

## TALLER VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALITICO

Nombres: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

### **Objetivo:**

Desarrollar las habilidades necesarias para realizar la validación de un método analítico.

### **Metodología:**

Conformar grupos de 3 a 5 personas

Leer completamente el instructivo de ensayo suministrado y determine:

1. La clasificación del método según los lineamientos de la USP
2. realice los cálculos de Linealidad, Precisión, exactitud y sensibilidad para el método entregado. Si requiere información adicional justifique la causa y supóngala
3. Utilice para la realización de los calculo las formulas entregadas

### **Tiempo estimado:**

60 minutos para la realización del taller

30 minutos para la socialización

### **Descripción:**

El analista de laboratorio Marmita Bureta, es la responsable de diseñar la validación del método analítico siguiente, para lo cual solo cuenta con el instructivo de análisis, la ayuda de sus compañeros y vasta experiencia en el tema.

Instructivo de ensayo para:  
**DETERMINACIÓN DE VITAMINA D3**

**1. OBJETIVO**

Describir los pasos a seguir para determinar el contenido de vitamina D<sub>3</sub> en comprimido no recubierto que contiene vitamina D3

**2. ALCANCE**

Este instructivo aplica a muestras sólida en tabletas ó capsulas.

**3. RESPONSABLE**

Analista de laboratorio  
Jefe de laboratorio

**4. PRECAUCIONES**

Utilizar guantes y aplicar los procedimientos de seguridad definidos en el laboratorio

**5. BASE DEL MÉTODO**

Valoración de la vitamina D<sub>3</sub>, utilizando para la separación la cromatografía líquida - fase normal, lectura posterior a UV

**6. EQUIPOS Y MATERIALES**

Cromatógrafo líquido, Columna, Ultrasonido, Balanza, Balones volumétricos y Pipetas volumétricas.

**7. DESCRIPCIÓN**

**PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR**

Pesar una cantidad de estándar de vitamina D3 equivalente a 7734 UI en un beaker de 100 mL, agregar 10 mL de Dimetisulfoxido, mezclar por agitación durante 5 minutos y con calentamiento suave.

Adicionar 15 mL de N-Hexano, tapar para evitar la perdida de hexano. Colocar en plancha de calentamiento a 50°C y con agitación por 10 minutos

Después de este tiempo llevar la muestra a un baño de hielo.

Pasar el sobrenadante (hexano) a un balón volumétrico de 50 mL.

Realizar las extracciones con hexano 2 veces más con porciones de 15 mL cada vez.

Juntar todos los extractos hexánicos en el balón de 50 mL .

Llevar a volumen con hexano y mezclar.

Tomar 1mL de la solución anterior y llevarla a un balón volumétrico de 10mL. Llevar a volumen con hexano y mezclar.

Llevar la solución anterior a un tubo de ensayo que contiene 0.5 g de sulfato de sodio anhidro. Agitar fuertemente y luego centrifugar.

Filtrar el sobrenadante por filtro de 0.2 um

## 7.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Pesar el contenido de 10 capsulas o comprimidos y macerarlos.

Pesar 6 gramos del pulverizado en un beaker de 100 mL .

Realizar el mismo tratamiento que al estándar.

Recoger los extractos hexánicos en un balón volumétrico de 50 mL.

Llevar a volumen con hexano y mezclar.

Llevar 10 ml de la solución anterior a un tubo de ensayo que contiene 0.5 g de sulfato de sodio anhidro. Agitar fuertemente y luego centrifugar.

Filtrar el sobrenadante por filtro de 0.2 um

### **Adecuación del equipo cromatógrafo líquido para fase normal**

Pasar por el canal C y D desconectado previamente la columna los siguientes solventes y a las siguientes condiciones:

<b>Solvente</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Flujo</b>
Agua	10 Min.	1,0 ml/min
Metanol	10 Min.	1,0 ml/min
Isopropanol	15 Min.	1,0 ml/min

Conectar la columna y pasarle metanol a flujo de 1,0ml/min por 10 minutos; luego, isopropanol a flujo de 1,0 ml/min por 10 minutos.

Buscar el método VITAMD3.M y encender la bomba y la lámpara y dejar estabilizando la columna durante 15 a 20 minutos; al inyectar colocar en el primer vial isopropanol y cuando termine las corridas lavar con isopropanol con el método LAVNH2.M. Si no se va a trabajar más con fase normal pasar isopropanol por el

canal D que contenía hexano; luego, pasar metanol por el C y el D. Dejar la columna con metanol.

## **CÁLCULOS**

$$C = \frac{A_m \times C_{st}}{A_{st} \times W_m} \times F \times P \times R$$

Donde:

C: UI de Vitamina D<sub>3</sub> en la cantidad rotulada

A<sub>m</sub>: Área de la muestra

A<sub>st</sub>: Área del estándar

W<sub>m</sub>: Peso o volumen de muestra

C<sub>st</sub>: Concentración del estándar

P : Potencia estándar (UI/g)

F: Factor de dilución de la muestra

R: Cantidad rotulada

$$\% \text{Vitamina D}_3 = \frac{C}{D} \times 100$$

Donde:

C: Unidades Internacionales de vitamina D<sub>3</sub> en la cantidad rotulada.

D: UI vitamina D<sub>3</sub> teórico por la cantidad rotulada.

## **ANEXOS**

NO APLICA