C (11 tabletas)
Media Experimental (Absorbancia)	0,281 ± 0,0170	0,425 ± 0,0078	0,286 ± 0,0150
Concentración Experimental (mg/mL)	0,0047 ± 0,0002	0,0072 ± 0,0001	0,0054 ± 0,0002
Concentración Experimental (UI)	190 ± 10	290 ± 5	216 ± 8
Concentración reportada (mg/mL)	0,0050	0,0075	0,0050
Concentración reportada (UI)	200	300	200

100 UI de vitamina D₃ equivalen a 0,0025 mg.

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013



CONCLUSION

La metodología utilizada para la extracción de vitamina D₃ en los suplementos de Calcio demuestra ser apropiada, ya que aparte de utilizar un disolvente orgánico poco tóxico (etanol 96-98%), permitió obtener un porcentaje de recuperación promedio igual a 98,16%, lo que indica un rendimiento muy alto. La técnica de Espectrofotometría de Absorción Molecular (EAM) con detección en el UV, resultó ser una buena opción para la determinación de vitamina D₃ en suplementos de Calcio. En los análisis realizados obtuvimos un límite de detección (LOD) igual a 0,00003 mg/mL y un límite de cuantificación (LOQ) de 0,00010 mg/mL, con una linealidad para el método que se

mantiene desde concentraciones de 0,0025 hasta 0,0100 mg/mL. Esto indica con toda seguridad, que la técnica utilizada es confiable para dicho rango. Pudo comprobarse experimentalmente que al realizar el estudio con las muestras problemas (suplementos de Calcio A, B y C), se obtuvo un porcentaje de recuperación medio del 98,16% con respecto a las concentraciones de vitamina D₃ reflejadas en ellos, obteniéndose una precisión de 0,000019. Esto demuestra que el método propuesto refleja la exactitud y precisión necesarias para que sea considerado adecuado al momento de aplicarlo en la determinación de vitamina D₃ presente en suplementos de Calcio. Para finalizar podemos decir que el método utilizado,

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013



una vez validado, proporciona un alto grado de confianza y seguridad, demostrando que los resultados obtenidos son correctos. Podemos asegurar que el método utilizado en esta investigación es válido para la determinación de vitamina D₃ en suplementos de Calcio, debido a que las pruebas realizadas han mostrado que es fiable y reproducible en el intervalo estudiado, lo que constituye el primer paso de todo modelo de gestión de calidad.

AGRADECIMIENTO Los autores agradecen al Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes por facilitar las muestras certificadas de colecalciferol; así mismo

agradecen al TSU Jesús Barrios por la colaboración prestada con respecto a la realización del muestreo.

REFERENCIAS

1. Guyton A. Tratado de Fisiología Médica. (9na Ed.). España: McGraw-Hill; 1997.
2. Holcomb D. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. This edition is Copyright LGC (Teddington) Ltd; 1998.
3. Colegio Nacional de Químicos, Farmacéuticos y Biólogos. México A.C. Guía de Validación de Métodos Analíticos; 2002.
4. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (A.E.F.I.). Validación de Métodos Analíticos. Monografías. Comisión de Normas de

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013



Buena Fabricación y Control de Calidad; 2001.

5. Varela C. Síntesis y Análogos Semirrígidos del Calcitriol y Correlación Estructura-actividad Biológica [Tesis Doctoral]. España: Universidad Santiago de Compostela; 2001.

6. Strohecker R. Vitamina D. Análisis de Vitaminas: Métodos Comprobados. Editorial Paz Montalvo. Barcelona (España); 1967.

7. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA). Guide lines for the Validation of Analytical Methods for Active Constituent, Agricultural and Veterinary Chemical Products; 2004.

8. International Conference on Harmonization (ICH). Note for

Guidance on Validation of Analytical Methods: Methodology; 1995.

9. International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology, VIM, ISO, Ginebra; 1993.

10. Norma Venezolana COVENIN 2552; 1999.

11. Guía ISO 3534-1:1993: Organización Internacional para la Estandarización Estadística. Vocabulario y Símbolos. Parte 1: Probabilidad y Términos Estadísticos en General. Ginebra: ISO; 1993.

12. Suárez R, Arévalo E, Linares L, Ustáriz F, Hernández G. Validación de un Método Analítico para la Determinación de Magnesio Eritrocitario. Avances en Química. 2009; 4(2): 53-62.

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013



13. Contreras M, Triana N.
Optimización y Validación de un
Método Analítico por
Espectrofotometría UV para la
Determinación de Vitamina D₃ en
Suplementos de Calcio. [Tesis de
Grado]. Universidad de Los Andes.
Facultad de Farmacia y Bioanálisis.
Mérida (Venezuela); 2011.

Recibido: 27-02-2013

Aprobado: 13-04-2013