

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO POR ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA-VISIBLE

VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR UV-VISIBLE SPECTROPHOTOMETRIC PHOSPHORUS DETERMINATION

María Guadalupe Cáñez Carrasco*, Alejandro Monserrat García Alegría

Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora. Rosales y Luis Encinas S/N. Hermosillo, Sonora. C.P. 83000.

RESUMEN

La entidad mexicana de acreditación (ema ac) establece que los parámetros analíticos de calidad para la cuantificación de un analito son exactitud, precisión, linealidad, especificidad, sensibilidad, sesgo, límite de detección, límite de cuantificación, entre otros. El objetivo del presente estudio fue la validación del método espectrofotométrico para la cuantificación de fósforo en condiciones ideales a partir de la preparación de estándares de trabajo a concentraciones conocidas y posteriormente determinar la aplicabilidad del método en bebidas de cola, con alto contenido de fósforo. La validación del método de análisis espectrofotométrico se logró a partir de una disolución de referencia de fósforo en forma de pentóxido de fósforo (P_2O_5). Los resultados obtenidos fueron: exactitud 99.12% de recuperación; precisión 0.96% de coeficiente de variación; linealidad 0.9992 de coeficiente de correlación (R); sensibilidad $m = 0.170 \pm 0.038$ mgL^{-1} ; límite de detección de 0.18 mgL^{-1} y límite de cuantificación de 0.58 mgL^{-1} de P_2O_5 . La aplicabilidad del método validado se evaluó en bebidas de coca cola®, obteniéndose una concentración de 113.15 ± 0.10 mgL^{-1} de fósforo. Este trabajo pretende ilustrar de manera sencilla la metodología para la estimación de los parámetros analíticos, que son necesarios para darle mayor confiabilidad a los resultados.

Palabras clave: validación, fósforo, método analítico, espectrofotometría, refrescos de cola.

ABSTRACT

The Mexican accreditation entity (MAE ca) establishes that the analytical quality parameters for the quantification of an analyte are accuracy, precision, linearity, specificity, sensitivity, bias, limit of detection, limit of quantification, among others. The objective of the present study was the validation of the spectrophotometric method for phosphorus quantification in ideal conditions from working standards with known concentrations and subsequently determine the applicability of the method in cola drinks with high phosphorus content. The validation of the spectrophotometric analysis method was achieved from a reference dissolution of phosphorus as phosphorus pentoxide (P_2O_5). The results obtained were: accuracy, 99.12% recovery; precision, 0.96 % coefficient of variation; linearity, 0.9992 correlation coeffi-

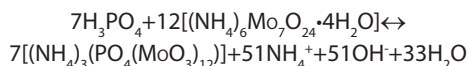
cient (R); sensitivity, $m = 0.170 \pm 0.038$ mgL^{-1} ; limit of detection, 0.18 mgL^{-1} and limit of quantification, 0.58 mgL^{-1} of P_2O_5 . The applicability of the validated method was evaluated in coca cola® beverages, resulting in a concentration of 113.15 ± 0.97 mgL^{-1} of phosphorus. This work is intended to illustrate in a simple way the methodology for the quality parameters estimation, which are necessary to give greater reliability to the results.

Keywords: validation, phosphorus, analytical methods, spectrophotometry, cola drink.

INTRODUCCIÓN

Por definición la validación es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos del método para una utilización o aplicación específica prevista (NMX-CH-152-IMNC-2005). La validación examina las características de desempeño de un método para identificar y establecer cualquier limitación que pueda esperarse del método, así como identificar los factores que pueden influir en el cambio de dichos parámetros y limitaciones; permite demostrar que el método es adecuado para el propósito, esto es, para resolver un problema analítico particular (CENAM, 2005; EURACHEM, 2003). En análisis químico cuantitativo, muchas decisiones importantes se basan en los resultados obtenidos por un laboratorio; por lo que es necesario, disponer de un indicador sobre la calidad de tales resultados. Hoy más que nunca se pretende que los químicos analíticos estén en condiciones de demostrar la calidad de sus resultados, indicando el grado de confiabilidad en que cada uno de estos parámetros demuestra su idoneidad para la finalidad prevista. Esto supone, que se indique en qué medida se prevé que tal resultado concordará con otros, independientemente del método aplicado. La validación analítica de los métodos de análisis es uno de los elementos básicos en sistemas de calidad. La validación trata de disminuir o controlar los factores que llevan a la imprecisión o inexactitud de un dato obtenido, a través de la realización de un trabajo analítico dentro de unos parámetros definidos generando una mayor fiabilidad y aceptación de los datos, al estar en proporción con la calidad del proceso de obtención de los mismos (Castineira, 2009). Entre los parámetros analíticos más utilizados se encuentran: exactitud, sesgo, precisión,

linealidad, repetibilidad, límite de detección y de cuantificación, sensibilidad, entre otros (CENAM-ema, 2008b). De tal manera que el objetivo del presente trabajo fue validar un método para la determinación espectrofotométrica de fósforo y demostrar la aplicabilidad del método en bebidas de cola. Para la determinación de fósforo mediante espectrofotometría UV-visible, se empleó el método del azul de molibdeno con ácido ascórbico, cuyo fundamento consiste en adicionar molibdato de amonio en presencia de fosfatos y este compuesto se reduce a un complejo azul soluble (fosfomolibdato de amonio), tal y como se representa en las reacciones químicas de la ecuación (Worsfold *et al.*, 2005; APHA, 2012):



MATERIALES Y MÉTODOS

Para la determinación de fósforo mediante espectrofotometría UV-visible, se empleó el método del azul de molibdeno. Se pesaron 0.1919 g de KH_2PO_4 , secado previamente a $105^\circ\text{C}/1$ h, disuelto en agua desionizada, aforando a 1 L. Esta disolución es equivalente estequiométricamente a la concentración teórica de 100 mgL^{-1} de P_2O_5 de la disolución madre. A partir de esta disolución se prepararon las disoluciones de trabajo de 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 4.0, 8.0 y 12.0 mgL^{-1} de P_2O_5 . El tiempo de incubación fue de 45 minutos a 50°C . Las concentraciones de trabajo para cada parámetro a evaluar se corrieron por quintuplicado cada una.

Para la preparación de la muestra de coca cola, se midió 1 mL de refresco desgasificado y se aforó a 50 mL con agua desionizada. Se midieron 5 mL de esta disolución, se le agregaron 20 mL de disolución reductora (molibdato de amonio $2.52 \times 10^{-3} \text{ M}$) y se aforó a 50 mL con agua desionizada. Posteriormente se le dio el mismo tratamiento que a los estándares. Se realizaron cinco corridas con cinco repeticiones cada una, obteniéndose 25 lecturas. La absorbancia de las disoluciones acuosas conteniendo P_2O_5 y la absorbancia de la muestra se determinaron en un espectrofotómetro marca AQUAMATE ThermoSpectronic Tipo Helios a 660 nm, y la absorbancia obtenida es directamente proporcional a la concentración de fósforo presente en la muestra (Severiche-Sierra y González-García, 2012).

Para la validación de la metodología analítica se procedió a la evaluación de los siguientes parámetros: exactitud, sesgo, precisión, linealidad, sensibilidad, límite de detección y límite de cuantificación, de acuerdo a lo que establece el Centro Nacional de Metrología y la Entidad Mexicana de Acreditación (CENAM-ema, 2008b).

Para la evaluación de la exactitud, sesgo y precisión se utilizaron las concentraciones de 1.2, 1.6, 2.0, 4.0 y 8.0 mgL^{-1} de P_2O_5 . Para las curvas de calibración y la evaluación de la linealidad se utilizaron las concentraciones de 0.4 hasta 8.0 mgL^{-1} de P_2O_5 . En tanto que para evaluar la sensibilidad del método a través de la curva Ringbom, se trabajó con el rango de concentraciones de 0.1 hasta 12.0 mgL^{-1} de P_2O_5 . Finalmente, para obtener el límite de detección (LD) y el límite de

cuantificación (LC) se trabajó en el rango de 0.1 a 1.2 mgL^{-1} de P_2O_5 .

Parámetros Analíticos de Calidad para la Validación del Método

Exactitud

Se utilizaron estándares de trabajo preparados a partir de una disolución madre de 20 mgL^{-1} de P_2O_5 . El cálculo del porcentaje de recuperación se obtiene con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración obtenida}}{\text{Concentración real}} \times 100 \quad (1)$$

En validación, el porcentaje de recuperación aceptable está entre 85 y 115% (IUPAC, 2014; CENAM-ema, 2008a).

Sesgo

El sesgo mide el error sistemático o determinado de un método analítico, en contraste con el error aleatorio. Puede existir uno o más componentes del error sistemático que contribuyen al sesgo. Una diferencia sistemática mayor con respecto al valor de referencia aceptado se refleja por un valor de sesgo más grande

El sesgo se define mediante la ecuación:

$$\text{Sesgo} = \bar{x} - \mu \quad (2)$$

Donde \bar{x} es el promedio de la concentración experimental y μ es la concentración teórica o verdadera (CENAM-ema, 2009).

Precisión

La precisión se evaluó mediante el cálculo del porcentaje del coeficiente de variación (%CV) y el criterio de aceptación para métodos instrumentales es $\leq 2\%$ de CV (Christian, 2009; Harvey, 2002).

$$\% \text{ CV} = \frac{S}{\bar{x}} \times 100 \quad (3)$$

Donde;

\bar{x} = media del grupo muestral

S = desviación estándar

Linealidad

La linealidad de la curva de calibración se determinó utilizando cinco concentraciones diferentes con un rango de $1.2 - 8.0 \text{ mgL}^{-1}$ de P_2O_5 para la determinación de fósforo con cinco repeticiones cada una (CENAM-ema, 2008a; Christian, 2009; Skoog *et al.*, 2013), obteniéndose 25 lecturas, a una longitud de onda de 660 nm. Este parámetro se evaluó por inspección visual del gráfico señal contra la concentración del analito y por dos métodos estadísticos apropiados: coeficiente de determinación (R^2) y coeficiente de correlación de Pearson (R). Estas determinaciones de linealidad no son excluyentes unas de otras (Miller y Miller, 2002; NMX-CH-152-IMNC-2005; Westgard, 2003).

Coefficiente de Determinación

$$R^2 = 1 - \frac{\sum (Y - \hat{Y})^2}{\sum (Y - \bar{Y})^2} \quad (4)$$

Donde: $\hat{Y} = \sum y/n$

Coefficiente de Correlación de Pearson

$$R = \frac{[a \sum y + b \sum x - n(\hat{Y})^2]}{\sum y^2 - n\hat{Y}^2} \quad (6)$$

Donde:

$$\hat{Y} = \sum y/n \quad (5)$$

El criterio de aceptación es si R y/o $R^2 > 0.995$, entonces el método es lineal (CENAM-ema, 2008a; Rodríguez *et al.*, 2012).

Sensibilidad

La sensibilidad de un método mide su capacidad para discriminar entre pequeñas diferencias en la concentración del analito. Según la IUPAC (2014), la sensibilidad (m) se define como el cociente entre la señal medida (absorbancia, s) y la concentración (c) de analito:

$$m = s/c \quad (7)$$

En una regresión lineal, la sensibilidad es la pendiente de la curva a una concentración dada. En caso de ser una recta, coincide con la pendiente de la misma. Como valor se puede utilizar el promedio de las pendientes obtenidas en las rectas de los ensayos de estandarización, indicando su desviación estándar (Sabido *et al.*, 2010).

Límite de Detección (LD) (NMX-AA-051-SCFI-2001):

$$LD = y_B + 3s_B \quad (8)$$

Donde:

y_B = concentración del analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco.

$3s_B$ = tres veces la desviación estándar del blanco.

Límite de Cuantificación (LC) (NMX-AA-051-SCFI-2001):

$$LC = y_B + 10s_B \quad (9)$$

Donde:

y_B = concentración del analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco.

$10s_B$ = diez veces la desviación estándar del blanco.

Las determinaciones de LD y LC, se realizaron posteriormente a la determinación del parámetro de linealidad, donde se aplicó una calibración lineal del tipo $y = bx + a$. Para determinar los parámetros LD y LC se midieron cinco disoluciones de referencia de P_2O_5 para elaborar su curva de calibración. El análisis se realizó tres veces para cada con-

centración. Simultáneamente se prepararon y determinaron cinco blancos por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros Analíticos de Calidad para la Validación del Método

Exactitud

Uno de los criterios de calidad que tiene gran relevancia en la estandarización y validación de un método analítico es la exactitud, ya que este parámetro refleja de manera evidente, el grado de concordancia entre un valor real (medido) y un valor teórico (verdadero) y generalmente se sustenta a través del porcentaje de recuperación o recobro (CENAM-ema, 2008a). Los valores obtenidos para la exactitud del método por medio del porcentaje de recuperación, calculados a partir de la Ec. (1), se muestran en la Tabla 1. Como se puede apreciar, los valores para el porcentaje de recuperación se encuentran dentro del rango $100 \pm 15\%$ considerado como aceptable (IUPAC, 2014; CENAM-ema, 2008a), ya que los valores fluctuaron entre 93.16 y 107.88, con un promedio global de 99.12% de recuperación. Si se considera el promedio global de 99.12 % de recuperación como valor aceptable de la exactitud, se tendría otro rango más estrecho para avalar la exactitud del método de acuerdo a nuevos criterios establecidos recientemente por la ema (2008a), en donde se establece un rango de aceptabilidad de $100 \pm 2\%$ de recuperación.

Los resultados obtenidos para el porcentaje de recuperación concuerdan con los obtenidos por García *et al.*

Tabla 1. Resultados obtenidos a partir de cinco concentraciones de P_2O_5 (mgL^{-1}) y por quintuplicado.

Table 1. Results obtained from five P_2O_5 concentrations (mgL^{-1}) and for quintupled.

RÉPLICA	Concentración de P_2O_5 (mgL^{-1})				
	1.2 Prom.	1.6 Prom.	2.0 Prom.	4.0 Prom.	8.0 Prom.
1	1.1100	1.4787	2.1408	3.9673	7.7800
2	1.1100	1.4939	2.1636	4.0814	7.9855
3	1.1200	1.4939	2.1784	4.1119	8.0312
4	1.1200	1.4939	2.1560	4.1119	7.9399
5	1.1300	1.4939	2.1484	4.1119	8.0464
Promedio \pm	1.12	1.49	2.16	4.08	7.96
DE**	± 0.01	± 0.01	± 0.01	± 0.06	± 0.11
Recuperación (%)	93.16	93.18	107.88	101.92	99.46
Sesgo	-0.08	-0.08	0.16	0.08	-0.04
% CV	0.75	0.46	0.68	1.54	1.35
% Error	-6.67	-6.88	8.00	2.00	-0.50
	0.004	0.004	0.004	.027	0.049

El promedio corresponde a cinco réplicas de la concentración del analito, con un total de 25 muestras. (**) = Desviación Estándar.

(2009), quienes validaron un método espectrofotométrico aplicable en los laboratorios clínicos para la determinación analítica de fósforo en suero, y encontraron que los porcentajes de recuperación son mayores del 98% y no sobrepasan el 102%. Por otro lado, Sabido *et al.* (2010) en la adaptación de un micrométodo espectrofotométrico para determinación de fósforo en hueso, reportaron valores de porcentaje de recobro de 89.97%. Estos porcentajes de recuperación se encuentran dentro de los límites ($100 \pm 15\%$) establecidos por la A.O.A.C. (2005) para la validación o prevalidación de métodos analíticos mediante análisis espectrofotométricos.

Por su parte, Carrillo *et al.* (2012) evaluaron espectrofotométricamente un método para determinar fósforo disponible en fertilizantes inorgánicos. Se analizaron tres fertilizantes y utilizaron un estándar de fosfato monopotásico (KH_2PO_4). Los valores de recuperación del fósforo al analizar un rango de patrones de KH_2PO_4 entre 0 y 15 mgL^{-1} , variaron entre 98.98% y 102.62% con un promedio 101.23%. Estos valores se consideran aceptables según los criterios de CENAM-ema (2008a).

Sesgo

Los resultados obtenidos para el sesgo se aprecian en la Tabla 2, los cuales se calcularon a partir de la Ec. (2). Para establecer el criterio de aceptabilidad del sesgo, se debe evaluar la prueba del sesgo, la cual generalmente se detecta analizando uno o varios materiales de referencia cuya composición se conoce. Con toda seguridad, la media experimental del análisis diferirá del valor verdadero de μ , proporcionado para el material de referencia. En este caso, debe juzgarse si esta diferencia es consecuencia de un error aleatorio en el análisis del material de referencia o de un sesgo en el método usado. La forma habitual de tratar estadísticamente este problema consiste en comparar la diferencia experimental $\bar{x}-\mu$ con la diferencia que cabría esperar para un nivel de probabilidad dado si no existiera sesgo. La presencia de un sesgo en el método se indica cuando el valor $\bar{x}-\mu$ experimental es mayor que el valor $\bar{x}-\mu$ calculado ($\pm tS/\sqrt{N}$) a partir de la Ec. (12). Por lo contrario, si el valor experimental es igual o menor que la diferencia calculada, no queda demostrada la presencia de un sesgo (Guarin, 2011).

Tabla 2. Validación del intervalo reportable para el sesgo.
Table 2. Validation of the reportable range for bias

Réplica	Valor teórico (mgL^{-1})	Valor experimental Promedio (mgL^{-1})	Sesgo	% Error	Criterio de aceptación
1	1.2	1.12	-0.08	-6.67	± 0.01
2	1.6	1.49	-0.11	-6.88	± 0.01
3	2.0	2.16	0.16	8.00	± 0.01
4	4.0	4.08	0.08	2.00	± 0.07
5	8.0	7.96	-0.04	-0.50	± 0.13

Este test de detección del sesgo se apoya en el parámetro estadístico *t Student* y utiliza la ecuación siguiente:

$$\bar{x}-\mu = \pm tS / \sqrt{N} \quad (10)$$

Donde N es el número de medidas replicadas que se han utilizado en este test.

Finalmente se compara el sesgo (desviación) o el porcentaje de error para cada dilución con el error permitido para la prueba. Los valores del sesgo calculados a partir de la Ec. (12) son mayores a los obtenidos experimentalmente, por lo que se puede decir que no existe un sesgo en el método analítico (Tabla 2).

Precisión

La precisión es una medida de la dispersión de los datos en torno a un valor central o el grado de concordancia entre mediciones replicadas de la misma cantidad, y puede expresarse como rango, desviación estándar, porcentaje del coeficiente de variación (%CV) o la varianza. En este estudio, la precisión se evaluó mediante el %CV el cual se calculó a partir de la Ec. (3), tal y como se puede apreciar en la Tabla 1, los resultados para este parámetro no rebasan el valor de 1.54, por lo cual, la precisión para este método analítico se considera aceptable, ya que para métodos instrumentales debe ser menor del 2% (Christian, 2009; Harvey, 2002).

Los resultados obtenidos en este estudio para %CV, son similares a los obtenidos por López (2009), quien determinó parámetros de desempeño en métodos analíticos espectrofotométricos específicos para cuantificar fósforo y potasio en suelos utilizados para cultivo del café, obteniendo un CV de 3.03% indicando que el método es preciso, de acuerdo al criterio de aceptación determinado en la validación de métodos analíticos por la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (2001), que para este parámetro establece que el $\%CV \leq 3.88$. Por su parte, García *et al.* (2009) al determinar la precisión del método espectrofotométrico para cuantificar fósforo en suero sanguíneo encontró que el CV está por debajo del 3%.

Linealidad

La linealidad es la capacidad (dentro de un intervalo dado) para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en las muestras de examen (CENAM-ema, 2008b). En este estudio, la linealidad se evaluó mediante el coeficiente de correlación de Pearson (R) a través de las ecs. (5-6) y el coeficiente de determinación (R^2) a través de las ecs. (4-6). R indica el grado de asociación entre dos variables (en este caso absorbancia y concentración) y R^2 , indica qué tan bueno es el modelo de regresión utilizado. Los criterios de aceptación para ambos parámetros son que R y R^2 deben ser mayores que 0.995 (CENAM-ema, 2008a; Rodríguez *et al.*, 2012). La inspección visual de la Figura 1, indica que la linealidad es aceptable, en tanto que el valor obtenido para R fue de 0.9992 y para R^2 de 0.9984. Por lo que de acuerdo a la EMA (2008a), los valores obtenidos son mayores que 0.995 y por lo tanto se corrobora

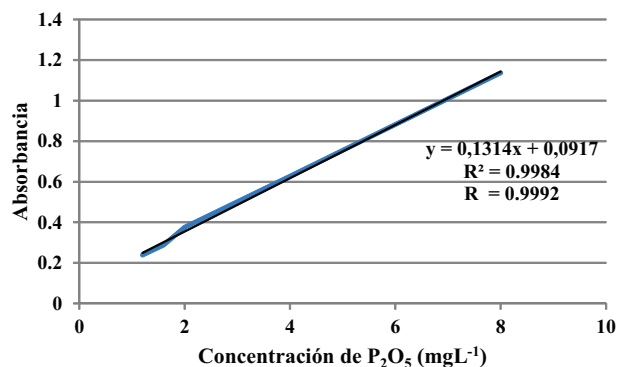


Figura 1. Curva de calibración para cuantificación de P en forma de P_2O_5
Figure 1. Calibration curve for quantifying P as P_2O_5 .

que la linealidad obtenida es aceptable. El resultado obtenido en este estudio para el coeficiente de correlación es similar con el reportado por Cavazos et al. (2000). En tanto que Gomara et al. (2004), encontraron que en el intervalo de 5 a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido kójico, el método es lineal ($R = 0.9994$) de acuerdo a ICH (2005).

Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico, se define como la pendiente, m , de la curva de calibración, ya que esta define la razón de cambio de la propiedad medida por unidad de concentración. Una respuesta no lineal en la gráfica de A vs C indica un cambio en el valor de la sensibilidad en función de la concentración. Conforme la concentración del analito se aproxima a cero, la señal desaparece dentro del ruido y se rebasa el límite de detección.

La sensibilidad aunque es independiente de la concentración, se obtiene como el cociente de dividir la señal medida (absorbancia) entre su valor ($m = s/c$), y por lo que se puede observar es simplemente igual a la pendiente promedio. En la Tabla 3 se correlacionan los datos mencionados y se muestra el valor de la m (sensibilidad) = $0.170 \pm 0.038 \text{ mgL}^{-1} P_2O_5$. El valor de sensibilidad obtenido a partir de la Ec. (7) debe permitir una adecuada discriminación de los valores de concentración en base a la lectura. Mientras más próxima al eje de las Y esté la recta, significa que a ligeros cambios en las concentraciones esperadas habrá grandes variaciones en los resultados de las lecturas observadas.

Por el contrario, entre más se aleje al eje de la Y, grandes cambios en la concentración no son significativos para la lectura. Se considera, que un método es sensible cuando una pequeña variación de concentración determina una gran variación de respuesta. La sensibilidad permite observar la capacidad de respuesta instrumental frente a una determinada cantidad de analito. Con respecto al tiempo, se visualiza mejor cómo se comporta el instrumento (Guía técnica No. 1, 2010).

Con el propósito de tener más elementos confirmatorios, se recurrió al desarrollo de la curva de Ringbom (Suárez

Tabla 3. Valores obtenidos para la sensibilidad de la curva de calibración del método.

Table 3. Values obtained for the method calibration curve sensitivity.

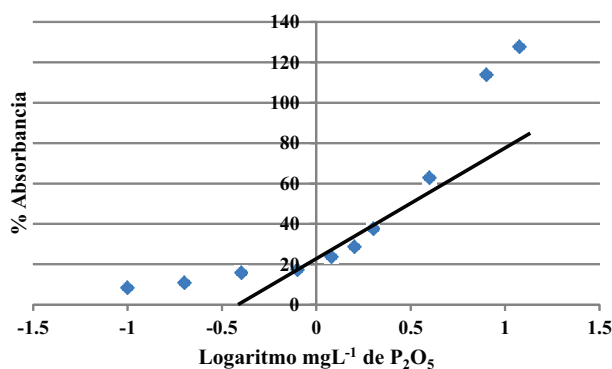
C $\text{mgL}^{-1} \text{ P}$	$S_{\lambda 660}$	Sensibilidad (m)
0.8	0.174	0.218
1.2	0.239	0.199
1.6	0.288	0.180
2.0	0.375	0.188
4.0	0.627	0.157
8.0	1.137	0.142
12.0	1.276	0.106
Promedio		0.170
Desvest		0.038

et al., 2009). Mediante una inspección visual se observa que la parte lineal de la gráfica (Figura 2) permite obtener el intervalo de concentraciones óptimo o el intervalo que presentará una relación lineal entre absorbancia y concentración, ya que en la zona de altas y bajas absorciones existe una desviación de la línea recta que debería esperarse. Esto significa que el intervalo de trabajo más confiable del método se encuentra entre 1.2 y 4.0 mgL^{-1} de fósforo en forma de P_2O_5 , que sería a su vez el intervalo donde se comete el mínimo de error. Por lo que la sensibilidad de este método está entre el rango 1.2 y 4.0 mgL^{-1} . Cabe recordar que la sensibilidad del instrumento está en función de la Ley de Lambert-Beer, y esta solo se cumple dentro de un intervalo de concentración, que comúnmente se le llama intervalo de trabajo, de tal manera que en este estudio, la Ley de Lambert-Beer no se cumple a concentraciones muy bajas o muy altas de fósforo y esto se refleja en el comportamiento gráfico de la curva de sensibilidad o curva de Ringbom.

Es importante señalar que en la Fig. 1 se muestra la recta de calibrado que se obtuvo graficando los promedios de las absorbancias de cinco estándares de P_2O_5 . En esta figura se aprecia claramente que las lecturas de absorbancia tuvieron una tendencia lineal, sin presentar dispersión significativa, asegurando una correlación lineal entre c y s ($c = \text{concentración}$; $s = \text{señal analítica} = \text{absorbancia}$) entre valo-

Figura 2. Curva Ringbom para valorar la sensibilidad del método.

Figure 2. Ringbom curve to assess the sensitivity of the method.



res de concentración de 1.2 y 8.0 mgL⁻¹ de P₂O₅. Este intervalo asegura la reproducibilidad de las lecturas dependientes de la concentración, con un valor de R = 0.9984.

Límite de Detección

El límite de detección (LD) es la concentración mínima de un analito en la matriz de una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, bajo condiciones analíticas específicas, según la norma mexicana NMX-CH-152-IMNC-2005 (IUPAC, 2014; Thompson *et al.*, 2002; CENAM-ema, 2008a).

El resultado obtenido para el LD de acuerdo al procedimiento recomendado por la NMX-CH-152-IMNC-2005, fue de 0.18 mgL⁻¹ de P₂O₅ utilizando un método espectrofotométrico UV-VIS. Este valor obtenido para el LD, fue estimado a partir de la Ec. (8), está muy por debajo del valor obtenido por García *et al.* (2009) quienes obtuvieron un LD con valor de 1.1 mgL⁻¹ de fósforo cuantificado a partir de suero sanguíneo humano. En otra investigación Severiche y González (2012), reportan un LD relativamente bajo de 0.03 mgL⁻¹ al validar el método colorimétrico del ácido ascórbico para la determinación de fosfatos en agua, que quizá rebase la capacidad analítica de los métodos espectrofotométricos.

Límite de Cuantificación

El límite de cuantificación (LC) es aquel valor de concentración mínima que puede obtenerse con una imprecisión aceptable (Thompson *et al.*, 2002; CENAM-ema, 2008a). El resultado obtenido para LC a partir de la Ec. (9), siguiendo el procedimiento establecido fue de 0.58 mgL⁻¹ de P₂O₅. Este resultado es similar al reportado por López (2009) quien obtuvo un LC de 0.7678 mgL⁻¹ para métodos espectrofotométricos para la cuantificación de fósforo en suelos utilizados para cultivo del café. Por su parte García *et al.* (2009), en la validación del método espectrofotométrico para la determinación analítica de fósforo en suero sanguíneo humano, obtuvieron valores para el límite de cuantificación de 4 mgL⁻¹ de fósforo, los cuales son más altos a los obtenidos en este estudio.

Es importante señalar que se han realizado estrategias de validación de métodos analíticos empleando técnicas de espectrofotometría UV-Visible, como los trabajos realizados por Gomara *et al.* (2004) para la cuantificación del ácido fólico, o la cuantificación de metabolitos estables de óxido nítrico en fluidos biológicos (Tenorio *et al.*, 2008), entre otros. Sin embargo, la gran mayoría de los trabajos recientes de validación de métodos analíticos tienen una gran aplicación en la investigación de productos farmacéuticos. Entre estos métodos analíticos validados se encuentra la determinación y/o cuantificación de sertralina (Walash *et al.*, 2011), candesartan (Pradhan *et al.*, 2011), determinación de fenol en productos farmacéuticos (Vukovic *et al.*, 2012), desloratadina (Derayea, 2014), cromoglicato de sodio y clorhidrato de oximetazolina (Abdel-Aziz *et al.*, 2014) entre otros.

Aplicabilidad del Método

Para confirmar la validación del método analítico utilizado, se procedió a evaluar la aplicabilidad del método para cuantificar la concentración de fósforo en una bebida de cola (coca cola®). Se obtuvo la linealidad de la curva de calibración en un rango de 1.2 a 8.0 mgL⁻¹ de P₂O₅. Con los datos obtenidos y aplicando mínimos cuadrados se llegó a la ecuación $Y = 0.1314X - 0.0917$, con un coeficiente de correlación (R) de 0.9992. La absorbancia promedio (0.1598) de las lecturas de las muestras analizadas se interpoló en la curva de calibración para obtener la concentración de P₂O₅ (0.5183 mgL⁻¹). La desviación estándar de la concentración de la muestra fue de 0.0972 mgL⁻¹. Posteriormente, considerando las diluciones realizadas se obtuvo la concentración de fósforo en el refresco de la siguiente forma:

$$\text{mgL}^{-1} \text{ de P} = (\text{mgL}^{-1} \text{ P}_2\text{O}_5) (fd_n) (\text{g de P/g de P}_2\text{O}_5) = (0.5183)(50)(10)(62/142) = 113.15$$

Por lo anterior el contenido de fósforo en las muestras de coca cola® analizadas en el presente estudio fue de 113.15 ± 0.10 x10⁻¹ mgL⁻¹. Cavazos *et al.* (2000), determinaron el contenido de fósforo en bebidas de consumo popular, como son los refrescos de cola por espectrofotometría UV-VIS, reportando que 355 mL de un refresco de cola proporcionan entre 66 y 85 mg de fósforo. Citan que el contenido de fósforo en coca cola® fue de 215 mgL⁻¹ con un % CV = 1.78. Por otro lado, Murphy (1983) reportó un contenido de H₃PO₄ de 5.06 ± 0.09 x10⁻³ M en refrescos de cola, lo que equivale a 156.86 mgL⁻¹ de P, utilizando el mismo método. Lozano-Calero *et al.* (1996) cuantificaron 142 mgL⁻¹ de P en crystal pepsi®. Martínez y Noyola (2012) cuantificaron el contenido de ácido fosfórico por el método colorimétrico de ácido vanadomolibdofosfórico, reportando 345.88 mgL⁻¹ de H₃PO₄, lo que equivale a 109.41 mgL⁻¹ de P.

Finalmente, la comunidad analítica internacional ha establecido las principales especificaciones y requisitos operativos de un laboratorio de pruebas por medio de la Norma Internacional ISO/IEC 17025:2005 "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración", esta norma especifica claramente la necesidad de la validación de los métodos analíticos como un requisito indispensable antes de realizar una medición analítica, ya que el desempeño de un método analítico es diferente en cada laboratorio que lo realiza y además los métodos analíticos no se pueden utilizar para medir algún mensurando en cualquier matriz, sino que son muchas veces específicos para la matriz en la que fueron desarrollados y por ende validados originalmente (INECC-CCA, 2010).

La validación de un método analítico se refiere a su evaluación cuantitativa y tiene como objetivo proporcionar información fiable, exacta y de fácil interpretación sobre el objeto de análisis (Gomara *et al.*, 2004; Sabido *et al.*, 2010; Severiche-Sierra y González-García, 2012).

CONCLUSIONES

Se validó el método analítico del azul de molibdeno para la cuantificación de fósforo a partir de P_2O_5 mediante los parámetros analíticos de exactitud, sesgo, precisión, linealidad, sensibilidad, límite de detección y límite de cuantificación. La aplicabilidad del método se realizó cuantificando el contenido de fósforo en bebidas de cola ($113.15 \pm 0.10 \text{ mgL}^{-1}$) y los resultados son aceptables y comparables a los obtenidos por otros investigadores que utilizan otras metodologías con el mismo fin.

REFERENCIAS

Abdel-Aziz O., El-Kosasy A.M., Magdy N., y El Zahar N.M. (2014). Novel spectroscopic methods for determination of Cromolyn sodium and Oxymetazoline hydrochloride in binary mixture. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 131:59-66.

AOAC. (2005). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 18th ed. Association of Official of Analytical Chemist. Washington, DC.

APHA. (2012). American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd. Washington, D.C.

Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. (2001). Validación de métodos analíticos. Ed. A.E.F.I. Madrid, España. p.67.

Canalías, R.F. (2003). Recomendaciones para el estudio de la precisión de los procedimientos de medida en el laboratorio clínico. *Química Clínica.* 22(2):63-65.

Carrillo, C.E., Ruíz, M., Aular, L.M., Mora, R., Castillo, L., Noguera, R., Tovar, M., Díaz, T., Arrieche, I.E., Fernández, S., Silva C. y Gamboa, O. (2012). Método directo para determinar fósforo disponible en fertilizantes. *Venezuelos* 20:5-11.

Castineira, Mirta. (2009). Desarrollo de un método y su validación para la determinación de melatonina en tabletas. ©Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales. *Superficies y Vacío* 22(3) 29-32.

Cavazos, R.N.C., Zárata, R.L. y Torres, de N.E. (2001). Determinación de fósforo y cafeína en bebidas de cola. 2001. *Revista de Educación Química* 12[2].

CENAM. (2005). Métodos analíticos adecuados a su propósito. Guía de laboratorio para validación de métodos y tópicos relacionados. CNM-MRDPT-030.

CENAM-ema. (2008a). Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. México, D.F.

CENAM- ema. (2008b). Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplea la técnica de espectrofotometría de ultravioleta-visible. México, D.F.

CENAM- ema. (2009). Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. México, D.F.

Christian, G.D. (2009). *Química Analítica*. Sexta edición. Ed McGraw Hill. pp. 65-113. México.

Derayea S.M. (2014). Validated selective spectrophotometric methods for the kinetic determination of desloratidine in tablets and in the presence of its parent drug. *Pak J Pharm Sci.* 27(6):1781-8.

EURACHEM/CITAC. (2003). Guide Traceability in Chemical Measurement. A guide to achieving comparable results in chemical measurement. This Guide was in part supported under contract with the UK Department of Trade and Industry as part of the National Measurement System Valid Analytical Measurement (VAM) Program.

García, B.L., Pérez, P.T.M. y Valdés, D.L. (2009). Validación del método ultravioleta para determinar fósforo en suero. *Revista Cubana de Farmacia.* 43(4):45-52. La Habana, Cuba.

Gomara, F.L., Correr, C.J., Sato, M.E.O. y Pontarolo, R. (2004). Desarrollo y validación de un método espectrofotométrico para cuantificación de ácido kójico. *Ars Pharm.* 45 (2): 145-153.

Guarin, M.L.J. (2011). Estandarización de las técnicas de fosfatos y cloruros en aguas crudas y tratadas para el laboratorio de la Asociación Municipal de Acueductos Comunitarios (AMAC) en el Municipio de Desquebradas. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología Química. Colombia.

Guía Técnica No.1. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos". Instituto de Salud Pública de Chile. Santiago de Chile.

Harvey, D. (2002). *Química Analítica*. Cuarta edición. Ed. McGraw Hill. pp. 30-33. México.

ICH. (2005). Note for Guidance on Validation of Analytical Methods: Methodology. International Conference on Harmonization.

INECC-CCA. (2010). Guía para la implantación, validación y verificación del desempeño continuo de un método analítico. México, p. 27.

IUPAC. (2014). Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement, *Pure and Appl. Chem.* vol. 71:337-348.

López, L.M. (2009). Determinación de parámetros de desempeño en métodos analíticos espectrofotométricos específicos para cuantificar fósforo y potasio en suelos utilizados para cultivo de café. Tesis de licenciatura en Química y Farmacia. Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador, Centro América.

Lozano-Calero, D., Martín-Palomeque, P. y Madueño-Loriguillo, S. (1996). Determination of phosphorus in cola drinks. *Journal of Chemical Education.* Vol. 73 No. 12.

Martínez, L.D.E. y Noyola, M.E.T. (2012). Determinación del contenido de ácido fosfórico y cafeína en bebidas de cola de mayor consumo en los cafetines de la Universidad de El Salvador. Tesis de Licenciatura en química y farmacia. El Salvador, Centro América.

Miller, N.J. y Miller, C.J. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, Editorial Prentice Hall, 4ª Edición.

Murphy, J. (1983). Determination of phosphoric acid in cola beverages. *Journal of Chemical Education.* Vol. 60 No. 5.

NMX-AA-051-SCFI-2001. Determinación de metales por absorción atómica en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas.

NMX-CH-152-IMNC-2005. Metrología en Química-Vocabulario. México, D.F.

NMX-EC-17025-IMNC-2000 (ISO/IEC 17025:1999). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. México, D.F.

Pradhan K.K., Mishra U. S., Sahu K.C. (2011). Development and validation of a stability indicating UV spectronic method

- for cndesartan in bulk and formulation. *Indian Journal of Pharmaceutical Science*. 73(6):693-696.
- Quino, I., Choque, R. y Cáceres, L.F. (2005). Validación de una nueva determinación espectrofotométrica para dipirona en fármacos. *Revista Boliviana de Química*. Vol. 22, No.1.
- Rodríguez, S.C.I., Pellerano, R.G., Romero, C. H., Acevedo, H.A. y Vázquez, F.A. (2012). Validación de un método para la determinación de boro en muestras foliares de *Citrus reticulata*. *Revista Tumbaga*, pág. 55.
- Sabido, C.C.R., Rosado, R.J.G., Castellanos, R.A.F., Betancur, A.D.A., Chel, G.L.A. y Acereto, E.O.M. (2010). Adaptación de un micrométodo espectrofotométrico para determinación de fósforo en hueso. *Rev. Latinoamer. Quím.* Vol. 38, No. 2, pp. 113-122. ISSN 0370-5943.
- Severiche-Sierra, C. y González-García, H. (2012). Determinación de fosfatos en aguas por método colorimétrico. Validación del método. *Química Hoy. Chemistry Sciences*. 2 (3).
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J. y Crouch, S.R. (2013). *Química Analítica*. Séptima edición. Ed. McGraw-Hill. pag. 647. México, D.F.
- Suarez, R., Arévalo, E., Linares, L., Ustáriz, F. y Hernández, G. (2009). Validación de un método analítico para la determinación de magnesio eritrocitario. *Avances en Química*. 4(2), 53-62. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida 5101-Venezuela.
- Tenorio L.F.A., del Valle M.L., Pastelin H.G. (2005). Validación de un método analítico espectrofotométrico para la cuantificación de metabolitos estables de óxido nítrico en fluidos biológicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 36(1):31-41.
- Thompson, M., Ellison, S.L.R y Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem*. 74(5):835-855.
- Vukovic J., Matsuoka S., Yoshimura K., Jurišić Grubešić R., Kremer D., y Šantic N. (2012). *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 131:59-66.
- Walash M.I., Belal F.F., El-Enany N.M. y Elmansi H. (2011). Development and validation of stability indicating method for determination of sertraline following ICH guidelines and its determination in pharmaceuticals and biological fluids. *Chemistry Central Journal*. 5:61.
- Westgard, O.J. (2003). *Basic Method Validation*. 2nd. Edition. Pp.29-30, 87-99, 111-122.
- Worsfold, P., Gimbert, L., Mankasingh, U., Omaka, O., Hanrahan, G., Gardolinski, P., Haygarth, P., Turner, B., Keith-Roach, M. y McKelvie, I. (2005). Sampling, sample treatment and quality assurance issues for the determination of phosphorus species in natural waters and soils. No. 2. *Talanta*. pp. 273-295.