

23

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**DESARROLLO Y VALIDACION DE METODOS  
ANALITICOS PARA VITAMINAS HIDROSOLUBLES  
EN PRODUCTOS MULTIVITAMINICOS POR  
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA  
RESOLUCION**

298791

**T E S I S**

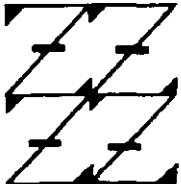
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A :**

**SERGIO GALICIA CHAVARRIA**

**U N A M  
F E S  
Z A R A G O Z A**



**LO HUMANO EJE  
DE NUESTRA REFLEXIÓN**

**DIRECTOR DE TESIS: M. en C. VICENTE JESUS HERNANDEZ ABAD.**

**MEXICO, D. F.**

**NOVIEMBRE DE 2001**



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

GALICIA CHAVARRÍA SERGIO

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: **Desarrollo y validación de métodos analíticos para vitaminas hidrosolubles en productos multivitamínicos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.**

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE M. en C. BEATRIZ ESPINOSA FRANCO  
VOCAL M. en C. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD  
SECRETARIO Q.F.B. MA. MARTHA UGALDE HERNÁNDEZ  
SUPLENTE M. en F. LETICIA CRUZ ANTONIO  
SUPLENTE Q.F.B. LETICIA CECILIA JUÁREZ

*Beatriz Espinosa Franco*  
*Vicente Jesús Hernández Abad*  
*Martha Ugalde Hernández*  
*Leticia Cruz Antonio*  
*Leticia Cecilia Juárez*

ATENTAMENTE.  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
México, D.F. a, 18 de Julio de 2001.

*Roberto Cruz González Meléndez*  
Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ  
JEFE DE LA CARRERA

*A la memoria de mi madre:*

*Angelina Chavarría Díaz*

*por su nobleza y gran corazón*

*hacia sus hijos. Por su gran apoyo*

*y esfuerzo para que yo alcanzara*

*la meta deseada.*

*A mi padre:*

*Armando Galicia Villegas*

*por su enérgica pero efectiva conducción*

*y por darme la oportunidad de desarrollarme*

*profesionalmente.*

Lugar donde se realizó el Trabajo Experimental:

**Laboratorios Columbia S.A. de C.V.  
Departamento de Desarrollo Farmacéutico**

***AGRADECIMIENTOS:***

El primero surge inevitablemente para el I. Q. Primitivo Tapia Silva por su apoyo y motivación constante durante la elaboración del presente trabajo.

Agradezco profundamente al M. en C. Vicente Jesús Hernández Abad por la revisión paciente del trabajo y sus comentarios siempre entusiastas y alentadores.

Agradezco también a:

M. en C. Beatriz Espinosa Franco

Q.F.B. Ma. Martha Ugalde Hernández

M. en F. Leticia Cruz Antonio

Q.F.B. Leticia Cecilia Juárez

por sus valiosos y oportunos comentarios durante la revisión

## INDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCION	1
II. FUNDAMENTO TEORICO	
1 VITAMINAS	
1.1 Clasificación	3
1.2. Estructura Química y Propiedades	4
1.3. Estabilidad de las Vitaminas	8
1.4. Multivitamínicos	10
2. METODOS GENERALES DE ANALISIS	12
3 CROMATOGRAFIA	
3.1 Definición	13
3.2. Mecanismos de Separación	13
3.3. Clasificación de la Cromatografía	14
3.4. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	15
4. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS	
4.1. Validación	21
4.2. Linealidad	21
4.3. Exactitud	21
4.4. Precisión	21
4.5. Límite de Detección	22
4.6. Límite de Cuantificación	22
4.7. Especificidad	23
4.8. Estabilidad de la muestra	23
4.9. Tolerancia del sistema	23
4.10. Criterios mínimos y adicionales en la Validación de Métodos Analíticos	24
4.11. Adecuación del Sistema Cromatográfico	24
5 ANALISIS DE VITAMINAS HIDROSOLUBLES POR CLAR	27
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
IV. OBJETIVOS	32
V. HIPOTESIS	33
VI. METODOLOGIA	
1. REACTIVOS Y DISOLVENTES	34
2. MATERIAL	34
3. EQUIPO	35

4. FORMULACIONES ANALIZADAS	36
5 METODO	39
<b>VII. RESULTADOS</b>	
1 DESARROLLO DE LOS METODOS	
1.1. Pruebas Preliminares	44
1.2. Establecimiento de los Sistemas Cromatográficos	
1.2.1.Efecto de la longitud de onda	48
1.2.2.Efecto de la composición de la fase móvil	48
1.2.3.Efecto del pH	49
1.2.4.Efecto de la mezcla de reactivos formadores del par iónico y de la cadena hidrocarbonada	54
1.2.5.Efecto de la concentración del par iónico	54
1.2.6.Efecto de la utilización de sales de fosfatos	54
1.2.7.Efecto de las características de la columna	54
1.3 Establecimiento de los Métodos	60
2. VALIDACION DE LOS METODOS	
2.1 Linealidad del Sistema	66
2.2. Linealidad del Método	67
2.3. Precisión del Método	67
2.4. Cromatogramas	67
<b>VIII. ANALISIS DE RESULTADOS</b>	
1 PRUEBAS PRELIMINARES	
1.1 Espectros de Absorción de las Vitaminas	86
2. DESARROLLO DEL SISTEMA	
2.1. Efecto de la Composición de la Fase Móvil	88
2.2. Efecto del pH	89
2.3. Efecto de las Características de la Columna	90
2.4. Consideración Acerca del Tipo de Vitaminas	90
3 COMENTARIOS ACERCA DEL DESARROLLO DE LOS METODOS	
3.1 Solución Multivitáminica Oral con Minerales	91
3.2 Solución Multivitáminica Inyectable con Hierro	92
3.3. Solución Multivitáminica Inyectable con Aminoácidos	92
3.4. Gotas Multivitáminicas Orales	93
3.5. Solución Multivitáminica Oral	94
3.6. Cápsulas Multivitáminicas Orales	94
3.7. Tabletas de Acido Fólico	95
4 VALIDACION DE LOS METODOS	96
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	98
<b>X. PROPUESTAS</b>	100

## INDICE DE TABLAS

TABLA NUMERO	TITULO	Página
I	Algunas propiedades de las vitaminas hidrosolubles	5
II	Técnicas para retener compuestos usando cromatografía en fase inversa	17
III.	Reactivos de uso frecuente en fases móviles.	18
IV.	Características de diferentes detectores utilizados en CLAR.	20
V.	Evaluaciones recomendadas para la validación de métodos analíticos.	26
VI.	Concentraciones utilizadas para cada vitamina en la linealidad del sistema	41
VII	Parámetros de validación evaluados y criterios de aceptación establecidos en el trabajo para los métodos analíticos de vitaminas hidrosolubles.	43
VIII.	Parámetros encontrados en los espectros de absorción de las vitaminas hidrosolubles.	47
IX.	Efecto de la composición de la fase móvil en la retención de las vitaminas con hexanosulfonato.	50
X	Efecto de la composición de la fase móvil en la retención de las vitaminas con heptanosulfonato.	50
XI.	Efecto del acetonitrilo en la retención de las vitaminas.	52
XII.	Efecto del pH en la retención de las vitaminas	52
XIII.	Efecto de la utilización de la mezcla hexanosulfonato de sodio. heptanosulfonato de sodio.	55
XIV.	Efecto de la longitud de la cadena hidrocarbonada en el reactivo del par iónico.	55
XV.	Efecto de la concentración del hexanosulfonato de sodio.	57
XVI.	Retención de las vitaminas utilizando soluciones amortiguadoras de fosfatos.	59
XVII.	Validación del método analítico para la solución oral con minerales.	68
XVIII.	Validación de los métodos analíticos para la solución multivitamínica inyectable con hierro.	69
XIX.	Validación de los métodos analíticos para la solución multivitamínica inyectable con aminoácidos.	70
XX.	Validación del método analítico para gotas multivitamínica orales.	71
XXI	Validación del método analítico para solución oral	72
XXII.	Validación de los métodos analíticos para cápsulas de gelatina dura	73
XXIII	Validación del método analítico para tabletas	74



## INDICE DE FIGURAS

FIGURA NUMERO	TITULO	Página
1	Estructura química de las vitaminas hidrosolubles.	6
2	Estructura química de las vitaminas liposolubles.	7
3.	Clasificación de la cromatografía.	15
4.	Partes básicas de un cromatógrafo de líquidos.	16
5	Espectros de absorción ultravioleta visible para vitaminas hidrosolubles.	45
6	Espectros de absorción ultravioleta visible para vitaminas hidrosolubles.	46
7	Efecto de la fase orgánica.	51
8	Efecto del pH.	53
9.	Efecto de la mezcla heptanosulfonato/hexanosulfonato de sodio.	56
10.	Efecto de la longitud de la cadena hidrocarbonada en la sal del ácido alquilsulfónico.	58
11	Gráfica típica obtenida para la linealidad de los métodos (riboflavina).	75
12	Cromatogramas típicos para la solución oral multivitamínica con minerales	76
13	Cromatogramas típicos para la solución inyectable con hierro (tiamina, piridoxina).	77
14.	Cromatogramas típicos para la solución inyectable con hierro (riboflavina).	78
15	Cromatogramas típicos para la solución multivitamínica inyectable con aminoácidos (nicotinamida).	79
16	Cromatogramas típicos para la solución multivitamínica inyectable con aminoácidos (riboflavina).	80
17.	Cromatogramas típicos para las gotas multivitamínicas orales.	81
18	Cromatogramas típicos para la solución multivitamínica oral.	82
19.	Cromatogramas típicos para las cápsulas multivitamínicas (ácido fólico).	83
20.	Cromatogramas típicos para las cápsulas multivitamínicas (cianocobalamina)	84
21.	Cromatogramas típicos para las tabletas (ácido fólico).	85
22.	Diagrama para la validación de los métodos analíticos por CLAR.	110
23.	Linealidad del método para nicotinamida en solución multivitamínica oral con minerales.	111
24	Linealidad del método para piridoxina y tiamina en solución multivitamínica	

	oral con minerales.	112
25.	Lincalidad del método para nicotinamida y piridoxina en solución inyectable con hierro.	113
26	Lincalidad del método para tiamina en solución inyectable con hierro.	114
27	Lincalidad del método para riboflavina en solución inyectable con hierro	114
28	Lincalidad del método para nicotinamida y riboflavina en solución multivitamínica inyectable con aminoácidos.	115
29	Lincalidad del método para piridoxina y tiamina en gotas multivitamínicas orales.	116
30.	Lincalidad del método para piridoxina y tiamina en solución multivitamínica oral.	117
31.	Lincalidad del método para ácido fólico y cianocobalamina en cápsulas de gelatina dura.	118
32.	Lincalidad del método para ácido fólico en tabletas.	119

## I. INTRODUCCION

Es común el desarrollo de productos vitamínicos para uso humano o veterinario para el tratamiento de deficiencias de estos grupos prostéticos importantes en el metabolismo, pero generalmente se presentan carencias múltiples o la carencia de alguno afecta la necesidad de otro, por lo cual se requiere la formulación de multivitamínicos<sup>1</sup> y, al mismo tiempo, se hace necesario el desarrollo y validación de los métodos analíticos para su control de calidad o estudios de estabilidad.

Las formulaciones incluyen vitaminas liposolubles o hidrosolubles. Dentro del grupo de vitaminas hidrosolubles se encuentran las vitaminas: B1 ó tiamina, B2 ó riboflavina, B6 ó piridoxina, B3 ó nicotinamida, B5 ó pantotenato de calcio, B<sub>12</sub> ó cianocobalamina, ácido fólico y ácido ascórbico.

La técnica más ampliamente usada en la actualidad para el análisis de estos productos, es la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), ya que es una técnica que permite la separación de mezclas complejas, por lo que resulta ideal su aplicación en estas formulaciones.

Se han descrito innumerables procedimientos para el análisis de vitaminas en materia prima o productos farmacéuticos por CLAR. Sin embargo, no siempre son aplicables a la formulación de interés debido a la variedad y la complejidad de las formulaciones, la cual depende, entre otras cosas: de la forma farmacéutica, del número de vitaminas presentes, de su concentración, de la forma de la sal de la vitamina, de los aditivos y de otros posibles principios activos en la fórmula, por lo que siempre se requiere el desarrollo de un nuevo procedimiento para el tratamiento de la muestra e incluso un nuevo método analítico<sup>2-18</sup>

En el presente trabajo, se describe el desarrollo y validación de los métodos de análisis para la cuantificación de vitaminas hidrosolubles por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, para utilizarlos en el control de calidad de productos con las siguientes formas

farmacéuticas: soluciones orales, cápsulas de gelatina dura, tabletas e inyectables, para uso humano o veterinario que contienen las vitaminas antes mencionadas como principios activos

Las vitaminas que se analizaron fueron: el clorhidrato de tiamina, el clorhidrato de piridoxina, nicotinamida, riboflavina-5-fosfato, cianocobalamina y el ácido fólico, algunas veces en forma simultánea y otras en forma individual, en presencia de minerales (glicerofosfatos), de aminoácidos, hierro, edulcorantes, saborizantes o conservadores.

Se describen los efectos de la composición de la fase móvil como la proporción de metanol, cambios en el pH y la longitud de la cadena hidrocarbonada de los ácidos alquilsulfónicos formadores del par iónico en la separación de las vitaminas cuando se analizan en forma simultánea. Se muestra el uso de la supresión iónica o la formación de pares iónicos en el análisis de las vitaminas utilizando columnas C18 como fase estacionaria, así como la elección de la longitud de onda del detector y la forma más adecuada de preparación de la muestra para extraer cuantitativamente los principios activos.

Se eligió una longitud de onda de 280 nm para la determinación simultánea de la riboflavina-5-fosfato, clorhidrato de tiamina, nicotinamida y clorhidrato de piridoxina en presencia de una mezcla de sales del ácido alquilsulfónico a pH ácido y mezclas de agua, metanol y/o acetonitrilo como componentes de la fase móvil. En otros casos, se requirió el desarrollo de métodos individuales detectando el compuesto a la longitud de onda de máxima absorción encontrada (cianocobalamina 360 nm y ácido fólico 280 nm) utilizando soluciones amortiguadoras de fosfatos en la extracción de los activos y en las fases móviles.

## II. FUNDAMENTO TEORICO

### I. VITAMINAS

#### *1.1 Clasificación*

Las vitaminas se clasifican en dos grandes grupos: liposolubles e hidrosolubles, las primeras incluyen las vitaminas A, E, K y colecalfiferol (vitamina D). La vitamina A se encuentra disponible como el alcohol libre, retinol y sus ésteres acetato, palmitato y propionato. La vitamina E se puede encontrar como la forma d- y dl del tocoferol y sus ésteres de acetato y succinato. El colecalfiferol, normalmente se utiliza en productos farmacéuticos como ergocalciferol (vitamina D3). Las formas liposolubles de la vitamina K incluyen: fitonadiona (vitamina K1), menadiona, diacetato de menadiol y dibutirato de menadiol, pero existen formas hidrosolubles como el difosfato sódico de menadiol, la sal dipotásica del disulfato de menadiol y el bisulfito sódico de menadiona.<sup>19</sup>

Por otra parte, se encuentran las vitaminas clasificadas como hidrosolubles, algunas son relativamente insolubles en agua como la riboflavina y la biotina, pero esa solubilidad depende de la naturaleza de la estructura del cristal y de la forma de la sal. Para ácidos tales como la biotina y el ácido fólico, la adición de álcalis incrementa significativamente la solubilidad. En este grupo quedan clasificadas las siguientes vitaminas: el clorhidrato de Tiamina ó vitamina B1, la cual también es común encontrarla como mononitrato de tiamina; La riboflavina o vitamina B2 y la sal sódica de riboflavina -5- fosfato, la nicotinamida o vitamina B3, la cual también se encuentra como niacina y como ácido nicotínico; el pantenol o vitamina B5 y sus sales pantotenato de sodio y pantotenato de calcio, el clorhidrato de piridoxina o vitamina B6 que también se puede encontrar como fosfato de piridoxal; la cianocobalamina o vitamina B<sub>12</sub> la cual también se encuentra como hidroxocobalamina y el ácido fólico. Estas vitaminas, son denominadas del complejo B<sup>18,20</sup>

Otras vitaminas hidrosolubles son: el ácido ascórbico (vitamina C) y sus sales ascorbato de sodio y ascorbato de calcio y, finalmente, la biotina.

## *1.2 Estructura Química y Propiedades*

Las vitaminas hidrosolubles forman un grupo complejo de compuestos químicos sin una estructura química común, con diversos grupos funcionales como metilo, hidroxilo, cetón, carboxilo, fenilo y amino, que le pueden conferir a cada vitamina un comportamiento diferente, ya sea ácido o básico, con características adecuadas para presentar fluorescencia o absorción de luz ultravioleta a una determinada longitud de onda, diferente pKa, etc. Todas tienen propiedades individuales que hacen posible la aplicación de diversas técnicas instrumentales para el análisis de estas sustancias químicas, ya sea como materia prima o en productos farmacéuticos, en forma individual o como multivitamínicos en forma específica. En general, las vitaminas hidrosolubles se presentan como sales ionizables en agua, ya sea como clorhidratos, sales de sodio, de calcio, fosfatos, nitratos o como ácidos o bases débiles, propiedades de suma importancia a considerar en la separación para su análisis por CLAR.

Por otro lado, las vitaminas liposolubles presentan pesos moleculares mayores, su estructura química es ligeramente más compleja, presentando además de estructuras cíclicas, cadenas largas hidrocarbonadas que las hacen insolubles en agua. Son compuestos no ionizables y presentan una conducta semejante para su análisis por CLAR en fase inversa, con mezclas de metanol-acetonitrilo y solamente pequeñas proporciones de agua. En la tabla 1, se presentan algunas propiedades de las vitaminas y en las figuras 1 y 2 sus estructuras.

TABLA I. Algunas Propiedades de las Vitaminas Hidrosolubles

VITAMINA	pKa	MAXIMO DE ABSORCION APROXIMADO (nm)	SOLUBILIDAD EN AGUA A 25°C (mg/mL)	OTRAS CARACTERISTICAS DE SOLUBILIDAD
TIAMINA (CLORHIDRATO)	pK1 = 5.00 pK2 = 9.50	234	1000	Soluble en etanol y metanol, insoluble en éter, hexano y cloroformo. <sup>1,2,19,21</sup>
TIAMINA (MONONITRATO)	pK1 = 4.80	246 medio ácido	27	Ligeramente soluble en cloroformo y etanol. <sup>2,19,21</sup>
RIBOFLAVINA	pK1 = 1.90 pK2 = 10.20 punto isoeléctrico a pH de 6	272	0.066 - 0.33	Ligeramente soluble en etanol y ciclohexanol, acetato de amilo, alcohol bencílico, soluble en álcalis diluidos con descomposición, insoluble en éter cloroformo, acetona y benceno. <sup>2,21</sup>
RIBOFLAVINA-5-FOSFATO	—	272	de 43 a 112 dependiendo del pH	Libremente soluble en etanol.
NICOTINAMIDA	pK = 3.30	261	1000	Soluble en etanol, ligeramente soluble en éter y cloroformo
ACIDO NICOTINICO	pK1 = 2.00 pK2 = 4.80	218	16-18	Soluble en etanol, muy ligeramente soluble en cloroformo, prácticamente insoluble en éter, soluble en soluciones alcalinas de hidróxidos y carbonatos. <sup>2,21</sup>
PIRIDOXINA (CLORHIDRATO)	pK1 = 5.00 pK2 = 9.00	286	220	Soluble en etanol, prácticamente insoluble en éter y cloroformo. <sup>2,21</sup>
ACIDO PANTOTENICO	pK = 4.41	Absorbe a longitudes menores a 220 nm	Libremente soluble	Muy inestable químicamente <sup>3</sup>
PANTENOL	—	Absorbe a longitudes menores a 220 nm	Libremente soluble	Miscible con etanol y metanol, ligeramente soluble en cloroformo y éter. <sup>2,21</sup>
PANTOTENATO DE CALCIO	—	Absorbe a longitudes menores a 220 nm	356	Ligeramente soluble en etanol y acetona. <sup>2,21</sup>
ACIDO ASCORBICO	pK1 = 4.17 pK2 = 11.57	245 medio ácido y 265 medio neutro	333	Soluble en etanol, metanol y acetona, insoluble en éter, cloroformo y benceno. <sup>2,21</sup>
ASCORBATO DE SODIO	pK1 = 4.20 pK2 = 11.60	243	620	Muy ligeramente soluble en etanol, prácticamente insoluble en cloroformo y éter. <sup>2,21</sup>
ACIDO FOLICO	pK1 = 4.70 pK2 = 6.80 pK3 = 9.00	278	0.0016 Gran incremento de solubilidad a pH arriba de 6	Aumenta la solubilidad en agua caliente, ligeramente soluble en metanol menos soluble en etanol y butanol, insoluble en acetona, cloroformo, éter y benceno, relativamente soluble en ácido acético, en soluciones alcalinas de hidróxidos y carbonatos. Soluble en ácido clorhídrico y sulfúrico. <sup>2,19,21</sup>
CIANOCOBALAMINA	pK = 3.30	212	12.5	Soluble en etanol, prácticamente insoluble en cloroformo y éter. <sup>2,21</sup>
HIDROXOCOBALAMINA	—	274	20	Soluble en etanol, prácticamente insoluble en cloroformo y éter. <sup>2,21</sup>

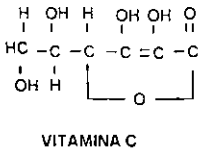
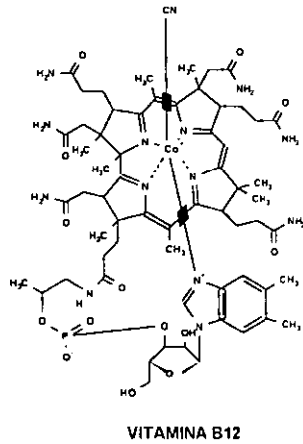
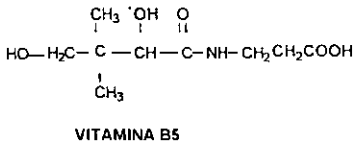
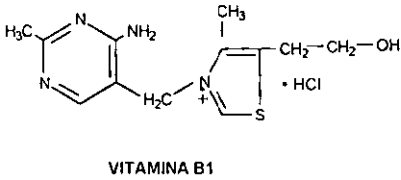
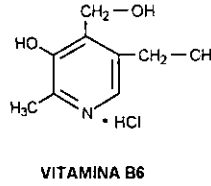
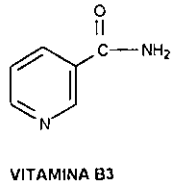
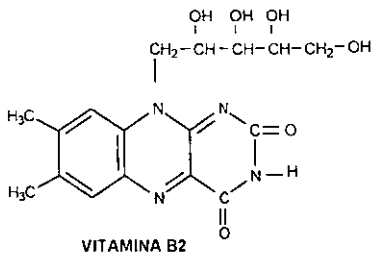
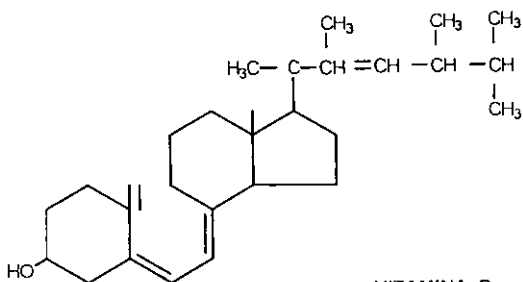
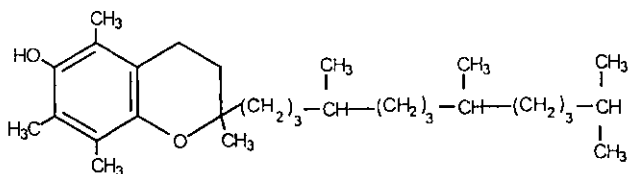


FIGURA 1: Estructura química de las Vitaminas Hidrosolubles

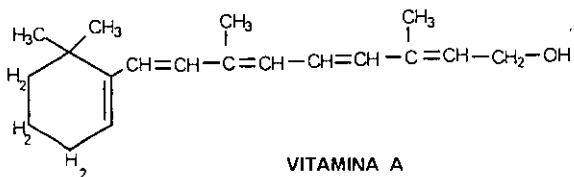




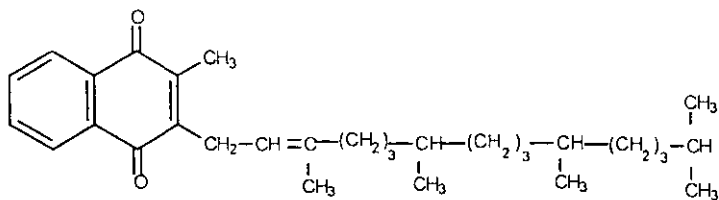
VITAMINA D



VITAMINA E



VITAMINA A



VITAMINA K

FIGURA 2. Estructura química de las Vitaminas Liposolubles

### 1.3 Estabilidad de las Vitaminas

Diferentes factores pueden influir en la estabilidad de las vitaminas además de la temperatura, ya que es normal que un incremento en ella, acelere su descomposición

Ciertas vitaminas pueden considerarse estables, debido a que no presentan mayores problemas de estabilidad en formas farmacéuticas, estas incluyen al colesterciferol, vitamina E acetato o ácido succínico, biotina, niacina o niacinamida, piridoxina y riboflavina. Las vitaminas que presentan grandes problemas de inestabilidad en diversas formas de dosificación, son la vitamina A (retinol y ésteres del retinol), vitamina K, ácido ascórbico, cianocobalamina, ácido fólico, ácido pantoténico, pantenol y tiamina.

La vitamina A, la fitonadiona y el colesterciferol pueden isomerizarse bajo condiciones encontradas frecuentemente en productos farmacéuticos.

El clorhidrato de piridoxina es estable en soluciones acuosas ácidas y puede incluso calentarse por 30 minutos a 120°C sin descomposición.

La tiamina presenta mayor degradación con el incremento del pH. Se ha encontrado también que su descomposición en medio neutro se acelera por la presencia de iones  $\text{Cu}^{+2}$ . En presencia de nitrato de sodio, se forma azufre y tiocromo además de 4-metil-5-( $\beta$ -hidroxietil) tiazol. El bisulfito y sulfito hidrolizan a la tiamina y la reacción es más rápida a pH alto. Se ha observado degradación total en 24 horas en presencia de bisulfito a pH mayores o igual a 6 en parenterales<sup>19</sup>. Las reacciones fotoquímicas presentan mayor velocidad a pH mayores de 4. Los tiazoles fotolizados, producen precipitados de tiamida a pH menor de 3.

La riboflavina es estable en presencia de ácidos, al aire y a los agentes oxidantes comunes (excepto ácido crómico, permanganato y persulfato de potasio). En soluciones ácidas o neutras y con radiación produce lumiflavina. El mismo comportamiento presenta la riboflavina-5-fosfato. En soluciones alcalinas se descompone rápidamente.

La cianocobalamina puede sufrir degradación catalizada por la descomposición de tiamina y pueden formarse cobalaminas y cobinamidas. Se ha demostrado también su degradación en soluciones acuosas al exponerlas a la luz.

Las soluciones acuosas de cianocobalamina se descomponen en presencia de acacia, aldehídos, ácido ascórbico, gluconato ferroso, sulfato ferroso y vainillina. A pH entre 4 y 7 la cianocobalamina es estable en solución acuosa y puede calentarse a 120°C sin una pérdida significativa<sup>3</sup>. La cianocobalamina es inestable en presencia de ácido ascórbico, especialmente en presencia de metales como el cobre, manganeso y molibdeno. La afectan también agentes reductores.

Las soluciones de cianocobalamina se han estabilizado con pirimidina, antioxidantes y agentes quelantes, ácido cítrico, cisteína, dicloro acetato de diisopropilamonio, sales de hierro, galactolactato, gluconato, lactato, soluciones amortiguadoras de fosfato (pH 4.6) conteniendo cloruro de sodio al 0.8%, sales de potasio y sodio. El alcohol bencílico al 0.9% la protege de la descomposición por radiación.

El ácido fólico presenta degradación a pH menor a 4, pero no a pH mayor de 5. Se ha demostrado también su degradación rápida con la luz solar a pH de 7 y más lenta en soluciones alcalinas

El ácido ascórbico puede presentar oxidación reversible formando ácido dehidroascórbico y puede ser catalizada por los iones  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{-2}$ ,  $\text{Zn}^{-2}$ ,  $\text{Fe}^{-3}$  y  $\text{Mn}^{-2}$ . El oxígeno disuelto en las soluciones incrementa la velocidad de degradación. La máxima velocidad de degradación ocurre a pH 4 y la menor a pH 5.6. Se ha demostrado que la luz fluorescente no afecta la degradación del ácido ascórbico en soluciones puras, pero en presencia de la riboflavina se acelera su descomposición.

Se han demostrado además ciertas incompatibilidades entre vitaminas, como son las siguientes: tiamina-riboflavina; tiamina-ácido fólico, tiamina-cianocobalamina, riboflavina-niacinamida; riboflavina-ácido fólico; riboflavina-ácido ascórbico; niacinamida-ácido ascórbico, niacinamida-ácido fólico; ácido ascórbico-ácido fólico; ácido ascórbico-cianocobalamina.<sup>19</sup>

#### 1.4 Multivitamínicos

Las vitaminas son compuestos orgánicos que se requieren en pequeñas cantidades para el desarrollo normal de la vida animal, incluyendo al hombre, y no pueden ser sintetizadas en el cuerpo o lo son en cantidades insuficientes. Actúan como grupos prostéticos en muchas etapas del metabolismo y su deficiencia puede deberse a una dieta inadecuada o un incremento de los requerimientos en etapas como el embarazo. Puede producirse también debido a alguna enfermedad, o por fármacos. Las vitaminas pueden usarse para prevenir y tratar algún estado de deficiencia vitamínica.<sup>1</sup>

Por lo general, se presentan deficiencias múltiples de vitaminas y se han encontrado casos en los que la administración de una de ellas, incrementa la necesidad de otra, por lo que existe justificación real para la terapia multivitamínica. Las deficiencias que ocurren más frecuentemente están relacionadas con: la tiamina, nicotinamida, riboflavina, ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub>. Las deficiencias de ácido pantoténico y biotina solo se han producido experimentalmente y la deficiencia de piridoxina se ha presentado en infantes alimentados con fórmulas sin fortificar con vitaminas.<sup>1</sup>

Los productos multivitamínicos tienen la ventaja de que contienen las proporciones de vitaminas necesarias para la nutrición, y las formas farmacéuticas más comunes son las sólidas, más específicamente tabletas recubiertas y cápsulas; esto es explicable debido a la inestabilidad potencial de las vitaminas, aunque se pueden formular en diferentes formas farmacéuticas como

- a. Emulsiones acuosas: En esta forma se preparan dispersiones acuosas de vitaminas, utilizando agentes tensoactivos adecuados y la preparación de dispersiones claras puede hacerse utilizando agentes surfactantes.
- b. Inyectables: En forma de inyectable podemos encontrar a las vitaminas A, E y colecalciferol en solución o en emulsiones acuosas, principalmente para uso veterinario. Se ha utilizado butilhidroxitolueno como antioxidante<sup>19</sup> y sellado de viales en atmósfera de nitrógeno, se ha utilizado también esterilización por calor húmedo en emulsiones para uso veterinario, encontrándose una mínima degradación de vitamina A

que permite utilizar este proceso de esterilización. La vitamina K generalmente se fórmula con los derivados hidrosolubles.

De las vitaminas hidrosolubles, la tiamina y el ácido ascórbico generalmente se formulan en forma individual en inyectables, esto debido a su gran inestabilidad química, pero se ha utilizado con éxito la mezcla EDTA, monioglicerol y bisulfito de sodio en formulaciones inyectables de ácido ascórbico para evitar su degradación.<sup>19,20</sup>

- c. Tabletas: Las vitaminas liposolubles, A, E y colecalciferol, normalmente se incorporan a las tabletas en forma de adsorbatos o productos recubiertos. Las vitaminas hidrosolubles tiamina, riboflavina, niacinamida, y piridoxina, que pueden contribuir al sabor en tabletas masticables, se pueden encontrar también en formas recubiertas. El ácido ascórbico puede estabilizarse con pequeñas cantidades de etilcelulosa. La biotina y cianocobalamina pueden utilizarse en forma de adsorbatos conteniendo pequeñas proporciones de la vitamina para asegurar la distribución de las cantidades tan pequeñas normalmente utilizadas. Se han empleado tanto la granulación húmeda como la seca y la compresión directa en la fabricación de tabletas vitamínicas con un posterior recubrimiento.<sup>19,20</sup>
  
- d. Cápsulas: Es otra de las formas farmacéuticas más comunes, sobre todo las cápsulas de gelatina blanda, debido a su sellado hermético. En esta forma farmacéutica se ha encontrado buena estabilidad para la riboflavina, piridoxina, Vitamina E, ácido ascórbico y niacinamida, así como para la Vitamina A y el colecalciferol. Para la cianocobalamina y el ácido fólico, tiende a variar de acuerdo al producto y el pantotenato de calcio generalmente tiene poca estabilidad. Se ha encontrado que el nitrato de tiamina es más estable que el clorhidrato de tiamina.
  
- e. Soluciones Orales: De esta manera podemos encontrar jarabes y gotas, pero en estas formas farmacéuticas generalmente se presentan problemas de estabilidad, tanto física como química. Son las menos recomendables para el desarrollo de formulaciones multivitamínicas. Una alternativa podrían ser los polvos para reconstituir.

- f. Ungüentos, cremas y lociones: Constituyen algunas otras formas farmacéuticas en que podemos encontrar a las vitaminas.

## 2. METODOS GENERALES DE ANALISIS

Existen en la actualidad una gran cantidad de métodos para el análisis de vitaminas hidrosolubles, en donde se aplican diversas técnicas, como las de titulación, las espectrofotométricas, fluorométricas, densitométricas, cromatografía de gases y cromatografía de líquidos de alta resolución.<sup>2-18</sup> La primera, generalmente solo puede utilizarse en el análisis de la sustancia pura, es decir, como materia prima. Las dos siguientes necesitan, por lo general, de un tratamiento previo de las muestras resultando métodos caros y laboriosos que requieren de una gran inversión de tiempo, poco prácticos para el análisis rutinario en control de calidad y menos aún para los estudios de estabilidad. Generalmente en estos casos se analiza de manera individual cada vitamina en caso de que pueda aplicarse al análisis de producto terminado. Ninguno de estos métodos satisface completamente las necesidades requeridas en la industria farmacéutica

La cromatografía en capa delgada, requiere la recuperación de la muestra desde la placa para utilizar posteriormente alguna otra técnica como la espectrofotométrica para la cuantificación, lo que involucra también tiempos de análisis largos; una alternativa a esta opción es el uso de placas de cromatografía de alta resolución y de un densitómetro.

Por otro lado, en la cromatografía de gases,<sup>3</sup> es común el uso de agentes derivatizantes caros para hacerlas más volátiles y poder trabajarlas a temperaturas menores para evitar su descomposición térmica en la columna. Por estas razones, la técnica de elección en el análisis de productos, no solo multivitamínicos sino en general en la industria farmacéutica en el control de calidad y en estudios de estabilidad, es la cromatografía de líquidos de alta resolución, usando generalmente columnas de fase inversa de octadecilsilano.<sup>3-18</sup>

### 3. CROMATOGRAFIA

#### *3.1 Definición*

La cromatografía es una técnica de separación de mezclas en la cual cada componente se distribuye entre dos fases, una denominada fase estacionaria y otra denominada fase móvil. Dependiendo de sus características fisicoquímicas, cada componente podrá tener mayor afinidad ya sea por la fase estacionaria o por la fase móvil, produciéndose su separación.

#### *3.2 Mecanismos de Separación*

Básicamente, existen cuatro mecanismos que explican la separación de los componentes de una mezcla en un sistema cromatográfico, estos son: la adsorción, la partición, el intercambio iónico y la exclusión. Cada uno de estos mecanismos predominan en cada uno de los tipos de cromatografía utilizados.<sup>22-23</sup>

**Adsorción:** En este mecanismo, se presentan interacciones reversibles de las sustancias a los sitios activos presentes en la superficie de la fase estacionaria a través de fuerzas electrostáticas o enlaces de hidrógeno y constituye el principio de separación predominante en la cromatografía sólido-líquido y sólido-gas.

**Partición:** En este mecanismo, se presentan fenómenos de distribución entre las dos fases cromatográficas, de acuerdo al coeficiente de partición de los componentes de la mezcla a separar y se presenta en forma predominante en la cromatografía líquido-líquido y líquido-gas.

**Intercambio iónico:** Es un mecanismo de separación en donde la fase estacionaria la constituyen grupos funcionales ácidos o básicos unidos a la superficie de un polímero (resina de intercambio iónico); la fase móvil generalmente es agua y los compuestos a separar iones. En este mecanismo, se forman auténticas combinaciones químicas heteropolares reversibles. Las especies cargadas en la fase móvil, son atraídas a los grupos funcionales del intercambiador iónico y desplazan a los iones unidos originalmente al intercambiador. Este mecanismo es útil en la separación de iones y compuestos con carga, pero realmente es poco común en el análisis de

productos farmacéuticos, ya que los sistemas tienden a presentar baja reproducibilidad o se requieren tiempos considerables para alcanzar su estabilización.

**Exclusión** Utilizado básicamente en la separación de compuestos de alto peso molecular, como proteínas y polímeros, en este mecanismo los compuestos a separar y que tienen un volumen molecular relativamente pequeño, se introducen en los espacios huecos de la fase estacionaria provocando su retención, en cambio los compuestos de mayor volumen molecular que no pueden introducirse en los intersticios de la fase estacionaria son llevados por la fase móvil lográndose la separación

### *3.3 Clasificación de la Cromatografía*

Se puede clasificar la cromatografía de diversas maneras: de acuerdo a los mecanismos de separación mencionados anteriormente o de acuerdo al soporte de la fase estacionaria en superficie plana o columna, pero la clasificación más común se basa en el tipo de fase móvil utilizada, es decir un líquido o un gas,<sup>22, 24</sup> esta clasificación se muestra en la figura 3.

Otra clasificación útil, que considera tanto las polaridades de la fase estacionaria como de la móvil, divide a la cromatografía en dos tipos: cromatografía en fase normal y cromatografía en fase inversa. La primera utiliza una fase estacionaria polar del tipo sílica gel y una fase móvil no polar con el uso de disolventes tales como benceno, tolueno, cloroformo, etc. Prácticamente fue del primer tipo de cromatografía que empezó a utilizarse, pero los reactivos además de tóxicos resultan ser caros, por lo que en la actualidad se utiliza más comúnmente la cromatografía en fase inversa, que emplea una fase estacionaria no polar del tipo octadecilsilano y una fase móvil polar que permite el uso de mezclas de disolventes tales como el agua, metanol y acetonitrilo, que resultan menos tóxicos y más baratos



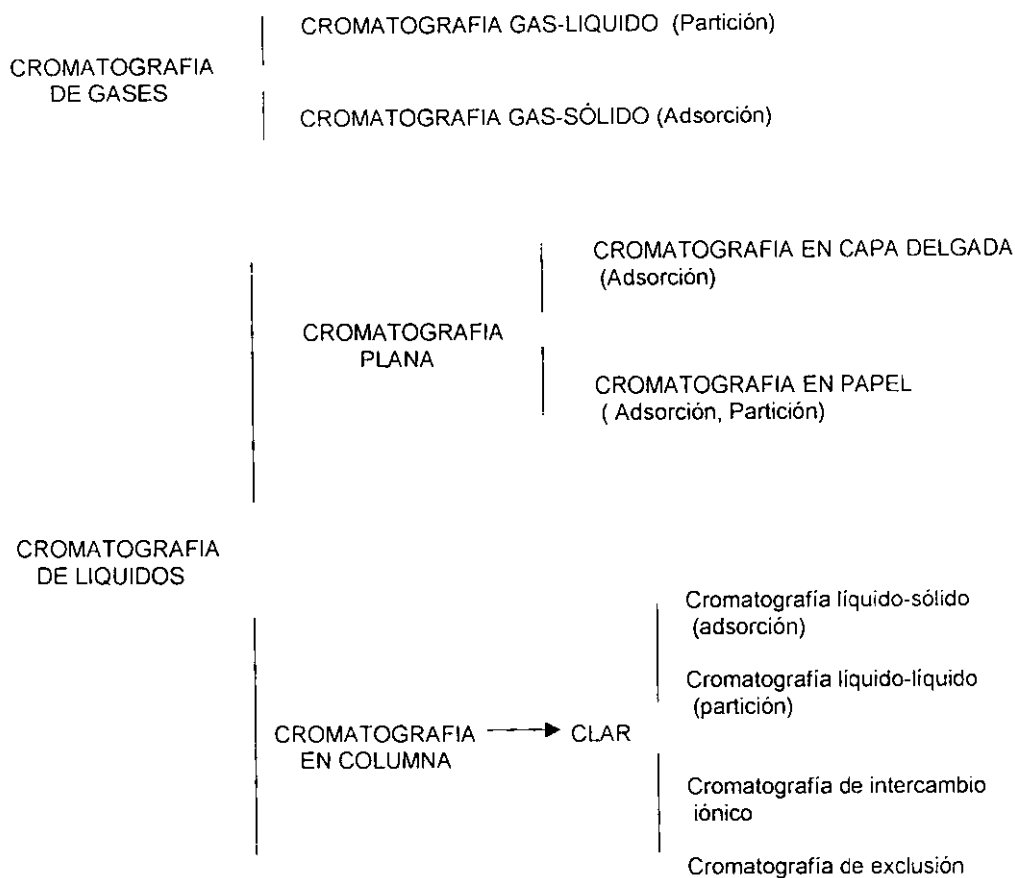


FIGURA 3. Clasificación de la cromatografía

### 3.4 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)<sup>2,13, 22-23</sup> implica, en forma general, el uso de una fase móvil líquida que consiste en una mezcla de disolventes que se hace pasar a través de una columna empacada con la fase estacionaria; para esta operación se hace necesario el uso de un sistema de bombeo. El equipo requiere también de un inyector, ya sea manual o automático, para introducir las muestras a la columna y de un detector adecuado para el análisis de la muestra, además de un registrador. La tecnología actual, permite el manejo de todo un equipo cromatográfico a través de una computadora y el uso de programas específicos aplicables a esta

técnica de análisis incluyendo detectores de arreglo de diodos, pero los principios siguen siendo los mismos

### Partes Básicas de un Cromatógrafo de Líquidos

Las partes básicas de un cromatógrafo de líquidos se describen en la figura 4

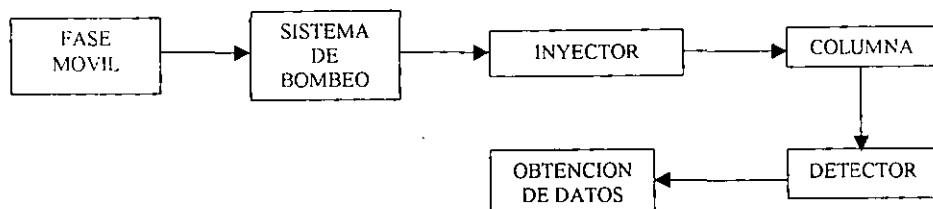


FIGURA 4. Partes básicas de un Cromatógrafo de Líquidos

**Fase móvil:** En el análisis de productos farmacéuticos por CLAR en fase inversa, se utilizan básicamente mezclas que contienen: agua, metanol, acetonitrilo y, algunas veces, pequeñas cantidades de tetrahidrofurano. Adicionalmente, se requiere el control del pH, para lo cual suelen utilizarse ácidos débiles como el ácido acético y el ácido fosfórico, siendo más recomendable éste último debido a la menor absorbancia que presenta a longitudes de onda bajas en la región ultravioleta. Una forma más efectiva del control de pH es utilizar soluciones amortiguadoras, como las de fosfatos, ya sea de sodio, de potasio o de amonio y ácido fosfórico e hidróxidos de sodio o potasio para efectuar el ajuste final del pH. Otras sales que pueden adicionarse a la fase móvil y que son muy utilizadas en la actualidad en la cromatografía de par iónico son las sales de sodio del ácido alquilsulfónico (etano, pentano, hexano, heptano y octano sulfonato de sodio) para el análisis de compuestos que se ionizan en medio ácido, es decir, bases débiles, muy comunes en productos farmacéuticos. Por otro lado, tenemos las sales como el hidróxido de tetrametil y tetrabutilamonio o bromuro de tetraheptilamonio para compuestos que se ionizan en medio alcalino, aplicables al análisis de ácidos débiles en productos farmacéuticos. El uso de estos reactivos es común en la técnica de separación por par iónico en donde la primera condición, es mantener ionizado el compuesto que se requiere separar y que dependerá por lo tanto de su carácter ácido o básico. La

ionización se logra entonces controlando el pH, posteriormente se forma un par iónico con la sal adicionada y puede lograrse la retención y separación en un sistema cromatográfico de fase inversa. Cuando se quiere utilizar la técnica de supresión iónica, basta simplemente con el control de pH para evitar ionizar los compuestos que se desean separar. En la cromatografía de fase inversa se requiere que los analitos no tengan carga, lo cual se logra básicamente suprimiendo la ionización o ionizando primero y formando un par iónico que se comporta como un compuesto sin carga (ver tabla II) Existen otras sales que pueden ser utilizadas en las fases móviles con el mismo principio. Es común también el uso de dietilamina y trietilamina para disminuir la asimetría de picos en el cromatograma. Las diversas sales del ácido alquilsulfónico generalmente tienen un efecto de retención proporcional a la longitud de la cadena carbonada, lo cual puede utilizarse para optimizar la separación. Otras sales y su aplicación se muestran en la tabla III.

Es la gran diversidad de fases móviles posibles de utilizar es lo que ha hecho de la cromatografía de líquidos una herramienta indispensable en el análisis cuantitativo de productos farmacéuticos.

**TABLA II. Técnicas para retener Compuestos usando Cromatografía en Fase Inversa**

COMPUESTO IONICO	pKa	FORMA ENCONTRADA A pH 2-5	FORMA ENCONTRADA A pH 7-8	TECNICA DE SEPARACION	AJUSTE DE pH (requerido en fase móvil)	PAR IONICO O SOLUCION AMORTIGUADORA
ACIDO FUERTE H <sup>+</sup> A <sup>-</sup>	< 2	IONIZADA	IONIZADA	PAR IONICO	Dependiendo del compuesto que formará el par iónico	Tetrabutilamonio o sales del ácido alquilsulfónico
ACIDO DEBIL H <sup>+</sup> A <sup>-</sup>	> 2	NO IONIZADA	IONIZADA	SUPRESION IONICA O PAR IONICO	Supresión pH 2-5 Par iónico pH 7-8	Sales de fosfatos o tetrabutilamonio
BASE DEBIL B <sup>+</sup> H <sup>-</sup>	< 8	IONIZADA	NO IONIZADA	SUPRESION IONICA O PAR IONICO	Supresión pH 7-8 Par iónico pH 2-5	Sales de fosfatos o Sales del ácido alquilsulfónico
BASE FUERTE B <sup>+</sup> H <sup>-</sup>	> 8	IONIZADA	IONIZADA	PAR IONICO	Dependiendo del compuesto formador del par iónico	Tetrabutilamonio o sales del ácido alquilsulfónico
NEUTROS	—	NO IONIZADA	NO IONIZADA	mezclas agua-metanol-acetonitrilo	No se requiere ajuste de pH	No se requieren

TABLA III. Reactivos de uso frecuente en Fases Móviles

TIPO DE SALES	DERIVADOS DE USO MÁS COMUN	APLICACIONES
SALES DE SODIO DEL ACIDO SULFONICO	ctanosulfonato de sodio pentanosulfonato de sodio hexanosulfonato de sodio heptanosulfonato de sodio octanosulfonato de sodio	En cromatografía par iónico en el análisis de compuestos con carácter básico
SALES CUATERNARIAS DE AMONIO	tetrabutilamonio (TBA <sup>+</sup> )	En cromatografía par iónico en el análisis de compuestos con carácter ácido
OTRAS	lauril sulfato sulfosuccinato de dioctil sódico	formadoras de par iónico
SOLUCION AMORTIGUADORA DE CITRATOS	citrato de sodio y ácido citrico	Básicamente en cromatografía de supresión iónica
SOLUCIONES AMORTIGUADORAS DE FOSFATOS	fosfato de sodio monobásico y dibásico fosfato de potasio monobásico y dibásico	Básicamente en cromatografía de supresión iónica
SOLUCION AMORTIGUADORA DE FORMIATO	formiato de sodio, ácido fórmico, formiato de amonio.	En cromatografía de supresión iónica
SOLUCION AMORTIGUADORA DE ACETATOS	Acetato de sodio y ácido acético	En cromatografía de supresión iónica

**Bomba:** Se requiere siempre un sistema de bombeo para hacer pasar la fase móvil a través de la columna. Se le han sumado aditamentos a fin de alcanzar siempre un flujo constante para lograr reproducibilidad en los tiempos de retención y, por lo tanto, en los análisis. Se han desarrollado sistemas automáticos que efectúan cambios de flujo y cambios en las proporciones de la fase móvil programables a través del tiempo que se aplican en las separaciones por gradiente.

**Inyector:** A través del inyector, se introducen las muestras al sistema cromatográfico y existen en la actualidad tanto inyectores manuales como inyectores automáticos con capacidad promedio de 100 muestras en los sistemas automatizados. La principal característica que debe tener un inyector, es su reproducibilidad de inyección a inyección, lo cual generalmente no resulta ser un problema en esta parte de los equipos.

**Columna:** De hecho, es en donde se lleva a cabo la separación y constituye una de las partes fundamentales en un sistema cromatográfico. Las columnas usadas en CLAR son de acero inoxidable con diferentes dimensiones, desde 30 cm hasta sólo algunos centímetros, siendo cada

vez más comunes estas últimas y teniendo la misma o mejor resolución debido a la disminución en el tamaño de partícula, es posible controlar también la forma esférica de la partícula, pero lo más importante son las características de polaridad que presentan esas fases estacionarias. La base de todas ellas es la sílica gel, pero modificada químicamente para hacerla menos polar, sustituyendo los grupos OH por cadenas de 18 carbonos en las columnas ODS o C18, por cadenas de 8 carbonos en las C8, por cadenas de 2 carbonos en las C2 o por grupos -CN en las columnas ciano, también pueden efectuarse sustituciones por grupos amino o fenilo. Usando una columna ODS (C18), prácticamente pueden lograrse casi todas las separaciones requeridas en el análisis farmacéutico utilizando la fase móvil adecuada.

**Detector:** Existen diferentes tipos de detectores utilizados en CLAR, pero el más utilizado en el análisis de productos farmacéuticos es el detector ultravioleta, el cual ha ido evolucionando desde los detectores de onda fija que solamente eran capaces de trabajar a dos longitudes de onda hasta los actuales detectores de arreglo de diodos, que permiten detectar simultáneamente a todas las longitudes de onda del espectro ultravioleta-visible, lo cual hace posible efectuar el espectro de cada uno de los compuestos que eluye de la columna, teniendo actualmente esta técnica mayores herramientas de identificación. Otra de las aplicaciones de este detector es en la determinación de la pureza de un pico en la especificidad de los métodos analíticos. En la tabla IV se resumen algunas características de los principales detectores para Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

**Obtención de datos:** Este puede ser a través de un integrador o una computadora personal y constituye la parte del equipo en donde se almacena e imprime la información relacionada con el análisis

En forma general, siempre se hace necesario el desarrollo de un procedimiento específico para tratar una muestra particular para su análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución, el cual dependerá de ciertas características de la formulación, tales como: su forma farmacéutica, los aditivos o el número de vitaminas presentes en el producto, así como su concentración, sin embargo, se pueden establecer guías generales para implementar y desarrollar los métodos requeridos para el análisis de medicamentos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

TABLA IV. Características de Diferentes Detectores Utilizados en CLAR

DETECTOR	EMPLEO	LIMITE DE DETECCION	OBSERVACIONES
INDICE DE REFRACCION	Universal	Alrededor de 0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Existen dos tipos a) reflexión y b) deflexión
DETECTOR U.V ONDA FIJA	Selectivo	Alrededor de 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$	De los primeros detectores U.V: para CLAR Sólo pueden usarse a 254 y 280 nm
DETECTOR U.V - VISIBLE ONDA VARIABLE	Selectivo	Alrededor de 0.3 nanogramos/ mL	De uso más común en el área farmacéutica. Intervalo de aplicaciones muy amplio. Puede elegirse cualquier longitud de onda o en forma simultánea detectar a 4.
DETECTOR U.V.- VISIBLE DE ARREGLO DE DIODOS	Selectivo	Alrededor de 0.3 nanogramos/mL	El más reciente tipo de detectores U.V. capaces de detectar simultáneamente en todo el espectro U.V - visible
DETECTOR DE FLUORESCENCIA	Selectivo	Alrededor de 8 picogramos/mL	Muy selectivo Pocos compuestos fluorescen, pero con mucha sensibilidad
DETECTOR ELECTROQUIMICO	Selectivo	Alrededor de $10^{-3}$ nanogramos/mL	Poco usado realmente en CLAR pero con grandes perspectivas debido a su elevada sensibilidad de detección.
DETECTOR DE CONDUCTIVIDAD	Selectivo de iones	Hasta alrededor de 0.2% de diferencia entre la conductividad de dos sustancias	Para detección de iones/sustancias conductoras
DETECTOR DE REACCION	Selectivo	semejante a U.V. y fluorescencia	Aplicable para sustancias que contengan grupos cromóforos o permitan su incorporación.

#### 4. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

La otra parte importante en el desarrollo de los métodos analíticos es la validación. Esto implica el demostrar que el método es lineal, preciso, exacto, reproducible y específico, de acuerdo al uso que se le dará al método, ya sea para el control de calidad del producto o materia prima, estudios de estabilidad, determinación de trazas, compuestos relacionados o productos de degradación Otra parte es la determinación de la tolerancia del sistema y la estabilidad de la muestra<sup>24-32</sup>

#### *4.1 Validación*

La validación de un método analítico se define como el proceso a través del cual se demuestra que el método cumple con las características o requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas, expresándolo en términos de parámetros analíticos.

#### *4.2 Linealidad*

La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos obtenidos son proporcionales a la concentración de la sustancia en un intervalo determinado. Esta relación podrá ser directa o a través de una transformación matemática. En la validación de un método analítico, se requiere evaluar la linealidad del sistema y la linealidad del método, en el primer caso, se demostrará que existe una relación lineal de la respuesta medida con respecto a la concentración del principio activo a las condiciones establecidas en el método propuesto, se trabajará entonces exclusivamente con el principio activo a diferentes concentraciones. En la linealidad del método, se demuestra que existe una relación lineal entre la cantidad adicionada y la recuperada, utilizando placebos adicionados de cantidades perfectamente conocidas del fármaco, y analizándolos bajo las condiciones establecidas en el método

#### *4.3 Exactitud*

La exactitud de un método analítico, es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor real. Se expresa como el porcentaje recuperado al analizar placebos adicionados con cantidades perfectamente conocidas de la sustancia a evaluar. Se utilizan para su evaluación los resultados obtenidos en la linealidad del método.

#### *4.4 Precisión*

Precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales obtenidos cuando se aplica repetidamente el método a una muestra homogénea del producto, usualmente se expresa en términos de coeficiente de variación.

La precisión puede evaluarse como repetibilidad y como reproducibilidad

- ✓ **Repetibilidad:** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.). Se acostumbra evaluarla en muestras que correspondan a la concentración del 100% de acuerdo a las condiciones establecidas en el método y se puede evaluar conjuntamente al efectuar la linealidad del sistema y durante la linealidad del método. Se puede calcular también la repetibilidad total del método analítico utilizando todos los valores obtenidos para la exactitud del método expresados en % recuperado y calculando el coeficiente de variación de esos valores.
  
- ✓ **Reproducibilidad:** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc.)

#### ***4.5 Límite de Detección***

Es la mínima concentración que puede detectarse para una sustancia en una muestra bajo las condiciones de operación establecidas. Esta prueba resulta importante en la determinación de trazas, tales como productos de degradación potencialmente tóxicos, impurezas en materias primas, compuestos relacionados o métodos analíticos aplicados a evaluar los sistemas de limpieza de las áreas de producción

#### ***4.6 Límite de Cuantificación***

Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas



#### *4.7 Especificidad*

Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia que interesa analizar y no a otros componentes de la muestra. Esta prueba se realiza de acuerdo a su aplicación, si será utilizado para el control de calidad del producto terminado, basta demostrar que no existe interferencia del placebo, en cambio si el método se utilizará en estudios de estabilidad se deberá comprobar la capacidad del método para cuantificar el principio activo en presencia de sus posibles productos de degradación o en presencia de posibles productos de degradación del placebo, para lo cual se sugiere someter el principio activo, el placebo y el producto terminado a condiciones ácidas, básicas y de oxidación usando comúnmente peróxido de hidrógeno o al efecto de la temperatura y/o luz, considerando la ruta de degradación más probable para el principio activo. Se ha sugerido lograr una degradación del principio activo entre el 10 y el 30%. El método deberá ser capaz de cuantificar el principio activo en presencia de cualquier posible producto de degradación, ya sea del principio activo o de los aditivos. Si se cuenta con los productos de degradación, pueden adicionarse al placebo y a la formulación además de analizarlos individualmente y evaluar si el método analítico propuesto es adecuado para separar el principio activo.

#### *4.8 Estabilidad de la Muestra*

Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de activo después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas como: temperatura ambiente, refrigeración y/o exposición a la luz.

#### *4.9 Tolerancia del Sistema*

Es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, modificaciones del pH, fuerza iónica o porcentaje de modificador orgánico en la fase móvil o variaciones en la longitud de onda. Se pueden evaluar también diferentes tipos de empaque o columnas con menor eficiencia a la usada durante el desarrollo del

método Se ha sugerido variar el pH en  $\pm 1$  unidad del especificado en el método, variar por lo menos  $\pm 10$  unidades la fuerza iónica normal de trabajo y el modificador orgánico con  $\pm 10\%$  si se encuentra en la fase móvil en una proporción mayor al 50%, si se encuentra en una proporción de 10% se sugiere probar  $\pm 50\%$ . Si la fase móvil es una mezcla compleja, se sugiere manejar combinaciones diferentes de los componentes Si se manejan temperaturas, se variará en  $\pm 10^\circ\text{C}$  y la longitud de onda en  $\pm 10\text{ nm}$ . Finalmente, se sugiere comparar la eficiencia de la columna con otra que tenga un 30% menos de eficiencia. La tolerancia nos permite conocer la robustez del método validado.

#### *4.10 Criterios Mínimos y Adicionales en la Validación de Métodos Analíticos*

En la tabla V, se resumen las pruebas sugeridas para la validación de métodos analíticos, los parámetros estadísticos utilizados para su evaluación, los criterios mínimos de aceptación recomendados y los criterios adicionales.

Se ha determinado que durante la validación de un método analítico, es siempre importante considerar la aplicación del criterio del analista considerando factores relacionados con el o los principios activos, concentraciones, forma farmacéutica, tipo de muestra, método de análisis, propósito de la técnica analítica, instrumentación, sustancias relacionadas etc.<sup>24-32</sup>

#### *4.11 Adecuación del Sistema Cromatográfico*<sup>13,24</sup>

Es un término utilizado en los últimos años para describir a una serie de parámetros cromatográficos mínimos bajo las cuales se deberá efectuar el análisis de un principio activo y deberán establecerse durante el desarrollo del método analítico, mantenerse durante su validación y posteriormente cada vez que se haga uso de ese método analítico. La adecuación del sistema se usa para verificar que la resolución y reproducibilidad de un sistema cromatográfico sea el adecuado para el análisis que se efectuará y deberán determinarse con el pico de interés. Actualmente, estas condiciones se especifican en muchos de los métodos descritos en las farmacopeas y los equipos de cromatografía recientes incluyen en sus programas, las fórmulas de cálculo para evaluarlos automáticamente si se requieren. Estos parámetros se describen a continuación

Eficiencia de la columna (N): Se evalúa como el número de platos teóricos y es un valor específico para cada principio activo. Este parámetro se deberá establecer como un valor mínimo requerido y que corresponderá al encontrado durante la validación del método analítico. Se deberá especificar principalmente cuando hay un sólo pico de interés en el cromatograma y se podrá calcular con la fórmula siguiente:

$$N = 16(t/W)^2$$

Donde N es el número de platos teóricos de la columna, t es el tiempo de retención y W es el ancho del pico en su base

Resolución (R): Es una función de la eficiencia de la columna y es una medida del grado de separación entre cada uno de los picos eluidos para establecer el poder de resolución general del sistema y para medir la resolución entre el estándar interno y el principio activo. Puede calcularse con la siguiente fórmula para dos picos cromatográficos:

$$R = 2(t_2 - t_1) / (W_1 + W_2)$$

Donde:  $t_1$  y  $t_2$  son los tiempos de retención respectivos para los picos 1 y 2.  $W_1$  y  $W_2$  son los anchos de los picos 1 y 2, respectivamente, en su base.

Precisión (C.V.): Evalúa la repetibilidad entre inyecciones del sistema calculando la desviación estándar relativa de 5 inyecciones repetidas cuando el límite establecido es 2.0% o menor y con 6 inyecciones cuando el límite es mayor a 2.0%.

Factor de Coleo (T): Se refiere a la asimetría del pico y es un parámetro que puede afectar la repetibilidad entre cada inyección si el pico presenta demasiado coleo. El valor ideal para este parámetro es de 1, que correspondería a un pico perfectamente simétrico. El valor límite aceptado es de no más de 2.0; sin embargo, este parámetro podrá establecerse de acuerdo a los resultados obtenidos en la validación. Se calcula de la siguiente manera

$$T = W_{0.05} / 2f$$

Donde  $W_{0.05}$  es el ancho del pico al 5% de su altura y f la distancia del centro del pico al borde frontal del mismo, determinados al 5% de su altura.

TABLA V. Evaluaciones Recomendadas para la Validación de Métodos Analíticos

DETERMINACIÓN	FORMA DE EVALUARLA	CRITERIOS MINIMOS DE ACEPTACIÓN	CRITERIOS ADICIONALES
LINEALIDAD DEL SISTEMA	Construyendo curva de calibración (concentración contra respuesta) utilizando cuando menos 5 diluciones a partir de una solución patrón y preparando cada dilución cuando menos por duplicado	$r \geq 0.99$ , $r^2 \geq 0.98$ $C.V. \leq 1.5\%$ para métodos cromatográficos	$b \approx 0$ ; el intervalo de confianza para $b$ deberá incluir al cero, efectuar prueba de hipótesis para $b$
PRECISION DEL SISTEMA	Preparando por lo menos 6 diluciones de la concentración seleccionada como 100% la cual es la concentración de la muestra en la solución final que proporciona una respuesta adecuada.	$C.V. \leq 15\%$ cromatográficos	
LINEALIDAD DEL METODO	A partir de placebos adicionados de cuando menos 3 diferentes cantidades de la sustancia de interés cada uno de manera independiente haciendo el análisis por triplicado	$m \approx 1$ ; $b \approx 0$ ; $r \geq 0.99$ ; $r^2 \geq 0.98$	El intervalo de confianza para $b$ deberá incluir al cero y el de la pendiente al 1, pruebas de hipótesis.
EXACTITUD DEL METODO	Expresando los valores de linealidad de método como porcentaje recuperado	C.V. con mismos valores que para repetibilidad y un promedio de recobro de 98-102% para métodos Cromatográficos	promedio recuperado > 100%. El intervalo de confianza deberá incluir al 100%, Prueba de hipótesis
REPETIBILIDAD AL 100%	Cuando menos con 6 placebos adicionados, preparados de manera independiente con la concentración teórica del 100%	$C.V. \leq 2\%$ Cromatográficos	
REPRODUCIBILIDAD	Analizando una muestra homogénea cercana al 100% de la concentración teórica cuando menos por dos analistas en dos días diferentes por triplicado	$C.V. \text{ total} \leq 2\%$ Cromatográficos	Análisis de varianza
ESPECIFICIDAD	Se efectuará con el placebo del producto a condiciones normales y preparado de la misma manera que la muestra.	Los aditivos no deberán interferir con la cuantificación del activo	
ESPECIFICIDAD EN ESTABILIDAD	Degradando la muestra y materia prima bajo diferentes condiciones hasta entre un 10 y el 30% o adicionando los posibles productos de degradación al placebo además de degradario	Ni los aditivos ni los productos de degradación o sustancias relacionadas, deberán interferir con la cuantificación.	
ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	Comparando los resultados de los análisis iniciales de 3 muestras con los obtenidos de las mismas después de permanecer por un tiempo a diferentes condiciones	El valor de la media para el factor I deberá estar entre 98-102% para métodos cromatográficos	El intervalo de confianza para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye al cero
TOLERANCIA DEL METODO	Analizando muestras bajo condiciones normales y bajo cambios en el pH, modificador orgánico de la fase móvil, temperatura y longitud de onda, además de la eficiencia de la columna.		Entre mayor robustez presente el método mejor
LIMITE DE DETECCION	Se evaluará cuando el método sea utilizado en la detección de trazas haciendo diluciones hasta obtener una respuesta dos veces por arriba del nivel del ruido.		Dependerá del uso del método
LIMITE DE CUANTIFICACION	Se evaluará cuando el método sea utilizado en la cuantificación de cantidades pequeñas		Dependerá del uso del método

## 5. ANALISIS DE VITAMINAS HIDROSOLUBLES POR CLAR

Se han utilizado muchas técnicas para el análisis de vitaminas hidrosolubles en productos farmacéuticos dependiendo del tipo de análisis que se requiera, ya sea para materia prima o en formulaciones. En el primer caso, se han usado incluso métodos por titulación, ya sea con indicador o potenciométricos. Estos métodos no son aplicables al producto terminado por no ser específicos y menos aún para multivitamínicos, solamente el ácido ascórbico se ha cuantificado por titulación con yodo<sup>13</sup> en este tipo de productos y ha demostrado ser indicador de estabilidad. Se han utilizado también métodos fluorométricos o microbiológicos. La técnica de fluorescencia, se ha aplicado al análisis individual de ciertas vitaminas como la tiamina y la riboflavina<sup>13-15</sup> en el control de calidad del producto terminado y los métodos microbiológicos al análisis de ácido fólico, cianocobalamina y pantenol.<sup>12, 14</sup> Estos métodos son específicos, sin embargo, requieren de una buena inversión de tiempo en la preparación de las muestras.

La espectrofotometría visible se ha utilizado en el análisis específico de nicotinamida, ácido fólico<sup>13, 14</sup> y de pantenol en producto terminado después de una reacción que desarrolla color o separación de las impurezas, lo que también requiere una buena inversión de tiempo. La técnica espectrofotométrica ultravioleta, puede aplicarse al análisis de cualquier vitamina pero solamente en materias primas y siempre que se cuente con los respectivos estándares de referencia primarios, la nicotinamida es una de ellas y para la vitamina B<sub>12</sub> se sugiere un método espectrofotométrico en la región visible para materia prima.<sup>14</sup>

La nicotinamida y el pantenol se han analizado por cromatografía de gases utilizando agentes derivatizantes para hacerlas más volátiles, elevando el costo y complejidad del análisis, por esta técnica se ha descrito también el análisis de ácido ascórbico y piridoxina, requiriendo también la formación previa de derivados silanizados: La derivatización requiere de un control especial para lograr la formación cuantitativa del derivado y evitar su hidrólisis por efecto de la humedad. Los reactivos resultan además caros.

La polarografía, electroforésis y cromatografía en capa delgada, constituyen otras de las técnicas utilizadas en el análisis de vitaminas hidrosolubles.

Ninguna de las técnicas anteriores, ha satisfecho completamente los requerimientos necesarios en el análisis de productos multivitamínicos para el control de calidad o estudios de estabilidad, ya que los métodos de análisis utilizados al aplicar estas técnicas son complicados, requieren de una gran inversión de tiempo, son inexactos o no cuentan con la especificidad adecuada. Actualmente, la técnica de mayor uso es la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) ya que puede permitir la determinación simultánea de varias vitaminas hidrosolubles aún en formulaciones complejas y con un mínimo tratamiento de la muestra, la técnica puede ser capaz además de separar las vitaminas de las posibles interferencias presentes en la formulación, de sus derivados, compuestos relacionados y de sus posibles productos de degradación. Los métodos que se han descrito para esta técnica incluyen separaciones en fase normal, por intercambio iónico y por supresión iónica, pero la forma más utilizada es la separación en fase inversa formando un par iónico con las sales de sodio del ácido alquilsulfónico (etilsulfonato, pentanosulfonato, hexanosulfonato, heptanosulfonato y octanosulfonato de sodio) a una concentración entre 0.005 y 0.02M<sup>24</sup> en medio ácido utilizando una columna ODS y un detector ultravioleta. Con menos frecuencia se ha descrito el uso de detectores de fluorescencia y electroquímicos. Otra opción es el uso de gradiente en la separación de los compuestos de interés

Se ha reportado el análisis simultáneo por CLAR de niacina, niacinamida, piridoxina, tiamina y riboflavina en tabletas multivitamínicas utilizando una columna octadecilsilano (C18), un detector ultravioleta a 270 nm, flujo de 0.5 mL/min y como fase móvil una mezcla 25/75 de metanol con una solución de hexanosulfonato de sodio 0.005M en agua y 1% v/v de ácido acético. El método es capaz de separar la niacina de la niacinamida.<sup>7</sup>

Se ha comparado también el uso de columnas amino (NH<sub>2</sub>) y de octadecilsilano (C18) en el análisis simultáneo de piridoxina, riboflavina, nicotinamida, vitamina B<sub>12</sub>, tiamina, ácido ascórbico, niacina y ácido fólico, estudiando además el efecto de las proporciones agua metanol, el pH, la adición de varias sales, soluciones amortiguadoras y reactivos de par iónico en la resolución.<sup>17</sup> En una columna C18 y con mezclas agua-metanol como fase móvil, los tiempos de retención para cada vitamina depende de su polaridad, eluyendo en el siguiente orden ácido ascórbico, piridoxina, riboflavina, vitamina B<sub>12</sub> y nicotinamida, los tiempos de retención de estas vitaminas disminuyen al aumentar la proporción de metanol, no se ven afectados significativamente para las vitaminas más polares y la tiamina no eluye. La proporción que ha dado mejores resultados

es (70:30) Se ha adicionado KCl y  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  y reactivos de par iónico a las fases móviles para lograr una mejor separación de las vitaminas.

Un problema frecuente es la separación del ácido ascórbico de la nicotinamida, ya que tienen tiempos de retención semejantes, la tiamina requiere necesariamente la presencia de reactivos par iónico del tipo sales de ácido hexanosulfónico para eluir, la riboflavina y vitamina B<sub>12</sub> en general presentan largos tiempos de retención con la posibilidad de presentar división del pico, la solución puede ser el aumento en la proporción de metanol. La dificultad más frecuente para el análisis de nicotinamida es la separación de la piridoxina, del ácido ascórbico y del ácido fólico, pero puede aumentarse la resolución con el uso de reactivos par iónico o fosfatos. El ácido fólico es una de las vitaminas que llega a presentar mayores problemas en su análisis, requiere de un medio básico para eluir y llega a tener el mismo tiempo de retención que la nicotinamida, pero puede separarse con el reactivo par iónico mencionado ya para otras vitaminas o con fosfatos.<sup>12, 17</sup>

En métodos por gradiente se han podido separar y analizar hasta 12 vitaminas utilizando fase inversa, una columna C18 y una fase móvil con fosfatos y pH 2.6 en agua metanol.<sup>5, 12</sup>

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las vitaminas actúan como grupos prostéticos en diversas etapas del metabolismo y generalmente se presentan carencias múltiples o la ausencia de una provoca deficiencia en otra, por lo que siempre se hace necesaria la formulación de productos multivitamínicos en diversas formas farmacéuticas. Junto con esto, se hace también necesario el desarrollo de los métodos analíticos para cuantificar las vitaminas presentes en los productos.

Se requiere el desarrollo de los métodos analíticos para diversas formulaciones vitamínicas, estos productos tienen diferentes mezclas de vitaminas a concentraciones diferentes y en diversas formas farmacéuticas, como soluciones orales, tabletas, cápsulas de gelatina dura e inyectables para uso humano o veterinario, algunos incluso con presencia de otros principios activos como el hierro en forma de citrato férrico amoniacal y de otros minerales como el calcio, el magnesio, sodio y potasio en forma de glicerofosfatos y en otra situación con presencia de aminoácidos como lisina, triptofano, fenilalanina y valina, además de los aditivos característicos de cada forma farmacéutica como los conservadores, edulcorantes, saborizantes y colorantes, teniendo por lo tanto una diversidad en la complejidad de las formulaciones.

Existen gran cantidad de métodos para cuantificar vitaminas hidrosolubles por diversas técnicas analíticas como las volumétricas, espectrofotométricas, fluorométricas y microbiológicas, pero su aplicación generalmente requiere de un tratamiento previo y prolongado de la muestra, resultando métodos caros y laboriosos que requieren una gran inversión de tiempo. Por estas técnicas, comúnmente se analizan de manera individual cada vitamina en caso de poder aplicarlas al análisis del producto terminado ya que pueden no ser específicas y pueden presentarse interferencias durante el análisis.<sup>2, 13, 18</sup>



Las técnicas cromatográficas tienen mayor especificidad, pero también pueden requerir tiempos de análisis prolongados si se utiliza cromatografía en capa delgada o reactivos derivatizantes caros en el caso de la cromatografía de gases <sup>3</sup>

La aplicación de las técnicas anteriores, resulta complicada, requieren tiempos prolongados de análisis, son inexactos o no cuentan con la especificidad adecuada.

Por lo anterior, se hace necesario el desarrollo y validación de métodos analíticos sencillos, aplicables a los productos de interés siguientes: solución multivitamínica oral con minerales, solución multivitamínica inyectable con hierro, solución multivitamínica inyectable con aminoácidos, gotas multivitamínicas orales, solución multivitamínica oral, cápsulas multivitamínicas y tabletas, proponiéndose para la cuantificación de las vitaminas hidrosolubles la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución.

## IV. OBJETIVOS

### *Objetivo General*

Desarrollar y validar métodos analíticos para vitaminas hidrosolubles en productos multivitamínicos por Cromatografía de Líquidos de alta Resolución utilizando fase inversa

### *Objetivos Específicos*

1. Desarrollar métodos de análisis para la cuantificación de diferentes vitaminas hidrosolubles: Clorhidrato de Tiamina, Clorhidrato de Piridoxina, Nicotinamida, Riboflavina-5-fosfato, Acido fólico y Cianocobalamina en diferentes formulaciones vitamínicas con diversas formas farmacéuticas por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, para el control de calidad de los productos.
2. Validar los métodos analíticos desarrollados para los productos vitamínicos, evaluando: linealidad del sistema, linealidad del método, precisión y exactitud del método, especificidad y reproducibilidad.

## V. HIPOTESIS

Debido a que la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es una técnica que permite la separación de mezclas complejas en base a la versatilidad de la fase móvil y tipos de materiales de empaque posibles de utilizar en la columna, y considerando además que las diferentes estructuras químicas de las vitaminas les confieren diferentes características de polaridad entre sí, será posible la separación y el análisis cuantitativo de las vitaminas hidrosolubles en las diversas formulaciones multivitamínicas y formas farmacéuticas por esta técnica cromatográfica utilizando fase inversa. Así mismos, los métodos analíticos serán precisos, exactos, reproducibles y específicos, para poder ser utilizados en el control de calidad de los productos que se encuentran en diversas formas farmacéuticas

## VI. METODOLOGIA

### 1. REACTIVOS Y DISOLVENTES

- Metanol HPLC Merck.
- Acetonitrilo HPLC Merck.
- Metanol Absoluto Merck.
- Etanol Absoluto Merck.
- Fosfato de potasio monobásico J.T. Baker.
- Fosfato de potasio dibásico J.T. Baker.
- Fosfato de sodio dibásico J.T. Baker.
- Acido fosfórico Merck.
- Hidróxido de sodio J.T. Baker.
- Hexanosulfonato de sodio Sigma.
- Heptanosulfonato de sodio Sigma.
- Octanosulfonato de sodio Sigma.
- Acido acético glacial Merck.
- Hidróxido de potasio J.T. Baker.

### 2. MATERIAL

- Vasos de precipitado pyrex de 100 y 250 mL
- Pipetas volumétricas tipo "A" pyrex de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 mL
- Matraces volumétricos pyrex tipo "A" de baja transmitancia de 25, 50 y 100 mL
- Matraces Kitazato de 1000 mL
- Jeringas de vidrio Hamilton microliter número 802 de 10 microlitros y jeringas de vidrio de 10 mL
- Embudo de filtración para fase móvil Millipore de 250 mL modelo XX1004703

- Membranas tipo HVLP de 0.45 micras de tamaño de poro Millipore de 13 y 47 mm de diámetro.
- Papel filtro Whatman no. 1, 2, 4 y 5, embudos de filtración

### **3. EQUIPO**

#### **a) Cromatógrafo de líquidos de alta resolución equipado con:**

- Detector de onda variable programable Waters modelo 490E, número de serie 490-005036.
- Bomba y módulo controlador de disolventes Waters modelo 600, número de series 000F00955 y C01274.
- Inyector manual de loop variable Waters modelo U6K, número de serie U6K-028471.
- Integrador Hewlett-Packard modelo 3396 A, número de serie 2841P00916.

#### **b) Cromatógrafo de líquidos de alta resolución equipado con:**

- Detector de onda fija Waters modelo 440, número de serie 440-01468
- Bomba Waters modelo 6000 A, número de serie SDS 5619
- Integrador Hewlett-Packard modelo 3390 A, número de serie 2149A09581
- Inyector manual Rheodyne de loop fijo modelo 7010, sin número de serie

#### **c) Cromatógrafo de líquidos de alta resolución equipado con:**

- Sistema de bombeo Beckman modelo System Gold 126, número de serie 366-1418
- Detector de arreglo de diodos Beckman modelo System Gold 168, no de serie 226-1508
- Inyector automático Beckman modelo System Gold 507 e, no. de serie 6573
- Computadora Compaq con programa System Gold.

#### **d) Espectrofotómetro ultravioleta-visible, Beckman DU- 65 número de serie 4290523**

#### **e) Columnas:**

- Columna Novapack C18 de 4 micras de tamaño de partícula, 3.9 mm de diámetro interno, 15 cm de longitud, marca Waters.
- Columna  $\mu$  Bondapack C18 de 10 micras de tamaño de partícula, de 3.9 mm de diámetro interno y 30 cm de longitud, marca Waters.
- Columna ODS Ultrasphere de 5 micras de tamaño de partícula, de 4.6 mm de diámetro interno y 25 cm de longitud, marca Beckman.

- Columna Lichro cart RP18 de 5 micras de tamaño de partícula, de 4.6 mm de diámetro interno y 25 cm de longitud, marca Merck
  - Columna Ultracarb (20) de 5 micras de tamaño de partícula, de 4.6 mm de diámetro interno y 25 cm de longitud.
- f) Baño ultrasónico Cole-Parmer, modelo 8853, número de serie 8853-20
- g) Parrilla de calentamiento y agitación Thermolyne Multi-Stir plate 4 Sybron Thermolyne, modelo SP-13025, serie 8879.
- h) Potenciómetro Beckman modelo  $\phi$  40 con electrodo de calomel-vidrio número de serie 0157487.
- i) Bomba de vacío Millipore Waters modelo 008-8957-AA, serie 1989

#### 4. FORMULACIONES ANALIZADAS

##### Producto A

##### SOLUCION MULTIVITAMINICA ORAL CON MINERALES (USO VETERINARIO)

<b>Ingrediente</b>	<b>Cantidad por 100 mL</b>
Clorhidrato de tiamina	70 000 mg
Clorhidrato de piridoxina	10 000 mg
Nicotinamida	140.000 mg
Riboflavina-5-fosfato sódica	14.000 mg
Sulfato de mefentermina	66 700 mg
Glicerofosfato de calcio	500 000 mg
Glicerofosfato de sodio	720.000 mg
Glicerofosfato de manganeso	50.000 mg
Glicerofosfato de potasio	100.000 mg
Vehículo c.b.p.	100 000 mL

## Producto B

### SOLUCION MULTIVITAMINICA INYECTABLE CON HIERRO (USO VETERINARIO)

<b>Ingrediente</b>	<b>Cantidad por 100 mL</b>
Clorhidrato de tiamina	10.000 mg
Clorhidrato de piridoxina	5.000 mg
Nicotinamida	100.000 mg
Riboflavina-5-fosfato	2.000 mg
Dexpantenol	5.000 mg
Citrato férrico amoniacal	7.500 mg
Sulfato de mefentermina	6.000 mg
Vehículo c.b.p.	100.000 mL

## Producto C

### SOLUCION MULTIVITAMINICA INYECTABLE CON AMINOACIDOS (USO VETERINARIO)

<b>Ingrediente</b>	<b>Cantidad por 100 mL</b>
Clorhidrato de tiamina	20.000 mg
Clorhidrato de piridoxina	20.000 mg
Nicotinamida	100.000 mg
Riboflavina-5-fosfato	8.000 mg
Dexpantenol	8.000 mg
Fenilalanina	3.680 mg
Triptofano	3.680 mg
Valina	2.640 mg
Hipofosfito de magnesio	720.000 mg
Gluconato de calcio	24000.000 mg
Vehículo c b p	100.000 mL

### Producto D

#### GOTAS MULTIVITAMINICAS ORALES (USO HUMANO)

<b>Ingrediente</b>	<b>Cantidad por 100 mL</b>
Clorhidrato de tiamina	1.000 g
Clorhidrato de piridoxina	0.500 g
Monoclorhidrato de l-lisina	30.000 g
Vehículo c.b.p.	100.000 mL

### Producto E

#### SOLUCION MULTIVITAMINICA ORAL (USO HUMANO)

<b>Ingrediente</b>	<b>Cantidad por 100 mL</b>
Clorhidrato de tiamina	0.200 g
Clorhidrato de piridoxina	0.100 g
Monoclorhidrato de l-lisina	9.600 g
Citrato férrico amoniacal	3.000 g
Vehículo c.b.p.	100.000 mL

### Producto F

#### CAPSULAS MULTIVITAMINICAS (USO HUMANO)

<b>Ingrediente</b>	<b>Cantidad por Cápsula</b>
Acido fólico	0.200 mg
Cianocobalamina	0.100 mg
Acido ascórbico	221.450 mg
Sulfato ferroso monohidratado	152.000 mg
Excipiente c.b.p.	1 capsula



## Producto G

### TABLETAS DE ACIDO FOLICO (USO HUMANO)

<b>Ingrediente</b>	<b>Cantidad por Tableta</b>
Acido fólico	0.2 mg
Excipiente c.b.p.	1 tableta

## **5. METODO**

### *5.1 Desarrollo del Sistema*

Establecer los sistemas cromatográficos, entendiéndose como tal, la elección de las condiciones óptimas para la separación de las vitaminas de interés en cada formulación, como: características y tipo de columna, velocidad de flujo, el volumen de inyección, la composición de la fase móvil, la temperatura de la columna, la longitud de onda del detector, las concentraciones de trabajo de las vitaminas, los disolventes utilizados para la preparación de las soluciones de vitaminas, etc. Trabajar con las sustancias o principios activos puros, para este efecto, se prepararán las siguientes soluciones:

Solución de cada vitamina en forma individual en agua destilada, metanol, acetonitrilo o mezclas e inyectar al cromatógrafo de líquidos.

#### Solución patrón de vitaminas

Preparar una solución mezcla de las vitaminas presentes en el producto para el que se desarrollará el método, a una concentración perfectamente conocida en agua destilada, metanol acetonitrilo o mezclas e inyectar al cromatógrafo de líquidos a las condiciones elegidas para iniciar el desarrollo en base al análisis de la revisión bibliográfica. Las concentraciones se podrán elegir también de acuerdo a lo reportado en la bibliografía.

## 5.2 Desarrollo del Método

Aplicar el sistema establecido a un producto en particular, trabajar con placebos adicionados y establecer el tratamiento que se dará a la muestra como tiempo y tipo de agitación, temperatura de calentamiento, forma de separación de aditivos insolubles ya sea por filtración o centrifugación, buscar el disolvente óptimo para la extracción cuantitativa de los activos de la matriz de aditivos evitando en lo posible la disolución de aquellos que pudieran deteriorar la columna, ensuciar la celda del detector o interferir en la cuantificación. En esta etapa, se trabajará con las siguientes soluciones:

**Solución estándar de referencia:** Preparar una solución mezcla con concentraciones perfectamente conocidas de cada una de las vitaminas de interés en agua, metanol, acetonitrilo o mezclas. Preparar también soluciones con cada vitamina individual.

**Solución muestra:** Preparar una solución a partir de muestra a analizar de tal manera que tenga la misma concentración de vitaminas que la solución estándar.

**Recobro adicionado:** Preparar una solución con el equivalente de placebo total del producto y adicionando cantidades perfectamente conocidas y equivalentes de cada vitamina de acuerdo a la concentración de la solución estándar y su concentración en el producto final. Tratar de la misma manera que la solución muestra.

**Solución placebo.** Preparar una solución a partir del equivalente utilizado para la preparación del recobro adicionado y tratarlo de la misma manera.

Injectar al cromatógrafo de líquidos a las condiciones cromatográficas establecidas previamente.

## 5.3 Validación

Evaluar la linealidad del sistema, para cada una de las vitaminas de interés en cada producto, especificidad, repetibilidad en la concentración al 100%, linealidad del método, exactitud del método, repetibilidad del método al 100% y reproducibilidad.

**LINEALIDAD DEL SISTEMA.** A partir de una solución patrón de las vitaminas, preparar soluciones a diferentes concentraciones correspondientes al 40, 60, 80, 100 y 120% de la

concentración establecida como el 100% en el desarrollo del método. Preparar por sextuplicado el nivel del 100% y los demás niveles por triplicado. Inyectar cada solución al cromatógrafo de líquidos a las condiciones establecidas para cada método y determinar la respuesta de cada vitamina (área del pico) En la tabla VI se establecen las concentraciones correspondientes al 100% por probar para cada vitamina en cada producto.

Efectuar el análisis de regresión lineal calculando la ordenada al origen, el coeficiente de correlación, el coeficiente de determinación, el intervalo de confianza y la prueba de hipótesis para la ordenada al origen.

**TABLA VI. Concentraciones utilizadas para cada Vitamina en la Linealidad del Sistema para cada producto. La concentración indicada corresponde al nivel del 100% y está dada en  $\mu\text{g/mL}$**

VITAMINA	PRODUCTO						
	A	B	C	D	E	F	G
Riboflavina-5-Fosfato	28	16	18				
Nicotinamida	280	400	200				
Piridoxina Clorhidrato	20	20		20	20		
Tiamina clorhidrato	140	40		40	40		
Acido fólico						12	12
Cianocobalamina						30	

A. Solución oral con minerales; B. Solución Inyectable con hierro; C. Solución Inyectable con aminoácidos; D. Gotas orales; E. Solución oral; F. Cápsulas de gelatina dura; G. tabletas

**ESPECIFICIDAD.** Tratar el placebo de las vitaminas evaluadas en cada producto de la misma manera que las muestras y analizarlas a las mismas condiciones para determinar que no existe interferencia para su cuantificación

**LINEALIDAD DEL METODO.** Evaluar a partir de placebos adicionados con cada una de las vitaminas a analizar en cada producto comparando contra una solución estándar de referencia Preparar las soluciones a partir de una solución patrón a los niveles correspondientes al 60, 80, 100, 110 y 120% de la cantidad etiquetada y de acuerdo al procedimiento establecido en el método, por sextuplicado el nivel del 100% y por triplicado los restantes. Calcular los miligramos o microgramos recuperados y efectuar el análisis de regresión lineal

**EXACTITUD DEL METODO.** Determinarla de la misma manera que para linealidad del método pero calculando el % recuperado para cada muestra y nivel en cada vitamina evaluada en el producto. Calcular la media del % recuperado, el intervalo de confianza y efectuar la prueba de hipótesis para la media

**PRECISION DEL METODO.** Evaluarla como repetibilidad y como reproducibilidad

**REPETIBILIDAD.** Determinar la variación existente en los valores del % recuperado de todos los niveles de concentración evaluados y la variación en los 6 valores del nivel correspondiente al 100%, esto a través del coeficiente de variación

**REPRODUCIBILIDAD.** Determinarla analizando un lote de producto terminado por 2 analistas en dos días diferentes. Calcular el coeficiente de variación total

**CRITERIOS DE ACEPTACION.** Los criterios de aceptación establecidos para la validación de los métodos analíticos desarrollados para los diferentes productos vitamínicos se enlistan en la tabla VII

TABLA VII. Parámetros de Validación Evaluados y Criterios de Aceptación establecidos en el trabajo para los Métodos de análisis de vitaminas hidrosolubles

PARAMETRO EVALUADO	FORMA DE EVALUARLO	CRITERIO DE ACEPTACION
<b>LINEALIDAD DEL SISTEMA</b>	<i>Con soluciones del estándar de referencia a diferentes concentraciones</i>	
Ordenada al origen	Calculando <i>b</i>	$b \approx 0$
Intervalo de confianza para la ordenada	Calculando <i>l.C.</i>	Debe incluir al 0
Prueba de hipótesis para la ordenada	Calculando <i>t</i>	$ t_{cal}  \leq t_{tab}$
Coefficiente de correlación	Calculando <i>r</i>	$r \geq 0.99$
Coefficiente de determinación	Calculando $r^2$	$r^2 \geq 0.98$
Repetibilidad al 100%	Calculando <i>C.V.</i>	$C.V. \leq 2\%$
<b>LINEALIDAD DEL METODO</b>	<i>Con placebo adicionados a diferentes niveles</i>	
Ordenada al origen	Calculando <i>b</i>	$b \approx 0$
Intervalo de confianza para la ordenada	Calculando <i>l.C.</i>	Debe incluir al 0
Prueba de hipótesis para la ordenada	Calculando <i>t</i>	$ t_{cal}  \leq t_{tab}$
Pendiente	Calculando <i>m</i>	$m \approx 1$
Intervalo de confianza para la pendiente	Calculando <i>l.C.</i>	Debe incluir al 1
Prueba de hipótesis para la pendiente	Calculando <i>t</i>	$ t_{cal}  \leq t_{tab}$
Coefficiente de correlación	Calculando <i>r</i>	$r \geq 0.99$
Coefficiente de determinación	Calculando $r^2$	$r^2 \geq 0.98$
<b>EXACTITUD DEL METODO</b>	<i>Con placebos adicionados a diferentes niveles expresados en %</i>	
Promedio Recuperado	Calculando el promedio del % recuperado	entre 98% y 102%
Intervalo de confianza para la media	Calculando <i>l.C.</i>	Debe incluir al 100%
Prueba de hipótesis para la media	Calculando <i>t</i>	$ t_{cal}  \leq t_{tab}$
<b>PRECISION DEL METODO</b>	<i>Con placebos adicionados a diferentes niveles expresados en %</i>	
Repetibilidad al 100%	Calculando la covarianza de las 6 muestras correspondientes al 100%	$C.V. \leq 2.5\%$
Repetibilidad total	Calculando la covarianza de las 18 muestras	$C.V. < 2.5\%$
Reproducibilidad	Analizando 3 muestras por 2 analistas y 2 días y calculando la covarianza de las 12 muestras.	$C.V. \leq 2.5\%$
<b>ESPECIFICIDAD DEL METODO</b>	<i>Analizando placebo</i>	
Para Control de Calidad		Ningún aditivo interferirá en la cuantificación del activo

## VII. RESULTADOS

La complejidad de las formulaciones requirió el uso de diversas técnicas analíticas para el análisis de los diferentes principios activos presentes en cada formulación, buscando siempre la simplicidad en el análisis sin sacrificar la exactitud en la cuantificación. Por lo que respecta a las vitaminas, en pocos casos fue posible la aplicación de algún método espectrofotométrico a través de algún desarrollo de color específico con alguna vitamina, por lo que en la mayoría de los casos se aplicó la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución y son los métodos que se describen y discuten en el trabajo.

### 1. DESARROLLO DE LOS METODOS

#### *1.1 Pruebas Preliminares*

##### Espectros de Absorción de las vitaminas

Fue necesario efectuar los espectros de absorción ultravioleta-visible para cada una de las vitaminas analizadas utilizando los disolventes presentes en la fase móvil para identificar los máximos de absorción, los intervalos de longitud de onda donde presentan absorción o existe ausencia de respuesta, para determinar la posibilidad de su cuantificación simultánea o pensar en un análisis independiente usando una sola longitud de onda. Los resultados se muestran en las figuras 5 y 6 En la tabla VIII se resumen los resultados obtenidos de estos espectros de absorción El disolvente para el clorhidrato de tiamina, riboflavina-5-fosfato, clorhidrato de piridoxina, nicotinamida y ácido ascórbico fue una solución de heptanosulfonato de sodio 0.005M en agua metanol acetonitrilo ácido acético glacial (60:20:20:1) La cianocobalamina y la hidroxocobalamina se disolvieron en una mezcla de fosfato de potasio monobásico:metanol en proporción (72: 28 ) ajustando el pH a 6 y el ácido fólico se disolvió en una solución de fosfato de potasio dibásico al 3%

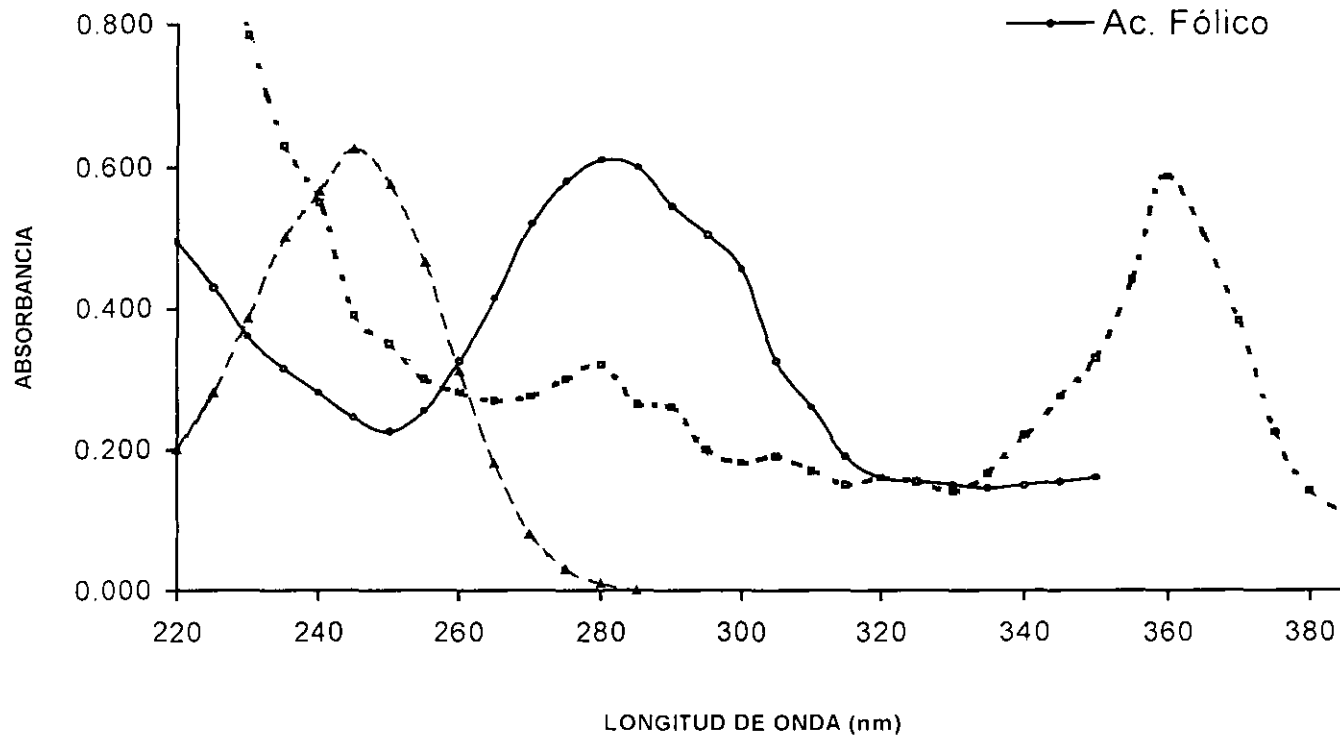


FIGURA 5. Espectros de Absorción Ultravioleta visible para Vitaminas Hidrosolubles

ESPECTROS DE VITAMINAS HIDROSOLUBLES

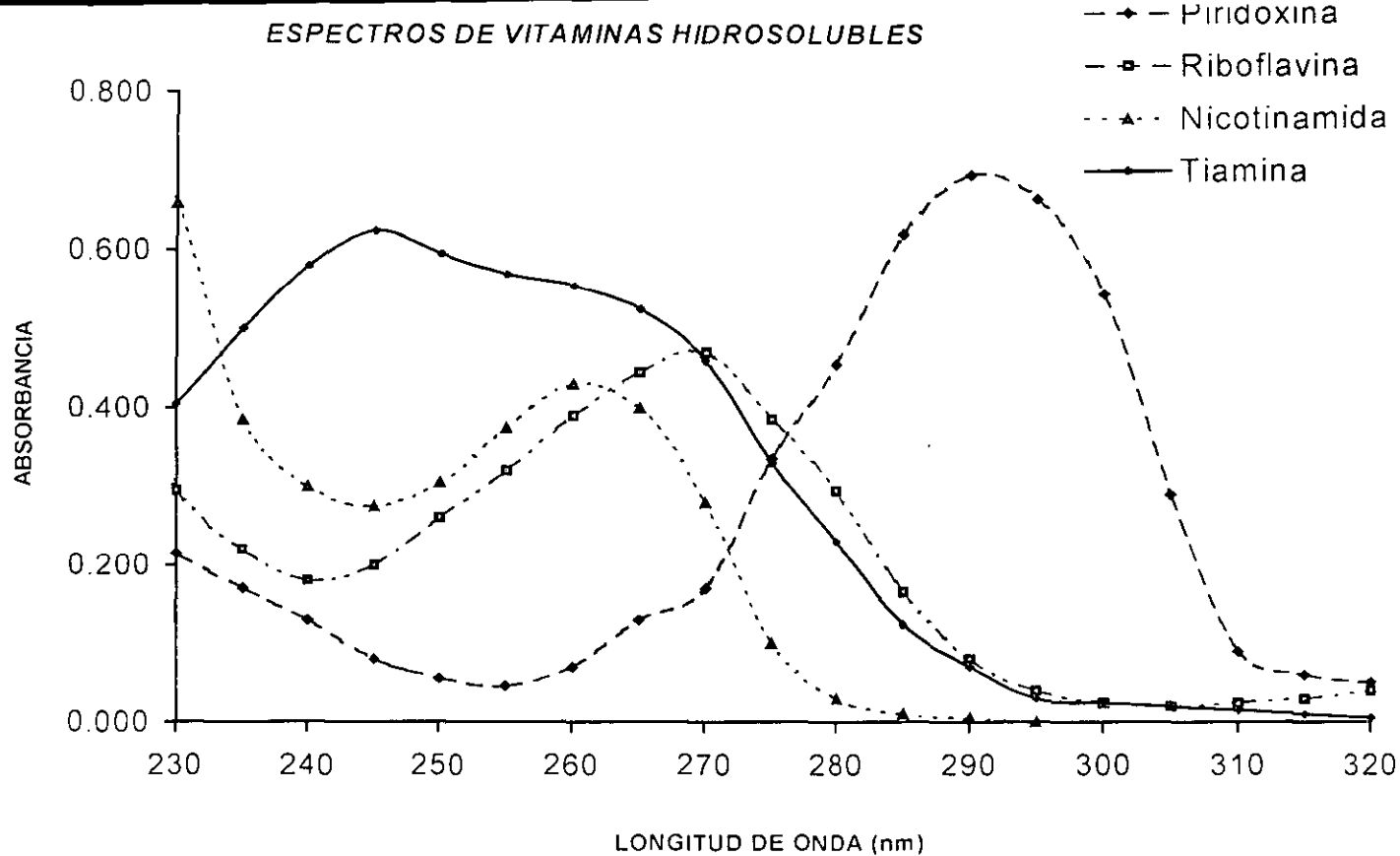


FIGURA 6. Espectros de absorción ultravioleta visible para vitaminas hidrosolubles.



TABLA VIII. Parámetros encontrados en los Espectros de Absorción de las Vitaminas Hidrosolubles

VITAMINA	CONCENTRACION ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$\lambda$ DE MAXIMA ABSORCION (nm)	ABSORBANCIA A LA $\lambda$ DE MAXIMA ABSORCION	OTRAS $\lambda$ CON PICOS DE ABSORCION (nm)	FACTOR DE RESPUESTA A 280 nm
TIAMINA (CLORHIDRATO)	16	245	0.619		12.24
RIBOFLAVINA-5 FOSFATO	8	267	0.469	370 y 445	29.68
PIRIDOXINA (CLORHIDRATO)	16	291	0.693		32.09
NICOTINAMIDA	16	261	0.429		1.30
CIANOCOBALAMINA	30	360	0.587	278 y 306	9.69
HIDROXOCOBALAMINA	30	351	0.523	274 y 478	12.07
ACIDO FOLICO	10	280	0.612	329 y 346	61.20
ACIDO ASCORBICO	12	245	0.659		

## *1.2. Establecimiento de los Sistemas Cromatográficos*

Se efectuaron una serie de pruebas que se consideraron necesarias para conocer el comportamiento de la retención de las vitaminas para posteriormente aplicarlo a la separación en cada producto. Se consideró concluida esta etapa cuando se establecieron las condiciones cromatográficas adecuadas para la separación de las vitaminas, ya sea en forma simultánea o por separado.

### 1.2.1. Efecto de la longitud de onda

Se inyectó una mezcla de vitaminas en solución, a las longitudes de onda de 254, 270 y 280 nm, encontrándose que a 280 nm disminuye el tamaño de los picos de la riboflavina y de la nicotinamida y aumenta el tamaño del pico de la piridoxina, lo cual se consideró conveniente para el análisis simultáneo debido a la alta concentración de nicotinamida en algunas formulaciones con respecto a las otras vitaminas y a la menor concentración de la piridoxina, además de que al utilizar la longitud de onda de 280 nm, disminuirían las posibilidades de interferencia de la mefenamina debido a su intervalo de absorción encontrado (entre 225 y 275 nm). Una razón más para decidir utilizar 280 nm, fue la consideración de que entre mayor lejanía exista del límite del espectro ultravioleta (200 nm aproximadamente), se tiene menor posibilidad de interferencia por otros aditivos. A 254 nm prácticamente no se detecta el pico de la piridoxina.

### 1.2.2. Efecto de la composición de la fase móvil

Se probaron diferentes proporciones de mezclas agua, metanol para evaluar el efecto de la fase orgánica sobre la separación de las vitaminas considerando los tiempos de retención como variable de respuesta, manteniendo constante la concentración de la sal del ácido alquilsulfónico (0.005M) y la proporción de ácido acético (1%). Para esta evaluación, se utilizó una columna C18

Novapack de 15 cm de longitud, 3.9 mm de diámetro interno y 4 micras de tamaño de partícula. La velocidad de flujo utilizada fue de 0.5 mL/min y una longitud de onda de 270 nm. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla IX, utilizando hexanosulfonato de sodio 0.005M presentándose gráficamente el efecto en la figura 7. En la tabla X se muestran los resultados obtenidos con heptanosulfonato de sodio 0.005M

En la tabla XI se muestran los resultados obtenidos con la inclusión del acetonitrilo al utilizar como fase móvil heptanosulfonato de sodio 0.005M en una mezcla de agua metanol acetonitrilo:ácido acético en proporción (75:20:5:1) y flujo de 1 mL/min pero en una columna C18 $\mu$ -Bondapack de 30 cm de longitud, 3.9 mm de diámetro interno, 10 micras de tamaño de partícula (Waters).

### 1.2.3 Efecto del pH

Se determinó el efecto del pH en la separación de las vitaminas, ajustándolo en la fase móvil a los siguientes valores: 3, 4 y 5. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla XII y en la figura 8. Se utilizó una columna C18 Novapack de 15 cm de longitud, 3.9 mm de diámetro interno, 4 micras de tamaño de partícula (Waters) a una longitud de onda de 280 nm y un flujo de 0.8 mL/min

**TABLA IX. Efecto de la Composición de la Fase móvil en la Retención de las Vitaminas (Modificación de la proporción de Metanol) utilizando hexanosulfonato y una columna C18 Novapack de 15 cm de longitud, 3,9 mm de diámetro interno y 4 micras de tamaño de partícula**

FASE MOVIL con ácido acético al 1%	TIEMPOS DE RETENCION (min)				OBSERVACIONES
	Agua:metanol	Piridoxina	Tiamina	Nicotinamida	
(75:25)	3.42	8.05	2.50	2.36	Prácticamente se obtiene el mismo tiempo de retención para Nicotinamida y Riboflavina
(85:15)	4.56	12.53	3.05	3.05	No se separan Nicotinamida y Riboflavina
(90:10)	4.83	13.86	3.10	3.10	No se separan Nicotinamida y Riboflavina

**TABLA X. Efecto de la Composición de la Fase móvil en la Retención de las Vitaminas (Modificación de la proporción de Metanol) utilizando heptanosulfonato en la fase móvil y una columna C18 Novapack de 15 cm de longitud, 3,9 mm de diámetro interno y 4 micras de tamaño de partícula.**

FASE MOVIL con ácido acético al 1%	TIEMPOS DE RETENCION (min)				OBSERVACIONES
	Agua:metanol	Piridoxina	Tiamina	Nicotinamida	
(75:25)	7.36	8.52	3.84	2.74	Muy semejantes los tiempos de retención de Nicotinamida y Riboflavina pero mayores que en tabla IX.
(85:15)	—	12.91	4.70	3.69	Los picos salen muy anchos
(90:10)	12.56	—	4.82, 5.02	3.95, 4.27, 4.90	Aumenta considerablemente el tiempo de retención de la Tiamina, se divide el pico de Nicotinamida y se observan 3 picos para la Riboflavina

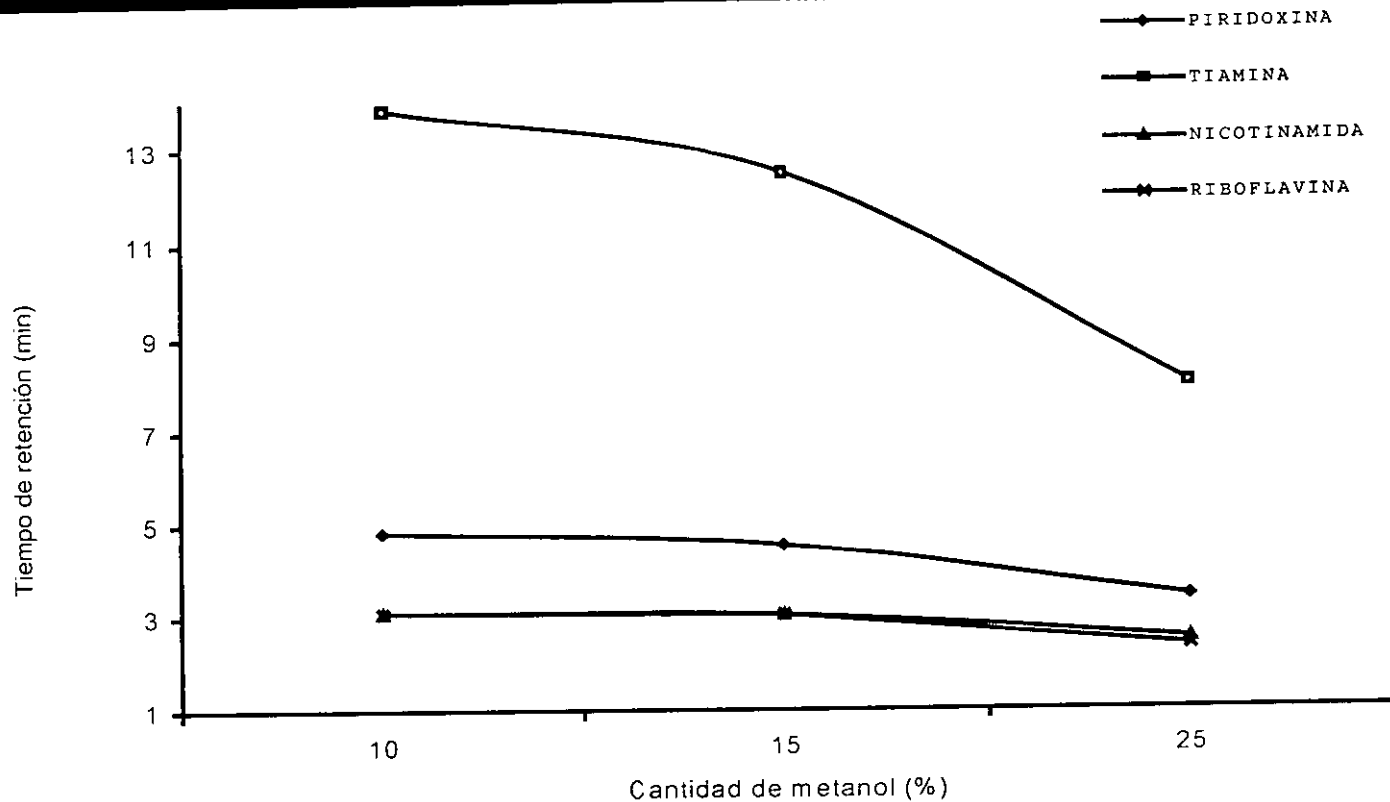


FIGURA 7. Gráfica del efecto de la proporción de metanol en la fase móvil hexanosulfonato de sodio 0.005M en agua:metanol:acético. Se mantuvo constante la concentración del reactivo par iónico en 0.005M y del ácido acético en 1%. Columna C18 Novapack, 15 cm x 3.9 mm, 4 micras; flujo de 0.5 mL/min, 270 nm.

TABLA XI. Efecto del acetonitrilo en la retención de las vitaminas utilizando una columna C18  $\mu$ -Bondapack C18 de 30 cm de longitud, 3.9 mm de diámetro interno, 10 micras de tamaño de partícula (Waters) a 280 nm, flujo de 1 mL/min.

FASE MOVIL	TIEMPOS DE RETENCION (min)				OBSERVACIONES
	Piridoxina	Tiamina	Nicotinamida	Riboflavina	
Heptanosulfonato de sodio 0.005M en agua:Metanol:Acetonitrilo:acético (75:20:5:1)	6.58	16.80	4.76	3.40	No bien separadas las vitaminas, solo la Tiamina, picos anchos, aumentan los tiempos de retención
Hexanosulfonato de sodio 0.005M en agua:Metanol:acético (75:25:1)	7.95	13.47	6.49	6.49	La ausencia de acetonitrilo aumenta el tiempo de retención de la Riboflavina, Nicotinamida y Piridoxina pero no se separan. El hexanosulfonato, disminuye el tiempo de retención de la Tiamina.

TABLA XII. Efecto del pH en la retención de las vitaminas utilizando una columna C18 Novapack de 15 cm de longitud, 3.9 mm de diámetro interno y 4 micras de tamaño de partícula a 280 nm

pH DE LA FASE MOVIL	TIEMPOS DE RETENCION (min)				OBSERVACIONES
	Piridoxina	Tiamina	Nicotinamida	Riboflavina	
Heptanosulfonato de sodio 0.005M en Agua:metanol:acetonitrilo:acético (80:15:5:1)					
pH 3	4.37	30.05	2.25	1.52	Mejor separadas la Riboflavina de la Nicotinamida, bien separada la Piridoxina y muy retrasada la Tiamina
pH 4	2.83	7.77 8.21	1.67	1.67	Disminuye tiempo de retención de la Tiamina pero se divide el pico, se juntan Riboflavina y Nicotinamida se separa bien la Piridoxina
pH 5	2.23	3.21	2.23	1.76	Todas las vitaminas tienden a juntarse, disminuyen los tiempos de retención

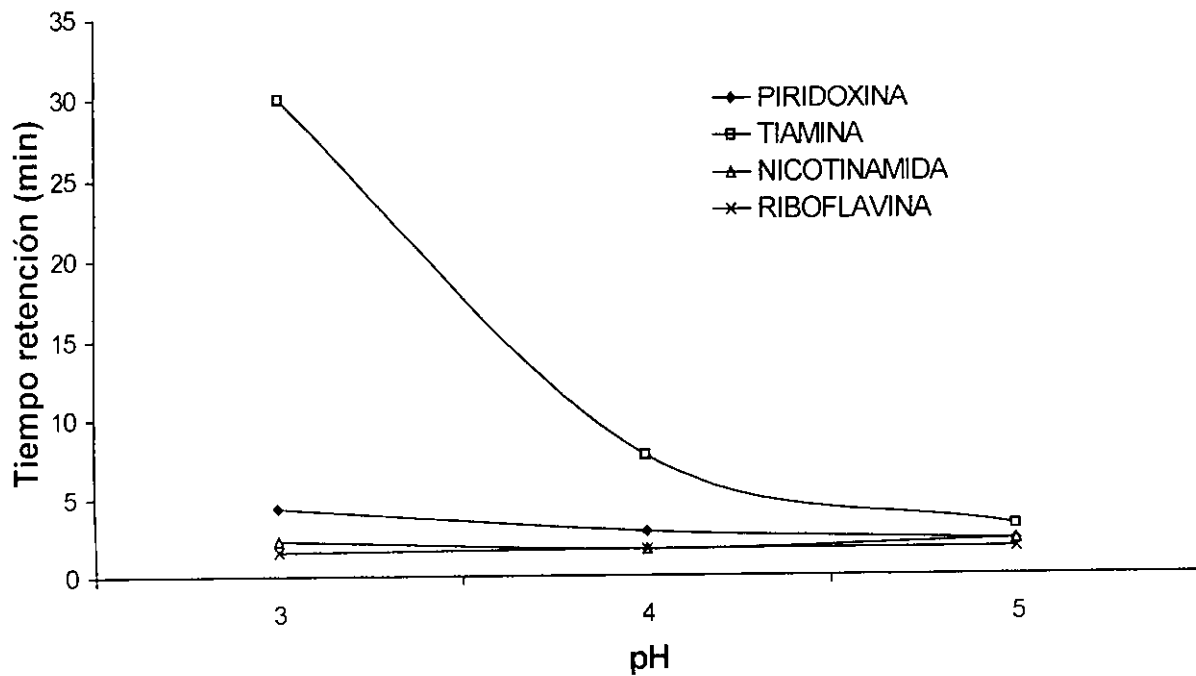


FIGURA 8. Gráfica del efecto del pH en la separación de las vitaminas con heptanosulfonato de sodio 0.005M en agua:metanol:acetonitrilo:acético (80:15:5:1), columna C18 Novapack, 15 cm x 3.9 mm y 4 micras.

#### 1 2 4 Efecto de la mezcla de reactivos formadores del par iónico y de la cadena hidrocarbonada de la sal formadora del par iónico

Se probaron el hexanosulfonato de sodio y el heptanosulfonato de sodio a una concentración 0.005M, por separado, en la fase móvil, encontrándose que con la primera sal no se separaban las vitaminas suficientemente y, que con la otra, se retenían demasiado al utilizar una proporción acuosa/orgánica tal que separara la riboflavina y nicotinamida, por lo que se probaron mezclas de ambos reactivos manteniendo la concentración total en 0.005M. Los resultados se muestran en la tabla XIII y en la figura 9. El efecto de la longitud de la cadena hidrocarbonada se observa en la tabla XIV y en la figura 10.

#### 1 2 5 Efecto de la concentración del par iónico

Se evaluó también la concentración de la sal formadora de par iónico en la separación de las vitaminas. Los resultados se encuentran en la tabla XV.

#### 1 2 6 Efecto de la utilización de sales de fosfatos.

Una alternativa probada para retener la riboflavina-5-fosfato y separarla de las otras vitaminas fue la utilización de una solución de fosfatos a pH de 3 y 3.5 en mezcla con metanol. Los resultados se muestran en la tabla XVI.

#### 1 2 7 Efecto de las características de la columna.

Se inyectaron también las vitaminas en diferentes columnas con longitudes de 15, 25 y 30 cm, tamaños de partícula de 4, 5 y 10 micras y diámetros internos de 3.9 y 4.6 mm. Los resultados se encuentran en las tablas IX a XVI. Pero cabe aclarar que aunque este estudio con diferentes columnas no fue realizado de acuerdo a un diseño experimental, brinda información importante acerca del efecto de las características de la columna en la separación de las vitaminas.



TABLA XIII. Efecto de la utilización de la mezcla hexanosulfonato de sodio, heptanosulfonato de sodio utilizando una columna ODS, de 25 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno, 5 micras de tamaño de partícula a 280 nm y 1 mL/min.

FASE MOVIL	TIEMPOS DE RETENCION (min)				OBSERVACIONES
	Piridoxina	Tiamina	Nicotinamida	Riboflavina	
Agua:metanol acetónitrilo:acético (65:25:10:1) con:					
Heptanosulfonato de sodio 0.001M y Hexanosulfonato de sodio 0.004M	3.98	7.01	3.04	2.37	Se obtienen picos simétricos, separados entre si y de los conservadores cuyos tiempos de retención corresponden a 11.08 y 11.64 minutos.
Heptanosulfonato de sodio 0.003M y Hexanosulfonato de sodio 0.002M	4.69	12.10	3.34	2.30	Tienden aumentar los tiempos de retención.
Heptanosulfonato de sodio 0.004M y Hexanosulfonato de sodio 0.001M	5.32	15.32	3.48	2.33	Aumentan tiempos de retención. Adecuada separación de las vitaminas sin interferencia del placebo, se observan en este último dos grandes picos con tiempos de retención muy semejantes a los 13.50 y 14.29 y otro muy pequeño a los 1.96 que no interfiere con el tiempo de retención de la Riboflavina pero los picos mayores identificados como sorbato de potasio y benzoato de sodio tienen casi el mismo tiempo de retención que la tiamina y no alcanzan a separarse

TABLA XIV. Efecto de la longitud de la cadena hidrocarbonada en el reactivo del par iónico en Columna C18 Novapack de 15 cm de longitud, 3.9 mm de diámetro interno y 4 micras de tamaño de partícula.

FASE MOVIL	TIEMPOS DE RETENCION (min)				OBSERVACIONES
	Piridoxina	Tiamina	Nicotinamida	Riboflavina	
Agua: metanol (75:25) con:					
Hexanosulfonato 0.005M	3.42	8.05	2.50	2.36	Semejantes los tiempos de retención para nicotinamida y riboflavina.
Heptanosulfonato 0.005M	7.36	8.52	3.84	2.74	Aumentan tiempos de retención.

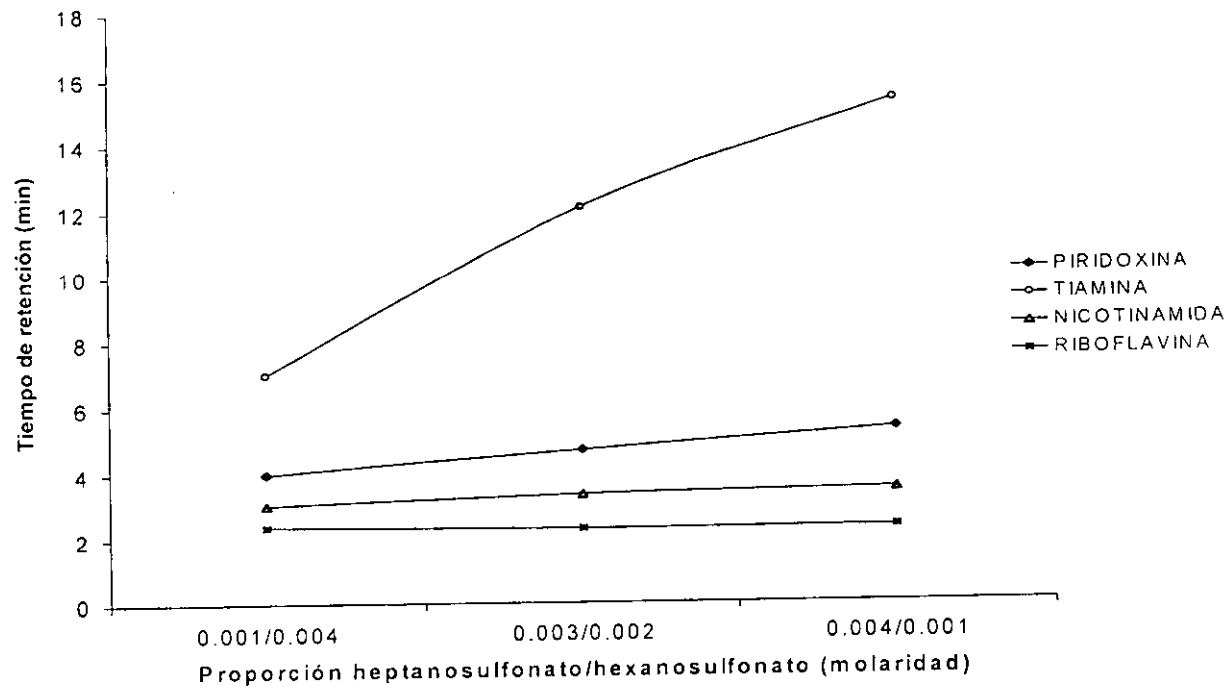


FIGURA 9. Gráfica del efecto de la mezcla heptanosulfonato/hexanosulfonato de sodio en la separación de las vitaminas

TABLA XV. Efecto de la concentración del hexanosulfonato de sodio en la retención de las vitaminas utilizando una columna ODS Ultrasphere de 25 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno, 5 micras de tamaño de partícula (Beckman) a una longitud de onda de 280 nm

FASE MOVIL	FLUJO (mL/min)	TIEMPOS DE RETENCION (min)				OBSERVACIONES
		Piridoxina	Tiamina	Nicotinamida	Riboflavina	
Agua:metanol:acético (65:35:1) con						
hexanosulfonato de sodio 0.008M	1.3	4.02	9.95	2.71	2.25	Tiempos de retención semejantes para la Riboflavina y Nicotinamida
hexanosulfonato de sodio 0.004M	1.3	4.00	9.99	2.71	2.10	Tiempos de retención semejantes para la Riboflavina y Nicotinamida

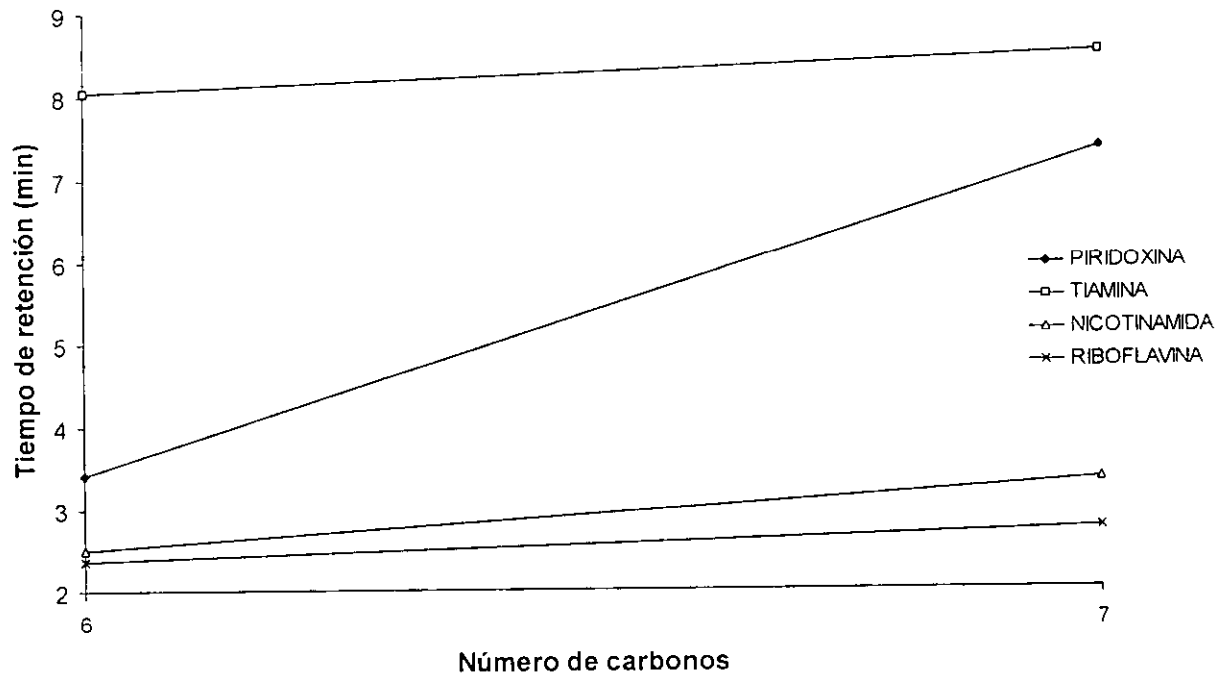


FIGURA 10. Efecto de la longitud de la cadena hidrocarbonada en la sal del ácido alquilsulfónico en la retención de las vitaminas. Se utilizó hexanosulfonato y heptanosulfonato de sodio 0.005M.

**TABLA XVI. Retención de las vitaminas utilizando soluciones amortiguadoras de fosfatos y una columna C18 Novapack de 15 cm de longitud, 3.9 mm de diámetro interno, 4 micras de tamaño de partícula (Waters) a 280 nm.**

FASE MOVIL	FLUJO (mL/min)	TIEMPOS DE RETENCION (min)				OBSERVACIONES
		Piridoxina	Tiamina	Nicotinamida	Riboflavina	
Fosfato de potasio 0.15M: Metanol (75.25) pH 3.5	0.8	1.42	1.50	2.23	4.52	Se retiene y se separa bien la Riboflavina de la otras vitaminas. su tiempo de retención es mayor que en los sistemas con heptanosulfonato de sodio. Los tiempos de retención de las otras vitaminas son muy cortos y prácticamente no se separan entre ellas, tienen tiempos de retención menores que la Riboflavina, incluso la Tiamina. El sistema es interesante porque podría utilizarse en la cuantificación individual de la Riboflavina en presencia de otras vitaminas
Fosfato de potasio 0.05M: metanol (65.35) pH 3	1	0.99	0.99	0.99	2.95	Salen juntos 2 derivados de la Riboflavina. Las otras vitaminas no se retienen.
Fosfato de potasio 0.05M metanol (85.15) pH 3	1	1.01	1.01	1.01	12.05	Bien separada la Riboflavina-5-fosfato de los otros fosfatos
Fosfato de potasio 0.05M metanol (15.85) pH 3	1				3.49	Tiempo de retención corto, no se separan las Riboflavinas, ya no se inyectaron las otras vitaminas

### *1.3 Establecimiento de los Métodos*

#### 1.3.1 Tratamiento de las muestras

Después del establecimiento de los sistemas cromatográficos considerando los efectos de las pruebas anteriores para lograr la separación de las vitaminas entre si y de los aditivos en cada producto, se trabajó sobre el tratamiento de las muestras para su análisis, las cuales en general, en las soluciones multivitamínicas, no presentaron ningún problema en su preparación, solamente la utilización de material de baja transmitancia para proteger las soluciones de la luz y el manejo de un pH ácido para la tiamina, piridoxina, nicotinamida y riboflavina. El tratamiento de las muestras básicamente consistió en diluirlas en mezclas de metanol, acetonitrilo agua y ácido acético a un pH próximo a 3, el cual se consideró aceptable para su estabilidad y para mantenerlas ionizadas. El inconveniente en estas formulaciones fue la gran cantidad de aditivos.

Para el caso de los sólidos, estos requirieron tratamiento en baño ultrasónico y centrifugación o filtración para eliminar sólidos insolubles. En su preparación se probaron soluciones amortiguadoras de fosfatos para extraer los principios activos (cianocobalamina y ácido fólico)

La eficacia del tratamiento de las muestras se evaluó a través del análisis de placebos adicionados para cuantificar el % recuperado de cada principio activo. Los métodos finales para esos tratamientos y los sistemas cromatográficos de análisis para cada producto, se muestran a continuación

En esta etapa fue necesario demostrar que ninguno de los aditivos de la formulación tienen el mismo tiempo de retención que alguno de los principios activos. En los casos en que se detectaron algunas interferencias en la cuantificación, fue necesario optimizar los sistemas cromatográficos y en algunos casos se identificaron esos compuestos, verificando primero en la fórmula los compuestos que presentan absorción a la longitud de onda de trabajo y que pudieran dar una señal en el sistema cromatográfico probado. Se inyectaron estos compuestos al sistema cromatográfico, individualmente a la concentración presente en la formulación y se compararon sus

tiempos de retención con los obtenidos en el placebo para identificar la interferencia e intentar eliminarla durante la extracción o por diferencia de solubilidades en caso de ser necesario.

### 1.3.2. Producto A: Solución Multivitáminica Oral con Minerales (uso veterinario).

#### *1.3.2.1. Valoración simultánea de Riboflavina-5-fosfato, Nicotinamida, Clorhidrato de Piridoxina y Clorhidrato de Tiamina.*

**Solución estándar de referencia.** Preparar una solución en agua:metanol:acetonitrilo ácido acético (proporción 65:25:10:1) que contenga las siguientes vitaminas. 140 µg/ mL de tiamina, 280 µg/ mL de nicotinamida, 20 µg/mL de piridoxina y 28 µg/ mL de riboflavina-5-fosfato. Adicionar placebo de estas vitaminas para quedar a la misma concentración que en la solución muestra.

**Solución Muestra.** Transferir una alícuota de 10 mL a un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar 20 mL del mismo disolvente utilizado en la preparación de la solución de referencia, colocar 3 minutos en baño ultrasónico, diluir y llevar a volumen con el mismo disolvente.

**Condiciones cromatográficas.** Columna ODS de 25 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno, 5 micras de tamaño de partícula, o Columna Lichro cart RP 18 de 25 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno, 5 micras de tamaño de partícula; detector a 280 nm, velocidad de flujo de 1 mL/min; y 20 µL de volumen de inyección.

Fase móvil: Solución de heptanosulfonato de sodio 0.001M más hexanosulfonato de sodio 0.004M en una mezcla de agua:metanol:acetonitrilo ácido acético en proporción (65 25 10 1)

### 1.3.3. Producto B: Solución Multivitáminica Inyectable con Hierro (uso veterinario)

#### *1.3.3.1. Valoración simultánea de Nicotinamida, Clorhidrato de Piridoxina y Clorhidrato de Tiamina.*

**Solución estándar de referencia.** Preparar una solución de vitaminas a las concentraciones de 40 µg/mL de clorhidrato de tiamina, 20 µg/mL de clorhidrato de piridoxina y 400 µg/mL de nicotinamida a partir de los estándares de referencia en una mezcla de agua metanol:acetonitrilo:ácido acético glacial en proporción (70:20:10:1).

**Solución muestra.** Transferir una alícuota de 5 mL a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir y llevar a volumen con el mismo disolvente utilizado en la preparación de la solución de referencia, transferir una alícuota de 2 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 50 mL, diluir, y llevar a volumen con el mismo disolvente.

**Condiciones cromatográficas.** Columna Ultrasphere ODS de 25 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno y 5 micras de tamaño de partícula, velocidad de flujo de 1 mL/min, detector a 280 nm y 20 µL como volumen de inyección.

**Fase móvil:** Hexanosulfonato de sodio 0.005M en una mezcla de agua metanol:acetonitrilo:ácido acético en proporción (70:20:10).

#### *1.3.3.2. Valoración de Riboflavina-5-fosfato.*

**Solución estándar de referencia.** Preparar una solución de riboflavina-5-fosfato a una concentración final de 16 µg/mL a partir del estándar de referencia y utilizando fase móvil como disolvente.

**Solución muestra.** Transferir una alícuota de 5 mL a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir y llevar a volumen con fase móvil, agitar, transferir una alícuota de 4 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 25 mL, diluir y llevar a volumen con fase móvil.

**Condiciones cromatográficas.** Columna Novapak C18 de 15 cm de longitud, 3.9 mm de diámetro interno y 4 micras de tamaño de partícula, flujo de 1 mL/min, detector a 280 nm y volumen de inyección de 20 µL.

**Fase móvil:** Una mezcla de solución acuosa de fosfato de potasio monobásico 0.054M con metanol y acetonitrilo en proporción (83:12:5).

1.3.4 Producto C: Solución Multivitamínica Inyectable con Aminoácidos (uso veterinario).

#### *1.3.4.1. Valoración de Nicotinamida.*



**Solución estándar de referencia.** Preparar una solución que contenga 200 µg/mL de nicotinamida estándar de referencia, 48 mg/mL de gluconato de calcio y 9.6 mg/mL de ácido bórico utilizando una mezcla de agua:metanol en proporción (67:33) como disolvente.

**Solución muestra.** Transferir una alícuota de 5 mL a un matraz volumétrico de 25 mL, diluir y llevar a volumen con el mismo disolvente que la solución estándar

**Condiciones cromatográficas.** Columna Ultrasphere ODS de 25 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno y 5 micras de tamaño de partícula, detector ultravioleta a 275 nm, volumen de inyección de 20 µL y gradiente de flujo: tiempo inicial flujo de 1.0 mL/min, al tiempo 4 minutos flujo de 1.5 mL/min, al tiempo 4.30 minutos flujo de 1.9 mL/min y al tiempo 7.0 minutos flujo de 1.0 mL/min.

Fase móvil: Octanosulfonato de sodio 0.005M en una mezcla de agua:metanol en la proporción (67:33).

#### *1.3.4.2. Valoración de Riboflavina-5-fosfato.*

**Solución estándar de referencia.** Preparar una solución de riboflavina-5-fosfato a una concentración de 18 µg/mL a partir del estándar de referencia, utilizando fase móvil como disolvente

**Solución muestra.** Transferir una alícuota de 5 mL a un matraz volumétrico de 25 mL, diluir y llevar a volumen con fase móvil.

**Condiciones cromatográficas** Columna Novapack C18 de 15 cm de longitud, 3.9 mm de diámetro interno, y 4 micras de tamaño de partícula, flujo de 1 mL/min; detector a 280 nm y volumen de inyección de 20 µL.

Fase móvil: Mezcla de una solución acuosa de fosfato de potasio monobásico 0.054 M metanol acetonitrilo en proporción (83:12:5).

### 1.3.5 Producto D: Gotas Multivitamínicas Orales (uso humano)

#### *Determinación simultánea de Clorhidrato de Tiamina y Clorhidrato de Piridoxina.*

**Solución estándar de referencia** Preparar una solución de clorhidrato de tiamina y clorhidrato de piridoxina en una mezcla de agua metanol:acetonitrilo ácido acético en proporción (60:20:20:1) en concentraciones de 40 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**Solución muestra:** Utilizar 2 mL del producto y diluir convenientemente en la misma mezcla que la solución estándar de referencia

**Condiciones Cromatográficas:** Columna  $\mu$ -Bondapack C18, de 30 cm de longitud, 3.9 mm de diámetro interno y 10 micras de tamaño de partícula, velocidad de flujo de 1 mL/min, detector ultravioleta a una longitud de onda de 280 nm, volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$ .

**Fase Móvil:** Heptanosulfonato de sodio 0.005M en una mezcla de agua metanol:acetonitrilo:acético glacial en proporción (60:20:20:1)

### 1.3.6. Producto E: Solución Multivitamínica Oral (uso humano).

#### *Determinación simultánea de Clorhidrato de Tiamina y Clorhidrato de Piridoxina.*

**Solución estándar de referencia** Preparar una solución de clorhidrato de tiamina y clorhidrato de piridoxina a las concentraciones aproximadas respectivas de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en una mezcla de agua:metanol: acetonitrilo: ácido acético glacial en proporción (60:20:20:1)

**Solución muestra.** Utilizar una muestra de 10 mL del producto y diluir apropiadamente en la misma mezcla utilizada en la preparación del estándar, hasta alcanzar una concentración semejante a la de la solución estándar

**Condiciones Cromatográficas.** Las mismas utilizadas para las gotas multivitamínicas orales

## 1.3.7 Producto F. Cápsulas Multivitamínicas Orales (uso humano)

### 1.3.7.1. Valoración de Cianocobalamina.

**Solución estándar de referencia.** Preparar una solución de cianocobalamina estándar de referencia en una concentración aproximada de 30 µg/mL en fase móvil

**Solución muestra.** Utilizar 3.17 g de polvo homogeneizado de cápsulas, transferir a un recipiente de 50 mL, adicionar volumétricamente 25 mL de fase móvil, colocar 15 minutos en baño ultrasónico y agitar en vortex durante 30 segundos. Filtrar la muestra directamente a través de membrana de 0.45 micras e inyectar al cromatógrafo inmediatamente

**Condiciones Cromatográficas.** Columna Ultrasphere ODS de 25 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno y 5 micras de tamaño de partícula, velocidad de flujo de 1 mL/min; detector ultravioleta a 360 nm y volumen de inyección de 20 µL.

Fase móvil: Fosfato de potasio monobásico 500 mg Disolver en 200 mL de agua, adicionar 280 mL de metanol y llevar a 1000 mL con agua destilada, ajustar a pH 6, si es necesario, con ácido fosfórico al 20% o hidróxido de potasio al 20%.

### 1.3.7.2. Valoración de Ácido Fólico.

**Solución estándar de referencia.** Preparar una solución de ácido fólico estándar de referencia en solución de fosfato de potasio dibásico al 3%. Pesar 24 mg y diluir hasta obtener una concentración de 12 µg/mL

**Solución muestra.** Utilizar 470 mg de polvo homogeneizado, transferir a un matraz volumétrico de 25 mL, adicionar 20 mL de fosfato de potasio dibásico al 3%, colocar 15 minutos en baño ultrasónico, llevar a volumen con el mismo disolvente y agitar 30 segundos en agitador vortex.

**Condiciones cromatográficas.** Columna Ultracarb (20) de 25 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno y 5 micras de tamaño de partícula, flujo de 1 mL/min, detector ultravioleta a 280 nm y volumen de inyección de 20 µL.

Fase móvil: Mezcla de una solución acuosa de fosfato de potasio monobásico 0.05M a pH 3.5 con acetonitrilo, en una proporción (90:10).

### 1.3.8. Producto G: Tabletas de Acido Fólico. (uso humano)

#### *Determinación de Acido fólico.*

**Solución estándar de referencia.** Pesar 700 mg de placebo de ácido fólico tabletas y 50 mg de ácido fólico estándar de referencia, transferir a un recipiente adecuado y homogeneizar. Pesar 150 mg de la mezcla y transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 80 mL de solución de fosfatos, colocar 10 minutos en baño ultrasónico, enfriar y llevar a volumen con solución de fosfatos, centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos, transferir una alícuota de 5 mL a un matraz de 50 mL, diluir y llevar a volumen con agua destilada.

**Solución muestra.** Pesar 150 mg de polvo de tabletas molidas, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 80 mL de solución de fosfatos y continuar de la misma manera que el estándar.

**Solución de fosfatos.** Prepararla disolviendo 71.57g de fosfato de sodio dibásico monohidratado y 5 g de fosfato de potasio monobásico anhidro en 1000 mL de agua.

**Condiciones Cromatográficas.** Columna Ultrasphere ODS de 25 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno, y 5 micras de tamaño de partícula, flujo de 1 mL/min, longitud de onda del detector de 280 nm, volumen de inyección de 20 µL.

Fase móvil: Solución acuosa de fosfato de potasio monobásico 0.05M a pH 3.5 mezclada con acetonitrilo en proporción (89:11).

## **2. VALIDACION DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS.**

### *2.1 Linealidad del Sistema.*

Los resultados de la validación de los métodos analíticos, se muestran en las tablas XVII a XXIII, reportándose para la linealidad del sistema los valores encontrados para la ordenada al

origen, su intervalo de confianza, y el valor absoluto de la t experimental en la prueba de hipótesis, los valores del coeficiente de correlación y de determinación, así como el coeficiente de variación encontrado para la repetibilidad de 6 diluciones a una concentración equivalente al 100%. Se consideró como variable de respuesta el área del pico de cada vitamina.

## *2.2 Linealidad del Método.*

Para linealidad del método, se reportan los valores de la ordenada al origen y la pendiente con sus respectivos intervalos de confianza y valores absolutos de las t experimentales, así como los coeficientes de correlación y de determinación.

Para la exactitud del método se reportan los valores promedio del porcentaje recuperado, el intervalo de confianza y el valor absoluto de la t experimental en la prueba de hipótesis para la media.

En figura 11 se muestra una gráfica típica obtenida para la linealidad del método correspondiente a la riboflavina-5-fosfato en la solución oral con minerales, y en el anexo 2 se muestran las gráficas restantes para cada vitamina analizada en cada una de las formulaciones.

## *2.3 Precisión del Método*

Con respecto a la precisión del método se reportan los valores de coeficiente de variación encontrados en la repetibilidad de los 6 recobros adicionados correspondientes al 100% y el coeficiente de variación calculado con el total de placebos adicionados analizados (18 muestras) durante la validación, denominada repetibilidad total y el coeficiente de variación encontrado para la reproducibilidad.

## *2.4 Cromatogramas.*

En las figuras 12 a la 21, se muestran los cromatogramas típicos obtenidos para las soluciones de estándares, muestras y placebos en cada método analítico desarrollado para los diferentes productos, indicando los tiempos de retención de las vitaminas.

TABLA XVII. Validación del Método Analítico para la Determinación Simultánea de Riboflavina-5- fosfato, Nicotinamida, Clorhidrato de Piridoxina y Clorhidrato de Tiamina en Solución Oral con Minerales.

PARAMETRO EVALUADO	RESULTADOS OBTENIDOS			
	RIBOFLAVINA-5-FOSFATO	NICOTINAMIDA	PIRIDOXINA	TIAMINA
<b>LINEALIDAD DEL SISTEMA</b>				
Ordenada al origen (b)	-10560	-30708	5795	-18037
Intervalo de confianza para la ordenada (I.C.)	-31607 a 10486	-63303 a 1886	-11797 a 23388	-71245 a 35172
Prueba de hipótesis para la ordenada   t cal	1.06	2.10	0.70	0.72
Coefficiente de correlación (r)	0.9988	0.9968	0.9989	0.9918
Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> )	0.9975	0.9935	0.9979	0.9836
Repetibilidad al 100% (C.V.%)	0.41%	1.41	1.03	1.35
<b>LINEALIDAD DEL METODO</b>				
Ordenada al origen (b)	0.01	0.56	0.01	-0.08
Intervalo de confianza para la ordenada (I.C.)	-0.07 a 0.09	-0.45 a 1.57	-0.04 a 0.06	-0.50 a 0.33
Prueba de hipótesis para la ordenada   t cal	0.27	1.20	0.46	0.43
Pendiente (m)	0.998	0.955	0.982	1.004
Intervalo de confianza para la pendiente (I.C.)	0.94 a 1.06	0.88 a 1.03	0.94 a 1.03	0.94 a 1.07
Prueba de hipótesis para la pendiente   t cal	0.06	1.34	0.84	0.15
Coefficiente de correlación (r)	0.9931	0.99255	0.9963	0.9936
Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> )	0.9869	0.98516	0.9927	0.9872
<b>EXACTITUD DEL METODO</b>				
Promedio Recuperado (%)	100.63	99.50	99.26	99.09
Intervalo de confianza para la media (I.C.)	99.41 a 101.85	98.66 a 100.34	98.33 a 100.18	97.91 a 100.26
Prueba de hipótesis para la media   t cal	1.09	1.26	1.69	1.64
<b>PRECISION DEL METODO</b>				
Repetibilidad al 100% (C.V.% de 6 muestras)	2.15	1.98	1.35	1.82
Repetibilidad total (C.V.% de 18 muestras)	2.44	1.68	1.88	2.39
Reproducibilidad (C.V.%)	2.39	1.69	2.30	2.09
<b>ESPECIFICIDAD DEL METODO</b>				
Para Control de Calidad	Ningún aditivo interfiere (ver cromatograma del placebo en la figura 11)			

Los parámetros calculados para la linealidad del sistema y método para Nicotinamida fueron calculados solo con los niveles de 80 a 120%

t tablas (0.975, 17) = 2.11 para la Riboflavina, Piridoxina y Tiamina en la exactitud del método

t tablas (0.975, 16) = 2.12 para la Riboflavina, Piridoxina y Tiamina en la linealidad del sistema y del método

t tablas (0.975, 14) = 2.14 para la Nicotinamida en la exactitud del método.

t tablas (0.975, 13) = 2.16 para la Nicotinamida en la linealidad del sistema y del método

**TABLA XVIII. Validación de los Métodos Analíticos para la Determinación de Clorhidrato de Tiamina, Clorhidrato de Piridoxina, Nicotinamida y Riboflavina-5-fosfato en una Solución Multivitáminica Inyectable con Hierro.**

PARAMETRO EVALUADO	RESULTADOS OBTENIDOS			
	TIAMINA	PIRIDOXINA	NICOTINAMIDA	RIBOFLAVINA-5-FOSFATO
<b>LINEALIDAD DEL SISTEMA</b>				
Ordenada al origen (b)	-45120	77366	79355	-183591
Intervalo de confianza para la ordenada (I.C.)	-239717 a 149477	-49549 a 204281	-103327 a 262037	-429738 a 62557
Prueba de hipótesis para la ordenada   t cal	0.49	1.29	0.92	1.58
Coefficiente de correlación (r)	0.9938	0.9983	0.9977	0.9932
Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> )	0.9877	0.9966	0.9954	0.9864
Repetibilidad al 100% (C.V.%)	1.73	1.72	1.77	1.45
<b>LINEALIDAD DEL METODO</b>				
Ordenada al origen (b)	0.80	0.04	18.01	0.09
Intervalo de confianza para la ordenada (I.C.)	-0.75 a 2.34	-0.63 a 0.71	-0.28 a 36.30	-0.31 a 0.50
Prueba de hipótesis para la ordenada   t cal	1.10	0.12	2.09	0.49
Pendiente (m)	0.98	0.99	0.97	0.99
Intervalo de confianza para la pendiente (I.C.)	0.95 a 1.01	0.97 a 1.02	0.93 a 1.01	0.95 a 1.03
Prueba de hipótesis para la pendiente   t cal	1.25	0.38	1.75	0.40
Coefficiente de correlación (r)	0.9981	0.9986	0.9973	0.9920
Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> )	0.9963	0.9973	0.9946	0.9938
<b>EXACTITUD DEL METODO</b>				
Promedio Recuperado (%)	99.84	99.66	100.79	100.20
Intervalo de confianza para la media (I.C.)	99.06 a 100.62	99.11 a 100.20	99.88 a 101.71	99.44 a 100.97
Prueba de hipótesis para la media   t cal	0.43	1.32	1.83	0.56
<b>PRECISION DEL METODO</b>				
Repetibilidad al 100% (C.V.% de 6 muestras)	0.89	0.81	1.15	0.54
Repetibilidad total (C.V.% de 18 muestras)	1.58	1.10	1.83	1.53
Reproducibilidad (C.V.%)	2.25	1.81	1.81	1.75
<b>ESPECIFICIDAD DEL METODO</b>	Ningún aditivo interfiere (ver cromatogramas de los placebos en las figuras 12 y 13)			
Para Control de Calidad				

Para la linealidad de sistema de la Riboflavina-5 fosfato solo se incluyeron los niveles de 60 a 120% , pero no los de 40%.

t tablas (0,975, 17) = 2.11 para todas las vitaminas en la exactitud del método

t tablas (0,975, 16) = 2.12 para todas las vitaminas en la linealidad del sistema y del método

TABLA XIX. Validación de los Métodos Analíticos para Riboflavina-5 fosfato y Nicotinamida en una Solución Multivitáminica Inyectable con Aminoácidos.

PARAMETRO EVALUADO	RESULTADOS OBTENIDOS	
	RIBOFLAVINA-5-FOSFATO	NICOTINAMIDA
<b>LINEALIDAD DEL SISTEMA</b>		
Ordenada al origen (b)	-184856	10626
Intervalo de confianza para la ordenada (I.C.)	-437503 a 67791	-15965 a 37217
Prueba de hipótesis para la ordenada   t cal	1.55	0.85
Coefficiente de correlación (r)	0.9928	0.9982
Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> )	0.9857	0.9964
Repetibilidad al 100% (C.V.%)	1.59	1.43
<b>LINEALIDAD DEL METODO</b>		
Ordenada al origen (b)	4.06	0.07
Intervalo de confianza para la ordenada (I.C.)	-9.26 a 17.38	-0.11 a 0.24
Prueba de hipótesis para la ordenada   t cal	0.65	0.82
Pendiente (m)	0.99	0.98
Intervalo de confianza para la pendiente (I.C.)	0.96 a 1.03	0.94 a 1.01
Prueba de hipótesis para la pendiente   t cal	0.42	1.28
Coefficiente de correlación (r)	0.9983	0.9976
Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> )	0.9967	0.9953
<b>EXACTITUD DEL METODO</b>		
Promedio Recuperado (%)	100.35	99.27
Intervalo de confianza para la media (I.C.)	99.76 a 100.95	98.51 a 100.03
Prueba de hipótesis para la media   t cal	1.25	2.02
<b>PRECISION DEL METODO</b>		
Repetibilidad al 100% (C.V.% de 6 muestras)	0.81	0.79
Repetibilidad total (C.V.% de 18 muestras)	1.19	1.54
Reproducibilidad (C.V.%)	1.81	1.93
<b>ESPECIFICIDAD DEL METODO</b>		
Para Control de Calidad	Ningún aditivo interfiere (ver cromatogramas de los placebos en las figuras 14 y 15)	

t (tablas (0.975, 17)) = 2.11 la exactitud del método

t (tablas (0.975, 16)) = 2.12 la linealidad del sistema y del método



**PRODUCTO D**

**TABLA XX. Validación del Método Analítico para el Análisis Simultáneo Clorhidrato de Tiamina y Clorhidrato de Piridoxina en Gotas Multivitamínicas Orales.**

PARAMETRO EVALUADO	RESULTADOS OBTENIDOS	
	TIAMINA	PIRIDOXINA
<b>LINEALIDAD DEL SISTEMA</b>		
Ordenada al origen (b)	-13874	-20574
Intervalo de confianza para la ordenada (I.C.)	-39960 a 12212	-50882 a 9734
Prueba de hipótesis para la ordenada   t cal	1.13	1.44
Coefficiente de correlación ( r )	0.9996	0.9994
Coefficiente de determinación ( r <sup>2</sup> )	0.9992	0.9988
Repetibilidad al 100% (C.V.%)	0.46	0.81
<b>LINEALIDAD DEL METODO</b>		
Ordenada al origen (b)	0.176	0.1074
Intervalo de confianza para la ordenada (I.C.)	-0.65 a 1.01	-0.38 a 0.60
Prueba de hipótesis para la ordenada   t cal	0.45	0.47
Pendiente (m)	0.99	0.99
Intervalo de confianza para la pendiente (I.C.)	0.95 a 1.04	0.94 a 1.05
Prueba de hipótesis para la pendiente   t cal	0.36	0.17
Coefficiente de correlación ( r )	0.9967	0.9955
Coefficiente de determinación ( r <sup>2</sup> )	0.9934	0.9910
<b>EXACTITUD DEL METODO</b>		
Promedio Recuperado ( % )	100.25	100.72
Intervalo de confianza para la media (I.C.)	99.43 a 101.07	99.78 a 101.65
Prueba de hipótesis para la media   t cal	0.65	1.62
<b>PRECISION DEL METODO</b>		
Repetibilidad al 100% (C.V.% de 6 muestras)	1.65	1.06
Repetibilidad total (C.V.% de 18 muestras)	1.64	1.86
Reproducibilidad (C.V.%)	0.17	0.50
<b>ESPECIFICIDAD DEL METODO</b> Para Control de Calidad	Ningún aditivo interfiere (ver cromatograma del placebo en la figura 16)	

t tablas (0.975, 17) = 2.11 la exactitud del método.

t tablas (0.975, 16) = 2.12 la linealidad del sistema y del método

TABLA XXI. Validación del Método Analítico para la Determinación Simultánea de Clorhidrato de Tiamina y Clorhidrato de Piridoxina en Solución Oral.

PARAMETRO EVALUADO	RESULTADOS OBTENIDOS	
	TIAMINA	PIRIDOXINA
<b>LINEALIDAD DEL SISTEMA</b>		
Ordenada al origen (b)	-13874	-20574
Intervalo de confianza para la ordenada (I.C.)	-39960 a 12212	-50882 a 9734
Prueba de hipótesis para la ordenada   t cal	1.13	1.44
Coefficiente de correlación ( r )	0.9996	0.9994
Coefficiente de determinación ( r <sup>2</sup> )	0.9992	0.9988
Repetibilidad al 100% (C. V. %)	0.46	0.81
<b>LINEALIDAD DEL METODO</b>		
Ordenada al origen (b)	-0.18	-0.24
Intervalo de confianza para la ordenada (I.C.)	-0.54 a 0.18	-0.55 a 0.08
Prueba de hipótesis para la ordenada   t cal	1.07	1.60
Pendiente (m)	1.01	1.03
Intervalo de confianza para la pendiente (I.C.)	0.99 a 1.03	0.99 a 1.06
Prueba de hipótesis para la pendiente   t cal	1.46	1.60
Coefficiente de correlación ( r )	0.9994	0.9982
Coefficiente de determinación ( r <sup>2</sup> )	0.9988	0.9964
<b>EXACTITUD DEL METODO</b>		
Promedio Recuperado ( %)	100.33	99.93
Intervalo de confianza para la media (I.C.)	99.98 a 100.68	99.32 a 100.53
Prueba de hipótesis para la media   t cal	1.97	0.26
<b>PRECISION DEL METODO</b>		
Repetibilidad al 100% (C. V. % de 6 muestras)	0.32	0.61
Repetibilidad total (C. V. % de 18 muestras)	0.71	1.21
Reproducibilidad (C. V. %)	1.50	1.25
<b>ESPECIFICIDAD DEL METODO</b>	Ningún aditivo interfiere (ver cromatograma del placebo en figura 17)	
Para Control de Calidad		

t tablas (0.975, 17) = 2.11 la exactitud del método.

t tablas (0.975, 16) = 2.12 la linealidad del sistema y del método

TABLA XXII. Validación de los Métodos Analíticos para Cianocobalamina y Acido fólico en Cápsulas de Gelatina Dura

PARAMETRO EVALUADO	RESULTADOS OBTENIDOS	
	CIANOCOBALAMINA	ACIDO FOLICO
<b>LINEALIDAD DEL SISTEMA</b>		
Ordenada al origen (b)	-31552	-31953
Intervalo de confianza para la ordenada (I.C.)	-95188 a 32082	-136326 a 72419
Prueba de hipótesis para la ordenada   t cal	1.05	0.65
Coefficiente de correlación (r)	0.9993	0.9993
Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> )	0.9987	0.9986
Repetibilidad al 100% (C.V.%)	0.30	1.01
<b>LINEALIDAD DEL METODO</b>		
Ordenada al origen (b)	26.65	-0.002
Intervalo de confianza para la ordenada (I.C.)	-6.76 a 60.05	-0.02 a 0.01
Prueba de hipótesis para la ordenada   t cal	1.69	0.35
Pendiente (m)	0.95	1.01
Intervalo de confianza para la pendiente (I.C.)	0.91 a 1.00	0.96 a 1.06
Prueba de hipótesis para la pendiente   t cal	2.11	0.39
Coefficiente de correlación (r)	0.9959	0.9964
Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> )	0.9918	0.9928
<b>EXACTITUD DEL METODO</b>		
Promedio Recuperado (%)	99.20	100.07
Intervalo de confianza para la media (I.C.)	98.16 a 100.23	99.17 a 100.96
Prueba de hipótesis para la media   t cal	1.65	0.16
<b>PRECISION DEL METODO</b>		
Repetibilidad al 100% (C.V.% de 6 muestras)	1.15	1.87
Repetibilidad total (C.V.% de 18 muestras)	2.09	1.80
Reproducibilidad (C.V.%)	1.90	2.35
<b>ESPECIFICIDAD DEL METODO</b>		
Para Control de Calidad	Ningún aditivo interfiere (ver cromatograma del placebo en la figura 19)	Ningún aditivo interfiere (ver cromatograma del placebo en la figura 18)

t tablas (0.975, 17) = 2.11 la exactitud del método

t tablas (0.975, 16) = 2.12 la linealidad del sistema y del método

TABLA XXIII. Validación del Método Analítico para Acido fólico en Tabletas para uso Humano

PARAMETRO EVALUADO	RESULTADOS OBTENIDOS
	ACIDO FOLICO
<b>LINEALIDAD DEL SISTEMA</b>	
Ordenada al origen (b)	-31953
Intervalo de confianza para la ordenada (I.C.)	-136326 a 72419
Prueba de hipótesis para la ordenada   t cal'	0.65
Coefficiente de correlación (r)	0.9993
Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> )	0.9986
Repetibilidad al 100% (C.V.%)	1.01
<b>LINEALIDAD DEL METODO</b>	
Ordenada al origen (b)	-0.03
Intervalo de confianza para la ordenada (I.C.)	-0.37 a 0.32
Prueba de hipótesis para la ordenada   t cal'	0.17
Pendiente (m)	1.00
Intervalo de confianza para la pendiente (I.C.)	0.97 a 1.04
Prueba de hipótesis para la pendiente   t cal'	0.24
Coefficiente de correlación (r)	0.9978
Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> )	0.9956
<b>EXACTITUD DEL METODO</b>	
Promedio Recuperado (%)	100.13
Intervalo de confianza para la media (I.C.)	99.39 a 100.87
Prueba de hipótesis para la media   t cal'	0.38
<b>PRECISION DEL METODO</b>	
Repetibilidad al 100% (C.V.% de 6 muestras)	1.42
Repetibilidad total (C.V.% de 18 muestras)	1.49
Reproducibilidad (C.V.%)	1.59
<b>ESPECIFICIDAD DEL METODO</b>	
Para Control de Calidad	Ningún aditivo interfiere en la cuantificación (ver cromatograma del placebo en figura 20)

t tablas (0.975, 17) = 2.11 la exactitud del método  
 t tablas (0.975, 16) = 2.12 la linealidad del sistema y del método

GRAFICA TIPICA OBTENIDA PARA LA LINEALIDAD DE LOS MÉTODOS  
(Ver en el anexo 2 las gráficas complementarias para la otras vitaminas en cada producto)

RIBOFLAVINA-5-FOSFATO

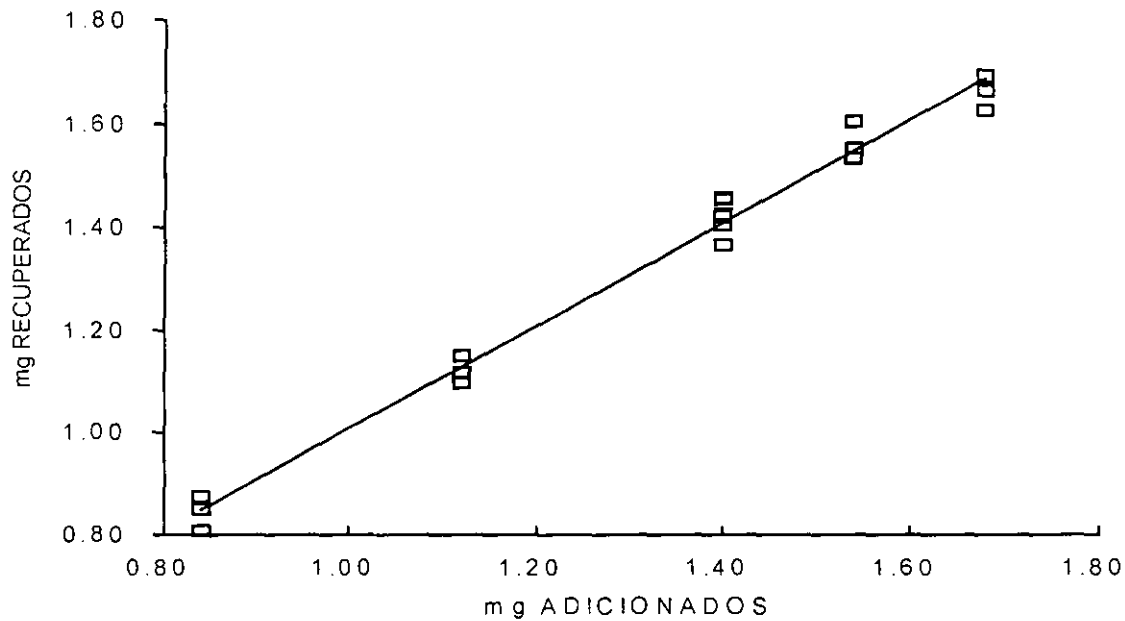


FIGURA 11. Producto A: Linealidad del método para Riboflavina-5-fosfato en el análisis simultáneo de Riboflavina, Nicotinamida, Piridoxina y Tiamina en solución multivitamínica oral con minerales para uso veterinario.

PRODUCTO A: SOLUCIÓN ORAL MULTIVITAMÍNICA PARA USO VETERINARIO

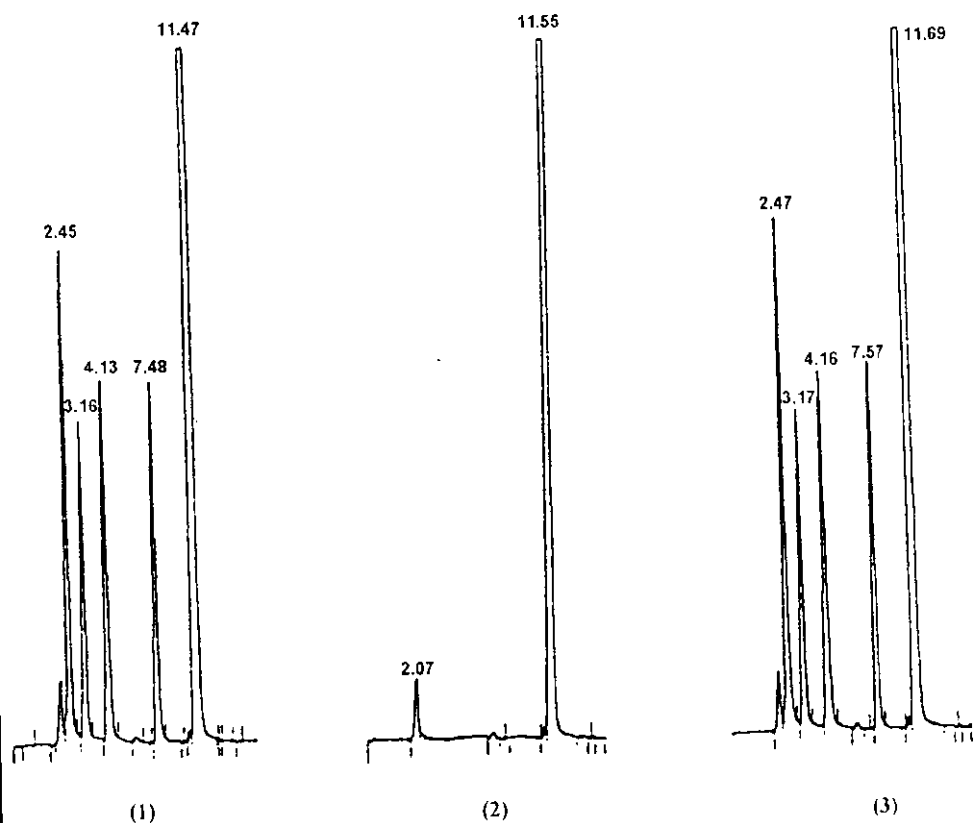


FIGURA 12. Cromatogramas típicos correspondientes al análisis simultáneo de Riboflavina-5-fosfato, nicotinamida, Clorhidrato de Piridoxina y Clorhidrato de Tiamina en solución multivitamínica oral con minerales.

- (1) Solución estándar
- (2) Solución placebo
- (3) Solución muestra

Tiempos de retención aproximados

Riboflavina-5-fosfato	2.45 min
Nicotinamida	3.16 min
Piridoxina	4.13 min
Tiamina	7.48 min
Conservadores	11.47 min

## PRODUCTO B: SOLUCION INYECTABLE PARA USO VETERINARIO

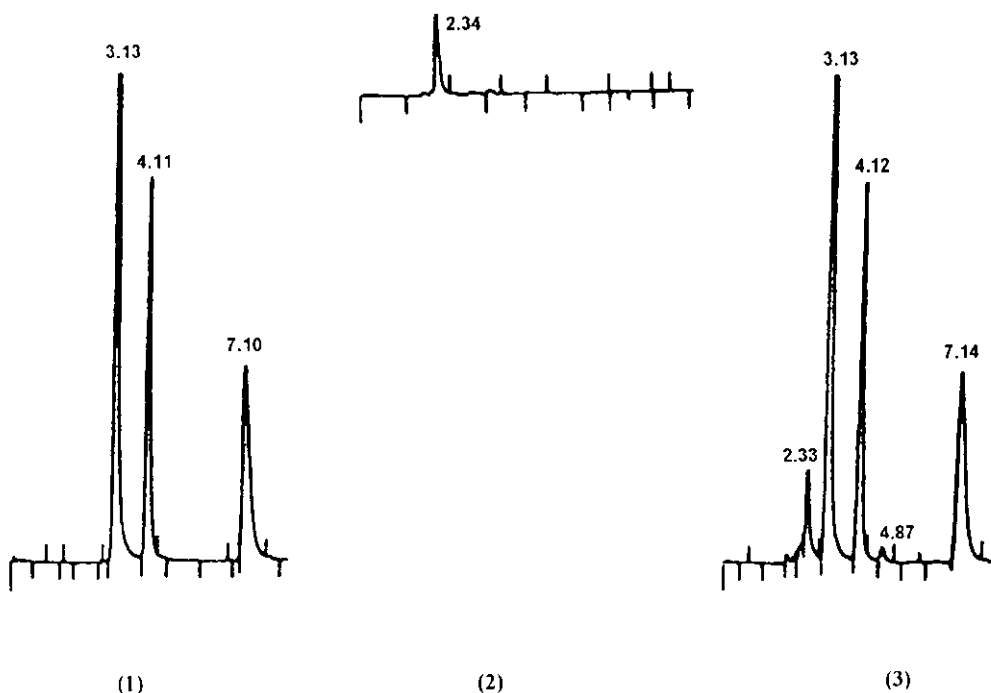


FIGURA 13. Cromatogramas típicos correspondientes al análisis simultáneo de Nicotinamida, Clorhidrato de Piridoxina y Clorhidrato de Tiamina en solución multivitáminica inyectable con hierro.

- (1) Solución estándar
- (2) Solución placebo
- (3) Solución muestra

Tiempos de retención aproximados.

Nicotinamida	3.13 min
Piridoxina	4.11 min
Tiamina	7.10 min

## PRODUCTO B: SOLUCION INYECTABLE PARA USO VETERINARIO

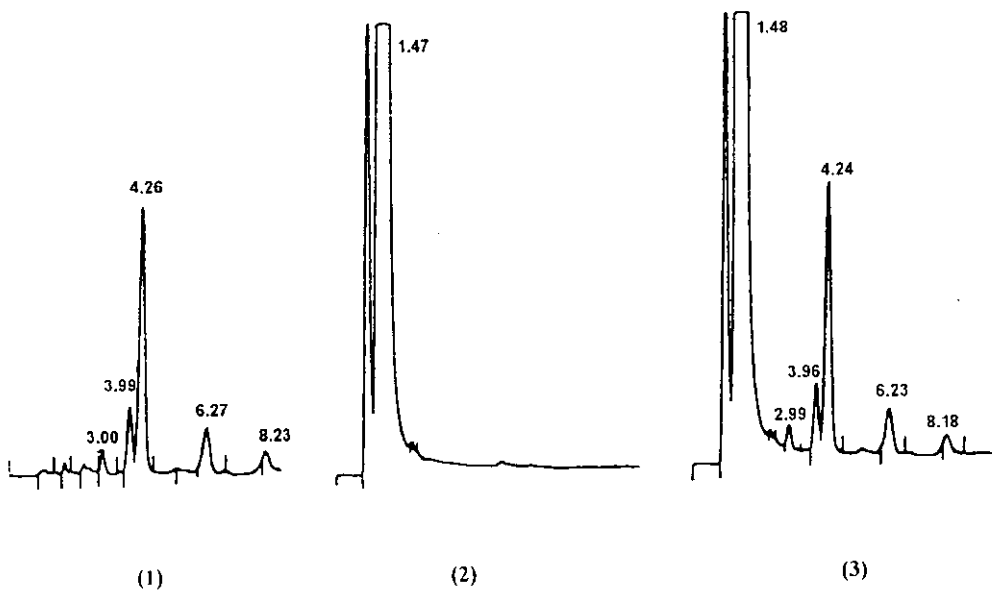


FIGURA 14. Cromatogramas típicos correspondientes al análisis de Riboflavina-5-fosfato en solución multivitamínica inyectable con hierro.

- (1) Solución estándar
- (2) Solución placebo
- (3) Solución muestra

Tiempos de retención aproximados:

Nicotinamida, Piridoxina y Tiamina	1.48 min
Riboflavina-5-fosfato	4.26 min
Riboflavina-4-fosfato	3.96 min



PRODUCTO C: SOLUCION MULTIVITAMINICA INYECTABLE CON AMINOACIDOS PARA USO VETERINARIO

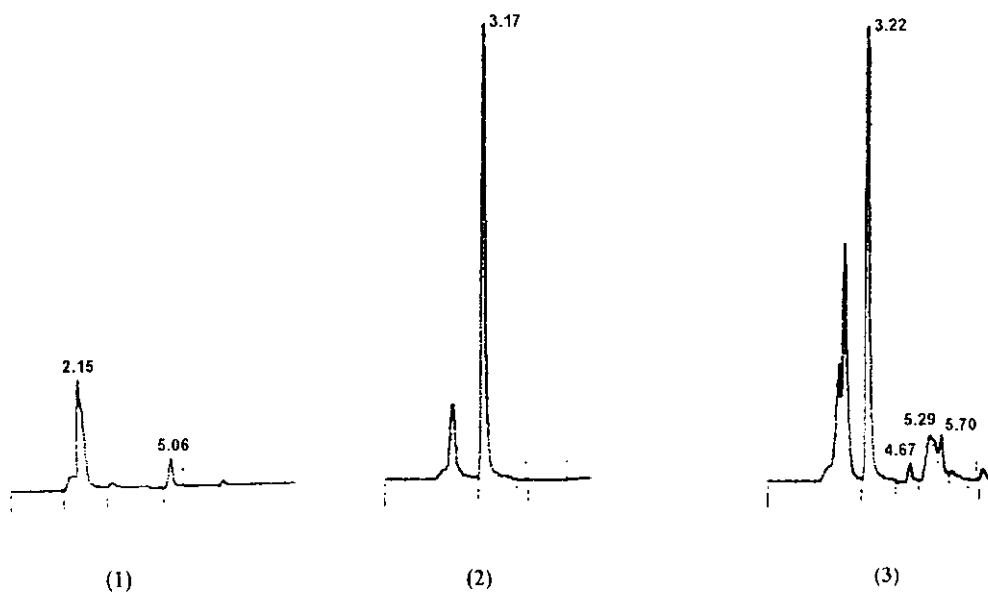


FIGURA 15. Cromatogramas típicos correspondientes al análisis Nicotinamida en solución multivitáminica inyectable con aminoácidos.

- (1) Solución placebo
- (2) Solución estándar
- (3) Solución muestra

Tiempos de retención aproximados:

Nicotinamida      3.17 min

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

PRODUCTO C: SOLUCIÓN MULTIVITAMÍNICA INYECTABLE CON AMINOÁCIDOS PARA USO VETERINARIO

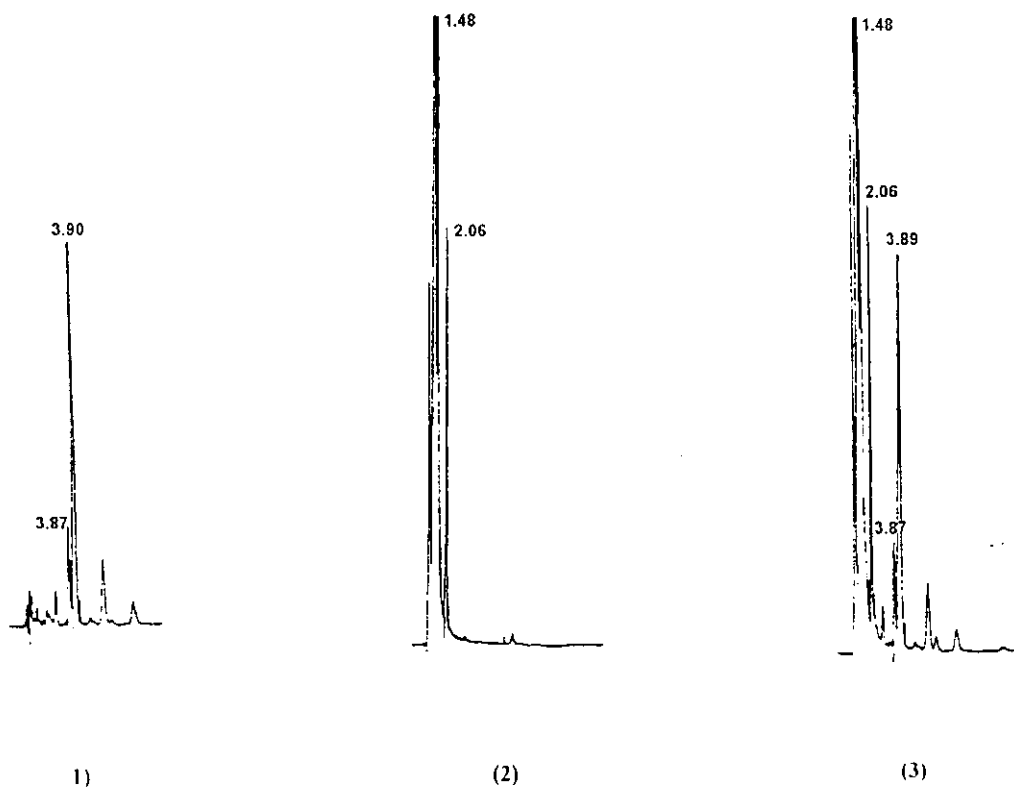


FIGURA 16. Cromatogramas típicos correspondientes al análisis de Riboflavina-5-fosfato en solución multivitamínica inyectable con aminoácidos.

- (1) Solución estándar
- (2) Solución placebo
- (3) Solución muestra

Tiempos de retención aproximados

Riboflavina-5-fosfato	3.90 min
Riboflavina-4-fosfato	3.87 min

PRODUCTO D: GOTAS MULTIVITAMINICAS ORALES PARA USO HUMANO

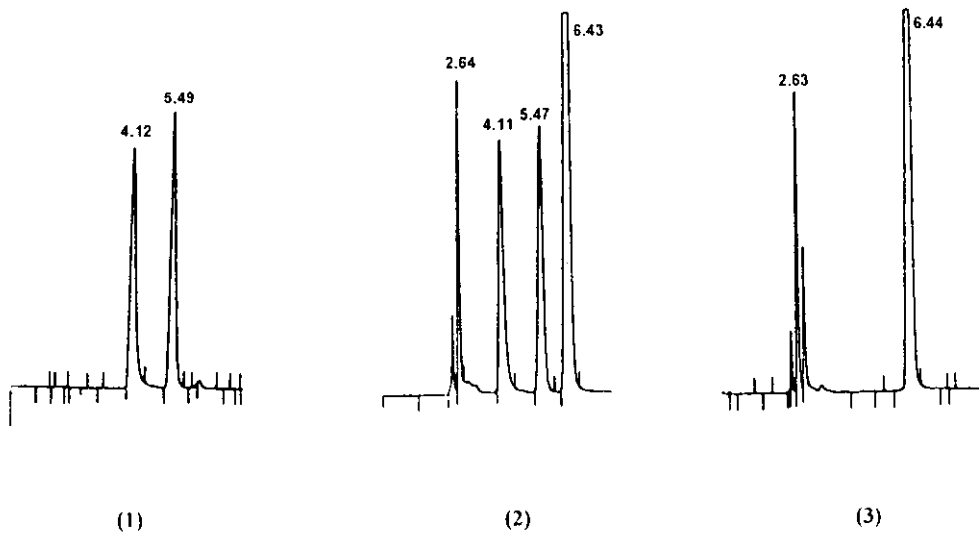


FIGURA 17. Cromatogramas típicos correspondientes al análisis simultáneo de Nicotinamida y Clorhidrato de Piridoxina en gotas multivitaminicas orales.

- (1) Solución estándar
- (2) Solución muestra
- (3) Solución placebo

Tiempos de retención aproximados:

Nicotinamida	4.12 min
Clorhidrato de Piridoxina	5.49 min

PRODUCTO E: SOLUCIÓN MULTIVITAMÍNICA ORAL PARA USO HUMANO

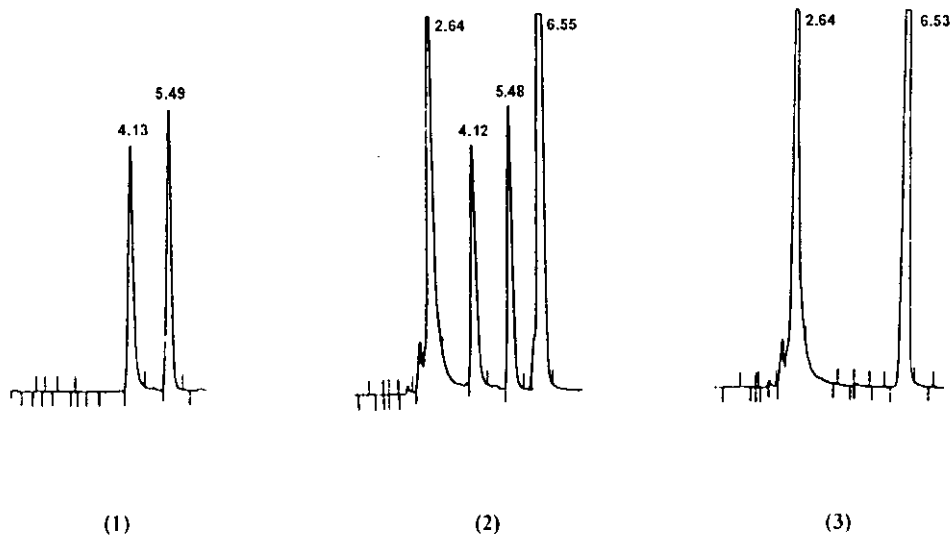


FIGURA 18. Cromatogramas típicos correspondientes al análisis simultáneo de Nicotinamida y Clorhidrato de Piridoxina en gotas multivitaminicas orales.

- (1) Solución estándar
- (2) Solución muestra
- (3) Solución placebo

Tiempos de retención aproximados:

Nicotinamida	4.13 min
Clorhidrato de Piridoxina	5.49 min

PRODUCTO F: CAPSULAS MULTIVITAMINICAS PARA USO HUMANO

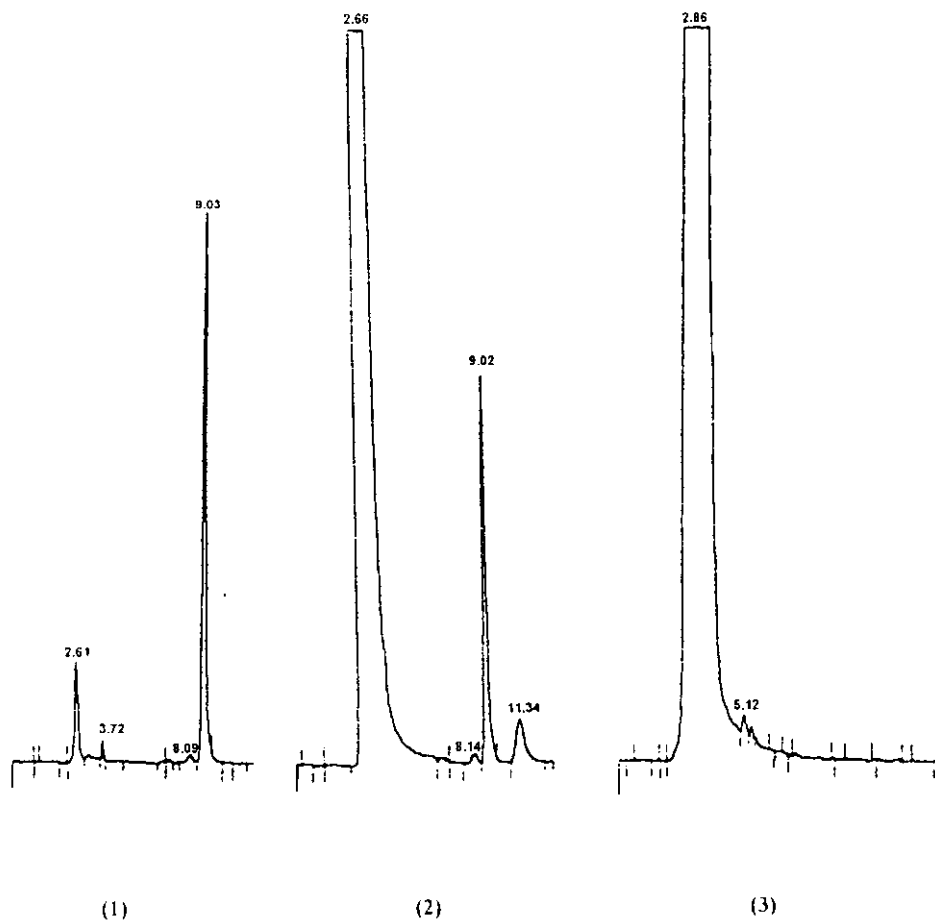


FIGURA 19. Cromatogramas típicos correspondientes al análisis de Acido Fólico en cápsulas multivitaminicas orales.

- (1) Solución estándar
- (2) Solución muestra
- (3) Solución placebo

Tiempos de retención aproximados

Acido fólico            9.03 min

PRODUCTO F: CAPSULAS MULTIVITAMINICAS PARA USO HUMANO

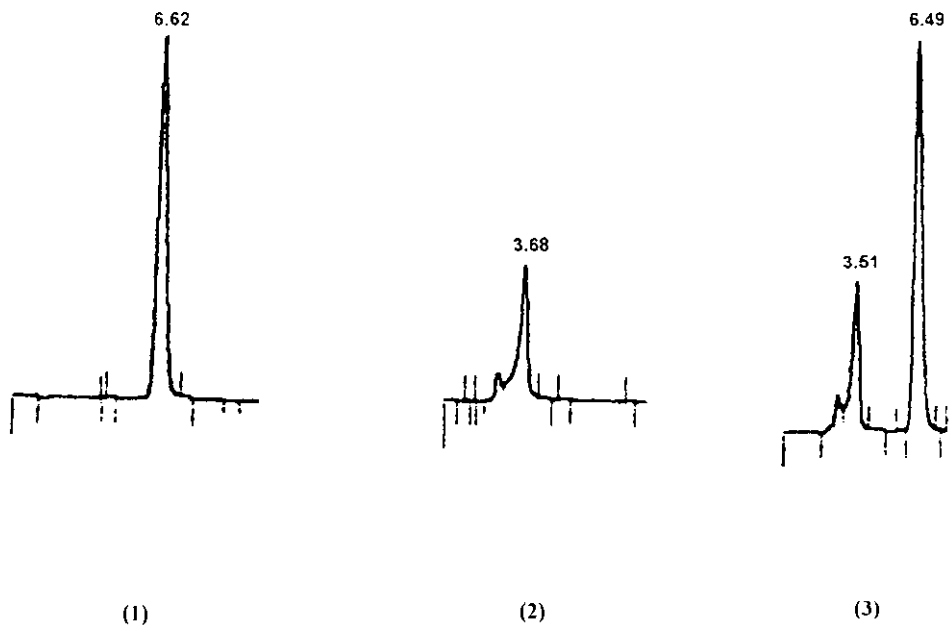


FIGURA 20. Cromatogramas típicos correspondientes al análisis de Cianocobalamina en cápsulas multivitaminicas orales.

- (1) Solución estándar
- (2) Solución placebo
- (3) Solución muestra

Tiempos de retención aproximados

Cianocobalamina      6.62 min

## PRODUCTO G: TABLETAS DE ACIDO FOLICO

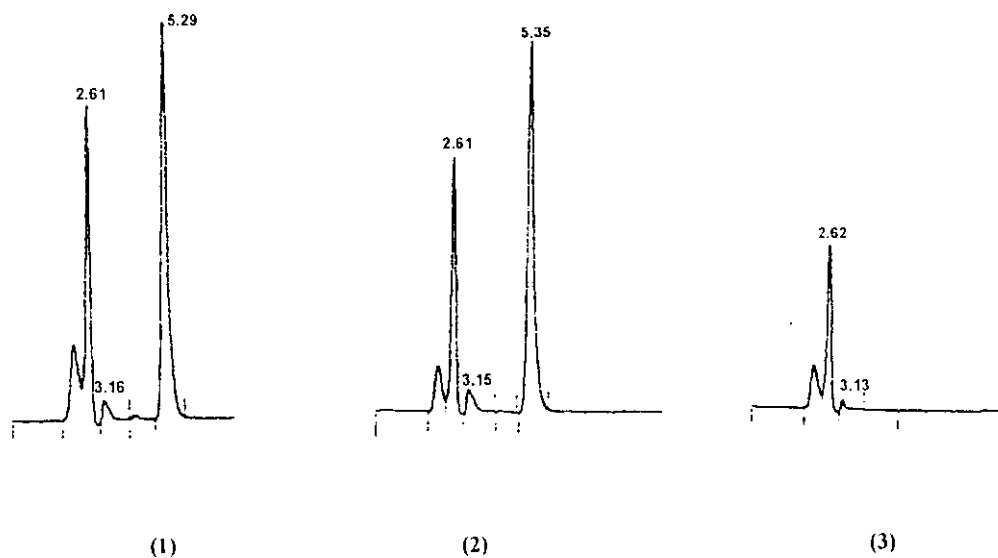


FIGURA 21. Cromatogramas típicos correspondientes al análisis de Acido fólico en tabletas orales.

- (1) Solución estándar
- (2) Solución muestra
- (3) Solución placebo

Tiempos de retención aproximados

Acido fólico      5.29 min

## VIII. ANALISIS DE RESULTADOS

### 1. PRUEBAS PRELIMINARES

#### *1.1 Espectros de Absorción de las Vitaminas*

En las figuras 5 y 6, se presentan los espectros de absorción superpuestos para las diferentes vitaminas analizadas, los cuales resultaron de gran utilidad en la elección de la longitud de onda para el análisis simultáneo o individual. De acuerdo con ellos, el intervalo donde las vitaminas hidrosolubles presentan absorción es amplio, desde la región visible del espectro (380 nm para la cianocobalamina) y presentando su máximo de absorción a 360 nm, hasta el límite de la región ultravioleta (210 nm). Otras vitaminas que presentan picos de absorción en la región visible además de la ultravioleta son la riboflavina-5-fosfato (370 y 445 nm) y el ácido fólico (478 nm), valores no presentados en las figuras pero indicados en la tabla VIII

Los máximos de absorción para las vitaminas hidrosolubles se encuentran en el intervalo de 230 nm a 300 nm, a excepción de la cianocobalamina, que lo presenta a 360 nm, pero también presenta un pico a 278 nm.

Se incluyen en la tabla VIII, datos del espectro de absorción del ácido ascórbico debido a que suele ser también uno de los componentes comunes en productos vitamínicos, aunque solamente se incluye en una de las formulaciones presentadas en este trabajo. Se presentan también datos de la hidroxocobalamina, que constituye una alternativa a la cianocobalamina en las formulaciones. Sus espectros de absorción son muy similares.

La elección de la longitud de onda para el análisis, dependió de la formulación, las vitaminas presentes y de sus concentraciones. En la figura 6, se presentan los espectros de las vitaminas que se cuantifican simultáneamente en los productos analizados, ya sea las cuatro o dos vitaminas; el intervalo al cual se observa que las vitaminas pueden presentar una adecuada



absorción para su determinación simultánea es entre 265 nm y 280 nm y cerrando aún más el intervalo entre 270 y 275 nm. Se eligió la longitud de onda de 280 nm para la determinación simultánea tomando en cuenta las consideraciones mencionadas en el capítulo de resultados con respecto al efecto de la longitud de onda

Por otra parte, el ácido ascórbico presentó poca absorción a longitudes de onda próximas a 280 nm al igual que la nicotinamida, ambas vitaminas presentan mayor absorción a longitudes de onda menores

En la figura 5 se pueden observar los espectros de absorción obtenidos para las vitaminas que se analizaron en forma individual (ácido fólico y cianocobalamina) y el del ácido ascórbico. El ácido fólico presenta su máximo de absorción alrededor de 280 nm, y a esa longitud de onda se cuantificó en las cápsulas de gelatina dura, este ácido solo es soluble en medios alcalinos, por lo que requirió, el uso de un disolvente adecuado para su extracción de la formulación.

Se analizó por separado la cianocobalamina, debido a su concentración tan pequeña, por lo cual, se consideró conveniente utilizar la longitud de onda de máxima absorción observada en su espectro (360 nm) Es una gran ventaja que esta vitamina presente su máximo de absorción hasta 360 nm, ya que esta característica pudo aprovecharse para analizarla en forma específica sin interferencia de la gran concentración del ácido ascórbico (formulación F) ni del ácido fólico por presentar poca absorbancia a esa longitud de onda, resultado que se confirma con la especificidad durante la validación (ver cromatograma en la figura 20) Las otras vitaminas también presentan poca o nula absorción a esa longitud de onda. La única vitamina que pudiera llegar a interferir en su análisis pero que no está presente en la formulación analizada, es la riboflavina-5-fosfato, por presentar un pico de absorción cercano a esa longitud de onda.

La cianocobalamina presenta poca absorción en el intervalo de 260 a 320 nm (figura 5) por lo cual, prácticamente podría esperarse una nula interferencia por parte de esta vitamina para el análisis de otras en ese intervalo de longitud de onda, considerando además las concentraciones tan bajas a las que se encuentra en las formulaciones

Se observó poca diferencia entre los máximos de absorción reportados en la literatura y los encontrados con las fases móviles utilizadas.

## **2. DESARROLLO DEL SISTEMA**

### ***2.1 Efecto de la Composición de la Fase Móvil***

#### **Proporción Agua: Metanol: Acetonitrilo.**

En la figura 7 y en la tabla IX se observa que la tendencia en los tiempos de retención de las vitaminas al aumentar la proporción en la fase orgánica (metanol), es hacia la disminución, y se tiende a observar una menor separación entre la riboflavina y nicotinamida. La incorporación del acetonitrilo a la fase móvil disminuye los tiempos de retención. Este comportamiento se debe a que el acetonitrilo es menos polar que el metanol y este a su vez es menos polar que el agua, por lo que en realidad se está disminuyendo la polaridad de la fase móvil, presentándose una mayor afinidad de las vitaminas por esta fase que por la estacionaria no polar, resultando en una disminución en los tiempos de retención, los cuales se deben a los diferentes grados de atracción por la fase estacionaria no polar y la fase móvil polar. Conocer este comportamiento es básico en la separación de los componentes de una formulación por CLAR.

#### **Efecto de las sales del ácido alquilsulfónico (Concentración y longitud de la cadena Hidrocarbonada).**

Al aumentar la longitud de la cadena hidrocarbonada del ácido alquilsulfónico, aumenta el tiempo de retención de las vitaminas (figura 10), lo que puede utilizarse para optimizar las separaciones en productos multivitamínicos ya que, dependiendo del producto y del número de vitaminas a separar, se utilizará el pentano, hexano, heptano u octanosulfonato de sodio, siendo posible además el uso de mezclas de estas sales como se observa en la figura 9, y existiendo una proporción óptima para lograr la separación sin alargar innecesariamente el análisis.

El aumento en los tiempos de retención de las vitaminas al aumentar la longitud de la cadena hidrocarbonada de la sal del ácido alquilsulfónico, se debe a un aumento en la lipoficidad de las moléculas, es decir, disminuye la polaridad del complejo [ión-par iónico] al aumentar la longitud

de la cadena hidrocarbonada, por lo que tienen mayor afinidad por la fase estacionaria poco polar retardando su salida de la columna.

Por otro lado, al aumentar o disminuir la concentración de los reactivos de alquilsulfonato a las concentraciones probadas, no se presenta efecto significativo en los tiempos de retención de las vitaminas (tabla XV), esto confirma que la concentración de 0.005M sugerida en la bibliografía es la óptima

## **2.2 Efecto del pH**

El pH sí modifica en gran medida la retención, observándose un mayor efecto sobre la tiamina, (figura 8 y tabla XII). Este efecto puede explicarse debido a la presencia de una amina cuaternaria en su estructura química, lo que la hace fuertemente iónica.

Se determinó que el pH óptimo para la separación es el ácido, lo cual es explicable debido a que en esa condición las vitaminas se encuentran ionizadas (sus pKa están por arriba de ese pH) (ver tabla I) para poder formar un par iónico y retenerse en la columna; en este caso, se utilizó un ácido débil (ácido acético) en una proporción al 1% en la fase móvil para el ajuste del pH. En esta proporción se determinó un pH promedio de 3, además podría ajustarse con otros ácidos como el perclórico e incluso el clorhídrico, ambos tendrían la ventaja de presentar menor absorción en la región ultravioleta del espectro, pero con el uso del ácido clorhídrico por ser un ácido fuerte se corre el riesgo de alcanzar un pH menor a 3 que puede dañar el empaque de la columna. Las vitaminas que se vieron menos afectadas por el pH son la nicotinamida y la riboflavina-5-fosfato.

El ajuste del pH resulta también determinante en el análisis individual de riboflavina-5-fosfato, ácido fólico o cianocobalamina para suprimir su ionización, lograr su retención y separación al utilizar soluciones amortiguadoras de fosfatos.

En general, la vitamina que presentó el mayor tiempo de retención en el análisis simultáneo en el tipo de sistemas de par iónico, es la tiamina, siguiéndole en orden descendente la piridoxina, nicotinamida y riboflavina-5-fosfato; esta última presenta el menor tiempo de retención (figura 12). Sin embargo, en el sistema con fosfatos en la fase móvil, la riboflavina-5-fosfato es la que presenta

el mayor tiempo de retención y las otras vitaminas no se retienen, separándose incluso los diversos derivados fosfatados de la riboflavina, como la riboflavina-4-fosfato, que presenta un tiempo de retención semejante a la 5-fosfato, los derivados difosfatos y la riboflavina base también tienden a separarse en este sistema (figura 14), no se identificaron cada uno de estos derivados pero concuerdan los tiempos de retención relativos con los reportados en las referencias <sup>12, 13</sup>

### *2.3 Efecto de las Características y Tipo de Columna*

Se utilizaron diferentes tipos de columnas C18, de diferente longitud y tamaño de partícula, encontrándose que con una longitud de 25 cm y un tamaño de partícula de 5 micras, era posible lograr la separación de las vitaminas, ya que al aumentar el tamaño de partícula a 10 micras, aunque se incrementara la longitud de la columna a 30 cm, la separación no era adecuada y, lógicamente al disminuir la longitud de la columna, la separación también era deficiente. Sin embargo, fueron determinantes las características de la columna utilizada para lograr la separación, ya que después de haber optimizado otros factores, el cambio de columna fue lo que permitió la separación en el análisis simultáneo de las vitaminas, en la solución oral con minerales y en la solución inyectable con hierro para uso veterinario.

La razón de este comportamiento se debe al número de platos teóricos (N) de las columnas, que es una medida de su eficiencia. Este número está en función de factores tales como la longitud de la columna cuando se mantienen constantes las otras características de la fase estacionaria. Siendo otro factor que modifica la eficiencia de la columna, el tamaño promedio de la partícula del empaque de octadecilsilano

### *2.4 Consideración acerca del tipo de Vitaminas*

En los sistemas cromatográficos utilizados en el análisis de los productos multivitamínicos objeto de estudio en el presente trabajo, se utiliza la formación de un par iónico o se suprime la ionización, por un lado la tiamina, nicotinamida, piridoxina y riboflavina, pudieron analizarse simultáneamente las cuatro, o mezclas de dos ó tres con un sistema agua: metanol:acetonitrilo ácido acético a un pH aproximado de 3, utilizando alguna sal individual o mezclas de sales de pentano, hexano heptano u octanosulfonato de sodio a una concentración 0.005M en una columna ODS de 25

cm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno y 5 micras de tamaño de partícula. Se optimizó la separación considerando el número y tipo de vitaminas a analizar, la formulación y los aditivos iniciando con la búsqueda de la proporción óptima de fase orgánica para separar las vitaminas que se retienen poco como la riboflavina, nicotinamida y piridoxina y posteriormente se eligió la longitud de la cadena hidrocarbonada de la sal formadora del par iónico o se utilizó una mezcla

Por otro lado, se encuentran la cianocobalamina, el ácido fólico y la riboflavina-5-fosfato, las cuales requirieron un análisis individual utilizando sales de fosfatos en la fase móvil

### **3. COMENTARIOS ACERCA DEL DESARROLLO DE LOS MÉTODOS**

#### ***3.1 Producto A: Solución Multivitamínica Oral con Minerales (uso veterinario)***

En este producto las vitaminas se encuentran más concentradas que en el producto B para uso veterinario, por estar destinado a utilizarse por vía oral, contiene minerales en forma de glicerofosfatos en una buena proporción dentro de la formulación y el método desarrollado por CLAR que evalúa simultáneamente cuatro vitaminas: el clorhidrato de tiamina, el clorhidrato de piridoxina, la nicotinamida y la riboflavina-5-fosfato, detectó alguna interacción en la cuantificación de las vitaminas que no se presenta en otras formulaciones, que se atribuyó a la presencia de los glicerofosfatos; esta interacción se observó como porcentos de recobro bajos durante la evaluación de la exactitud del método, al analizar placebos adicionados; esto fue corregido adicionando placebo a la solución estándar, con lo cual mejoraron los porcentos de recobro haciendo exacto el método

La riboflavina se cuantificó en esta formulación a partir de la respuesta (área) del pico principal presente y que corresponde a la riboflavina-5-fosfato. Fue posible su cuantificación simultánea debido a la ausencia del citrato férrico amoniacal, que interfiere en su cuantificación cuando está presente y requiere un método adicional.

Fue necesario utilizar, en este caso, dos sales para formar el par iónico con las vitaminas, el hexanosulfonato de sodio (pic B6) y el heptanosulfonato de sodio (pic B7) para lograr una resolución adecuada de las 4 vitaminas y los fosfatos de riboflavina; esto en pH ácido utilizando ácido acético glacial y una mezcla de agua, metanol y acetonitrilo (figura 12).

### ***3.2 Producto B: Solución Multivitamínica Inyectable con Hierro (uso veterinario)***

Para el caso de la solución multivitamínica inyectable con hierro, se probó el mismo sistema cromatográfico desarrollado para el producto anterior, esto considerando que las dos formulaciones tienen las mismas vitaminas y, la formulación inyectable, tiende a ser menos compleja.

Se evalúan simultáneamente la nicotinamida, clorhidrato de piridoxina y clorhidrato de tiamina con el método desarrollado por CLAR (figura 13). No fue necesario utilizar dos sales del ácido alquilsulfónico por lo que el sistema se utilizó solamente con hexanosulfonato de sodio 0.005M.

La formulación contiene citrato férrico amoniacal que interfirió en la cuantificación de la riboflavina-5-fosfato por lo que esta vitamina se evalúa por separado en un método donde se retiene más separándose del citrato férrico y de las otras vitaminas e invirtiéndose los tiempos de retención. Es posible separar además los diversos fosfatos de la riboflavina presentes desde la materia prima como son la misma riboflavina-5-fosfato que se encuentra en mayor proporción, la riboflavina-4-fosfato que le sigue en proporción a la anterior y pequeñas cantidades de difosfatos de riboflavina incluyendo la base (figura 14), así mismo, el sulfato de mefentermina, no presentó interferencia en ninguno de estos métodos. El pH encontrado para la solución acuosa de fosfato de potasio monobásico de la fase móvil fue de 4.5.

### ***3.3 Producto C: Solución Multivitamínica Inyectable con Aminoácidos (uso veterinario)***

Para esta formulación, dos métodos analíticos fueron desarrollados por CLAR, uno para cuantificar nicotinamida y otro para riboflavina-5-fosfato. En el primero se utilizó octanosulfonato de sodio como formador del par iónico para retener en mayor proporción a la nicotinamida y poder separarla de los componentes que eluyen con tiempos de retención menores (figura 15). Se utilizó un gradiente de flujo para disminuir el tiempo de análisis, ya que eluyen otros componentes después de la nicotinamida. Nuevamente se detectó alguna interacción entre la nicotinamida tal vez con el gluconato, se adicionó ácido bórico al estándar para lograr % de recobros aceptables y exactitud en

el método El clorhidrato de tiamina se analizó por fluorometría y el clorhidrato de piridoxina por espectrofotometría visible por desarrollo de color Este fue un caso en el que fue posible la aplicación de estas técnicas espectrofotométricas debido a la ausencia de aditivos posibles de interferir en su cuantificación ya que el producto es inyectable, el producto contiene además aminoácidos pero en proporciones mucho menores a las de las vitaminas, además de que algunos de ellos no presentan absorción en la región ultravioleta-visible.

La riboflavina-5-fosfato se analiza con un sistema semejante al de la formulación B utilizando una solución amortiguadora de fosfatos en la fase móvil que separa los diferentes derivados del fosfato de la riboflavina. (figura 16).

### ***3.4 Producto D: Gotas Multivitaminicas Orales (uso humano)***

Las soluciones farmacéuticas orales, no solo las vitamínicas, suelen ser de los productos con mayor grado de dificultad para su análisis por CLAR, debido a la gran cantidad de aditivos que contienen, como los edulcorantes, saborizantes, colorantes, conservadores algunas veces antioxidantes y otros.

Para esta formulación, se desarrolló un método para cuantificar simultáneamente clorhidrato de tiamina y clorhidrato de piridoxina, vitaminas que se encuentran más concentradas que en otras formulaciones, (figura 17). La complejidad relativa en este producto se debió básicamente a los conservadores y saborizantes, que suelen presentar también absorción a la misma longitud de onda de las vitaminas

La adición de un ácido débil como el ácido acético en la fase móvil, se requirió para mantener un pH ácido, lograr mantener ionizadas las moléculas de las vitaminas para que puedan formar el par iónico con el heptanosulfonato de sodio y lograr su retención al carecer de carga y, por tanto, poder separarse por cromatografía en fase inversa También, se ajustó la proporción de la mezcla agua metanol acetonitrilo manteniendo constante la proporción de ácido acético y la concentración del reactivo formador del par iónico, para lograr la separación de las vitaminas incluyendo los aditivos presentes en la formulación.

### *3.5 Producto E: Solución Multivitamínica Oral (uso humano)*

Este producto contiene básicamente las mismas vitaminas que las gotas orales, pero más diluidas, lo que de entrada implicó un ajuste en la forma de diluir la muestra para el análisis simultáneo de nicotinamida y clorhidrato de piridoxina (figura 18) adicionalmente, la muestra contiene una gran cantidad de citrato férrico amoniacal, que presentó absorción en la longitud de onda seleccionada para evaluar las vitaminas. Sin embargo, fue posible su separación, la dificultad es semejante a las gotas en lo que respecta a los aditivos como el colorante, saborizante y conservadores y los principios de separación y acción de los componentes en la fase móvil, son los mismos que para el producto anterior por lo cual, fue posible utilizar el mismo sistema.

### *3.6 Producto F: Cápsulas Multivitamínicas Orales (uso humano)*

Se desarrollaron dos métodos analíticos independientes, uno para cuantificar cianocobalamina y otro para evaluar el ácido fólico (figuras 19 y 20). El problema principal en esta formulación, lo constituyó la cantidad tan pequeña en que se presentan estas vitaminas en la fórmula, y esto se generaliza a las fórmulas que las contienen, especialmente la vitamina B<sub>12</sub>. La presencia de una gran cantidad de ácido ascórbico y sulfato ferroso, complicó la extracción y cuantificación de la cianocobalamina, sumándose además la gran inestabilidad que suele presentar esta vitamina, por lo que fue recomendable ir preparando las muestras al momento de inyección al cromatógrafo. Para eliminar los sólidos, no se filtraron las muestras a través de papel filtro. debido a que al analizar de esta manera se encontró una posible adsorción de la cianocobalamina en el papel, al encontrar porcentos de recuperación bajos, además, para mantener la vitamina el menor tiempo posible en solución antes de su análisis y evitar alguna degradación, se decidió no centrifugar, sino filtrar directamente a través de la membrana tipo HVLP de 0.45 µm antes de inyectar al cromatógrafo. El uso de la fase móvil a pH cercano a 6 en el análisis de la cianocobalamina, resulta importante debido a que se encuentra en el intervalo de su mayor estabilidad<sup>7</sup> además de suprimirse su ionización (pKa = 3.30) para retenerse en la columna

El ácido fólico, aunque en una concentración ligeramente mayor, presentó problemas de extracción. El ácido fólico se analizó por la técnica de supresión iónica, a pH de 3.5 para suprimir su ionización. (pKa = 4.70) y retenerlo en la columna C18. Se utilizó una solución de fosfato de potasio



dibásico al 3% en la preparación de las soluciones de análisis para poder disolverlo, debido a que con esta solución se obtiene un pH de alrededor de 9.2 con lo que se incrementa su solubilidad.

Por otro lado, el ácido ascórbico fue posible cuantificarlo por espectrofotometría ultravioleta a 244 nm en una solución de ácido clorhídrico 0.01N en metanol

### *3.7 Producto G: Tabletas de Acido Fólico. (uso humano)*

En general, las formas farmacéuticas sólidas son las que tienden a presentar menos problemas de análisis por CLAR, esto debido a que se formulan con aditivos que no presentan absorción ultravioleta o visible, por lo cuál se tiene menor posibilidad de interferencia y la simplicidad aumenta con monofármacos.

Sin embargo, la fórmula presentó un problema de absorción en presencia de los aditivos de la formulación, debida a una circunstancia no identificada lo que provocaba una menor absorción de luz del activo y por lo tanto una menor respuesta en el detector, la otra razón menos probable es la de problemas de extracción, ya que se probaron diferentes formas de agitación, diferentes disolventes, etc. El problema se resolvió adicionando placebo a la solución estándar, lográndose un método cuantitativo.

El análisis fue a través de la técnica de supresión iónica a pH de 3.5 en la fase móvil. En la preparación de las muestras se utiliza una mezcla de sales de fosfatos con la cual se obtiene un pH de 7, para poder solubilizar el ácido fólico (figura 21)

#### 4. VALIDACION DE LOS METODOS

Las pruebas de validación de los métodos analíticos indicadas en las tablas XVII a XXIII, permitieron demostrar que cuentan con una adecuada linealidad de la respuesta con respecto a la concentración para cada una de las vitaminas en cada uno de los métodos y en cada producto, con ordenadas al origen, coeficientes de correlación y determinación que cumplen con los límites establecidos en la tabla VII.

Los resultados muestran que existe linealidad de los métodos para la cuantificación de las vitaminas con ordenadas al origen de aproximadamente cero, intervalos de confianza que incluyen al cero, pendientes cercanas a 1 con intervalos de confianza que incluyen a la unidad y valores absolutos para las pruebas de hipótesis menores que las de tablas

Los coeficientes de correlación y de determinación fueron respectivamente mayores a 0.99 y 0.98 lo cual cumple con los criterios de aceptación

Con respecto a la exactitud, se obtuvieron promedios recuperados de aproximadamente el 100% con intervalos de confianza que lo incluyen y valores para las pruebas de hipótesis menores que las de tablas, lo que demuestran la exactitud de los métodos

Los valores de coeficiente de variación calculados para precisión de los métodos evaluada como: repetibilidad al 100% con 6 muestras, como repetibilidad en todos los placebos adicionados (18 muestras) y como reproducibilidad, fueron menores al 2.5%. lo que se considera adecuado, ya que se evaluaron productos vitamínicos cuantificando en algunos casos de manera simultánea diferentes principios activos en formulaciones sumamente complejas

La especificidad con respecto a los aditivos, se demostró a través de los cromatogramas de los placebos, en donde no se observa ningún pico con el mismo tiempo de retención de los activos que pudiera interferir en su cuantificación

Para el caso de la nicotinamida, cuando se cuantificó simultáneamente en la solución multivitáminica oral con minerales (producto A) utilizando una longitud de onda de 280 nm, se encontró solamente linealidad del método en el intervalo de niveles de 80 a 120% y no hasta 60%

como en los demás métodos, sin embargo, se consideró adecuado para los fines que se utilizará, ya que los límites de aceptación como producto terminado para los productos se encuentran generalmente en el intervalo de 90 a 110% y, en ese intervalo, el método presentó una adecuada linealidad, el mismo comportamiento se encontró en la linealidad del sistema por lo que los valores utilizados para los cálculos fueron de 80 a 120% incluyendo un nivel adicional del 110%, (tabla XVII) lo que corresponde a un intervalo entre 224 – 336 µg/mL. La razón por la cual se explica este comportamiento, es la de haber cuantificado la Nicotinamida en una longitud de onda (280 nm) donde esta vitamina presenta baja absorción ultravioleta (ver espectro de absorción en figura 6), pero que se consideró adecuada debido a la alta concentración relativa de esta vitamina en los productos analizados. Otra razón para utilizar esta longitud de onda, fue por cuestión de la posible interferencia por aditivos de la formulación si se utilizaba una longitud de onda mas baja y, una tercera razón fue el bajo factor de respuesta que presenta esta vitamina en comparación con las otras presentes lo cual se compensa con su alta concentración (ver tabla VIII)

El intervalo de linealidad de sistema para esta vitamina se amplió al trabajar a mayores concentraciones, como sucedió el caso de la solución inyectable con hierro (producto B), en donde se observó una linealidad adecuada en un intervalo más amplio ( de 160 - 441 µg/mL) (tabla XVIII)

La linealidad para esta vitamina, no presentó ningún problema cuando se cuantificó de manera individual a una longitud de onda menor (275 nm) en la solución multivitamínica inyectable (producto C) cuyos resultados se muestran en la tabla XIX.

La riboflavina-5-fosfato presentó una adecuada linealidad del sistema al evaluarla para la solución multivitamínica inyectable para uso veterinario (producto B), en el intervalo de 80-120% (tabla XVII) que equivale al intervalo de concentraciones entre 11-22 µg/mL, pero no presenta una linealidad adecuada hasta un nivel del 40%

## IX. CONCLUSIONES

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución resultó ser una técnica sumamente útil en el desarrollo de métodos de análisis por fase inversa para los productos vitamínicos, debido a que permitió la separación de las mezclas complejas que forman este tipo de formulaciones al poder utilizar una gran diversidad de fases móviles y aprovechando las diferencias en las propiedades que presentan las diferentes vitaminas, debidas a su estructura química tales como la polaridad, solubilidad, pKa y absorción de luz, permitiendo, en algunos casos, el análisis simultáneo de varias vitaminas con un tratamiento mínimo de muestra, como en el caso de las soluciones, ya sea orales o inyectables para uso humano o veterinario, que requirieron simplemente dilución de la muestra

Los métodos desarrollados y validados, resultaron ser lineales tanto para el sistema cromatográfico, como para el método, así como exactos, precisos, reproducibles y específicos para poder ser utilizados en el control de calidad de estos productos.

El análisis de vitaminas hidrosolubles por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en los productos utilizados, puede básicamente dividirse en tres partes la primera, se refiere al análisis de clorhidrato de tiamina, clorhidrato de piridoxina, nicotinamida y riboflavina-5-fosfato, las cuales pudieron analizarse simultáneamente en pH ácido utilizando la técnica del par iónico al formarlos con alguna sal sódica del ácido alquil sulfónico, como el hexanosulfonato de sodio, heptanosulfonato de sodio y octanosulfonato de sodio, que son de los que mejores resultados dieron en este tipo de separaciones. Fue necesario también el ajuste de las proporciones de agua, metanol y acetonitrilo para optimizar la separación

Para el ácido fólico su cuantificación se centró en aumentar su solubilidad utilizando soluciones de fosfato de potasio monobásico en la preparación de las muestras y emplear una técnica de supresión de la ionización

Para la cianocobalamina, la técnica utilizada para su análisis fue la de supresión iónica a un pH de 6

En la solución oral con minerales, fue posible el análisis simultáneo de cuatro vitaminas, entre ellas la riboflavina-5-fosfato, sin embargo, la presencia de citrato férrico en la solución inyectable requirió de un método individual para esta vitamina. En las gotas y solución oral, también fue posible la utilización de un método simultáneo para cuantificar nicotinamida y piridoxina y en la solución inyectable con aminoácidos se cuantificó individualmente tanto la nicotinamida como la riboflavina-5-fosfato

En los sólidos orales se cuantificaron individualmente tanto el ácido fólico como la cianocobalamina

El procedimiento seguido para el desarrollo o adaptación de los métodos de análisis de vitaminas hidrosolubles en los productos analizados, fue básicamente el mismo, por lo que puede generalizarse de acuerdo al procedimiento descrito en el anexo 1 y pudiera ser aplicable también al desarrollo de otros métodos de análisis para otros principios activos en productos farmacéuticos.

Como en todo sistema cromatográfico, la parte determinante en la separación fue la columna, la cual en el análisis simultáneo, requirió tener la longitud adecuada (mínimo 25 cm) para lograr la separación, pero sin alargar innecesariamente el tiempo de análisis y un tamaño de partícula adecuado (mínimo 5 micras)

## X. PROPUESTAS

No se descarta la posibilidad de mejora de los métodos al optimizar aún más la longitud de onda para el análisis simultáneo a una sola longitud de onda, o utilizar la posibilidad que brindan los actuales detectores ultravioleta de arreglo de diodos de leer simultáneamente a todas las longitudes de onda del espectro para poder cuantificar cada vitamina a su máximo de absorción y mejorar la exactitud y precisión de los métodos así como del uso de gradiente para el análisis simultáneo de un mayor número de vitaminas.

Para el análisis simultáneo del clorhidrato de tiamina, nicotinamida, clorhidrato de piridoxina y riboflavina, se sugiere utilizar una longitud de onda de 275 nm para mejorar el intervalo de linealidad para la nicotinamida ya que 280 nm, se encuentra cerca de su mínimo de absorción.

Las vitaminas absorben bien a longitudes de onda cercanas a los 200 nm, sin embargo, no es recomendable utilizar esas longitudes de onda, debido a que existe mayor posibilidad de encontrar interferencia en la valoración, ya que un número mayor de compuestos pueden presentar absorción ultravioleta a longitudes de onda bajas.

Alguna posibilidad no probada en este estudio, es la utilización de la extracción en fase sólida para concentrar la muestra y, al mismo tiempo, eliminar aditivos y otras posibles interferencias en el análisis de vitamina B12 que se encuentra en cantidades muy pequeñas en las formulaciones multivitamínicas. El uso de este tipo de extracción podría aplicarse también a la purificación de la muestra para eliminar aditivos que pudieran interferir en la cuantificación de las otras vitaminas y para no saturar la columna de compuestos que no requieren análisis.

Existe también la posibilidad de análisis de la cianocobalamina a través de la formación de un par iónico a un pH ácido, menor a su pKa que es de 3.3

Es importante incluir también en la validación de los métodos analíticos la adecuación del sistema cromatográfico y establecer los valores mínimos para la eficiencia de la columna, la resolución, factor de coeio y la precisión entre inyecciones repetidas para asegurar que el análisis se efectúe siempre bajo las mismas condiciones así como considerar los excesos de vitaminas que generalmente se incluyen en los productos multivitamínicos

Otros aspectos importantes acerca de la validación, lo constituye la evaluación de la estabilidad de la muestra y la tolerancia del sistema.

Los principios empleados en este estudio para el análisis de vitaminas hidrosolubles por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución no solo podrian aplicarse al análisis de otros vitamínicos, sino también al análisis farmacéutico de otros productos con otros fármacos, ya que prácticamente el 80% de los principios activos, son bases débiles, algunos otros son ácidos débiles y tendrán un comportamiento similar a las vitaminas

## XI. ANEXOS

### ANEXO I

#### PROCEDIMIENTO SUGERIDO PARA EL DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA VITAMINAS HIDROSOLUBLES.

Se considera que en el análisis de vitaminas hidrosolubles, siempre será necesaria la adaptación parcial o total del método a una formulación específica, debido a la complejidad que generalmente presentan ya sea por su forma farmacéutica, el número y tipo de vitaminas presentes en la formulación, los aditivos y otros posibles principios activos y, por lo tanto, se requerirá también la validación respectiva.

Las soluciones son las que generalmente menor tratamiento de muestra requieren, sin embargo, son las que mayor número de problemas de interferencia en el análisis suelen presentar debido a la gran cantidad de aditivos que incluyen, como los conservadores, antioxidantes, colorantes, edulcorantes y saborizantes. Las formas farmacéuticas sólidas tienden a tener menor cantidad de aditivos y generalmente no presentan absorción ultravioleta, lo que simplifica en parte el establecimiento de los sistemas cromatográficos que separen las vitaminas en forma específica

Con base en la metodología seguida para el análisis de diferentes productos vitamínicos, se sugiere el siguiente procedimiento para el desarrollo de métodos analíticos, lo que constituye una propuesta a la sistematización en el desarrollo de métodos analíticos, tema sobre el cual puede considerarse que existe poca bibliografía.

Se consideran básicamente cuatro partes en el desarrollo de los métodos además de la revisión bibliográfica.



- A) Pruebas preliminares
- B) Desarrollo del sistema cromatográfico
- C) Desarrollo de los métodos
- D) Validación

1. **Investigación Bibliográfica.** Llevar a cabo una revisión bibliográfica, con la finalidad de conocer las propiedades físicas y químicas del (los) fármaco (s), en particular sus características de

a. **Solubilidad.** La cual constituye una propiedad de suma importancia para elegir el disolvente mas apropiado que se utilizará, ya sea en la preparación de los estándares de referencia, de las muestras, o en la posible extracción del activo de la base farmacéutica. Las características de solubilidad también pueden dar indicios del disolvente en la fase móvil que puede eluir al compuesto de interés.

b. **Propiedades ácidas ó básicas.** Es importante en un desarrollo por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, conocer las propiedades ácido-base y el pKa del fármaco a analizar, para determinar de antemano si se trabajará como un compuesto neutro, como un ácido o una base, y poder manejar las posibilidades de evitar su ionización (supresión iónica) o favorecerla (para formar un par iónico) durante la elección de la fase móvil en cromatografía de fase inversa, dependiendo del procedimiento de separación elegido.

c. **Propiedades de absorción de luz ultravioleta-visible o características de fluorescencia.** Conocer estas propiedades constituye otra de las prioridades de investigación durante esta etapa del desarrollo de métodos analíticos, para determinar no sólo en que intervalo de longitud de onda es posible detectar al compuesto de interés, sino también conocer los máximos de absorción. Se sugiere iniciar las pruebas preliminares de desarrollo a esos máximos, pero posteriormente obtener un espectro utilizando la fase móvil propuesta para el análisis, para confirmar o ajustar si es necesario la longitud de onda de detección. Las propiedades de absorción son importantes debido a que el detector ultravioleta-visible es el de uso más común

**d. Estabilidad frente a reactivos específicos, a la luz. e interacciones del (los) principio (s) activo (s).** La mayoría de las vitaminas se ven afectadas por la presencia de la luz, por lo que se trabajarán en material de baja transmitancia para evitar su degradación durante su análisis; por tal razón, es importante conocer las propiedades de estabilidad de los fármacos de interés, para considerarlos durante la preparación de las muestras y evitar además ponerlos en contacto con reactivos que aceleren su descomposición.

Es importante investigar los posibles productos de degradación y compuestos relacionados, o las posibilidades de que el compuesto pueda hidrolizarse en medio ácido, básico o sufrir reacciones de oxido-reducción. Es necesario también conocer si el compuesto puede presentar isómeros.

**e. Referencias para su análisis cuantitativo.** Es necesario investigar los métodos de análisis reportados en la bibliografía.

**2. Elección de la técnica Analítica a utilizar.** Después de la revisión detallada de la información recopilada, se elegirá la técnica considerando la factibilidad del equipo, reactivos, disolventes, características del fármaco, características de la formulación y la finalidad del método, ya sea para el control de calidad, estudio de estabilidad, determinación de trazas, compuestos relacionados, estudio de disolución o limpieza de áreas o equipo de producción, para efectuar una adaptación parcial o total de algún método analítico para el principio activo en el producto de interés o desarrollar un sistema nuevo si es necesario

**3. Pruebas preliminares.** Es conveniente en esta etapa evaluar las características de solubilidad del principio activo en los disolventes más comunes como etanol, metanol, acetonitrilo, cloroformo y agua. Se sugiere también efectuar el espectro de absorción ultravioleta-visible en el o los disolventes que probablemente se usaran en el análisis y, posteriormente, en la fase móvil propuesta para cuantificar el fármaco a su máximo de absorción, para el caso de las vitaminas, la elección de la longitud de onda, dependerá de las que se encuentren presentes en la formulación y de sus concentraciones

La concentración a la que se trabajará inicialmente será la reportada en la bibliografía y el objetivo inicial será reproducir el método elegido y efectuar los ajustes necesarios a las condiciones de análisis con base en los resultados y observaciones obtenidas. Si se considera conveniente se deberá evaluar el efecto del pH en la retención o separación de los componentes y el efecto en la composición de la fase móvil.

**4. Desarrollo del Sistema.** No se puede hablar de una división total entre esta etapa y la anterior, pero en esta se sugiere trabajar básicamente con los fármacos puros hasta encontrar las condiciones óptimas para la separación y la posibilidad de análisis de los fármacos. En el caso de los métodos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, al concluir esta etapa se deberá tener definida la longitud de onda óptima del detector, composición y pH de la fase móvil, velocidad de flujo características de la columna, (empaquete, longitud, tamaño de partícula, diámetro interno etc.), hasta lograr un tiempo de retención adecuado que dependerá del número de vitaminas presentes en la formulación, o hasta lograr una resolución adecuada entre los compuestos de interés si se trata de un producto con más de 1 principio activo.

Generalmente, los aditivos farmacéuticos y los productos de degradación tienen tiempos de retención menores a los del fármaco, por lo que no se recomienda tener tiempos de retención cortos en el desarrollo del sistema.

Para el caso particular de las vitaminas, se sugiere iniciar las pruebas de separación utilizando hexanosulfonato de sodio en una concentración 0.005M en agua metanol acetonitrilo ácido acético en la proporción (75:20:5:1) y, dependiendo de las vitaminas que se requieran separar, ajustar la proporción de metanol, modificando también la del agua, pero manteniendo constante la proporción de acetonitrilo. El ajuste se efectuará hasta obtener una separación adecuada de las vitaminas que se retienen poco en estos sistemas (riboflavina, nicotinamida), posteriormente se determinará la conveniencia de modificar la cadena hidrocarbonada de la sal del ácido alquilsulfónico. Es necesario considerar también el no alargar innecesariamente el tiempo de análisis.

**5. Desarrollo del Método.** En esta etapa además de trabajar con el principio activo puro, se trabajará con el placebo y placebos adicionados, El objetivo es establecer las condiciones óptimas

para el tratamiento previo de la muestra antes de la utilización de alguna técnica instrumental que permita la cuantificación del fármaco. Se elegirá el disolvente adecuado que disuelva o extraiga el principio activo de la formulación, el tipo y tiempo de agitación, la cantidad de muestra que se utilizará, la forma y grado de dilución de la muestra. En algunas, será conveniente adicionar volumétricamente el disolvente en lugar de prepararlas en matraces volumétricos y llevar a volumen, sobre todo cuando la cantidad de muestra es grande y se trata de un sólido, se elegirá el uso de decantación, filtración o centrifugación para separar algunos aditivos insolubles, se establecerá el tipo de papel filtro a utilizar y el tipo de membrana para filtrar las muestras para Cromatografía de Líquidos ya que algunos fármacos tienden a adsorberse en algunos materiales de la membrana e incluso en el papel filtro. Se establecerá la velocidad y tiempo de centrifugación. Cuando el disolvente es muy volátil, las muestras tienden a concentrarse al intentar filtrar, esto se ha observado al utilizar metanol o acetonitrilo puros, por lo que lo más recomendable en estos casos, es centrifugar en recipientes cerrados. Si se requiere, se determinará la conveniencia de calentar la muestra y será necesario establecer la temperatura y tiempo óptimo de calentamiento. Se requerirá demostrar también que el placebo no interfiere en la cuantificación, para lo cual se tratará el placebo de acuerdo con el procedimiento que se ha determinado previamente y no deberá dar respuesta, o esta no deberá interferir con la cuantificación del activo. El tratamiento de la muestra deberá ser el ideal para extraer cuantitativamente el activo de la formulación, lo cual se evalúa a partir de placebos adicionados, cuantificando el % de recobro.

Para el caso de las vitaminas, los disolventes más adecuados son el agua, metanol y preferentemente mezclas de estos dos disolventes, algunas veces con pequeñas proporciones de acetonitrilo o ácido acético, que puede llegar a ser un constituyente de la fase móvil.

Solamente el ácido fólico requiere de un disolvente diferente debido a su baja solubilidad en agua, pero pueden utilizarse soluciones acuosas alcalinas, como una solución de fosfato de potasio dibásico al 3%.

Si la forma farmacéutica es líquida, la preparación consiste solamente en diluir la muestra convenientemente en el disolvente adecuado, si se trata de un sólido, lo más recomendable es centrifugar para evitar al máximo la exposición de las vitaminas a la luz, el aire y la evaporación de

disolvente, para el caso de la cianocobalamina se recomienda filtrar directamente a través de la membrana de 0.45 micras después de su extracción de la formulación.

**6. Validación.** En esta etapa se confirma o establece si las condiciones elegidas para el sistema cromatográfico y la forma de tratar las muestra son las más adecuadas o se requieren efectuar ajustes para lograr métodos cuantitativos que cumplan con los requerimientos establecidos.

Después del desarrollo del método es necesario determinar a través de pruebas en el laboratorio, que el sistema y la metodología propuesta para el análisis del producto son las adecuadas para el propósito para el que se diseño el método y que este es capaz de evaluar el o los principios activos; es decir, se reta o evalúa el método, propuesto y se afinan o efectúan los cambios necesarios para lograr un método exacto, preciso y específico. En esta etapa es posible, si así se considera necesario, optimizar las condiciones del sistema y del método. Tal vez se requieran cambios en la composición de la fase móvil para lograr la especificidad en estabilidad, ya que con respecto a los excipientes se efectúa en la etapa anterior, o cambios en la concentración del activo hasta encontrar un intervalo en el cual el (los) fármaco (s) de interés presenten una respuesta lineal con respecto a la concentración, la cual cuando se trata de multifármacos pudiera lograrse con un cambio en la longitud de onda.

También es posible optimizar la forma de tratamiento de la muestra durante la linealidad del método, para lograr un % recuperado adecuado a partir de los placebos adicionados.

Para la validación de métodos analíticos puede seguirse el procedimiento general siguiente

**LINEALIDAD DEL SISTEMA.** Evaluarla analizando soluciones preparadas a partir de soluciones patrón de los estándares de referencia a 5 concentraciones diferentes cada una de las vitaminas de interés. Los niveles evaluados corresponderán al 40, 60, 80, 100 y 120% o un nivel mayor de la concentración determinada como el 100% durante las pruebas preliminares, desarrollo del sistema y durante el desarrollo del método. Preparar 6 soluciones para el nivel correspondiente al 100% y 3 para las concentraciones correspondientes a los otros niveles. Calcular la ordenada al origen y efectuar la prueba de hipótesis para la ordenada al origen, calcular el coeficiente de variación para los valores al 100% para evaluar la precisión (repetibilidad) a este nivel. Se establece

como límite de aceptación un coeficiente de variación menor al 2.0% para la precisión considerando la complejidad de las formulaciones y la dificultad que suele presentar el análisis de vitaminas y más cuando se analizan simultáneamente. Calcular también el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación. Los criterios de aceptación sugeridos se muestran en la tabla VII

**ESPECIFICIDAD.** Evaluarla a partir del tratamiento de un placebo preparado de la misma manera que una muestra e inyectado al cromatógrafo a las mismas condiciones establecidas en el método, para comprobar que no existe ningún componente en la formulación con el mismo tiempo de retención que alguno de los principios activos analizados que pudiera interferir en su cuantificación. En caso de efectuar especificidad en estabilidad, preparar soluciones acuosas de vitaminas, placebos y placebos adicionados, someterlos al efecto de la luz, calor y temperatura en medio ácido, básico y oxidativo, para degradarlas y analizar de acuerdo al método propuesto. Para el medio ácido ajustar el pH entre 2-3 con una solución de ácido clorhídrico, para el medio básico ajustar el pH entre 10-11 con una solución de hidróxido de sodio, y para el medio oxidativo adicionar 0.5 mL de una solución de peróxido de hidrógeno al 30%, colocar las soluciones así preparadas en una estufa a una temperatura entre 35°C y 40°C por un tiempo aproximado de 3 días o a las condiciones suficientes para degradar las vitaminas. Posteriormente neutralizar las muestras, diluir cuantitativamente de acuerdo al método establecido e inyectar al cromatógrafo de líquidos a las condiciones establecidas para cada método analítico.

**LINEALIDAD DEL METODO.** Evaluar analizando placebos adicionados con cantidades perfectamente conocidas de cada uno de los analitos. Utilizar cantidades de placebo equivalentes a la cantidad de muestra sugerida por el método establecido con anterioridad y adicionar alícuotas a partir de una solución patrón conteniendo las vitaminas a evaluar. Las concentraciones corresponderán al 60, 80, 100, 110 y 120 % o un nivel mayor de la cantidad etiquetada. Analizar cada nivel de concentración de manera independiente y por triplicado, a excepción del nivel de 100% que se evaluará por sextuplicado. Utilizar el método de análisis propuesto con anterioridad y hacer la gráfica de los miligramos adicionados contra los miligramos recuperados calculando los parámetros de la tabla VII. El coeficiente de variación del 2.5% se establece para la precisión (repetibilidad, reproducibilidad), debido a la complejidad de las formulaciones y a la dificultad que suele presentar el análisis de vitaminas y más cuando se analizan simultáneamente, por otra parte, esta variación es justificable si se consideran los tiempos de análisis cortos y la especificidad

posible de lograr con esta técnica permitiendo poco tratamiento a la muestra además de ser aún mayor la precisión que con los métodos microbiológicos descritos en las farmacopeas

**EXACTITUD** Evaluar con los mismos resultados de la linealidad del método pero expresando los miligramos recuperados como porcentaje recuperado y calcular el promedio recuperado de los 18 datos obtenidos efectuar la prueba de hipótesis para el promedio recuperado y calcular el intervalo de confianza.

**PRECISION.** Evaluarla como repetibilidad y como reproducibilidad

*Repetibilidad.* Calcular del coeficiente de variación del porcentaje recuperado en los 18 datos obtenidos en la linealidad del método. Calcular también el coeficiente de variación para los 6 valores correspondientes al nivel del 100% para evaluar la precisión a este nivel.

*Reproducibilidad.* Evaluarla analizando por triplicado un lote del producto terminado de producción o piloto por dos analistas en dos días diferentes y calcular el coeficiente de variación total

En la figura 22 se esquematizan las fases de la validación de los métodos analíticos.

## VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

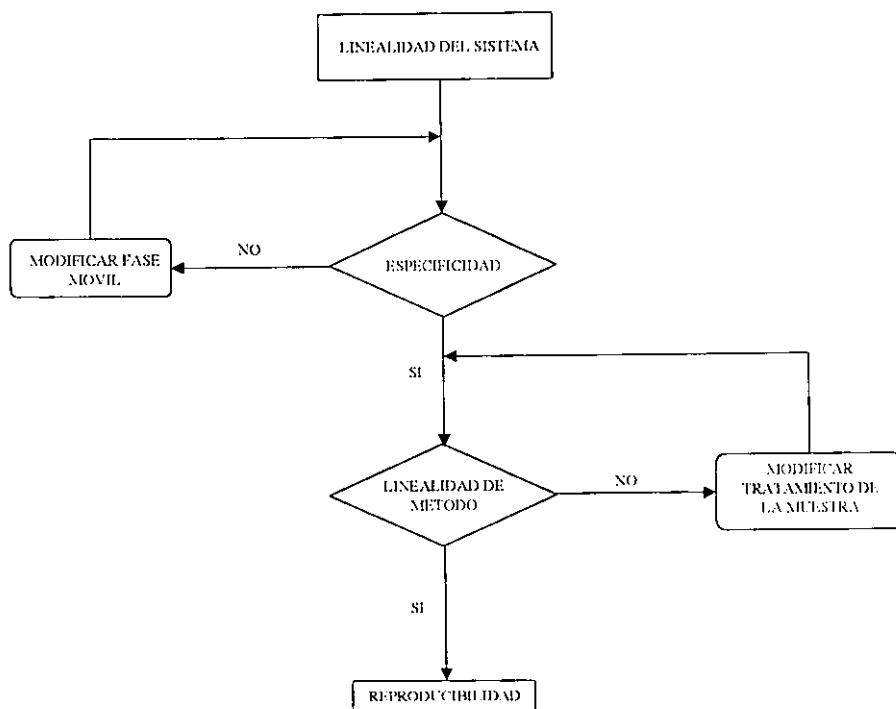


FIGURA 22. Diagrama para la validación de los métodos analíticos por CLAR



ANEXO 2

GRAFICAS DE LINEALIDAD OBTENIDAS PARA CADA PRINCIPIO ACTIVO EN CADA PRODUCTO.

PRODUCTO A: LINEALIDAD DEL METODO PARA LA NICOTINAMIDA EN SOLUCION ORAL USO VETERINARIO

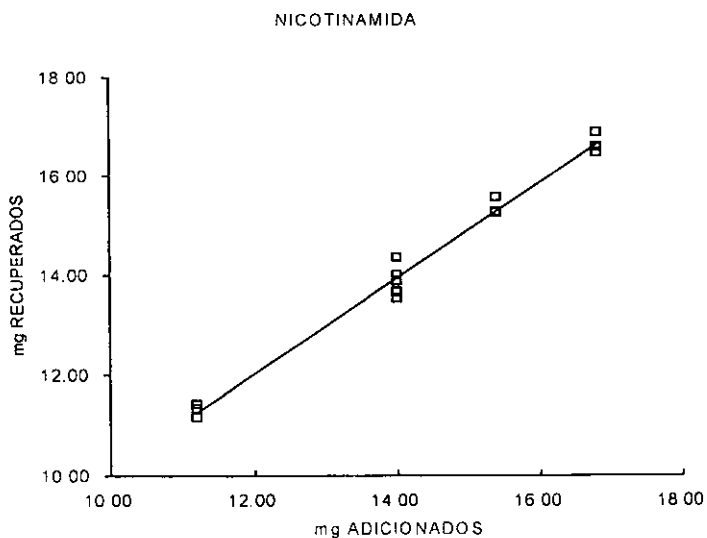


FIGURA 23. Linealidad del método en el análisis simultáneo de Riboflavina, Nicotinamida, Piridoxina y Tiamina en solución multivitamínica oral con minerales.

PRODUCTO A: LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA PIRIDOXINA Y TIAMINA EN SOLUCION ORAL USO VETERINARIO

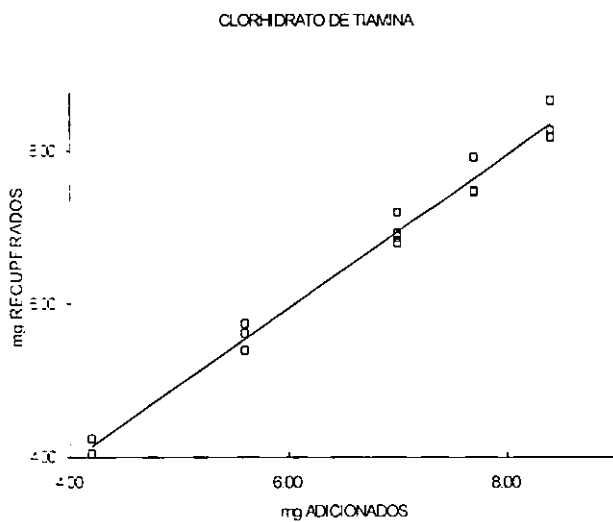
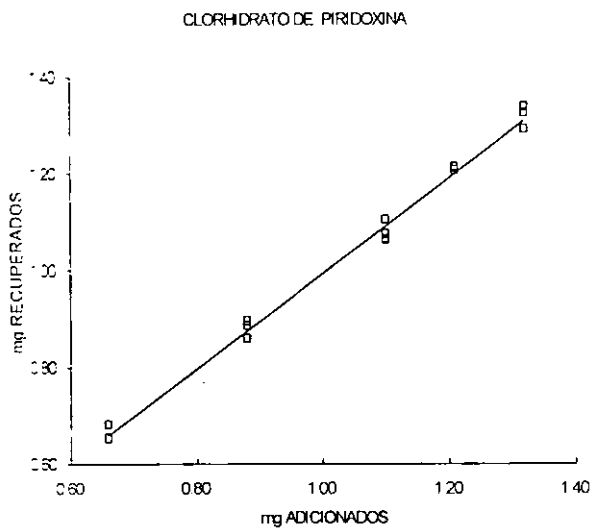


FIGURA 24. Linealidad del método en el análisis simultáneo de Riboflavina, Nicotinamida, Piridoxina y Tiamina en solución multivitáminica oral con minerales.

PRODUCTO B: LINEALIDAD DEL METODO PARA NICOTINAMIDA Y PIRIDOXINA EN SOLUCION INYECTABLE PARA USO VETERINARIO

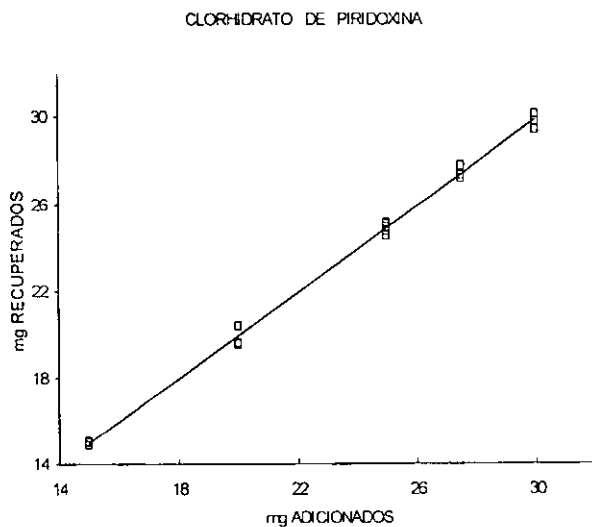
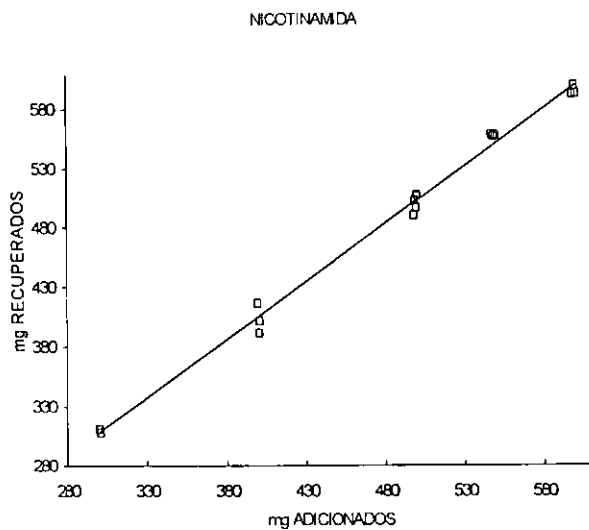


FIGURA 25. Linealidad del método en el análisis simultáneo de Nicotinamida, Piridoxina y Tiamina en solución multivitáminica inyectable con hierro.

PRODUCTO B: LINEALIDAD DE LOS METODOS PARA CLORHIDRATO DE TIAMINA Y RIBOFLAVINA EN SOLUCION INYECTABLE PARA USO VETERINARIO

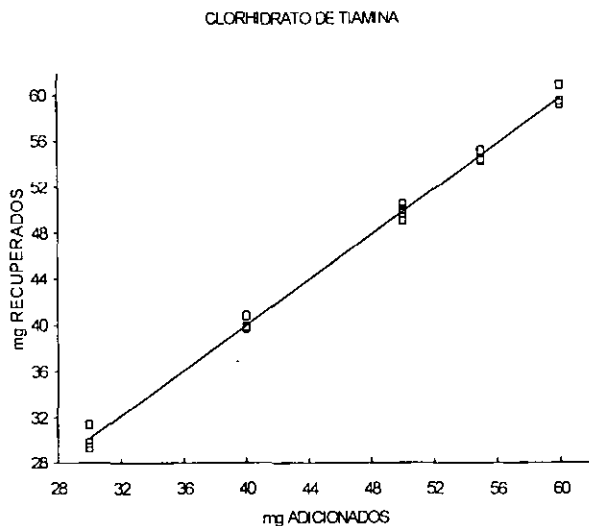


FIGURA 26. Linealidad del método en el análisis simultáneo de Nicotinamida, Piridoxina y Tiamina en solución multivitáminica inyectable con hierro.

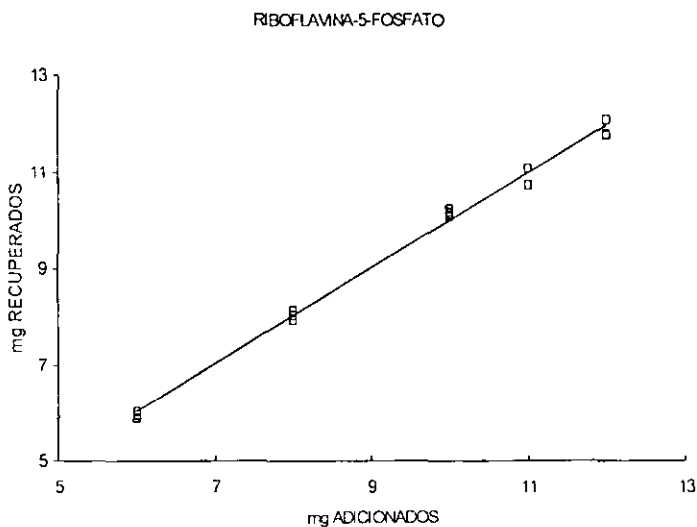


FIGURA 27. Linealidad del método para Riboflavina-5-fosfato en solución multivitáminica inyectable con hierro (valoración individual.)

PRODUCTO C: SOLUCION INYECTABLE PARA USO VETERINARIO

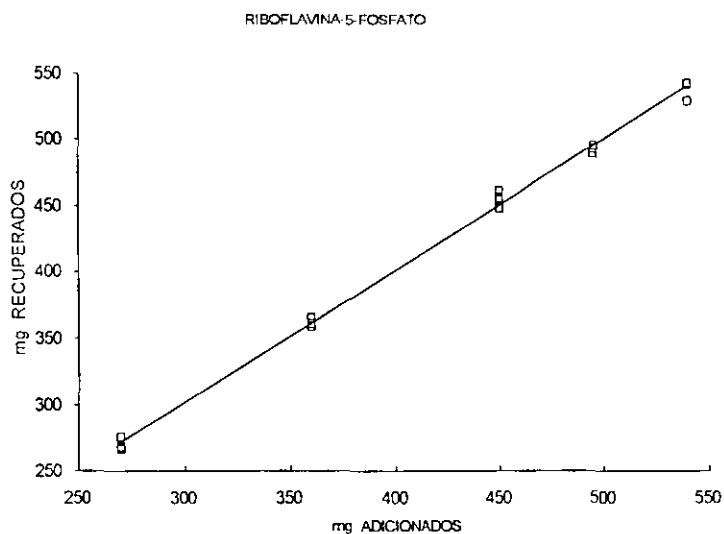
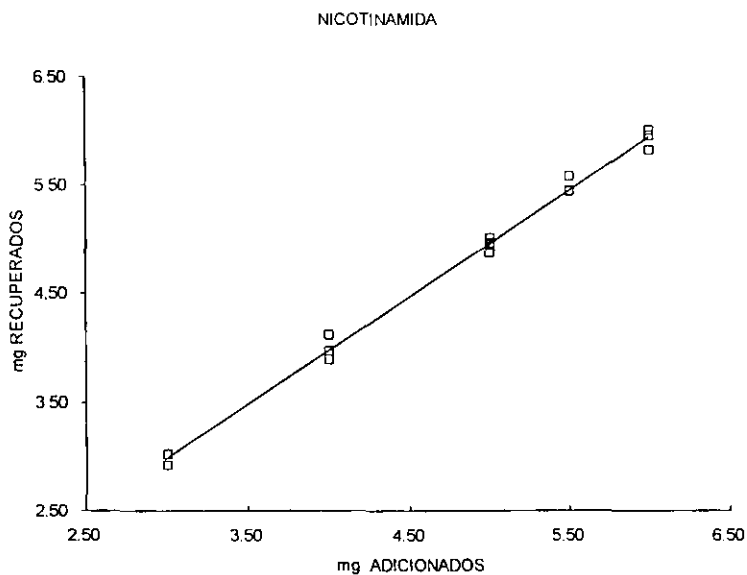


FIGURA 28. Linealidad de los métodos para el análisis de Nicotinamida y Riboflavina-5-fosfato en solución multivitáminica inyectable con aminoácidos (métodos independientes)

PRODUCTO D: GOTAS ORALES PARA USO HUMANO

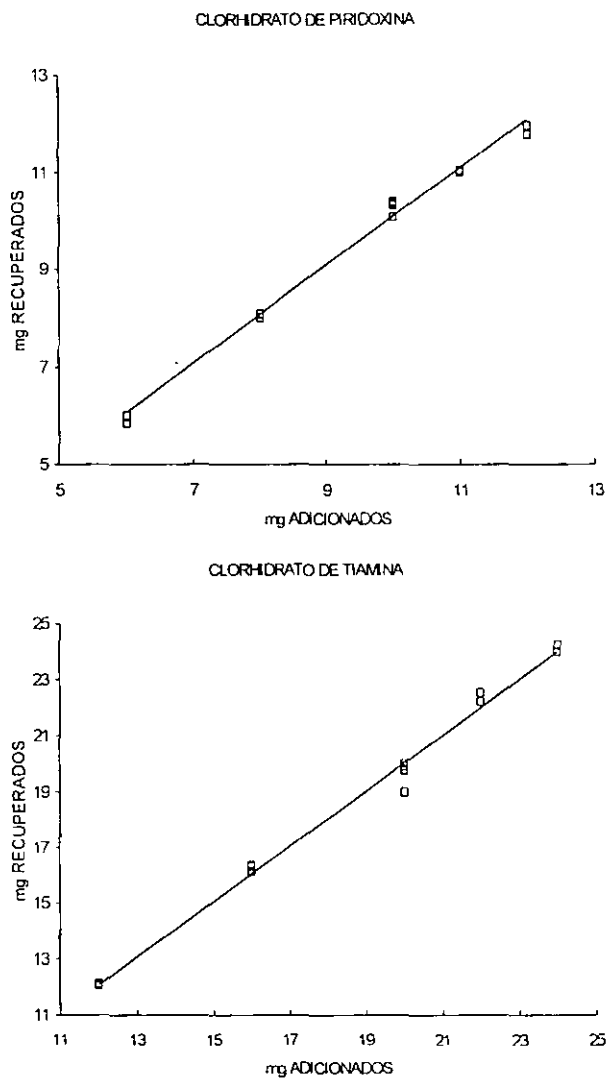


FIGURA 29. Linealidad del método para el análisis simultáneo del Clorhidrato de Tiamina y Piridoxina en gotas multivitamínicas orales.

PRODUCTO E: SOLUCION ORAL PARA USO HUMANO

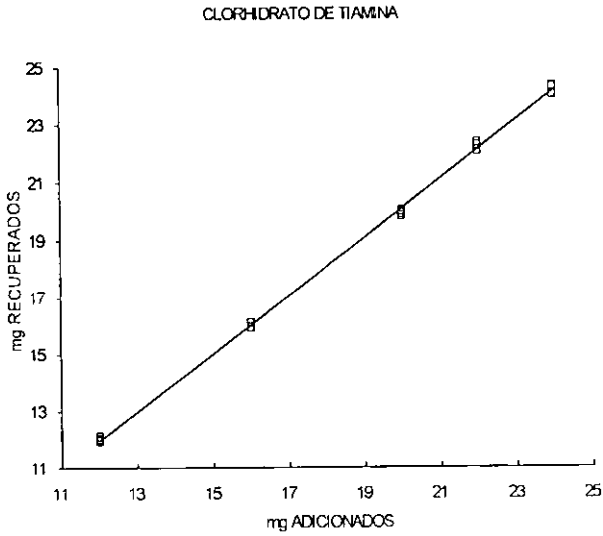
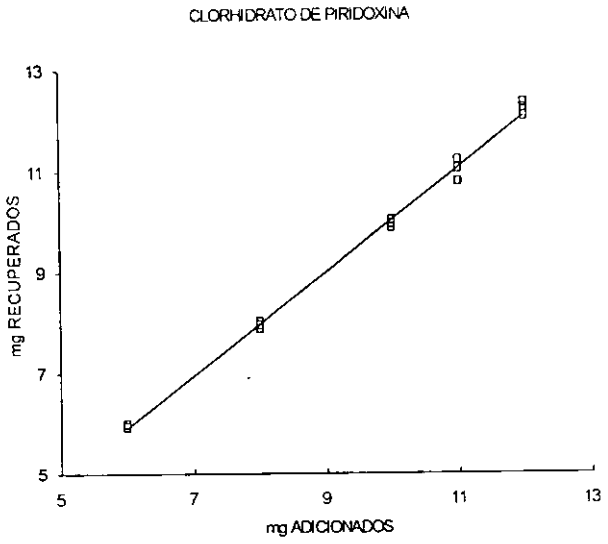


FIGURA 30. Linealidad del método para el análisis simultáneo de Clorhidrato de Tiamina y Clorhidrato de Piridoxina en solución multivitáminica oral.

PRODUCTO F: CAPSULAS DE GELATINA DURA PARA USO HUMANO

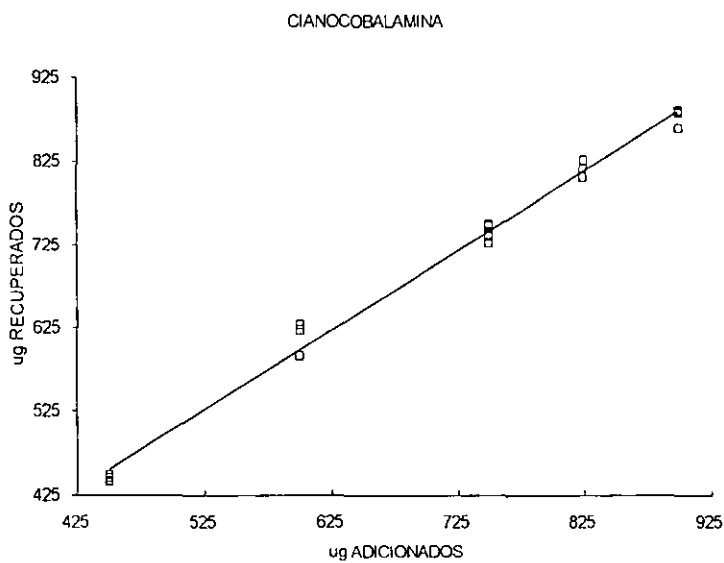
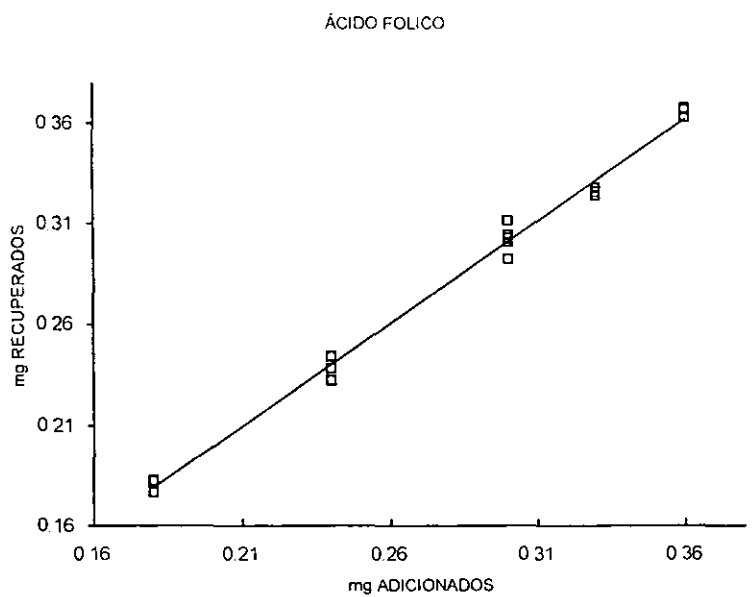


FIGURA.31. Linealidad de los métodos para el análisis de Acido fólico y Cianocobalamina en cápsulas de gelatina dura (métodos independientes)



PRODUCTO G: TABLETAS PARA USO HUMANO

ÁCIDO FOLICO

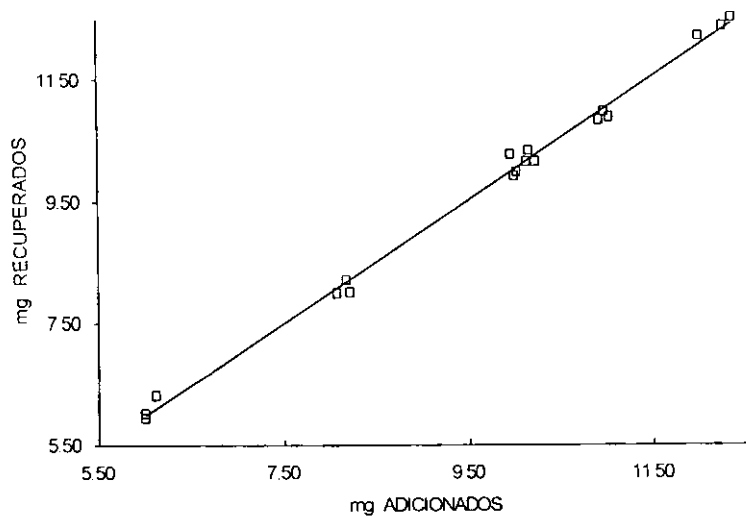


FIGURA 32. Linealidad del método para Acido fólico en tabletas (análisis individual).

## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 Hoover E Remington's pharmaceutical sciences. 15th Ed Pennsylvania Mack Publishing Company, 1975. p 938-964
- 2 Moffat A. Clarke's isolation and identification of drugs. 2nd. Ed. London The Pharmaceutical Press; 1986. p. 160-201, 360, 496, 633, 669, 807, 949, 959, 1014-1015
- 3 De Leenheer A. Lambert W. Modern Chromatographic analysis of vitamins 2nd Ed New York Marcel Decker Inc; 1992
- 4 Dalbacke J. Dahquist I. Determination of vitamin B<sub>12</sub> in multivitamin in multimineral tablets by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction J Chromatogr. 1991: 541: 383-392.
- 5 Dong M. Tsunehiko J. Factors affecting the ion-pair chromatography of water-soluble vitamins. J. Chromatogr. 1985: 442: 81-95.
- 6 Frenkel E High-Performance liquid chromatographic separation of cobalamins J Cromatogr 1979: 174: 393-400
- 7 Kirchmeier R. Upton R. Simultaneous determination of niacin, niacinamide, pyridoxine, thiamine and riboflavin in multivitamin blend by ion-pair high-pressure liquid chromatography., J. Pharm. Sci. 1978: 67 (10):1444-1446
- 8 Paveenvampen C. Liquid chromatography determination of folic acid in multivitamin preparation. J Pharm. Sci 1986: 75: 1192-1194
- 9 Pellerin F., Dumitrescu D Dosage des vitamines lipo et hydrosoluble dans les preparations polyvitaminees par chromatographie liquide haute performance Talanta 1980: 27 (3) 243-251
- 10 Reusch J., Amin M. High-performance liquid chromatography of water-soluble vitamins par simultaneous determination of vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> y C, nicotinamide, and folic acid in capsule preparations by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography The Analyst 1987: 112: 989-991
- 11 Shuster R. HPLC of pharmaceutical products vitamins application note AN 132-6 Hewlett Packard
- 12 Roche Vitamins and food chemicals division, department of human nutrition and health pharma industry unit Analytical procedures for the determination of vitamins in multivitamin preparations, Products Roche S A. de C V ,México D.F.

- 13 The United States Pharmacopoeia & National Formulary USP 24, NF 19 Philadelphia: National Publishing :1999; p.1914-1926, 2149-2152, 480, 1851, 2329-2380
14. Secretaria de Salud Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 7ª ed México Publicaciones e Impresiones de Calidad, 2000. p 226, 405, 1712
- 15 Department of health and social services for Northern Ireland .British Pharmacopoeia. United Kingdom HMSO; 1993. p. 565.
16. Helrich K. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 15th, ed. Arlington Virginia: Association of official analytical chemists, Inc, 1990. vol. II: p.1045-1106
- 17 Wills R. Shaw C Day W. Analysis of water-soluble vitamins by high pressure liquid chromatography J. Cromatogr. Sci. 1977; 15: 262-266.
18. Florey K. Analytical profiles of Drug Substances New York: Academic Press, 1981 vol. 10. p.182-288, vol. 13. p. 447-485. vol. 18 p. 413-458 vol. 19. p 221-259, 429-476.vol.45. p. 45-79.
- 19 DeRitter E. Vitamins in pharmaceutical formulations J. Pharm Sci 1982; 71 (10) 1073-1095.
- 20 Bühler V. Vademecum for vitamin formulations 2nd ed Germany Wissenschaftliche verlagsgesellschaft GmbH; 2001 p 7-127
- 21 Budavari S. O'Neil M.Smith A. Heckelman P.Kinneary J. The merck index and encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 12 ed. U.S.A: Merck & Co , Inc; 1996. p. 867-868, 4253, 6571,7149,8164, 8366, 9429, 10151,
- 22 Zweig G Sherma J. Handbook of chromatography general data and principles United States CRC Press, Inc, 1985 vol II. p 1-89
- 23 Abbott D. Andrews R. Introducción a la cromatografía. 2nd ed. España Alhambra, 1983 p 1-25
- 24 Snyder LL Kirkland J. Glajch J. Practical hplc method development 2nd Ed New York John Wiley and Sons. Inc; 1997. p 1-56, 100-230
- 25 Egan H Methods of analysis and analysis of methods J. of AOAC.1977 60 260-267
- 26 International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use Validation of analytical procedures: methodology ICH Harmonized Tripartite Guideline.1996.

- 27 Secretaria de Salud, Colegio Nacional de Q.F.B. Validación de Métodos Analíticos Guías oficiales
- 28 Marques M. J. Probabilidad y estadística para ciencias químico biológicas México McGraw- Hill Interamericana de México, 1991.
- 29 Hokanson C G A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development Part I the initial method validation process Pharm Tech. 1994: 118-130.
- 30 Hokanson C G A life cycle approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development, Part II changes and the need for additional validation Pharm. Tech. 1994: 92-100.
- 31 Inman E L General method validation guidelines for pharmaceutical Samples J Chromatogr. Sci. 1987: 25: 252-256.
- 32 Guerra J. Validation of analytical methods by FDA laboratories part I and part II Pharm Tech. 1986: 10: 74-84.