

29/14



Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
" ZARAGOZA "

ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS METODOS DE
CUANTIFICACION DE VITAMINA B₁₂ EN UNA
FORMULACION INYECTABLE DE USO VETERINARIO

Tesis Profesional

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a

ALBERTO GARNICA LOPEZ



México, D. F.

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE GENERAL

	Página
1. INTRODUCCION	1
2. GENERALIDADES	3
2.1. Las vitaminas.	3
2.2. Propiedades de la vitamina B12	3
2.3. Farmacología	9
2.4. Métodos de análisis	12
2.5. El método microbiológico	16
3. OBJETIVOS	22
4. HIPOTESIS	23
5. MATERIALES Y EQUIPO	24
5.1. Reactivos	24
5.2. Equipo	24
6. METODOS	26
6.1. Determinación cuantitativa de vitamina B12 por el método microbiológico (difusión en agar)	26
6.2. Determinación de vitamina B12 por cromatografía de líquidos de alta resolución	30
7. DESARROLLO DEL METODO	31
7.1. Desarrollo de las técnicas microbiológicas	31
7.2. Confrontación de la influencia de los excipientes en los métodos de análisis	36
7.3. Desarrollo del método de separación	38
7.4. Optimización del método de análisis	47
7.5. Evaluación de la especificidad	48
7.6. Precauciones del método de análisis	49
7.7. Validación del método de análisis	49

	Página
8. RESULTADOS	52
8.1. Resultados de la validación del método microbiológico	52
8.2. Comparación de métodos de cuantificación	58
9. CONCLUSIONES	61
ANEXO	63
BIBLIOGRAFIA	69

1. INTRODUCCION

El análisis farmacéutico comprende aquellos procedimientos necesarios para determinar "la identidad, potencia, calidad y pureza" de los medicamentos.

La necesidad de conocer la cantidad de un principio activo en un medicamento para asegurar su efecto terapéutico, ha llevado a desarrollar métodos que permitan la evaluación del mismo, -- los cuales consideran propiedades fisicoquímicas, químicas, biológicas y puramente físicas del principio activo y excipientes.

Es entonces cuando la investigación analítica será requerida para desarrollar un método de cuantificación satisfactorio, -- esto es, que tenga la sensibilidad adecuada, que sea selectivo para usarse sin interferencia de otros componentes en la muestra, -- que la exactitud y precisión alcanzadas sean proporcionales a la -- información deseada, que sea confiable y, finalmente, que el tiempo requerido para que se lleve a cabo sea razonable.^{1,2}

El proposito de este trabajo es desarrollar un método de cuantificación microbiológico para una formulación inyectable de -- uso veterinario que contiene vitamina B12. Al desarrollar el método se debe tomar en cuenta que se desea una técnica en la cual los excipientes de la formulación no interfirieran en la cuantificación de la vitamina, pues dichos excipientes tienen la característica -- de ser bactericidas, es decir, inhibidores del crecimiento, lo que hace problemática la cuantificación de la vitamina, al obtenerse -- resultados erróneos; esto es debido a que aumentan la difusión de la vitamina en el ensayo en placa dando diámetros de crecimiento -- más grandes.

Sabemos que el desarrollo de un medicamento involucra -- dos parámetros: a) la selección de los excipientes adecuados para una máxima estabilidad del principio activo (sin interferir en su acción terapéutica) y b) la selección de las técnicas de cuantifi-

cación más adecuadas para este medicamento.

Para el medicamento de interés se tiene ya un método -- desarrollado, este método emplea la cromatografía de líquidos de - alta resolución (CLAR) como método de separación y la espectrofo - tometría como método de cuantificación.³

La necesidad de desarrollar un método de cuantificación- para la vitamina B12 basado en el ensayo microbiológico se enfoca en el interés de tener un método primario de cuantificación alter- nativo para dicha vitamina que sea confiable, rápido y de fácil ma- nejo, y sobre todo que cuantifique la actividad biológica de la vi tamina.

2. GENERALIDADES

2.1. LAS VITAMINAS.

Las vitaminas intervienen en el mantenimiento de las funciones metabólicas, son sustancias orgánicas existentes en los alimentos, capaces o no de ser sintetizadas por el organismo, actúan en pequeñas dosis y no son usadas como fuente material y energética, pero son necesarias para el mantenimiento de las funciones metabólicas normales del organismo.⁴

2.2. PROPIEDADES DE LA VITAMINA B12.

2.2.1. Propiedades físicas y químicas.

La vitamina B12 corresponde a una serie de sustancias -

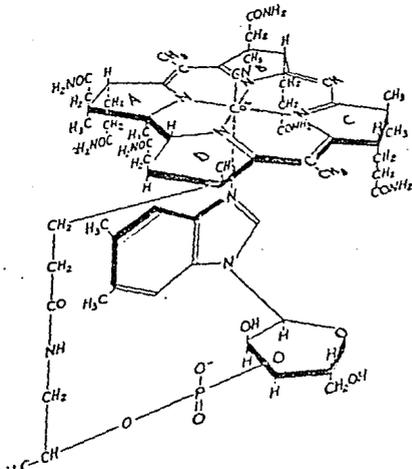


Fig. 1.- Estructura de la cianocobalamina⁵

denominadas cobalaminas derivadas de la cobamida, la cual consta de un núcleo central denominado corrina con cuatro anillos pirrólicos con cadenas laterales amídicas y que contiene cobalto trivalente unido a la D-ribosa a través de una cadena de aminopropanol y -fosfato. Para formar la vitamina B12, la cobamida se une al dimetilbenzimidazol dando lugar a las cobalaminas, La vitamina B12 propiamente dicha es la cianocobalamina y posee un grupo ciano unido al cobalto (figura 1), mientras que la vitamina B12a, la hidroxocobalamina, contiene un grupo hidroxilo en vez de cianuro.⁴

Nombre químico: *Sal interna de ciano fosfato de 3'-cercobamida con 5,6-dimetil-1-a-D-ribofuranosilbenzimidazol.*

Formula condensada: $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$.

Peso molecular: 1355.42

Composición: 55.74% de C, 6.68% de H, 4.34% de Co, 14.45% de N, 16.5% de O, 2.28% de P.

Descripción: Cristales rojos oscuros higroscópicos. Oscurecen a 210-220°. No funde a 300° (descompone). Inodoro e insipido.

Absorción máxima en agua:

278 nm ($E_{1cm}^{1\%}$ 115)

361 nm ($E_{1cm}^{1\%}$ 204)

550 nm ($E_{1cm}^{1\%}$ 64)

Solubilidad: 1 g en 180 ml de etanol (90%)

1 g en 80 ml de agua

insoluble en acetona, cloroformo y éter.⁶

2.2.2. Estabilidad.

Cuando es expuesta al aire puede absorber alrededor de -12% de agua, los cristales hidratados son estables al aire.⁶

La vitamina B12 se descompone por la acción de agentes oxidantes y reductores, es ligeramente inestable en soluciones -- ácidas o alcalinas. Por ejemplo, la cianocobalamina es convertida en hidroxocobalamina entre pH 3.5 y 6.5 bajo la acción de la luz, esta reacción puede ser revertida o parada por almacenamiento en la oscuridad.⁷ El pH de máxima estabilidad para la cianocobalamina está entre 4.5 y 5.⁸⁻¹⁰ Una solución de cianocobalamina puede esterilizarse a 120°C por 20 minutos usándose una solución reguladora de citratos 0.05 M, pH 4.5, sin que exista evidencia de degradación.⁸⁻¹⁰

La forma hidratada de vitamina B12 es estable sola o en trituraciones secas en cloruro de sodio, sacarosa, manitol y almidón de maíz; los efectos de los azúcares en la estabilidad de la vitamina B12 indican que al final de 6 meses de almacenamiento, la glucosa y fructosa causan 23% de degradación, sorbosa 11%, lactosa 18% y ambas maltosa y sacarosa 3%; los aminoácidos ocasionan efectos variados en la vitamina B12, la mayoría de ellos del 10 al 13% de degradación, mientras la cistina y cisteína ocasionan total destrucción de la vitamina a temperatura elevada.^{9,10,13,14}

Algunas vitaminas, como la riboflavina, tiamina, nicotinamida y ácido ascórbico aceleran su descomposición; frente a ---- estos efectos los iones férricos en bajas concentraciones muestran un efecto protector, el ferrocianuro de potasio es la más efectiva de las sales de Fe, además pueden usarse tioureas o hidrocafato - de etilo, éstos como agentes antioxidantes.^{8,11-14}

La estabilidad de la vitamina B12 frente a la luz presenta 4 aspectos:

i. La exposición a la luz solar (intensidad aproximada - de 8000 cd-ft) causan un 34% de pérdida de potencia en la solución neutra de vitamina B12 después de dos horas de exposición. A una intensidad de 300 cd-ft o menos no hay una destrucción notable des

pués del mismo tiempo de exposición.¹⁶

ii. La luz de una lámpara incandescente de un reflector - de aproximadamente 14000 cd-ft tiene un marcado efecto destructivo sobre soluciones de vitamina B12 (aproximadamente 45% después de dos horas de exposición). Este valor decrece en tanto disminuye la intensidad de la luz. Una intensidad de 3600 cd-ft no ocasiona una alteración detectable después de dos horas.¹⁶

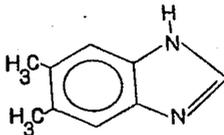
iii. De fuentes de luz monocromáticas, cuyas intensidades corregidas están en el mismo rango, la destrucción es más eficiente en la región de longitud de onda corta. Una alta intensidad de luz en el rojo no muestra destrucción después de dos horas.¹⁶

iv. Los resultados obtenidos con luz ultravioleta siguen el patrón obtenido por la luz solar, no presentándose una relación cuantitativa pues no se establecen luminosidades comparativas.¹⁶

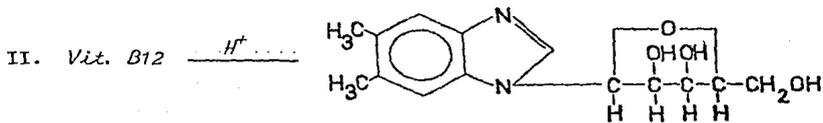
2.2.3. Productos de degradación.

Los productos de degradación se han obtenido y estudiado para deslindar la estructura de la vitamina B12 que ya se conoce; - estos productos de degradación se obtienen por hidrólisis drástica de la vitamina. Las reacciones generales para obtener dichos productos de degradación son:

I. Vit. B12 HCl

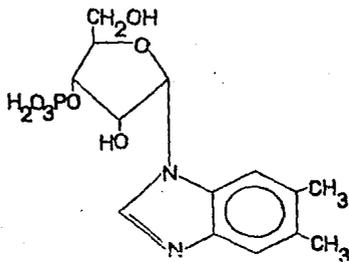


5,6-dimetilbenzimidazol 17,18

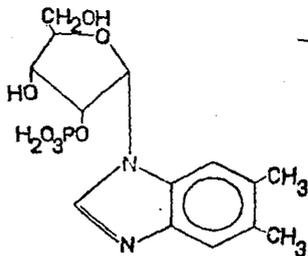


1-a-D-ribofuranosido-5,6-dimetilbenzimidazol^{19,20}

III. Vit. B12 $\xrightarrow[76hr\ 25^\circ]{HCl\ 6N}$

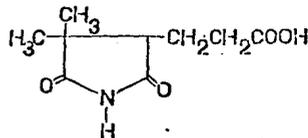
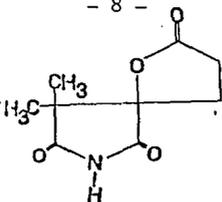
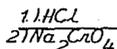


a-ribozolo-2'-fosfato



a-ribozolo-3'-fosfato^{21,22}

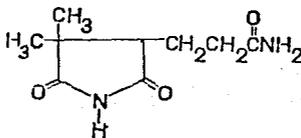
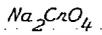
IV. Vit. B12



ácido DL-3,3-dimetil-
2,5-dioxo-4-hidroxi-
pirrolidín-4-propioni-
co lactona.

ácido DL-3,3-dimetil-
2,5-dioxo-4-hidroxi-
pirrolidín-4-propio-
nico.²³

V. Vit. B12



3,3- dimetil- 2,5-dioxopirrolidín-4-
propionamida.²⁴

De todos estos productos de degradación, los que muestran actividad en el crecimiento en ratas son:

5,6-dimetilbenzimidazol²⁵; 1- α -D-ribofuranósido-5,6-dimetilbenzimidazol (α -ribazol)²⁶; 1- β -D-ribofuranósido-5,6-dimetilbenzimidazol (β -ribazol)²⁶; la actividad de estos compuestos en el crecimiento es en niveles de miligramos.

2.3. FARMACOLOGIA.

Las cobalaminas intervienen en muchos sistemas metabólicos; son esenciales para el crecimiento y nutrición normales, hemato-poyesis normal, producción normal de todas las células epiteliales (incluso las del tubo digestivo) y para conservar la mielina del sistema nervioso y donde quiera que las células se reproduc---
can.²⁹

En el organismo la vitamina B12 se transforma en dos -- coenzimas B12, que se encuentran en la sangre e hígado, la 5'-de--soxiadenosilcobalamina o coenzima B12--unión de la desoxiadenosina--con el cobalto--y la metilcobalamina.⁴

Se necesita coenzima B12 para la transferencia de hidrógeno e isomerización donde hay conversión del metilmalonato en ---succinato, y esto significa que la cobalamina interviene en el metabolismo de las grasas y de los carbohidratos. Como una forma de--utilización del ácido propiónico en los tejidos animales en su ---conversión por la vía del metilmalonato, es posible que una razón--de la lesión neurológica en los pacientes con deficiencia de vitamina B12 sea su imposibilidad para elaborar la parte líquida de la lipoproteína de la vaina de mielina.⁴

La forma de vitamina B12 que se necesita para convertir--la homo--cisteína en metionina en el mamífero es la metilcobalamina (figura 2).

La vitamina B12 interviene en el mantenimiento de los -- grupos sulfhidrilos (SH) en la forma reducida necesaria para la -- función de muchos sistemas enzimáticos activados por grupos SH. -- Puede fomentar la formación de metionina en parte al disminuir la--oxidación del grupo SH de la homocisteína, que es aceptor de meti--lo.^{27,28}

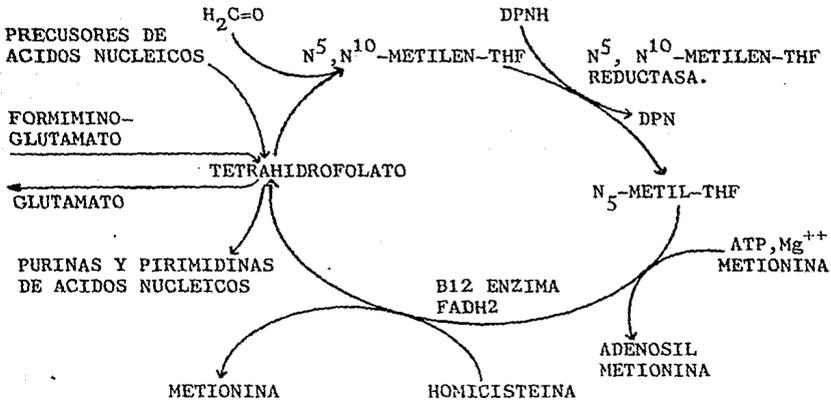


Fig. 2. Ciclo de tetrahidrofolato en el cual interviene la vitamina B12

La vitamina B12 interviene en la síntesis de las proteínas por su papel en la síntesis de metionina, y posiblemente de otros modos también. Como la metionina interviene en la elaboración de los lipotrópicos colina y betaina, este es otro punto en el que la cobalamina desempeña un papel en el metabolismo de los lípidos.²⁹⁻³²

2.3.1. Mecanismo de acción.

Referente a su mecanismo de acción debe tomarse en cuenta que en las anemias megaloblásticas existe un trastorno del metabolismo del ácido desoxirribonucleico, necesario para la correcta hematopoyesis y crecimiento de las células epiteliales; pero este trastorno existe tanto en las anemias por deficiencia de vitamina-B12 como a las debidas a deficiencias de ácido fólico; pero además el ácido fólico también es capaz de convertir una médula ósea megaloblastica en una normal.

loblástica en nomoblástica, en los casos de anemia perniciososa y - otras anemias megaloblásticas, pero no mejora las lesiones neurológicas de la primera, pudiendo por el contrario agravarlas. Existe por lo tanto, una interrelación entre la vitamina B12 y folato en sus accipnes sobre la medula ósea. La vitamina B12 no actúa directamente sobre la medula ósea sino a través del ácido fólico, en el sentido de que una deficiencia de la primera lleva a un trastor no de metabolismo del segundo, que es la causa de la anemia megaloblástica.^{4,28}

2.3.2. Absorción.

La cianocobalamina se absorbe de manera cuantitativa y - con rapidez en los sitios de inyección intramuscular y subcutánea, alcanzandose su máximo en el plasma dentro de la hora siguiente a la inyección intramuscular.^{4,29}

Para que se absorba por el intestino es necesaria la --- presencia del factor intrínseco gástrico (glucoproteína) que, al - combinarse con la vitamina B12 permite su absorción, que se realiza en el íleon y muy poco en el yeyuno y colon. En la anemia perniciososa en que falta dicho factor intrínseco la absorción intestinal es muy pobre, requiriendose dosis por lo menos 100 veces mayores - por vía oral que por vía parenteral, para conseguir efectos eritropoyeticos similares, ya que la mayor parte de la vitamina B12 ---- aparece en las heces (hasta e. 90%); si se agrega factor intrínseco en forma de polvo de estómago de cerdo, la absorción aumenta y - ejerce su acción eritropoyetica a pequeñas dosis.⁴

2.3.3. Destino.

Una vez absorbida, la vitamina B12 pasa al plasma san--- guíneo, y su nivel se eleva llegando a valores normales en la anemia permisiosa, cuando se administra dicha vitamina en dosis conve

nientes. En el plasma se encuentra en su mayor parte combinada -- con las globulinas, α -globulina o transcobalamina I y especialmente β -globulina o transcobalamina II, por lo que se almacena especialmente en el hígado, donde se transforma en las enzimas metilcobalamina y 5'-desoxiadenosilcobalamina, pasando posteriormente a la -- medula ósea donde se utilizan para regular la critropoyesis.⁴

2.3.4. Excreción.

La vitamina B12 administrada por las vías intravenosa o intramuscular que sobrepasa la capacidad de enlace del plasma, del hígado y de otros tejidos se elimina por filtración glomerular, y la depuración es aproximada a la de la insulina. También es excretada en la bilis y se vuelve a absorber en el intestino -circulación enterohepática-.²⁹

2.4. METODOS DE ANALISIS.

Los metodos para determinar la vitamina B12 pueden englobarse en tres grupos: biológicos, microbiológicos y químicos. - Los métodos biológicos son lentos y difíciles de realizar ya que - en ellos utilizan animales de experimentación -conejos, ratones, -- etc.-, que necesitan con cuidados previos a su utilización y un -- manejo cuidadoso, por lo que se necesitan instalaciones especiales para su realización. Los métodos microbiológicos son más sensibles y rápidos, se requiere personal especializado, no necesitandose -- trabajar en areas amplias. Ambos métodos, biológicos y microbio-- lógico, son reproducibles con sensibilidades buenas, pero para -- llevarse a cabo se hace necesario un control estricto en la realización del trabajo. Los métodos químicos tienen tambien, sensi--- bilidades adecuadas, pero menores a los métodos anteriores, son --

mucho más rápidos y con buena reproducibilidad.³⁷

2.4.1. Métodos Químicos y Fisicoquímicos.

2.4.1.1. Ensayo espectrofotométrico de vitamina B12.

Una solución acuosa de cianocobalamina tiene los siguientes máximos de absorción:

$$278 \text{ nm } (\pm 1 \text{ nm}), E_{1\text{cm}}^{1\%} = 115$$

$$361 \text{ nm } (\pm 1 \text{ nm}), E_{1\text{cm}}^{1\%} = 207$$

$$550 \text{ nm } (\pm 1 \text{ nm}), E_{1\text{cm}}^{1\%} = 63$$

La absorción a 361 nm es apropiada para la determinación espectrofotométrica. La extinción a 550 nm es comparativamente --- menor por lo que se obtienen métodos menos sensibles. La determinación de cianocobalamina por medición de absorbancia a 361 nm es el método empleado por la USP.^{7,33,34,62}

2.4.1.2. Ensayo espectrofotométrico de vitamina B12 por medio de diacínida.

El método está basado en la diferencia entre el espectro visible de la vitamina B12 y el espectro de su complejo diacínídico formado en solución ante la presencia de exceso de iones cianoa 582 nm.³⁵

2.4.1.3. Determinación colorimétrica con sales R-nitrosas.

El método comprende la oxidación de la muestra de ensayo con peróxido de hidrógeno y la solución resultante es tratada con-

una solución R-nitrosa (1-nitroso-2-naftol-3,6-sulfonato disódico), a un pH apropiado. El color rojo-naranja así desarrollado tiene un máximo a 420 nm y obedece la ley de Beer entre 100 y 600 mcg de -- vitamina B12.⁷

2.4.1.4. Determinación espectrofotométrica de cianuro en la vitamina B12.

El ensayo de grupo ciano en la vitamina B12 proporciona un método específico para la determinación de dicha vitamina, esto es debido a que una molécula de cianuro puede ser liberada de cada molécula de vitamina B12 por un método de reducción o por procedimiento de eliminación y el cianuro es aislado cuantitativamente -- como cianuro de hidrógeno el cual se determina colorimétricamente con reactivo de fosfato de cloramina-T y reactivo de pirazolona-- piridina, obteniéndose el color azul que obedece la ley de Beer -- entre 5 y 400 ng de vitamina B12 y tiene un máximo a 620 nm.⁷

2.4.1.5. Determinación por espectroscopía de Absorción Atómica.

El método involucra la disolución de vitamina B12 y -- subsecuente determinación del cobalto complejado por espectroscopía de absorción atómica.⁷

2.4.1.6. Ensayo de trazas radioactivas.

El ensayo comprende el uso de una forma marcada de vi-- tamina conteniendo cobalto radiactivo para la determinación de la vitamina B12 en mezclas complejas, cápsulas de vitaminas y ciano-- cobalamina sola. La adición de vitamina B12 radioactiva al inicio-

del experimento permite una determinación exacta del porcentaje -
recobrado del trazador por medición de la radioactividad, del cual
el porcentaje recobrado de vitamina es computado y analizado.⁷

2.4.1.7. Determinación por cromatografía en papel.

La cianocobalamina es separada de otros componentes (al-
gunas vitaminas) por cromatografía en papel usando butanol secunda-
rio saturado de agua conteniendo 1% de ácido acético como solvente
revelador, las manchas son eluidas y determinadas espectrofotomé-
tricamente.^{7,36}

2.4.2. Métodos microbiológicos.

2.4.2.1. Ensayo con Ochromonas malhamensis (ATCC 11532).

Esta alga es la más específica de todos los demás micro-
organismos usados para cuantificar a la vitamina B12, ya que res-
ponde a aquellas cobalaminas (benzoimidazol-cobalaminas) que po-
seen efecto terapéutico a la anemia perniciosa. El ensayo se afec-
ta por la presencia de grandes cantidades de metionina, que simula
actividad de vitamina B12 cuando se emplea este microorganismo. --
Sensibilidad 1 pg = 10^{-12} g.³⁷⁻⁴¹

2.4.2.2. Ensayo con Euglena gracilis cepa Z (ATCC 12716)

Este organismo no es tan específico como el anterior, pe-
ro comparte con aquel la propiedad de responder solamente a cobala-
minas, como las adenina-cobalaminas, clínicamente inactivas. Sensi-
bilidad 1 pg = 10^{-12} g.^{7,37-41}

2.4.2.3. Ensayo con Escherichia coli 113-3
(ATCC 11105).

Este organismo responde al factor B (derivado no nucleóti do de la cianocobalmina), una amplia variedad de cobalaminas y a metionina. Es aplicable cuando la vitamina B12 se encuentra libre de materiales interferentes. La sencilla técnica y ahorro de tiempo que supone la realización de este ensayo microbiológico puede compensar la desventaja que representa su escasa especificidad.³⁸⁻⁴⁴

2.4.2.4. Ensayo con Lactobacillus leichmannii
(ATCC 4797 y 7830).

Este organismo responde a una gran variedad de cobalaminas y a desoxirribósidos, los cuales desvian los requerimientos de cobalamina.^{7,37-41,45,46}

pg = picogramos

2.5. EL METODO MICROBIOLOGICO.

La necesidad de comprobar la cantidad de un principio activo estipulada en el marbete de un medicamento como una medida de control de calidad, ha llevado a desarrollar métodos en los cuales se consideran las propiedades químicas, fisicoquímicas y puramente físicas del principio activo puro. Para muchos principios activos, estas consideraciones son suficientes para su cuantificación, pero para otros no es tan sencillo, pues estas características no son suficientes o no son tan confiables, entonces la alternativa obvia es considerar sus propiedades biológicas.^{7,56}

Desafortunadamente las propiedades biológicas no pueden-

ser cuantificadas fácilmente debido a que los métodos biológicos - puros nunca han sido exitosos principalmente por la variabilidad - inherente al sistema biológico (uso de animales), por esta razón - se ha optado por trabajar con microorganismos, los cuales han ---- demostrado tener una respuesta más uniforme y un manejo más sen--- cillo. 37,56

Los dos métodos de Ensayo Microbiológico más comunmente- usados son el método el placa (Difusión en agar) y el método en -- tubo (Turbidimétrico). El fundamento de ambos métodos es la com-- paración cuantitativa del efecto de dos sustancias sobre el creci- miento de un microorganismo apropiado en un medio nutriente. Las - dos sustancias son un estándar y una muestra cuya potencia será -- determinada. El efecto puede ser para inhibir el crecimiento, como es el caso de los antibióticos, o para promover el crecimiento, -- como es el caso de las vitaminas y aminoácidos. 60,61

2.5.1. El ensayo de difusión en agar.

El ensayo microbiológico se basa en la respuesta que -- presenta un microorganismo a la acción de una vitamina, la cual se hace difundir a través de un gel nutriente inoculado con dicho --- microorganismo de prueba. La respuesta que se presenta es la promo- ción del crecimiento; esta respuesta deberá seguir una función --- directamente proporcional a la concentración del compuesto a pro- bar y cumplir con las características de precisión, exactitud y -- linealidad del método. Como se observa, el ensayo microbiológico - plantea una problemática complicada pero no difícil de solventar,- por lo que se deben definir los parámetros que afectan la respues- ta, estos se pueden enunciar como sigue: 50-52, 56, 60, 61

- a) Selección del organismo de prueba, cuya sensitivi- dad sea inherente al compuesto.
- b) Densidad del inóculo: la concentración del microorga- nismo seleccionado debe ser la adecuada y uniforme -

en el medio, para obtener una respuesta reproducible del microorganismo indicador.

- c) Formulación y condiciones del medio nutriente: que el medio nutriente sea óptimo para el crecimiento del microorganismo de prueba.
- d) Espesor de la capa de agar: este es un punto muy importante pues se sabe que a un mayor grosor de capa, la anchura de las zonas decrece y la sensibilidad del método disminuye.
- e) Volumen de la solución de prueba aplicada a la capa: esta deberá ser lo suficientemente grande para actuar como un reservorio de concentración constante o deberá ser un volumen estándar, para no tener diferencias en la difusión de la muestra.
- f) Tiempo de aplicación de la solución de prueba: si los estándares y los problemas se aplican a distintos tiempos la difusión de ambos será diferente y por lo tanto variará la respuesta.
- g) Temperatura de incubación: habrá que seleccionar la temperatura adecuada de crecimiento más uniforme, donde la relación dosis-respuesta sea la mejor.

2.5.1.1. Diseño 2 + 2, dosis.

La respuesta que presenta un microorganismo frente a un factor de crecimiento es casi inmediata, esta respuesta depende, no obstante, de la dosis administrada, además se ha encontrado que esta relación es usualmente caracterizada por una curva dosis-respuesta de tipo logarítmica, existiendo por lo tanto una relación casi directa entre la dosis y la respuesta.⁶⁴

Las potencias de muestras desconocidas pueden ser determinadas por medición de la respuesta a una dilución apropiada y --

y leída de una curva dosis-respuesta.⁵⁶

Mientras que es perfectamente legítimo comparar la respuesta de una muestra con la respuesta de una curva estándar determinada al mismo tiempo, es preferible usar un diseño alternativo de experimentación que proveerá: (1) mejores resultados por la misma cantidad de esfuerzo práctico, y (2) algunas indicaciones de la validez del ensayo.⁵⁶

Las características específicas de la relación rectilínea logaritmo dosis-respuesta son:⁵⁶

i. La línea de respuesta de cualquier otra sustancia cualitativamente idéntica deberá ser paralela a la del estándar, de donde la pendiente puede ser medida no solamente de la estándar sino también de la muestra.

ii. Es esencial tener por lo menos dos niveles de dosis para estimar la pendiente de la línea de respuesta. en contraste con la respuesta lineal aritmética, donde una observación y el origen son suficientes.

Knudsen y Randall (1945) describieron un diseño simétrico, balanceado y eficiente para el ensayo de penicilina. Este diseño emplea dos niveles de dosis tanto de la estándar como de la muestra, la proporción entre la dosis alta y baja es la misma para ambas preparaciones, este diseño se conoce como diseño 2+2; para este diseño cada una de las cajas de petri incluyen una de las cuatro dosis (tratamientos), y así la replicación es igual al número de cajas y es lo mismo para todos los tratamientos.⁵⁶

La figura 3 es la representación gráfica de la relación dosis-respuesta para dos preparaciones, estándar y muestra, las cuales tienen la misma potencia nominal, y por consiguiente su diferencia en potencia es revelada por la distancia vertical entre las líneas paralelas.⁵⁶

El significado de la respuesta (diámetro de zonas de ---

crecimiento) es calculado de la siguiente manera:

Sta = respuesta promedio de la dosis alta del estándar

Stb = respuesta promedio de la dosis baja del estándar

Pa = respuesta promedio de la dosis alta del problema

Pb = respuesta promedio de la dosis baja del problema

Asumiendo que las líneas son esencialmente paralelas -- pero que la respuesta está sujeta a errores del azar, entonces la mejor estimación de la diferencia en la respuesta debida a la diferencia entre la dosis alta y baja es obtenida como la medida de esa diferencia para el estándar y la muestra y se conoce por E.⁵⁶

$$E = \frac{1}{2} [(Sta-Stb) + (Pa-Pb)]$$

Similarmente la mejor estimación de la diferencia en la respuesta debida a la diferencia entre la muestra y el estándar es obtenida por la diferencia de los promedios de los dos niveles y se conoce como F.⁵⁶

$$F = \frac{1}{2} [(Pa-Sta) + (Pb-Stb)]$$

De la figura 3 se observa que la diferencia en el log-dosis correspondiente a E es I que es el logaritmo de la relación de dosis, y que correspondiente a F es M que es el logaritmo (base 10) de la relación de las potencias del problema y estándar. La grafica tambien muestra el símbolo b, el cual es la diferencia calculada en la respuesta (asumiendo que es una línea recta) que corresponde a un intervalo de dosis de proporción 10:1.⁵⁶

De todo esto se obtienen que los cocientes geométricos son: $F/M = E/I = b/\log 10 = b$
de donde :

$$M=f/b$$

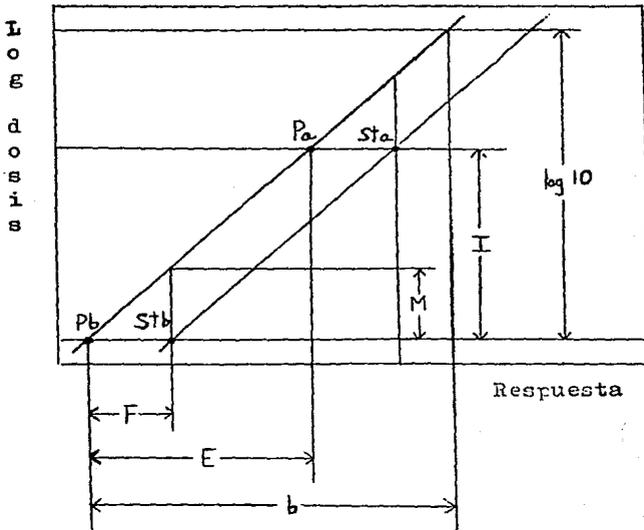


Fig. 3

En el caso donde la muestra y el estándar son de potencias semejantes, la correspondiente razón de potencias es obtenida simplemente por:⁵⁶

$$R = \text{antilog } M$$

con lo cual se puede obtener el porcentaje de activo en la muestra proble con:⁵⁶

$$X = \frac{100 \text{ RCD}}{Y}$$

donde

R = potencia

C = concentración de la dosis alta del estándar

D = factor de dilución

Y = concentración teórica del activo en la muestra

X = porcentaje del activo en la muestra

3. OBJETIVOS

- 3.1. Desarrollar un método microbiológico de análisis cuantitativo para la cianocobalamina en una solución inyectable de uso --- veterinario.
- 3.2. Validar el método microbiológico.
- 3.3. Estudiar las ventajas y desventajas del método microbiológico con respecto a un método de cromatografía de líquidos de alta resolución.

4. HIPOTESIS

Controlando las condiciones de las variables que afectan el método microbiológico de análisis cuantitativo para la cianocobalamina -- (vitamina B12) se busca que método desarrollado sea exacto y preciso.

5. MATERIAL

5.1. REACTIVOS.

Etanol R.A.	MERCK
Acido Sulfúrico R.A.	
Cloruro de Sodio	
Cloroformo R.A.	J.T. BAKER
Fosfato de potasio monobásico	J.T. BAKER
Fosfato de potasio dibásico anhidro	J.T. BAKER
Sulfato de amonio	
Sulfato de magnesio	
Citrato de sodio	
Metanol grado UVASOL	MERCK
Bacto Agar	DIFCO
Bacto Dextrosa	DIFCO
Medio cultivo Minimal Agar Davis	DIFCO
Medio de cultivo Agar Soya Trypticosa (TSA)	DIFCO

5.2. EQUIPO.

Espectrofotómetro	BECKMAN Mod. DU-8
Potenciómetro digital	BECKMAN Mod. 3500
Microgeringa (25 mcl)	HAMILTON
Columna μ -Bondapak C ₁₈ de 5 micras, 30 cm de longitud y 3.9 mm de diámetro	WATERS ASS.
Cromatógrafo de líquidos de alta resolución, equipado con detector de longitud de onda fija	WATERS ASS.

Integrador

HEWLETT PACKARD

Centrifuga de control de tiempo integrado

Mod. 3390A

INTERNATIONAL

EQUIPMENT Co.

Autoclave

Mod. 380

MAN-PLAY

Medidor de zonas

FISHER-LILLY

Incubadora Precisión

GCA. CORPORATION

Membranas tipo FG y HA de 0.45u

MILLIPORE

Campana de flujo laminar

Horno

Penicilindros

Colocador de penicilindros

CRAFT

Mechero Fisher

Pipetas Pasteur

6. METODOS

6.1. DETERMINACION CUANTITATIVA DE VITAMINA B12 POR EL-METODO MICROBIOLOGICO (DIFUSION EN AGAR).

6.1.1. Preparación de la solución reguladora de fosfatos 0.2 M pH 7.6.

Preparar una solución reguladora de fosfatos pH 7.6 con una concentración de 0.2 M, de acuerdo a la USP XX.

6.1.2. Preparación del estándar de referencia.

Pesar aproximadamente 40 mg de vitamina B12 (cianocobalamina) en un matraz volumétrico de 100 ml, llevar el volumen con agua deionizada estéril (Solución Stock). De esta solución pasar 1 ml y llevar al aforo de 100 ml; de la solución anterior tomar 5 ml y llevar a 50 ml con agua deionizada estéril (Solución A). De la solución A tomar 10 ml y llevar a 50 ml (Dosis alta del estándar, Sta). De la solución A tomar 5 ml y llevar a 50 ml (Dosis baja del estándar, Stb).

6.1.3. Preparación de la muestra problema.

Homogenizar la muestra y transferir 1 ml a un tubo de ensayo, adicionar 3 ml de solución reguladora de fosfatos pH 7.6 ± 0.1, agitar vigorosamente por 5 minutos, dejar reposar 5 minutos, filtrar y pasar 1 ml del filtrado y llevarlo a 10 ml con agua deionizada estéril (Solución B). De la solución B tomar 2 ml y llevar a 25 ml (Dosis alta del problema, Pa). De la solución B tomar 2 ml y llevar a 50 ml (Dosis baja del problema, Pb).

6.1.4. Preparación de la solución salina 0.9%.

Pesar 0.9 g de cloruro de sodio y llevarlo al aforo a - 100 ml con agua destilada y esterilizar.

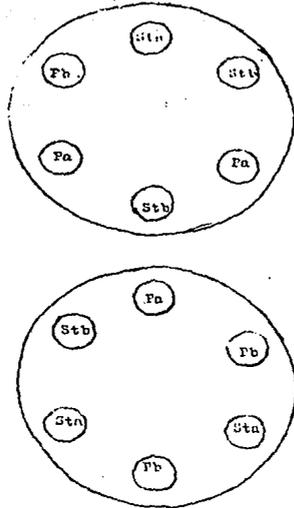
6.1.5. Preparación del microorganismo de prueba.

El microorganismo de prueba es Escherichia coli 113-3 - (ATCC 11105), este se mantiene a 5°C en tubos de medio inclinado - TSA, y se resiembra cada semana para mantenerlo activo. Para el -- ensayo se usa al microorganismo con un día previo de resiembra; -- adicionar alrededor de 10 ml de solución salina a tubo resembrado, separar al microorganismo del medio suspendiendolo en la solución-salina, coleccionar el sobrenadante, centrifugar 20 minutos a 2500 -- rpm, separar el sobrenadante, lavar la masa de células 3 veces con solución salina estéril, despues del último lavado adicionar 10 ml de solución salina, agitar y ajustar la suspensión a una trans---- mitancia del 10% a 530 nm.

6.1.6. Preparación de cajas.

En esta técnica se utiliza unicamente una capa de agar - que se inocular cuando se encuentra a 52°C, con 6 ml del micro----- organismo ajustado por cada 100 ml de medio. Utilizar 20 ml de --- medio inoculado por caja, dejar solidificar las cajas por 2 minutos aproximadamente.

Las cajas se marcan como se muestra en la figura 5, co-- locar 6 cilindros a cada una de las cajas a intervalos de 60° y en un radio de 2.8 cm. Aplicar los problemas y estándares con pipeta Pasteur como se muestra en la figura 5.



donde:

- Sta = Dosis alta del estándar (promedio de lecturas)
- Stb = Dosis baja del estándar (promedio de lecturas)
- Fa = Dosis alta del problema (promedio de lecturas)
- Fb = Dosis baja del problema (promedio de lecturas)

Fig. 5. Colocación de penicilinas

Cubrir las cajas con tapas de porcelana porosa o tapas - de vidrio con papel filtro e incubar a 37°C por 18 horas ----- aproximadamente, leer las cajas en un medidor de zonas, y se rea-- lizan los calculos de acuerdo a las siguientes formulas:

$$E = \frac{1}{2} [(Sta-Stb) + (Pa-Pb)]$$

$$F = \frac{1}{2} [(Pa- Sta) + (Pb-Stb)]$$

$$I = \text{Log} \frac{Sta}{Stb} = \text{Log} \frac{Pa}{Pb}$$

$$b = \frac{E}{I} \quad M = \frac{F}{b} \quad R = \text{antilog } M$$

$$\% \text{ cuantificado de vitamina B12} = \frac{R \times C \times D \times 100}{\text{mcg teóricos}}$$

donde:

E = estimación de la diferencia en la respuesta debida - a la diferencia entre las dosis

F = estimación de la diferencia en la respuesta debida - a la diferencia entre la muestra y el estándar

R = relación de potencias

I = relación de dosis

C = concentración de dosis alta del estándar
en mcg/ml

D = factor de dilución

6.2. DETERMINACION DE VITAMINA B12 POR CROMATOGRAFIA -
DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

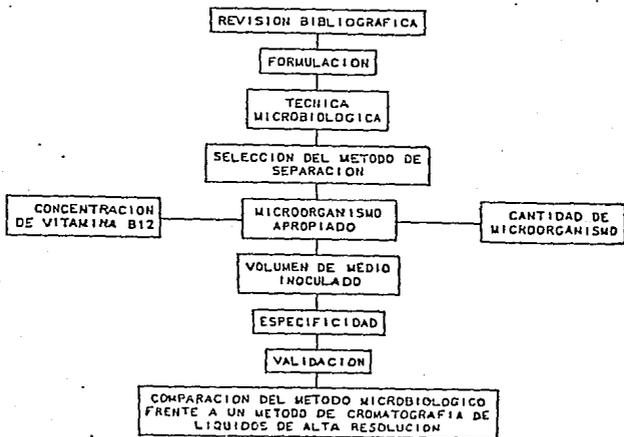
El método involucra la utilización de una cromatografía-
de fase reversa, para lo cual se utiliza un cromatógrafo de líqui-
dos con detector de longitud de onda fija.

Las condiciones son:

Fase móvil:	agua:Metanol (70:30)
Vel. Flujo:	0.7 ml/min
Detector:	546 nm
Atenuación:	2 ³ (8)
Vel. Carta:	0.25 cm/min
Columna:	μ -Bondapak C ₁₈ de 5 micras 30 mc de longitud y 3.9 mm de --- diámetro WATERS ASS.
Tiempo de retención:	<u>±</u> 9.8 minutos

7. DESARROLLO DEL METODO

Para el desarrollo general de la técnica microbiológica se seleccionó al microorganismo apropiado simultáneamente con las condiciones de análisis, los parámetros se optimizaron para el método, siguiendo el diagrama de flujo que se muestra en seguida:



7.1. DESARROLLO DE LAS TECNICAS MICROBIOLOGICAS.

Para la elección de la técnica microbiológica más adecuada de cuantificación de vitamina B12 se consideraron las técnicas que se tienen ya reportadas (ver sec. 2.4.) y se seleccionaron las más idóneas para llevarse a cabo en el laboratorio y poder así decidir por la más adecuada. Los métodos que se escogen son un método microbiológico turbidimétrico y otro de cilindro---

placa.

A) Análisis turbidimétrico.

Para realizar el método turbidimétrico, se toma como base la técnica descrita en la USP XXI en donde se utiliza al ----- Lactobacillus leichmannii ATCC 7830 como microorganismo indicador.

Para este método se utilizan tres tipos de medios, uno - para mantener al microorganismo de prueba, otro para preparar el - inóculo y el tercero para el ensayo mismo. El medio de mantenimiento conserva la viabilidad y la sensibilidad del organismo de prueba para el ensayo, en este caso se trata del medio Bacto-B12 Culture Agar USP (DIFCO 0541), este medio es preparado de acuerdo a - la fórmula especificada en el tercer suplemento de la USP XIV para el crecimiento de L. leichmannii ATCC 7830 usado en el ensayo de vitamina B12, este medio es también recomendado para el cultivo de otros Lactobacillus y otros microorganismos asidúricos. El medio de inóculo acondiciona al microorganismo para ser usado inmediatamente, para este propósito se utiliza el medio Bacto-B12 Inoculum-Broth USP (DIFCO 0542) el cual tiene las mismas características - que el anterior, con la diferencia de ser un medio líquido; finalmente el medio de ensayo permite la cuantificación de la vitamina, por lo que se usa el medio Bacto-B12 Assay Medium USP (DIFCO 0457), que se prepara de acuerdo a la fórmula dada en la USP XV para el - ensayo microbiológico de la vitamina B12, está libre de vitamina - B12 pero contiene todos los otros factores necesarios para el crecimiento de L. leichmannii ATCC 7830.

La adición de vitamina a este medio se realiza en incrementos específicos de concentración dando una respuesta del microorganismo equivalente a estos incrementos de cianocobalamina, esto se ve mejor explicado basándose en una curva dosis-respuesta, la -

variable independiente será el factor de crecimiento, que es la cianocobalamina y la respuesta medida es el crecimiento del microorganismo de prueba en el medio líquido que puede ser medido turbidimétricamente. Para el funcionamiento del ensayo turbidimétrico se utilizan series de tubos con el medio de ensayo y se adicionan cantidades graduales de la vitamina estándar y de la muestra junto con un blanco control, se inoculan con una cantidad medida de suspensión de microorganismo indicador, se incuban en baño de agua y la respuesta se lee espectrofotométricamente midiendo transmitancia.

Para la realización de este método se optimizaron las concentraciones necesarias de vitamina B12 para construir la curva de calibración empleada en la cuantificación de la cianocobalamina. También se determinó la cantidad mínima de puntos necesarios para la curva, la cantidad de inóculo y el tiempo de incubación; todas estas características se obtuvieron a partir de la materia prima, del placebo (formulación completa sin vitamina) y de la formulación completa con vitamina B12.

B) Análisis por difusión en agar.

Para el método de cilindro-placa se tomaron en cuenta las técnicas reportadas con anterioridad, seleccionándose la más adecuada a las necesidades que se presentan. Se utilizó como microorganismo indicador a la Escherichia coli 113-3.

En este ensayo de difusión en agar se utiliza el diseño 2+2, en el cual se emplean dos niveles de dosis tanto del estándar como de la muestra, teniendo que la proporción entre la dosis alta y baja es la misma para ambas preparaciones, para este diseño cada una de las cajas de petri incluyen una o dos de las cuatro dosis (ver sec. 2.5.1.1.).

El ensayo microbiológico en placa depende de la difusión del factor de crecimiento (que es la vitamina B12) requerido que se encuentre contenido en cilindros de acero inoxidable sobre el agar inoculado y la respuesta del microorganismo se determina por la medición del diámetro de la zona de crecimiento alrededor del contenedor de acero inoxidable, se aplican muestras del estándar para hacerse la confrontación. Para este método se optimiza la concentración del microorganismo en el agar inoculado, se optimiza la actividad del microorganismo, se optimizan las dosis alta y baja que se aplican tanto del estándar como del problema, todas estas características se obtienen a partir de la materia prima, del placebo y de la formulación completa como en el método anterior.

Para la optimización de las concentraciones tanto de la dosis alta y baja de los estándares así como la actividad del microorganismo se diseñó un experimento en el cual se prueban concentraciones de microorganismo y concentraciones de principio activo que han sido utilizados con anterioridad en otros métodos de cuantificación (Syntex, Desarrollo Microbiológico). Ahora bien, las respuestas presentan el diámetro de las zonas de crecimiento que se van obteniendo, observándose (tabla 1), que los mejores diámetros se encuentran usando una concentración de microorganismo de 6 ml de una solución al 10%T (530 nm) por cada 100 ml de medio y como dosis alta a 0.08 mcg/ml y dosis baja 0.04 mcg/ml; esta selección se realiza de acuerdo al tamaño de la zona de crecimiento, esto es que la obtención de zonas de crecimiento demasiado grandes se deforman y ocasionan resultados erróneos, así mismo cuando se obtienen zonas de crecimiento pequeñas se obtienen errores en la cuantificación del activo.

Con respecto a la actividad del microorganismo se diseñó un experimento semejante al anterior, en este se prueba la edad --

OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACION DE INOCULO

VITAMINA B12	MICROORGANISMO 102T a 530 nm		
	2ml/100 ml ⁽¹⁾	4ml/100ml ^(a)	6ml/100ml ^(*)
0.20 mcg/ml	27.0 mm	25.6 mm	23.6 mm
0.10 mcg/ml	26.9 mm	24.3 mm	22.0 mm
0.08 mcg/ml	23.1 mm	21.1 mm	19.6 mm
0.04 mcg/ml	21.8 mm	19.0 mm	17.6 mm

TABLA 1. Relación de la concentración del microorganismo y de la concentración de la vitamina B12. (1)-difusión -- elevada, halos poco uniformes; (a)=difusión media, halos poco definidos; (*)= difusión uniforme, halos definidos.

ACTIVIDAD DEL MICROORGANISMO

EDAD DE LA CEPA	TIPO DE CRECIMIENTO
10 DIAS	ZONAS DE CRECIMIENTO MUY POCO DEFINIDAS
5 DIAS	ZONAS DE CRECIMIENTO POCO DEFINIDAS
1 DIA	ZONAS DE CRECIMIENTO BIEN DEFINIDAS

TABLA 2. Actividad del microorganismo, Escherichia coli 113-3 (ATCC 11105)

del microorganismo, observandose (tabla 2), que el microorganismo con una edad de 1 día previo de resiembra es el que produce mejores resultados, y esto es explicable puesto que un microorganismo con una actividad adecuada responderá con una gran energía y se obtendrán resultados más confiables.

Para la elección de la técnica microbiológica se toman con consideración las ventajas y desventajas de cada uno de los métodos probados para poder elegir al más adecuado a las necesidades que plantea el trabajo. De esta manera, el método de difusión en agar presenta las siguientes características: un tiempo de análisis pequeño, únicamente un medio para el ensayo, el microorganismo tiene un nivel de respuesta bueno y además es poco delicado, es decir que no es necesario tener muchos cuidados con él, se preparan pocas diluciones y tienen un costo reducido, por lo cual se cumplen los objetivos buscados. El turbidimétrico, por el contrario, muestra problemas de respuesta del microorganismo, es decir, se necesitan mayores cuidados para obtenerse una respuesta adecuada, tiene un tiempo de análisis crítico, esto es debido a que una vez iniciado el análisis no se puede detener en ninguna etapa hasta obtener los resultados, es poco práctico para ser usado rutinariamente, utiliza tres medios de cultivo distintos que no pueden ser preparados en el laboratorio, por lo cual su costo se eleva. Por estas razones se selecciona al método de difusión en agar como el método adecuado a nuestras necesidades.

7.2. CONFRONTACION DE LA INFLUENCIA DE LOS EXCIPIENTES- EN LOS METODOS DE ANALISIS.

en la tabla 3 se muestran algunos resultados de cuantificaciones de vitamina B12 realizados por los dos métodos en la materia prima, la formulación y el placebo de vitamina B12, en ellos-

se observa que en la formulación existe la influencia de esta, es decir que existen excipientes interferentes a la cuantificación de la vitamina por este método microbiológico, esta interferencia es aditiva, es decir aumenta la difusión de la vitamina en el medio, dando zonas de crecimiento de mayor tamaño aparente pues se observa una zona, dentro de la zona de crecimiento, que se encuentra ausente de crecimiento celular.

una vez seleccionada la técnica microbiológica de cuantificación de vitamina B12 se procede a desarrollar un método para eliminar esos excipientes interferentes que impiden la cuantifica-

COMPARACION DE METODOS

ANALISIS	TURBIDIMETRICO			DIFUSION EN AGAR		
	MP	F	P	MP	F	P
1	100.32	64.42	----	99.97	124.67	----
2	99.32	62.32	----	99.01	123.34	----
3	100.73	54.33	----	100.87	132.98	----
4	101.65	64.92	----	101.36	129.59	----
5	102.45	69.12	----	102.38	121.87	----
6	102.12	61.22	----	100.09	121.93	----
7	100.03	69.12	----	100.22	122.69	----
8	100.15	78.22	----	100.22	122.69	----
9	98.49	63.42	----	98.41	128.98	----
10	99.48	60.92	----	99.51	128.98	----

MP = MATERIA PRIMA F = FORMULACION COMPLETA P = PLACEBO

TABLA 3. Comparación de métodos. M=materia prima, F=formulación completa, P=placebo de vit. B12. Porcentaje recobrado de vitamina referido a un 100%.

ción confiable de la vitamina B12, para esto hay que tener en consideración que la forma farmacéutica de interés es una formulación inyectable de uso veterinario constituida por vitamina B12 (cianocobalamina) y excipientes. La vitamina B12 es un principio activo que tiene la característica de que no necesita grandes cantidades para llevar a cabo su efecto cuando se administra por vía parenteral, por esta razón se encuentra en una muy baja cantidad en el inyectable, los excipientes, por el contrario, se encuentran en cantidades comparativamente mayores; esto ocasiona ciertos problemas para la cuantificación de la vitamina B12, pues mientras esta es una sustancia que promueve el crecimiento, algunos de los excipientes tienen la capacidad de inhibir el crecimiento del organismo de prueba del método microbiológico de cuantificación, además de que aumentan la difusión de la vitamina del medio, lo que ocasiona un aumento en el tamaño de las zonas de crecimiento, razón por la cual es esencial eliminar dichas interferencias.

7.3. DESARROLLO DEL METODO DE SEPARACION.

Para este propósito se sabe que los constituyentes tienen semejanzas muy marcadas en sus solubilidades, y que los excipientes se separan en forma sólida cuando se encuentran en solución a pH's extremos. Por esta razón se presentan dos opciones alternativas para resolver este problema y que son: 1) separación por extracción o precipitación con disolventes y 2) separación por precipitación a diferentes pH's.

Para llevar a cabo la primera opción se tiene que las propiedades importantes que presentan los excipientes interferentes para su separación son: solubilidades semejantes a la vitamina B12 (tabla 4).

Existe un método de Cromatografía de Líquidos de Alta -- Resolución (CLAR) que se utilizó como un auxiliar para el segui--- miento del proceso de separación de los excipientes interferentes-- en la determinación microbiológica de la vitamina B12 y ha servido además para ayudar en la selección del mejor proceso de sepa----- ración; este método de CLAR fue desarrollado con anterioridad --- para esta formulación y se tienen que es un método en el cual la - influencia de otros constituyentes se ve nulificada por la buena - separación que hace de la vitamina B12.

SUSTANCIA	AGUA	ETANOL	CLOROF	ETER	ACETONA
vit. B12	1-80	1-180	insol.	insol.	insol.
EI (1)	1.14	Lig.	muy lig.	muy lig.	insol
EI (2)	1-1	1-1.3	1-1	1-43	insol

TABLA 4. Solubilidades comparativas de los constitu- yentes de la formulación, insol=insoluble, lig=ligeramente soluble, muy lig= muy ligeramente soluble, las- solubilidades están marcadas en gramos por mililitro. EI=excipiente interferente.

Los resultados que se presentan más adelante muestran las eficiencias comparativas de cada uno de los metodos probados, estas evaluaciones se realizarón en base a una cuntificación en CLAR. En- el primer experimento se evalúa el efecto de diferentes disolven-- tes sobre la solubilidad de los excipientes interferentes, la elec- ción de estos agentes de separación se realiza de acuerdo a los -- datos de solubilidad, se utilizan volúmenes diferentes de estos -- disolventes y los resultados muestran si existe o no separación, -

sin tomar en cuenta que esta separación se lleve a cabo por extracción o precipitación (tabla 5), en este experimento no se considera la cantidad de vitamina que sea arrastrada pues es un experimento de sondeo para decidir cual será el separador más idoneo, que - como se observa en la siguiente tabla es la precipitación con la acetona.

SOLVENTE	VOLUMEN (ml)						
	1	2	3	10	15	20	25
ACETATO DE ETILO	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ETER	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ACETONA	NS	NS	NS	SS	SS	SS	SS
CLOROFORMO	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

TABLA 5. Separación por solventes, NS=no se separa, SS=se separa.

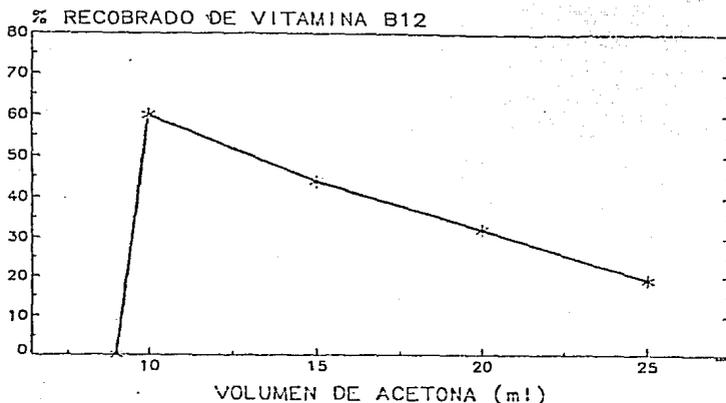
. EFECTO DE ACETONA EN LA SEPARACION DE LA VIT. B12

SUBSTANCIA	VOLUMEN (ml)						
	1	2	3	10	15	20	25
EXCIPIENTE INTERFERENTE (1)	NS	NS	NS	SS	SS	SS	SS
EXCIPIENTE INTERFERENTE (2)	NS	NS	NS	SS	SS	SS	SS
VITAMINA B12	NS	NS	NS	60%	44%	32%	19%

NS = NO HAY SEPARACION

TABLA 6. Se muestra el porcentaje remanente de vitamina por extracción.

EFFECTO DEL VOLUMEN DE ACETONA EN LA SEPARACION



GRAFICA 1. Efecto del volumen de acetona en la separación

Posteriormente se decide optimizar la cantidad de acetona mínima para una buena separación, para esto se observó el efecto de la separación a distintos volúmenes del disolvente sobre los excipientes interferentes y la vitamina B12 (tabla 6).

Puesto que 10 ml es la cantidad mínima de acetona para llevarse a cabo la separación de los excipientes y, como se muestra en la tabla 6 y la gráfica 1, se observa un arraste de la vitamina en el proceso de separación, este no es adecuado por lo que se tiene que buscar la resolución del problema con la segunda opción.

Ahora bien, en base a que en un rango de pH existe una precipitación de los excipientes interferentes en solución (entre-

pH 7 y 9.5, se separan en forma solida), entonces se decidió aprobar esta característica buscando un pH en el cual existiera una máxima eliminación de las interferencias que dificultan la cuantificación de la vitamina. Para este propósito se probaron diferentes soluciones reguladoras que permitieran obtener estos rangos -- de pH y separación de los excipientes. De las soluciones amortiguadoras usadas se seleccionaron 3, por ser en las que se muestran separaciones y como se observa en la tabla 7, con la que se obtuvo -- mejor separación es con la solución de fosfatos pH 9 que está dentro del rango mencionado con anterioridad.

SUBSTANCIA	SOL. REGULADORA pH 6 FOSFATOS 0.2M	SOL. REGULADORA pH 9 FOSFATOS 0.2M	SOL. REGULADORA pH 8 CITRATOS 0.5M
EI (1)	NS	SS	NS
EI (2)	SS	SS	SS
vit. B12	NS	60%	NS

TABLA 7. Separación por pH, EI= excipiente interferente, NS=no se separa, SS=se separa, %= porcentaje remanente - de vitamina por extracción.

Posteriormente se probaron diferentes pH's con solución reguladora de fosfatos 0.2 M dentro del mismo rango (tabla 8), donde se aprecia que a pH 7 y 7.5 se obtiene un buen porcentaje de vitamina recuperada.

Se probó un rango más pequeño de pH (tabla 9) en donde se observa que a pequeñas variaciones de pH (7.4.7.7.) no se presentarán cambios significativos en la concentración de cianocobalamina recuperada.

Esto nos hace ver la importancia que tiene obtener pará-

EFFECTO DEL pH EN LA SEPARACION DE VIT. B12

SUBSTANCIA	pH					
	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5
EXCIPIENTE INTERFERENTE (1)	SS	SS	SS	SS	SS	SS
EXCIPIENTE INTERFERENTE (2)	SS	SS	SS	SS	SS	SS
VITAMINA B12	103%	98%	89%	76%	64%	60%
VITAMINA B12-MATERIA PRIMA	101%	99%	90%	78%	68%	63%

* SOLUCION REGULADORA DE FOSFATOS 0.2 M

TABLA 8. Efecto del pH en la separación de vit. B12

metros precisos en el desarrollo de una técnica, el rango de pH - óptimo de separación es de 7.4 a 7.7, el cual es un pH muy adecuado, que no influye en la respuesta del microorganismo de prueba -- del método de cuantificación. El efecto del pH se observa en la -- gráfica 2.

EFFECTO DEL pH EN LA SEPARACION DE VIT. B12

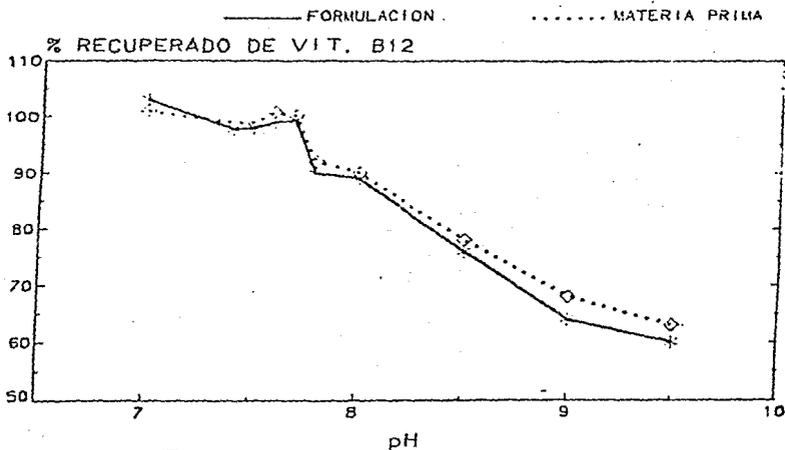
SUBSTANCIA	pH				
	7.4	7.5	7.6	7.7	7.8
EXCIPIENTE INTERFERENTE (1)	SS	SS	SS	SS	SS
EXCIPIENTE INTERFERENTE (2)	SS	SS	SS	SS	SS
VITAMINA B12	97.8%	98%	99%	99.4%	90%
VITAMINA B12-MATERIA PRIMA	98.9%	99%	100.8%	100.2%	92%

* SOLUCION REGULADORA DE FOSFATOS 0.2 M

TABLA 9. Efecto del pH en la separación de vit. B12

Una vez seleccionado el agente separador (Solución reguladora de fosfatos 0.2 M pH 7.6), se estudió el efecto del volumen de este y como se muestra en la tabla 10, el mejor volumen de agentes separador es de 2 ml pues se separa una cantidad adecuada de -

EFFECTO DEL pH EN LA SEPARACION



GRAFICA 2. Efecto de pH en la separación de vit. B12

Los excipientes interferentes y no se enmascara la respuesta de la vitamina por el exceso de sales en la solución de la vitamina separada.

Como ultimo paso se estudió el proceso técnico de separación estudiando el tiempo de agitación y el tiempo de reposo con--

EFFECTO DEL VOLUMEN DEL AGENTE SEPARADOR

SUBSTANCIA	VOLUMEN (ml)		
	1	2	3
EXCIPIENTE SEPARADOR (1)	TRAZAS	----	----
EXCIPIENTE SEPARADOR (2)	TRAZAS	TRAZAS	TRAZAS
VITAMINA B12	106.4%	99.08%	101.13%

RESOLUCION REGULADORA DE FOSFATOS 0.2 M pH 7.6

TABLA 10. Efecto del volumen del agente separador.

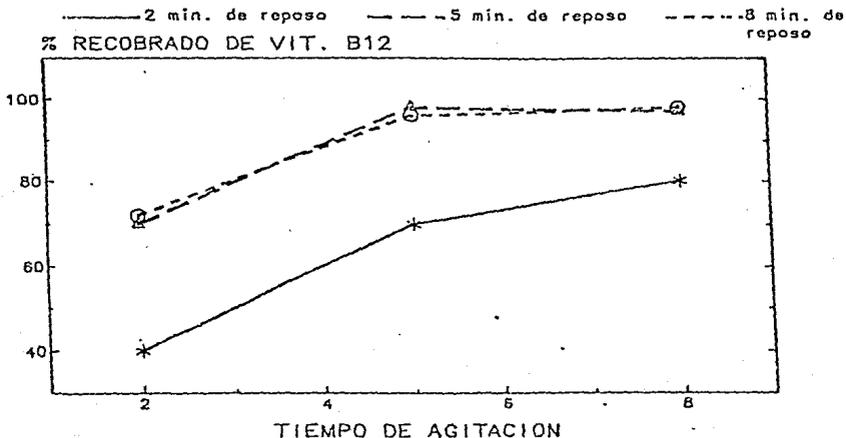
tra la cantidad de EI(1), que es el más difícil de separar, esto es para obtener una técnica repetible con parámetros precisos como se muestra en la tabla 11:

OPTIMIZACION DEL PROCESO DE SEPARACION

TIEMPO DE AGITACION (MINUTOS)	TIEMPO DE REPOSO (MINUTOS)		
	2	5	8
2	40 %	70 %	72 %
5	70 %	98 %	96 %
8	80 %	97 %	98 %

TABLA 11. Optimización del proceso de separación. Se presentan %'s de separación de EI(1).

OPTIMIZACION DEL PROCESO TECNICO DE SEPARACION



GRAFICA 3. Optimización del proceso técnico de separación.

Todos los resultados que se presentan se obtienen a partir de un promedio de 10 datos, mostrando la variabilidad inherente a un método que no ha sido optimizado.

El comportamiento gráfico de los tiempos de separación frente a la concentración de vitamina cuantificada a diferentes tiempos de reposo se aprecian mejor en la grafica 3.

Los resultados muestran que los tiempos (5 minutos de agitación y 5 minutos de reposo) son adecuados con lo que se obtie

ne una buena separación de excipientes.

Los resultados anteriores muestran que la mejor técnica de separación es la precipitación con solución reguladora de fosfatos 0.2 M pH 7.4-7.7 pues como se observa se eliminan la mayor parte de los excipientes interferentes sin que se vea afectada la cantidad de vitamina B12 presente en la muestra, además es una técnica rápida, sencilla y barata pues no utiliza muchos reactivos.

7.4. OPTIMIZACION DEL METODO DE ANALISIS.

Finalmente se probó al método completo de cuantificación

COMPARACION DE METODOS

ANALISIS	RESULTADOS % RECGERADO	
	MICROBIOLOGICO	CLAR
1	99.36	99.03
2	100.29	99.93
3	100.77	100.84
4	100.83	100.04
5	102.92	102.62
6	102.11	102.26
7	97.02	97.33
8	98.50	98.40
9	95.37	95.11
10	97.57	97.71

TABLA 12. Comparación de métodos (ensayo microbiológico y CLAR).

de la vitamina B12, es decir, primero se separan los excipientes - interferentes de la formulación y posteriormente se lleva a cabo - el análisis microbiológico (difusión en agar) de la vitamina. Al - mismo tiempo se llevan a cabo algunas comparaciones de este método con el de CLAR (Tabla 12).

7.5. EVALUACION DE LA ESPECIFICIDAD.

Como otra fuente de variación entre ambos métodos (CLAR- y microbiológico) se prueba la especificidad del método microbiológico; este tipo de prueba define el grado en que los resultados inferidos del método se deben solo a la sustancia que se desea determinar y no otras sustancias que pudieran estar presentes en el material que se analiza.⁶³ En la práctica se demuestra la especifidad al nalizar:

- a) La formulación completa, es decir con los excipientes y el principio activo en cantidades conocidas.
- b) La formulación placebo de la vitamina B12.
- c) La vitamina B12 como materia prima.

Todas estas formulaciones y materia prima se someten a - las mismas condiciones de degradación acelerada, como son luz so- lar, luz ultravioleta y temperatura, con un tiempo de exposición - de 2 semanas para cada una de las condiciones de degradación.

El metodo microbiológico resulta ser poco específico --- (ver sec. 9.1.5.), esto se debe a que los productos de degradación de la cianocobalamina tienen actividad en el crecimiento del microorganismo. Ahora bien, se debe señalar que los objetivos iniciales del trabajo son de cuantificación de la vitamina B12 para evaluar- la por un método rápido, sencillo y seguro.

7.6. PRECAUCIONES DEL METODO DE ANALISIS.

Finalmente, con respecto al material de vidrio que se utiliza al realizar este método microbiológico se debe tener el cuidado de eliminar las sustancias interferentes que pudieran influir en la determinación de la vitamina B12 como serían: residuos orgánicos detergentes y metales que pudiera complejarse con el cobalto de la cianocobalamina, la importancia del lavado del material de vidrio en el ensayo de la vitamina es recalcado por la USP. Se recomienda que este material en su totalidad sea lavado con agua deionizada por lo menos 12 veces y posteriormente 10 lavados como mínimo con agua deionizada estéril, con esto se remueven las sustancias interferentes y se obtienen resultados satisfactorios.

7.7. VALIDACION DEL METODO DE ANALISIS.

Cuando se desarrollan nuevos métodos analíticos, es necesario conocer la confiabilidad de los resultados obtenidos, para lo cual es indispensable validar dichos métodos determinando su exactitud, linealidad, precisión, especificidad y sencibilidad.

7.7.1. Parámetros.

A) Exactitud.

Se entiende por exactitud a la concordancia existente entre un valor determinado experimentalmente y su valor real.^{48,63}

Para la determinación de este parametro se realizan análisis de recobros de vitamina B12, es decir de formulaciones placebo adicionadas con cantidades conocidas del principio activo como-

son 50%, 60%, 80%, 100% y 120% de la cantidad normalmente estipulada en el marbete, a estos datos se les hace la prueba de t-student para comparación de medias.

B) Lineabilidad.

Este parámetro mide el grado en que la respuesta del método se aproxima a una función lineal del tipo $y = a + bx$ (donde $a=0$ y $b=1$) al trabajar a diferentes concentraciones. Esto significa que se obtiene una línea alrededor de la cual se agrupan los puntos del diagrama de dispersión de las variables sometidas a estudio, se grafican los mcg agregados contra los mcg encontrados y se realiza una prueba de t-student tanto para el intercepto como para la pendiente, obteniéndose también el grado de asociación entre las dos variables (coeficiente de correlación "r"), además, se realiza el análisis de varianza para la carencia de ajuste, esto es para determinar si el modelo de regresión lineal es adecuado para el tratamiento de datos.^{48,49,63}

C) Precisión.

Se refiere a una medida de la concordancia de un conjunto de valores experimentales respecto a un valor central.^{48,63}

i. Repetibilidad.

Para este caso se hace la estimación de la desviación estándar de los datos experimentales. Mediante una prueba de ji-cuadrado se evalúa la significancia de la variabilidad.

ii. Reproducibilidad.

En este diseño se contemplan diferentes analistas y diferentes días y para conocer su variabilidad se utiliza el Análisis de Varianza para dos factores aleatorios; este diseño consiste

en desglosar las diversas fuentes que contribuyen a la variabilidad el fenómeno, probando la significación de cada fuente contra el error experimental y valorando así su importancia relativa, cuyo criterio de prueba es el cociente del estadígrafo de prueba F de dos varianzas. 48,49,63

7.7.2. Comparación de métodos de análisis.

Para comparar ambos métodos (microbiológicos y de CLAR) se realizan los análisis estadísticos siguientes:

- i. Para la repetibilidad, la prueba de F
- ii. Para la reproducibilidad, la prueba de F
- iii. Para la exactitud, la prueba de t-student
- iv. Para la linealidad, la prueba de t-student.

8. RESULTADOS

8.1. RESULTADOS DE LA VALIDACION DEL METODO MICROBIOLOGICO.

METODO MICROBIOLOGICO PARA VIT. B12

VALIDACION

mcg ASREGADOS	mcg ENCONTRADOS	% DE RECOBRO
20.000	19.530	97.65
20.000	20.630	103.15
20.000	20.510	102.55
20.000	20.346	101.73
20.000	20.600	103.00
24.000	24.526	102.19
24.000	23.501	97.92
24.000	22.630	94.29
24.000	23.935	99.73
24.000	25.550	106.46
32.000	32.346	101.08
32.000	31.606	98.77
32.000	32.550	101.72
32.000	32.371	101.16
32.000	31.830	99.47
40.000	39.884	99.71
40.000	38.952	97.38
40.000	39.776	99.44
40.000	39.876	99.69
40.000	42.136	105.34
48.000	48.835	101.74
48.000	48.830	101.73
48.000	48.878	101.83
48.000	47.755	99.49
48.000	47.750	99.48

$$\bar{X} = 100.66$$

$$s = 2.57$$

$$s^2 = 6.37$$

$$n = 25$$

8.1.1. Exactitud.

$$t_{\text{cal}} = 1.29$$

$$t_{0.975} = 2.06$$

siendo $-2.06 < 1.29 < 2.06$, la técnica es exacta hasta una $p < 0.2$.

8.1.2. Linealidad.

a. Ordenada al origen.

$$t_{\text{cal}} = 0.08$$

$$t_{0.975} = 2.06$$

siendo $-2.06 < 0.08 < 2.06$, la ordenada al origen se -- acepta hasta una $p < 0.2$.

$$\text{I.C.: } -1.03 < A_0 < 1.11$$

b. Pendiente.

$$t_{\text{cal}} = 0.33$$

$$t_{0.975} = 2.06$$

siendo $-2.06 < 0.33 < 2.06$, se acepta la pendiente --- hasta una $p < 0.4$.

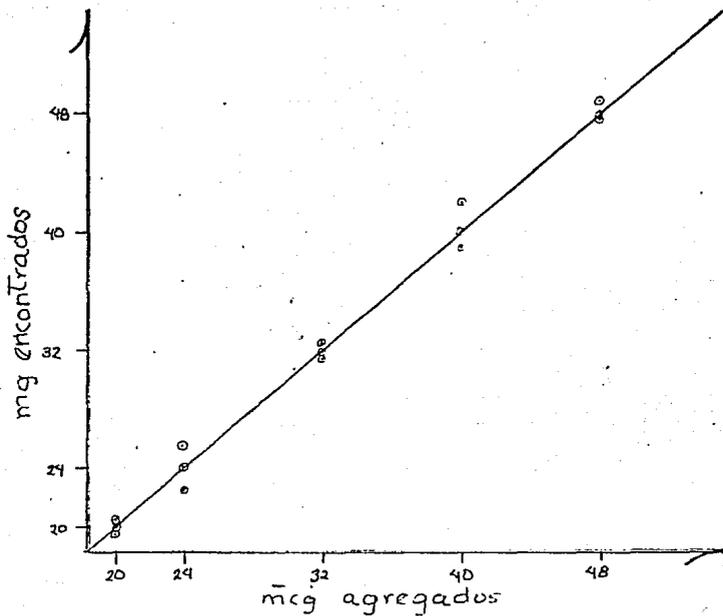
$$\text{I.C.: } 0.97 < B_0 < 1.04$$

c. Ecuación de la recta ajustada.

$$Y = 0.041 + 1.005 X$$

los mcg se ajustan con la ecuación de regresión lineal.

GRAFICA DE LA LINEALIDAD DEL METODO



Ecuación de la recta: $Y = 0.041 + 1.005 X$

Coefficiente de determinación: $r^2 = 0.994$

Error típico de estimación modificada: $S_{y/x} = 0.774$

d. Regresión lineal.

Como se observa la carencia de ajuste no es significativa, por lo que el modelo planteado es adecuado para analizar los datos.

CARENCIA DE AJUSTE VS. ERROR PURO ANOVA

LACK OF FIT VS. PURE ERROR ANOVA

SOURCE	DOF	SS	MS	F ratio
REGRESSION	1	2.65E+03	2.65E+03	4417.6
RESIDUAL	23	1.38E+01	6.00E-01	
LACK OF FIT	3	4.22E-01	1.41E-01	0.2103
PURE ERROR	20	1.34E+01	6.70E-01	
TOTAL	24			

IF(N,N,0.05) = 3.10

8.1.3. Precisión (Repetibilidad).

$$X_{cal}^2 = 16.99$$

$$X_{0.95}^2 = 36.41$$

siendo $16.99 < 36.41$, la técnica es repetible hasta una $p < 0.2$.

$$I.C.: 1.97 < \sigma < 3.51$$

8.1.4. Reproducibilidad.

REPRODUCIBILIDAD DEL METODO DE VIT. B12

	ANALISTA 1	ANALISTA 2
DIA 1	99.69	99.84
	98.45	100.30
	100.04	97.08
DIA 2	97.08	99.17
	101.48	102.09
	99.44	101.26

TABLA DE ANADEVA (DOS FACTORES ALEATORIOS)

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F C.
A	1	1.0528	1.0528	0.42069
D	1	2.1817	2.1817	0.87180
A-D	1	2.5025	2.5025	0.78060
E	8	25.6472	3.2059	

A : ANALISTA
D : DIA
E : ERROR

Como se observa no hay algún efecto por el anlista, el día o su interacción.

8.1.5. Especificidad.

Se sometieron muestras de formulación completa, materia prima y placebo a condiciones severas de degradación. Las condiciones, tiempo de exposición y resultados se muestran a continuación:

MUESTRA	CONDICIONES DE DEGRADACION	TIEMPO DE EXPOSICION	RESULTADOS % MICRO	% CLAR
FORMULACION COMPLETA	T.A.	2 semanas	100.72	101.27
	LUZ SOLAR	2 semanas	76.71	51.48
	LUZ UV	2 semanas	108.66	93.83
	80°C	2 semanas	32.29	-----
MATERIA PRIMA	T.A.	2 semanas	99.81	102.10
	LUZ SOLAR	2 semanas	86.45	88.11
	LUZ UV	2 semanas	46.73	39.27

Todos los resultados están referidos a un 100% de vitamina B12 presente en la formulación completa y en la materia prima, los resultados del placebo de vitamina B12 no se presentan --- pues la respuesta es nula a la presencia de la vitamina B12.

8.2. COMPARACION DE METODOS DE CUANTIFICACION.

8.2.1. Exactitud.

TABLA DE COMPARACION

VARIABLES	METODO DE ENSAYO MICROBIOLÓGICO	METODO DE CLAR
n	25	30
\bar{X}	100.66	100.33
s	2.57	1.20
s ²	6.37	1.40
t _{cal}	1.29	1.52
t _{0.95}	2.06	2.06
L.C.	99.60-101.73	99.88-100.78

$$t_{cal} = 0.60$$

$$t_{0.975,35} = 2.03$$

siendo $-2.03 < 0.60 < 2.03$, no hay diferencia significativa en la exactitud de ambos métodos a una $p < 0.3$

$$I.C.: -0.59 < \mu_1 - \mu_2 < 1.25$$

8.2.1. Reproducibilidad.

TABLA DE COMPARACION

VARIABLES	METODO DE ENSAYO MICROBIOLÓGICO	METODO DE CLAR
n	12	12
CUADRADO MEDIO DEL ERROR (CM _E)	3.21	3.69

$F_{0.975,8,8} = 4.43$; $F_{0.025,8,8} = 0.22$; $F_{cal} = 0.86$

siendo $0.22 < 0.86 < 4.43$, ambos métodos tienen la misma reproducibilidad, a una $p < 0.25$

I.C.: L.S. = 3.84

L.I. = 0.19

8.2.3. Repetibilidad.

TABLA DE COMPARACION

VARIABLES	METODO DE ENSAYO MICROBIOLOGICO	METODO DE CLAR
n	25	30
\bar{X}	100.66	100.33
s	2.57	1.20
s^2	6.37	1.40
χ^2_{cal}	16.99	10.17
$\chi^2_{0.95}$	36.41	36.41
L.C.	1.97-3.51	1.0166-1.81

$F_{0.975,24,29} = 2.15$; $F_{0.025,24,29} = 0.46$; $F_{cal} = 4.54$

siendo $0.46 < 4.54 > 2.15$, los métodos no tienen la misma repetibilidad.

8.2.4. Linealidad.

TABLA DE COMPARACION

VARIABLES	METODO DE ENSAYO MICROBIOLOGICO	METODO DE CLAR
n	25	30
Ordenada al origen (A)	0.04	0.015
Pendiente (B)	1.005	1.002
$S_{y/x}$	0.774	0.424
r	0.997	0.999

$$t_{cal} = 0.09$$

$$t_{0.975, 50} = 2.01$$

siendo $0.09 < 2.01$, no hay diferencia significativa —
entre las rectas de regresión hasta una $p < 0.4$.

9. CONCLUSIONES

- 1). La mejor técnica de separación de los excipientes interferentes resulta ser la separación por precipitación con solución reguladora de fosfatos 0.2 M pH 7.6, porque elimina la interferencia existe en la formulación sin afectar la concentración de la vitamina B12 y es además una técnica barata, sencilla y rápida.
- 2). Para probar la eficiencia del método microbiológico completo, es decir junto con el método de separación, se le determinó la exactitud, precisión y linealidad; los resultados muestran que es un método que tiene una adecuada reproducibilidad porque no existe efecto del analista, del día y de la interacción con una significancia menor a 0.25, es repetible a una $p < 0.2$, es un método exacto a una $p < 0.2$ y con una linealidad con significancia de la ordenada a una $p < 0.2$ y de la pendiente a una $p < 0.4$, es decir, que es un método con todas las características para ser usado en forma rutinaria con la confianza de obtener resultados verídicos sin una variabilidad muy pronunciada, además es un método sencillo y de fácil manejo que no ofrece mayores problemas al llevarse a cabo en el laboratorio por cualquier analista debidamente entrenado; es también un método muy barato puesto que no utiliza reactivos caros y estos se utilizan en pequeñas cantidades, tiene la ventaja de que si no se tiene acceso al medio de cultivo para el método (Agar Mínimo de Davis) este puede ser preparado en el laboratorio.
- 3). Se encuentra que el método microbiológico resulta ser poco específico, por lo cual se utilizará solamente en la cuanti-

ficación de la potencia de la vitamina en la muestra de ---
inyectable que se analice; esta baja especificidad se debe-
a que algunos productos de degradación de la cianocobalami-
na tienen actividad en el crecimiento, lo cual afecta a su-
cuantificación por microbiología.

- 4). Al compararse ambos métodos (microbiológico y de CLAR) se --
observa que no hay una diferencia significativa en exactitud
a una $p < 0.3$ y en linealidad a una $p < 0.4$, no así en la --
precisión, donde los dos métodos son igualmente reproducibles
a una $p < 0.25$ pero no son igualmente repetibles, y esto es -
natural pues en el método microbiológico se lleva a cabo un-
método adicional de separación que no utiliza el de CLAR, --
además de que se trabaja con microorganismos que están ex---
puestos a variaciones.

- 5). Se concluye que puede utilizarse cualquiera de los dos méto-
dos (con alta confiabilidad), para determinar vitamina B12 -
en la formulación presente de acuerdo a las necesidades que-
tenga el laboratorio.

- 6). De acuerdo con lo anterior se determina que los objetivos --
planteados se ha cumplido.

A N E X O

A. EXACTITUD.

Estadígrafo de contraste: $t_{\text{cal}} = \frac{\bar{X} - \mu_0}{s/\sqrt{n}}$

Intervalo de confianza para μ al 95%:

$$\bar{X} \pm t_{1-\alpha/2} \cdot s/\sqrt{n}$$

B. LINEALIDAD.

$$a = \frac{(\sum Y)(\sum X^2) - (\sum X)(\sum XY)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2} = \text{ordenada al origen}$$

$$b = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2} = \text{pendiente}$$

Cálculo de error típico de estimación modificada:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{n(\sum Y^2) - a(\sum Y) - b(\sum XY)}{n^2 - 2n}}$$

Estadígrafo de contraste:

a) ordenada al origen $t_{\text{cal}} = \frac{a - a_0}{S_{y/x} \sqrt{\frac{X^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}}}$

b) pendiente $t_{\text{cal}} = \frac{(b - b_0) s_x \sqrt{n-1}}{S_{y/x}}$

Coefficiente de correlación

$$r = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{[n(\sum X^2) - (\sum X)^2][n(\sum Y^2) - (\sum Y)^2]}$$

C. PRECISION.

a. Repetibilidad

Estadígrafo de contraste: $\chi_{\text{cal}}^2 = \frac{(n-1) s^2}{\sigma^2}$

Intervalo de confianza:

$$\sqrt{\frac{(n-1) s^2}{\chi_{1-\alpha/2}^2}} < \sigma < \sqrt{\frac{(n-1) s^2}{\chi_{\alpha/2}^2}}$$

b. Reproducibilidad

Modelo lineal estadístico.

$$y_{ijk} = \mu + A_i + D_j + AD_{ij} + \epsilon_{k(ij)}$$

$$i = 1-a$$

$$j = 1-b$$

$$k = 1-n$$

donde:

y_{ijk} observación del i -ésimo analista del j -ésimo día de la k -ésima repetición.

μ media general.

A_i analista i -ésimo.

D_j día j -ésimo.

AD_{ij} dependencia analista-día del i -ésimo nivel y j -ésimo -- nivel respectivamente.

$\epsilon_{k(i,j)}$ error experimental

Para la interpretación estadística se realizó un análisis de varianza para el modelo arriba mencionado.

TABLA DE ANADEVIA

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F _{cal.}
Analista	$\Sigma\Sigma(\bar{Y}_{i.}-\bar{Y})^2_*$	a-1 (a)	e = */a	e/h
Día	$\Sigma\Sigma(\bar{Y}_{.j}-\bar{Y})^2_a$	b-1 (b)	f = a/b	f/h
Analista-Día	$\Sigma\Sigma(\bar{Y}_{ij}-\bar{Y}_{i.}-\bar{Y}_{.j}+\bar{Y})^2_\zeta$	(a-1)(b-1) (c)	g = ζ/c	g/h
Error	$\Sigma\Sigma(Y_{ij}-\bar{Y}_{ij})^2_e$	ab(r-1)(d)	h = e/d	

D. CARENCIA DE AJUSTE.

Modelo lineal estadístico.

$$y_{ij} = B_0 + B_1 X_i + \epsilon_{ij}(i)$$

$$i = 1 \dots t$$

$$j = 1 \dots n$$

donde

B_0 ordenada al origen

B_1 pendiente

y_{ij} observación (mcg. recobrados) del i -ésimo tratamiento -- (mcg. adicionados) de la j -ésima repetición.

X_i i -ésimo tratamiento (mcg. adicionados).

$\epsilon_{j(i)}$ error experimental de la j -ésima repetición dentro -- del i -ésimo tratamiento.

Para la interpretación estadística se realizó un analisis de varianza para el modelo arriba mencionado.

TABLA DE ANADEVVA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F_{cal}
Regresión	1(a)	$\Sigma \Sigma (\bar{Y}_i - \bar{Y})^2$	$e = a/a$	e/f
Residual	n-2(b)	$\Sigma \Sigma (Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2$	$f = a/b$	
Carencia de ajuste	t-2(c)	$\Sigma \Sigma (\bar{Y}_i - \bar{Y}_i)^2$	$g = c/c$	g/h
error puro	n-t(d)	$\Sigma \Sigma (Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2$	$h = c/d$	
total	n-2	$\Sigma \Sigma (Y_{ij} - \bar{Y})^2$		

Los \bar{Y}_{ij} se calculan ajustando el modelo propuesto por el -- método de mínimos cuadrados.

Las formulas de cálculo son:

$$\hat{y}_{ij} = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 x_{ij}$$

$$\hat{\beta}_0 = \bar{y} - \hat{\beta}_1 \bar{x}$$

$$\hat{\beta}_1 = \frac{n \sum \sum x_i y_{ij} - \sum \sum x_i \sum \sum y_{ij}}{n \sum \sum x_i^2 - (\sum \sum x_i)^2}$$

COMPARACION DE METODOS

A. REPETIBILIDAD.

Estadígrafo de contraste: $F_{cal} = \frac{s_1^2}{s_2^2}$

Intervalo de confianza:

$$\frac{s_1^2 / s_2^2}{F_{1-\alpha/2}} < \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2} < \frac{s_1^2 / s_2^2}{F_{\alpha/2}}$$

B. REPRODUCIBILIDAD.

Estadígrafo de contraste: $F_{cal} = CM_{E_1} / CM_{E_2}$

C. EXACTITUD.

Estadígrafo de contraste: $t_{cal} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$

$$S_p = \left[\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \right]^{\frac{1}{2}}$$

Intervalo de confianza:

$$(\bar{X}_1 - \bar{X}_2) \pm t_{1-\alpha/2} \sqrt{s_1^2 / n_1 + s_2^2 / n_2}$$

D. LINEALIDAD.

Estadígrafo de contraste: .

$$B_1 - B_2$$

$$t_{\text{cal}} = \frac{(S_{y/x_1} + S_{y/x_2})}{\sqrt{\frac{1}{M_{x_1}^2 - \frac{(\sum x_1)^2}{n_1}} + \frac{1}{M_{x_2}^2 - \frac{(\sum x_2)^2}{n_2}}}}$$

con $(n_1-2) + (n_2-2)$ grados de libertad.

BIBLIOGRAFIA

1. Mollica, J.A.; J. Pharm. Sci., 67, 443 (1978)
2. Connors, K.A.; "A Textbook of Pharmaceutical Analysis",
2nd Ed, Wiley-Interscience Publication, New York,
USA, 1977
3. Syntex; Desarrollo Farmacéutico, Syntex, S.A., 1985
4. Litter, M.; "Farmacología", El Ateneo, Buenos Aires, 5'
Ed, 1975
5. Smith, E.L.; "Vitamin B12", 3rd Ed, John Wiley & Sons,
New York, 1965
6. "The Merck Index", 9th Ed. Merck & Co., Rahway, N.J. USA, 1976
7. Manzur-Ul-Haque Hashmi; "Assay of Vitamins in Pharmaceutical
Preparation", John Wiley & Sons, London, 1973
8. Trener, N.R.; J. Am. Pharm. Ass. Sci. Ed., 39, 361 (1950)
9. Macek, T.J.; ibid, 41, 285 (1952)
10. Bartolucci, A.; ibid, 43, 159 (1954)
11. Blitz, M.; ibid, 43, 651 (1954)
12. Zuck, D.A.; J. Pharm. Sci., 52, 59 (1963)
13. Conine, J.W.; ibid, 52, 63 (1963)
14. Gambier, A.S.; J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 47, 356 (1958)
15. Loy, H.W.; J. Pharm. Sci., 51, 721 (1962)
16. De Merre, L.J.; J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 45, 129 (1956)
17. Brinck, N.G.; J. Am. Chem. Soc., 71, 2951 (1949)
18. Brinck, N.G.; ibid, 72, 4442 (1950)
19. Brinck, N.G.; ibid, 72, 1866 (1950)
20. Brinck, N.G.; ibid, 74, 2856 (1952)
21. Kaczka, E.A.; J. Am. Chem. Soc., 74, 5549 (1952)
22. Kaczka, E.A.; ibid, 75, 6317 (1953)
23. Folkers, K.; ibid, 77, 251 (1955)

24. Kuehl, F.A.; *ibid*, 77, 4418 (1955)
25. Emerson, G.; *ibid*, 72, 3084 (1950)
26. emerson, G.; *ibid*, 73, 1069 (1951)
27. Buchanan, J.M.; *J. Biol. Chem.*, 238, 1025 (1963)
28. Jaenicke, a.; *Ann. Rev. Biochem.*, 33, 293 (1964)
29. Goodman, L.S.; Gilman, A. "The Pharmaceutical Basis of Therapeutics", 4th Ed, The Macmillan Co., New York, 1977
30. Rege, D.V.; *J. Biol. Chem.*, 210, 373 (1954)
31. Mistry, S.P.; *ibid*, 212, 713 (1955)
32. Verly, W.G.; *ibid*, 213, 621 (1955)
33. Breuning, C.P.; *J. Pharm. Sci.*, 50, 537 (1961)
34. Van Melle, P.J.; *J. Am. Pharm. Assoc.*, 45, 26 (1956)
35. Rudkin, G.O.; *Anal. Chem.*, 24, 1155 (1952)
36. Boyd Woodruff, H.; *J. Biol. chem.*, 183, 569 (1950)
37. Strohecker, R.; Henning, H.M.; "Vitamin Assay. Tested Method", Stuttgart, Germany, 1965
38. Kavanagh, F.; "Analytical Microbiology", Academic Press, New York, 1963
39. Stokstad, Y.; *Ann. Rev. Microbiol.*, 9, 112 (1955)
40. Wright, G.; *ibid*, 10, 142 (1956)
41. Hendlin, F.; *ibid*, 8, 49 (1954)
42. Campbell, J.A.; *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, 42, 276 (1953)
43. Bandelin, F.J.; *ibid*, 43, 474 (1954)
44. McLaughlan, J.M.; *ibid*, 44, 594 (1955)
45. Skeeggs, H.R.; *J. Biol. Chem.*, 184, 211 (1950)
46. Thompson, H.T.; *ibid*, 184, 175 (1950)
47. "Curso teórico-práctico de Espectroscopía y Validación de -- Técnicas Analíticas", AFM, México, 1981

48. Remington, R.D.; "Estadística Biométrica y Sanitaria", ---
Prentice/Hall International, Londres, 1974
49. Spiegel, M.R.; "Teoría y Problemas de Estadística", McGraw -
Hill, Colombia, 1969
50. Cooper, K.E.; J. gen. Microbiol., 7, 8 (1952)
51. Humphrey, J.H.; ibid, 7, 129 (1951)
52. Cooper, K.E.; ibid, 18, 670 (1958)
53. Lees, K.A.; Analyst, 80, 95 (1955)
54. Tootil, J.P.R.; ibid, 80, 110 (1955)
55. Knudsen, L.F.; J. Bacteriol., 50, 187 (1945)
56. Hewitt, W.; "Microbiological Assay. An Introduction to ----
Quantitative Principles and Evaluation", Academic -
Press, New York, USA, 1977
57. Stapert, E.M.; J. Pharm. Sci., 52, 805 (1963)
58. Kavanagh, F.; ibid, 63, 1463 (1974)
59. ibidem, 1459 (1974)
60. Loy, H.W.; anal. Chem., 31, 971 (1959)
61. Finn, R.K.; ibid, 31, 975 (1959)
62. Laidlaw, W.G.; "Introduction to Quantum Concepts in Spectros-
copy", McGraw-Hill, New York, 1970
63. García, M.A.; "Estudio comparativo de dos métodos analíticos
para la determinación cuantitativa de hidrocortisona
en una formulación de hidrocortisona 1% + vioformo-
3% en crema", Tesis profesional, ENEP ZARAGOZA, ---
UNAM, México, 1983
64. Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed, Mack Publi---
shing Co, Easton, Pennsylvania, 1980