



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN**

**CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE LAS VITAMINAS B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub> Y  
CIANOCOBALAMINA PRESENTES EN UN INYECTABLE MEDIANTE  
UN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO MULTIVARIABLE**

**T E S I S**  
**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**  
**P R E S E N T A:**  
**GRISELDA CERVANTES SOLANO**

ASESOR: QFB. JOSÉ ANTONIO GARDUÑO ROSAS



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.

---

---

## **AGRADECIMIENTOS**

- ★ A mis padres que siempre han estado conmigo en cada uno de los pasos que he dado en mi vida, brindándome incondicionalmente su apoyo, comprensión y cariño. A los que quiero mucho y les estoy infinitamente agradecida por haberme ayudado a lograr todo lo que tengo.
  
- ★ A mi hermana Mony, que siempre ha estado a mi lado y a la que admiro ya que es una gran persona.
  
- ★ A mi sobrinita Danielita por ser esa personita tan especial en mi vida que me ha dado muchos momentos de felicidad.
  
- ★ A mi gran amiga la chinita a la que quiero y considero como una hermana, ya que siempre he contado con ella y me ha brindado su apoyo para seguir adelante.
  
- ★ A Toñito por ser una persona muy linda, con la que he pasado momentos muy bonitos de mi vida.
  
- ★ A mis amigos: Omeйда, Christian, Luís Miguel, Salvador, Alfredo, Ulises, Lupe, Rox, con los que pase grandes momentos y que gracias a ellos aprendí muchas cosas.
  
- ★ A mi asesor de tesis: QFB. José Antonio Garduño Rosas por haberme brindado todo su apoyo para que pudiera realizar este trabajo, y el cual me ha dejado grandes enseñanzas.
  
- ★ A mi jurado: QFB. Elia Granados Enríquez, QFB. Guadalupe Rebollar Barrera, MC. Adriana Morales Hipólito y el Dr. Roberto Díaz Torres, por su apoyo y sus aportaciones.
  
- ★ Y especialmente a Dios por haberme dado la oportunidad de vivir y aprender de ella cosas nuevas cada día.

---

## ÍNDICE:

<b>ABREVIATURAS</b> .....	5
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	6
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	6
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	7
<b>CAPÍTULO 1: GENERALIDADES</b>	
1.1. Definición de Vitaminas.....	9
1.2. Clasificación de las Vitaminas.....	9
1.3. Requerimientos Diarios.....	10
1.4. Propiedades Fisicoquímicas y Espectrales de la Cianocobalamina (B <sub>12</sub> ).....	12
1.5. Propiedades Fisicoquímicas y Espectrales del Clorhidrato de Piridoxina (B <sub>6</sub> ).....	13
1.6. Propiedades Fisicoquímicas y Espectrales del Clorhidrato de Tiamina (B <sub>1</sub> ).....	14
1.7. Métodos de Análisis de las Vitaminas.....	15
1.7.1. Métodos para la Determinación de Cianocobalamina.....	15
1.7.2. Métodos para la Determinación de Piridoxina.....	17
1.7.3. Métodos para la Determinación de Tiamina.....	18
1.8. Quimiometría.....	20
1.9. Tipos de Variables.....	20
1.10. Errores Experimentales.....	21
1.11. Modelos Univariantes y Multivariantes.....	22
1.12. Análisis Multivariante.....	22
1.13. Calibración Multivariante.....	23
1.13.1. Métodos de Calibración Multivariante.....	23
1.14. Mínimos Cuadrados Parciales (MCP).....	24
1.14.1. Algoritmo para el método de MCP.....	25
1.15. Validación del modelo.....	29
1.16. Validación Cruzada.....	30
1.16.1. Selección del número óptimo de factores.....	30
1.16.2. Selección del número de estándares para la calibración.....	31
1.16.3. Detección de muestras desechables (outliers).....	31
1.16.4. Selección de la Región Espectral.....	32
1.17. Validación.....	33
1.17.1. Definiciones de Validación.....	33
1.17.2. Objetivos de la Validación.....	34
1.17.3. Importancia de la Validación.....	34

---

1.18. Tipos de Validación.....	35
1.18.1 Validación Prospectiva.....	35
1.18.2. Validación Retrospectiva.....	36
1.18.3. Revalidación.....	36
1.19. Parámetros de Validación de los Métodos Analíticos.....	37
1.19.1 Exactitud.....	37
1.19.2. Precisión.....	37
1.19.3. Selectividad.....	38
1.19.4. Limite de Detección.....	39
1.19.5. Limite de Cuantificación.....	39
1.19.6. Linealidad.....	40
1.19.7. Rango.....	40
1.19.8. Tolerancia.....	40
1.19.9. Estabilidad.....	40
1.20. Criterios de Validación en Función del Tipo de Método Analítico.....	41

## **CAPÍTULO 2: DESARROLLO EXPERIMENTAL**

2.1. Materiales, Reactivos, Equipo y Software Utilizado en el Desarrollo y Validación del Método Analítico.....	43
2.1.1. Material.....	43
2.1.2. Reactivos.....	43
2.2.3. Equipo.....	43
2.2.4. Software.....	44
2.2. Desarrollo Experimental.....	44
2.3. Elaboración de los Espectros de Absorción.....	45
2.4. Selección del medio de disolución y longitudes de onda.....	47
2.5. Determinación de las concentraciones para formar la calibración.....	47
2.6. Elaboración de la calibración.....	49
2.7. Análisis de la Calibración.....	51
2.7.1. Análisis SCERP.....	51
2.7.2. Análisis de Linealidad.....	53
2.7.3. Análisis de Muestras Desechables (OUTLIERS).....	54
2.8. Ensayo Analítico.....	55
2.9. Validación.....	56
2.9.1. Linealidad del Sistema.....	56
2.9.2. Precisión del Sistema.....	60

---

---

2.9.3. Linealidad del Método.....	62
2.9.4. Exactitud del Método.....	66
2.9.5. Precisión del Método.....	68
2.9.6. Estabilidad de la Muestra Analítica.....	72
2.9.7. Tolerancia.....	75
2.9.8. Especificidad.....	80
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXOS</b>	
Anexo A. Preparación de los medios de disolución.....	88
Anexo B. Preparación de las soluciones stock para los barridos.....	89
Anexo C. Preparación de las soluciones stock para la calibración.....	90
Anexo D. Preparación de placebos cargados.....	91
Anexo E. Preparación de Solución Vehículo.....	92
Anexo F. Procedimiento para evaluar la estabilidad de la muestra analítica.....	93
Anexo G. Criterios de Aceptación para los parámetros de validación.....	95
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>97</b>

---

## ABREVIATURAS

B <sub>1</sub>	Tiamina
B <sub>6</sub>	Piridoxina
B <sub>12</sub>	Cianocobalamina
mg	Miligramos
µg	Microgramos
g	Gramos
UI	Unidades Internacionales
ml	Millilitros
nm	Nanómetros
UV	Ultravioleta
Abs	Absorbancia
mcg	Microgramos
DS.	Desviación estándar
CV.	Coefficiente de variación
R	Coefficiente de Correlación
R <sup>2</sup>	Coefficiente de Determinación
%	Porcentaje
hrs	Horas
T°	Temperatura
°C	Grados Centígrados
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
MCP	Mínimos Cuadrados Parciales
CLS	Classic Least Square (Regresión lineal Múltiple Clásica)
ILS	Inverse Least Square
PCA	Análisis de Componentes Principales
PLS	Partial Least Squares Regresión (Mínimos Cuadrados Parciales)
MCC	Mínimos Cuadrados Clásicos
Outliers	Muestras desechables
SCERP	Predicted Residual Error Sum of Squares (Sumatoria del cuadrado de los residuales)
MSE	Mean Square Error (Suma del error medio)
ICH	Internacional Conference on Harmonisation
FIP	Federación Internacional Farmacéutica
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
OMS	Organización Mundial de la Salud

---

---

### **OBJETIVO GENERAL:**

- ✦ Establecer un método analítico que sea confiable para determinar el contenido químico de la Vitamina B<sub>1</sub>, de la Vitamina B<sub>6</sub> y de Cianocobalamina presentes en un inyectable, por medio del método de Mínimos Cuadrados Parciales.

### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- ✦ Determinar las condiciones espectrofotométricas óptimas que nos permitan cuantificar a las vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub> y Cianocobalamina presentes en un inyectable.
- ✦ Establecer un modelo de calibración que permita la cuantificación simultánea de las tres vitaminas presentes en la muestra.
- ✦ Determinar el contenido químico de las tres vitaminas presentes en la muestra, por medio del Método de Mínimos Cuadrados Parciales.
- ✦ Validar el método analítico, evaluando los parámetros de: linealidad del sistema, linealidad del método, precisión, exactitud, estabilidad, tolerancia y especificidad, para asegurar la calidad del método.



---

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo que ha tenido la Industria Farmacéutica en los últimos años, la ha obligado a tener mayores exigencias en la optimización de procesos así como en la calidad de sus productos, lo cual hace que sea necesario el desarrollo de nuevos métodos de análisis que sean rápidos y confiables.

En la actualidad existen muy pocos métodos analíticos que permitan la determinación simultánea de varios activos dentro de una muestra, debido a que la mayoría de los métodos utilizados son selectivos o requieren de la separación de la muestra de otras sustancias que pueden interferir en su determinación. Siendo los métodos por Cromatografía los más utilizados para la cuantificación de 2 o más activos, ya que estos permiten la cuantificación y separación de varios componentes que se encuentren dentro de una mezcla compleja. Sin embargo estos métodos pueden presentar algunas desventajas como lo son el costo, reactivos utilizados, acondicionamiento del equipo y tiempo en preparación y lectura de las muestras.

En esta investigación se propone el desarrollo de un nuevo método analítico utilizando técnicas instrumentales sencillas como la Espectrofotometría y el uso de técnicas numéricas como el Método de Mínimos Cuadrados Parciales (MCP), por medio de las cuales se puede lograr la cuantificación simultánea de varios analitos, sin perder las ventajas de ser un método sencillo, fácil de utilizar y tener bajo costo.

La importancia de este trabajo radica en el desarrollo y validación de un nuevo método analítico para la determinación simultánea de tres vitaminas (Clorhidrato de Piridoxina, Clorhidrato de Tiamina y Cianocobalamina) presente en un inyectable por el método de Mínimos cuadrados Parciales (MCP), y con esto poder asegurar la calidad del producto farmacéutico analizado.

Dentro de la Industria Farmacéutica, la validación es un factor muy importante ya que por medio de esta se puede asegurar la calidad de los medicamentos, de la misma manera que se puede incrementar la productividad, la reducción de costos y el cumplimiento de normas y reglamentos oficiales.

---

# **CAPÍTULO 1:**

# **GENERALIDADES**

---

## 1.1. DEFINICIÓN DE VITAMINAS.

El término “vitamina” propuesto por Funk en 1911 significa “amina vital”, amina por ser un compuesto orgánico presente en baja concentración en los alimentos y vital por ser necesaria su presencia en la dieta diaria.<sup>1</sup>

Las vitaminas son compuestos efectivos en pequeñas cantidades, no aportan energía y no se utilizan como unidades estructurales del organismo, sino que son esenciales para la transformación de la energía y la regulación del metabolismo de las unidades estructurales.

Las vitaminas son componentes esenciales, que requieren ser ingeridos constantemente y por períodos prolongados para que el organismo se desarrolle completamente. Es por ello que la mejor fuente de estos micro-nutrientes esta en la alimentación. En las dosis correctas provocan un completo estado de nutrición en el cuerpo.<sup>2</sup>

## 1.2. CLASIFICACIÓN DE LAS VITAMINAS.

Las vitaminas se dividen en dos grandes grupos:

**Vitaminas Liposolubles:** Se caracterizan porque no son solubles en agua, se almacenan en el organismo y su ingesta en exceso puede provocar desajustes. Químicamente se trata de lípidos insaponificables, caracterizados por su incapacidad para formar jabones, ya que carecen en sus moléculas de ácidos grasos unidos mediante enlaces éster.<sup>3</sup> Las vitaminas que pertenecen a este grupo son las siguientes:

- **Vitamina A** o retinol (antixerofthalmica)
- **Vitamina D** o colecalciferol (antirraquítica)
- **Vitamina E** o tocoferol (Antioxidante)
- **Vitamina K** o naftoquinona (antihemorrágica)

---

**Vitaminas Hidrosolubles:** Aquellas solubles en agua. A diferencia de las vitaminas liposolubles no se almacenan en el organismo. Esto hace que deban aportarse regularmente y sólo puede prescindirse de ellas durante algunos días. El exceso de vitaminas hidrosolubles se excreta por la orina, por lo que no tienen efecto tóxico por elevada que sea su ingesta. <sup>3</sup>Y pertenecen a este grupo las siguientes vitaminas:

- **Vitamina C** o ácido ascórbico (antiescorbútica)
- **Complejo B**, las vitaminas que forman este complejo son:
  - **Vitamina B<sub>1</sub>** o tiamina (antineurítica)
  - **Vitamina B<sub>2</sub>** o riboflavina
  - **Vitamina B<sub>3</sub>**, ácido nicotínico o niacina
  - **Vitamina B<sub>5</sub>** o ácido pantoténico
  - **Vitamina B<sub>6</sub>** o piridoxina
  - **Vitamina B<sub>7</sub>**, vitamina H o biotina
  - **Vitamina B<sub>9</sub>**, vitamina M o ácido fólico.
  - **Vitamina B<sub>12</sub>** o cianocobalamina
  - **Vitamina B<sub>15</sub>** o ácido pangámico
  - **Vitamina B<sub>17</sub>**, laetril o amigdalina

### 1.3. REQUERIMIENTOS DIARIOS.

Las vitaminas son fundamentales para las diferentes especies, puesto que no pueden sintetizarse en el organismo y eso es justamente lo que la define como tal: la necesidad de su presencia en la dieta.

El requerimiento diario de vitaminas que el organismo necesita ha sido establecido científicamente tras años de investigación. Las cantidades necesarias son diferentes según sea el sexo y la edad de la persona; y en el caso de las mujeres también cambia durante el embarazo y la lactancia.

Sus valores se expresan en diferentes unidades, generalmente microgramos (µg) o miligramos (mg.) según sea la vitamina de la que se habla, pero también se puede encontrar indicada en unidades internacionales (UI). <sup>4</sup>

Tabla No. 1 Requerimientos diarios de vitaminas para la población Mexicana según el Instituto Nacional de Medicinas y Nutrición. <sup>(4)</sup>

	INFANTES		NIÑOS Y PÚBERES			ADULTOS	EMBARAZADAS	MUJERES LACTANTES
	0 a 5 m	6 a 11 m	1 a 3a	4 a 6a	7 a 18a			
Proteína (g)	13*	14*	20	28	1.3g/kg	1.0g/kg	+8	+20
Vitamina A (µg eq retinol)	400	400	400	450	1000	1000	800	1300
Vitamina D (µg) <sup>a</sup>	10	10	10	5	-----	-----	10	
Vitamina E (mg eq α. toc)	3	4	6	7	10	10	10	
Vitamina C (mg)	35	40	40	45	60	60	70	
Tiamina (mg) <sup>b</sup>	0.35	0.45	0.7	0.8	1.2	1.5	1.5	1.6
Riboflavina (mg) <sup>b</sup>	0.45	0.55	0.8	1.0	1.5	1.7	1.7	1.8
Niacina (mg eq) <sup>b</sup>	6	7	9	11	16	19	19	20
Vitamina B <sub>6</sub> (mg)	0.3	0.6	1.0	1.1	1.7	2.0	2.2	2.1
Vitamina B <sub>12</sub> (µg)	0.3	0.5	0.7	0.9	1.7	2.0	2.2	2.6
Folacina (µg)	25	35	50	65	180	200	400	280

Los **suplementos** son aquellos que se toman como aporte extra a los nutrientes de una dieta para evitar deficiencias, así dan cierto margen de seguridad para evitar enfermedades por deficiencias. Como ejemplo están los suplementos vitamínicos. <sup>5</sup>

Un **suplemento vitamínico** es un preparado que contiene vitaminas. Los cuales son fuentes concentradas de dichos nutrientes, solos o combinados, que se comercializan en formas farmacéuticas como cápsulas, tabletas, polvos y soluciones; y que se encuentran previstas para que se tomen en pequeñas cantidades unitarias y no como alimentos convencionales. Cuya finalidad es complementar la ingestión de estos nutrientes en la alimentación diaria.

Las vitaminas y minerales podrán proceder de fuentes ya sea natural o sintética y su selección debe basarse en criterios como la inocuidad y la biodisponibilidad. Además, los criterios de pureza deberán tener en cuenta las normas de la FAO/OMS, o bien, en su defecto, las farmacopeas, o criterios internacionales reconocidos.

La cantidad mínima de cada vitamina y/o mineral contenidos en un suplemento de vitaminas y minerales, por porción diaria de consumo según la indique el fabricante, deberá ser equivalente al 15 por ciento de la ingesta diaria recomendada determinada por la FAO/OMS. <sup>6</sup>

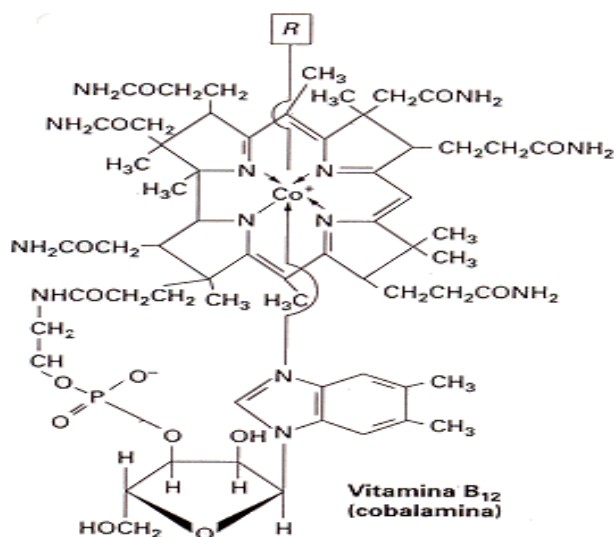
---

Los suplementos se pueden clasificar de dos tipos:

- 1) **Multivitamínicos o polivitamínicos:** Contienen muchas vitaminas diferentes y a veces también minerales. Un ejemplo serían los suplementos del complejo B, los cuales pueden contener varias vitaminas de este grupo, y a veces alguna otra, como la vitamina C.
- 2) **Suplementos de una sola vitamina:** Como su nombre indica contienen una vitamina concreta.<sup>5</sup>

#### 1.4. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y ESPECTRALES DE CIANOCOBALAMINA (B<sub>12</sub>).

**Estructura Química:**



**Nombre:** 5,6-Dimetilbecimidazolil cianocobalamida

**Fórmula Química:** C<sub>63</sub>H<sub>88</sub>CoN<sub>14</sub>O<sub>14</sub>P

**Peso Molecular:** 1355.38g/mol.

**Descripción:** Cristales rojos oscuros o polvo amorfo rojo. La forma anhidra es higroscópica.<sup>7</sup>

**Solubilidad:** Soluble en agua 1 en 80(1g/80ml), en etanol 1 en 180 (90%), prácticamente insoluble en cloroformo y en éter.

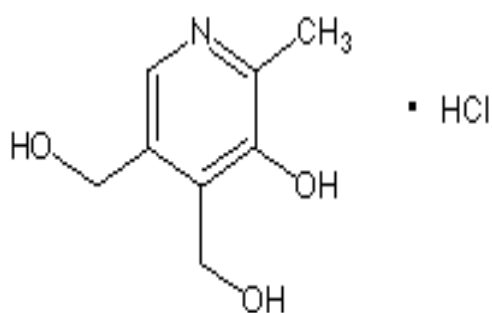
---

**Propiedades Espectrales:** En solución acuosa la cianocobalamina presenta una absorción máxima a 278, 361 y 551nm. Y presenta una absorbancia máxima en la región de 350 a 368nm.

**Estabilidad:** Las formas cristalinas de la vitamina B<sub>12</sub> son estables protegiéndolas de la luz. La cianocobalamina es la forma más estable de la vitamina B<sub>12</sub>. Y presenta una estabilidad óptima a un pH de 4.0 a 4.5.<sup>8</sup>

### 1.5. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y ESPECTRALES DE CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA (B<sub>6</sub>).

**Estructura Química:**



**Clorhidrato de Piridoxina**

**Nombre:** Clorhidrato de 3-hidroxi-4,5bis-(hidroximetil)-2-metilpiridina

**Fórmula Química:** C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>.HCl

**Peso Molecular:** 205.64g/mol.

**Descripción:** Polvo cristalino blanco o casi blanco, es estable en el aire y se descompone lentamente con la luz.<sup>7</sup>

**Solubilidad:** Soluble en agua (22g/100ml), soluble en alcohol, propilenglicol, parcialmente soluble en acetona, insoluble en éter y cloroformo.<sup>8</sup>

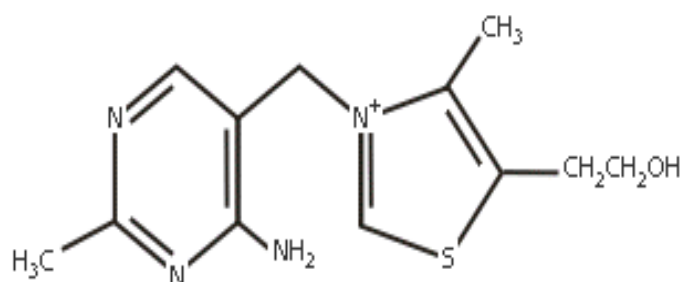
**Propiedades Espectrales:** En solución ácida presenta una absorbancia máxima a 290nm, en búfer de fosfatos pH 6.88 absorbe a 254nm y 324nm.

---

**Estabilidad:** Todas las formas de las vitaminas B6 son estables en soluciones ácidas y protegidas de la luz, es relativamente estable al calor, pero es afectada por la oxidación, la luz ultravioleta y el medio ambiente alcalino. <sup>9</sup>

## 1.6. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y ESPECTRALES DE CLORHIDRATO DE TIAMINA (B<sub>1</sub>).

### Estructura Química:



Tiamina (B<sub>1</sub>)

**Nombre:** Monoclorhidrato del cloruro de 3-[(4-amino-2-metil-5-pirimidinil)metil]-5-(2-hidroxiethyl)-4-metiltiazolio.

**Fórmula Química:** C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>4</sub>OS.HCl

**Peso Molecular:** 337.27g/mol.

**Descripción:** Polvo cristalino blanco o cristales blancos, cuando se expone al aire el producto anhidro, rápidamente absorbe agua cerca de un 4%.<sup>8</sup>

**Solubilidad** En agua 1g/ml, Etanol (95%) 1g/100ml, Etanol (100%) 0.3g/100ml), Glicerol 5g/100ml, insoluble en éter, benceno, hexano y cloroformo.

**Propiedades Espectrales:** El Clorhidrato de Tiamina Absorbe en la región de 200 a 300nm. La absorción máxima varía del pH de la solución. A valores de pH neutros y entre 5 presenta dos máximos de absorción en 234nm y 264nm.

**Estabilidad:** La tiamina es una de las vitaminas solubles en agua más estable. Su máxima estabilidad en solución es entre pH de 2 a 4. <sup>7</sup>



---

## 1.7. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LAS VITAMINAS.

Los principales Métodos de análisis de las vitaminas son de tres tipos:

1. **Biológicos:** en los que las ratas, ratones, cobayos y pollos, sirven como animales de ensayo.
2. **Microbiológicos:** que emplean bacterias que requieren algunas de las vitaminas hidrosolubles; son rápidos, específicos y precisos. Estos métodos se utilizan para la fabricación y el control de laboratorio de la producción de algunas vitaminas.
3. **Químicos:** que utilizan un color característico o una reacción sensible específica para los compuestos; existen para la mayoría de las vitaminas en mezclas no complicadas. Las separaciones cromatográficas seguidas de diversas técnicas de detección, brindan medios alternativos de cuantificación.<sup>10</sup>

### 1.7.1. Métodos para la Determinación de Cianocobalamina.

Los métodos disponibles para ensayos de vitamina B<sub>12</sub> incluyen la polarografía, espectrofotométricos, métodos cromatográficos, procedimientos microbiológicos y procedimientos de radio ligando.

Sin embargo, la cromatografía de líquidos es aplicada únicamente para realizar determinaciones en suplementos y preparaciones farmacéuticas que contengan altas concentraciones de vitamina B<sub>12</sub>.

El Compendio Regulatorio y el Handbook de Métodos de Análisis han resumido los procedimientos para la determinación adecuada de Cianocobalamina en productos farmacéuticos, biológicos y alimenticios, como se observa en la siguiente tabla:<sup>8</sup>

Tabla No. 2 Compendio Regulatorio y Handbook de Métodos de Análisis para la Vitamina B<sub>12</sub>

<b>FUENTE</b>	<b>FORMA</b>	<b>APLICACIÓN</b>	<b>MÉTODOS PROPUESTOS</b>
<b>U.S Formulario Nacional Farmacopea, 1995</b>	Cianocobalamina	Cianocobalamina soluble en aceite y en agua  Vitamina soluble en cápsulas/tabletas agua/aceite/minerales	Método 1: CLAR, 550nm  Método 2: Microbiológico
	Cianocobalamina	Vitamina soluble en agua en cápsulas/tabletas agua/aceite/minerales	Método 1: CLAR, 550nm  Método 2: Microbiológico
	Cianocobalamina	Cianocobalamina Co <sup>57</sup> en cápsulas /solución oral	Método 2: Microbiológico
	Cianocobalamina	Cianocobalamina en inyectables	Espectrofotométrico 361nm
	Cianocobalamina	Cianocobalamina (NLT 96%, NMT 100.5%)	Espectrofotométrico 361nm
<b>Farmacopea Británica, 15th ed, 1993</b>	Cianocobalamina	Cianocobalamina	Espectrofotométrico 361nm
	Cianocobalamina	Cianocobalamina en inyectables	Espectrofotométrico 361nm
	Cianocobalamina	Cianocobalamina en tabletas	CLAR, 361nm
	Cianocobalamina	Cianocobalamina Co <sup>57</sup> en cápsulas	CLAR, 361nm y Detector Gamma para Co <sup>57</sup>

---

### 1.7.2 Métodos para la Determinación de Piridoxina.

Por varias razones el análisis por CLAR es el método preferido para la determinación de la vitamina B<sub>6</sub>. En el análisis de alimentos este puede ser preciso complementándolo con ensayos microbiológicos y en el análisis de sangre mediante procedimientos enzimáticos e inmunológicos.

El Compendio Regulatorio y Handbook de Métodos de Análisis han resumido los métodos más útiles para la determinación de la vitamina B<sub>6</sub> en la siguiente tabla:<sup>8</sup>

Tabla No.3 Compendio Regulatorio y Handbook de Métodos de Análisis para la Vitamina B<sub>6</sub>

FUENTE	FORMA	APLICACIÓN	MÉTODOS PROPUESTOS
<i>U.S Formulario Nacional Farmacopea, 1995</i>	Clorhidrato de Piridoxina	Clorhidrato de Piridoxina en agua y en aceite. Vitamina soluble en cápsulas/tabletas agua/aceite/minerales.	CLAR, 280nm
	Clorhidrato de Piridoxina	Clorhidrato de Piridoxina en agua. Vitamina soluble en cápsulas/tabletas agua/aceite/minerales.	CLAR, 280nm
<i>USP 23NF 18, Suplemento Nutricional, Monografías Oficiales</i>	Clorhidrato de Piridoxina	Clorhidrato de Piridoxina (NLT 98%, NMT 102%)	Colorimetría, 650nm
	Clorhidrato de Piridoxina	Clorhidrato de Piridoxina tabletas/inyecciones	Colorimetría, 650nm
<i>Farmacopea Británica, 15th ed, 1993</i>	Clorhidrato de Piridoxina	Clorhidrato de Piridoxina	Titulación
	Clorhidrato de Piridoxina	Piridoxina en tabletas	Espectrofotométrico, 290nm

### 1.7.3. Métodos para la Determinación de Tiamina.

Los métodos que se utilizan actualmente para la determinación de tiamina incluyen el método clásico de Tiocromo, análisis microbiológico y CLAR.<sup>8</sup>

La determinación de la Tiamina en los alimentos, materiales Biológicos y productos Farmacéuticos, se efectúa casi con exclusividad mediante el método fluorométrico de tiocromo. Al oxidarse con ferrocianuro en solución alcalina, la tiamina se transforma en tiocromo, que tiene una fluorescencia azul intensa. Es un método muy sensible y se correlaciona bien con los resultados del bioanálisis. Pero la secuencia de la determinación implica la extracción de la vitamina, hidrólisis enzimática, absorción, elusión y oxidación a tiocromo, que se extrae con isobutanol y se determina por fluorometría.<sup>3</sup>

Los métodos de análisis para la tiamina se encuentran resumidos en la siguiente tabla:<sup>8</sup>

Tabla No. 4 Compendio Regulatorio y Handbook de Métodos de Análisis para la Vitamina B<sub>1</sub>

FUENTE	FORMA	APLICACIÓN	MÉTODOS PROPUESTOS
<b>U.S Formulario Nacional Farmacopea, 1995</b>	Tiamina	Tiamina en aceite y en agua.	CLAR, 280nm
	Clorhidrato de Tiamina	Vitamina soluble en cápsulas/tabletas agua/aceite/minerales.	
<b>USP 23NF 18, Suplemento Nutricional, Monografías Oficiales</b>	Tiamina	Tiamina en agua	CLAR, 280nm
	Clorhidrato de Tiamina	Vitamina soluble en cápsulas/tabletas agua/aceite/minerales.	
	Tiamina	Clorhidrato de Piridoxina (NLT 98%, NMT 102%)	CLAR, 254nm
Clorhidrato de Tiamina			
	Tiamina	Clorhidrato de Piridoxina	CLAR a 254nm
	Clorhidrato de Tiamina	En elixir/ inyectables	

	Tiamina Clorhidrato de Tiamina	Clorhidrato de Tiamina en tabletas	Fluorométrico por tiocromo Ex $\lambda$ = 365 Em $\lambda$ = 435
	Monohidrato de Tiamina	Monohidrato de Tiamina (NLT 98%, NMT 102%)	CLAR, 254nm
	Monohidrato de Tiamina	Monohidrato de Tiamina en Elixir	CLAR, 254nm
<b>Farmacopea Británica, 15th ed, 1993</b>	Clorhidrato de Tiamina	Clorhidrato de Tiamina	Potenciométrico
	Monohidrato de Tiamina	Nitrato de Tiamina	Titulación
	Clorhidrato de Tiamina	Tiamina en Inyectables	CLAR, 244nm

---

## 1.8. QUIMIOMETRÍA.

En 1975, *The Chemometrics Society* definió la Quimiometría como “la disciplina química que utiliza métodos matemáticos y estadísticos para diseñar o seleccionar procedimientos de medida y experimentos óptimos, para proporcionar la máxima información química mediante el análisis de datos químicos.

D.L. Massar define la Quimiometría como “la disciplina química que utiliza la Matemática, la Estadística y la Lógica formal para diseñar o seleccionar procedimientos experimentales óptimos, proporcionar la máxima información química relevante a partir del análisis de datos químicos, y obtener conocimiento a partir de sistemas químicos”. (1997).<sup>11</sup>

Su objeto es optimizar cada fase del análisis para potenciar e incrementar el conocimiento de todo proceso analítico en su conjunto. La cual se sustenta en modelos matemáticos sencillos y quizás algunos mas complejos para los sistemas multivariantes que requieren un mayor uso del algebra vectorial.<sup>12</sup>

## 1.9. TIPOS DE VARIABLES:

Atendiendo su naturaleza las variables pueden ser:

- a) **Variables de escala:** (también llamadas valores): Son las variables que proporcionan la información relativa de los objetos en forma numérica (concentración, absorbancia, conductividad, etc.). Este tipo de variables se incluyen en vectores escalares los cuales son utilizados para formar matrices.
  
- b) **Variables Categóricas:** Expresan la pertenencia de cada objeto a un determinado grupo o categoría. Estas variables no se expresan mediante una escala numérica, sino tan solo mediante un código clasificatorio de los objetos. Sirven para especificar que objetos deben de incluirse en un cálculo o formar parte de una matriz y para mejorar las representaciones gráficas, facilitando así la interpretación de los resultados.<sup>11</sup>

---

## 1.10. ERRORES EXPERIMENTALES.

Existen dos clases de errores

- 1) **Errores aleatorios:** (Debidos únicamente al azar), son directamente calculables y aparecen por causas incontroladas de naturaleza errática e imprevisible. Pueden tener lugar en dos sentidos (por exceso y por defecto) con igual probabilidad y reducirse hasta límites aceptables, pero jamás anularse, sea cual fuere el operador o el método empleado.
  
- 2) **Errores Sistemáticos:** Los errores sistemáticos son de tipo no aleatorio, se pueden estimar con patrones adecuados, pero no son directamente calculables. Se originan en cualquiera de los tres pilares implicados en el método de análisis (analista, método e instrumentación), bien sea por sí mismos, por sus interacciones o con el entorno. Los errores sistemáticos pueden ser:
  - a) *Personales:* Son los errores debido a los juicios que hace el experimentador. Aparecen en la mayoría de casos en que se presenta un error importante en métodos firmemente establecidos. Pueden minimizarse trabajando con cuidado y autodisciplina.
  
  - b) *Del método:* Se deben básicamente al comportamiento químico y/o físico no ideal de los reactivos o reacciones. Muchos errores del método se deben a interferencias químicas y su eliminación requiere un profundo conocimiento de la muestra y de las propiedades fisicoquímicas del analito. Afectan todas las determinaciones.
  
  - c) *Instrumentales:* Son debidos a la discrepancia entre el valor nominal y real. Se corrigen procediendo periódicamente al contraste y aforo del material (calificación del instrumento).

En general los errores sistemáticos son los más importantes en magnitud dentro del análisis y aun difíciles de revelar. La mejor forma de detectarlos y corregirlos es antes de validar el método.<sup>12</sup>

---

### 1.11. MODELOS UNIVARIANTES Y MULTIVARIANTES.

Los *modelos univariantes* son los modelos más sencillos que pueden postularse. Todo valor observado de la variable dependiente se expresa como una función lineal de una o más variables independientes. Tiene medidas en los que únicamente se obtiene un valor numérico o escalar. La aplicación de estos métodos supone que la respuesta instrumental es consecuencia de la presencia de un solo componente químico, es decir, no hay interferencias ni contribuciones desconocidas al ruido de fondo en la señal instrumental.

En los *modelos multivariantes* existe más de una variable dependiente, en la cual los datos se ordenan en una tabla o matriz de datos, donde cada columna corresponde a una variable y cada fila a una muestra. En este caso no es necesario modelar explícitamente las interferencias ni el ruido de fondo antes de extraer la información química relevante, aunque es necesario que los patrones sean de la misma naturaleza que las muestras estudiadas.<sup>13</sup>

### 1.12. ANÁLISIS MULTIVARIANTE.

El análisis de muestras que contienen mezclas de compuestos químicos constituye uno de los retos más importantes de la química analítica. La dificultad aumenta cuando se pretende determinar simultáneamente a estos compuestos a bajas concentraciones o en presencia de otras sustancias que tienen estructuras o propiedades similares las cuales interfieren en su determinación.

Los métodos utilizados tradicionalmente para resolver la falta de selectividad en las muestras, consisten en la separación previa de los compuestos químicos puros antes de analizarlos. Si la separación ha sido completa (ejemplo: por cromatografía), tan solo es necesaria una medida univariante para tener la información cuantitativa deseada. No obstante esta requiere de un costo elevado, ya que se necesita tener una instrumentación analítica sofisticada e invertir tiempo en las condiciones de separación. Como alternativa se han desarrollado métodos quimiométricos de análisis multivariado, los cuales permiten extraer la información requerida sobre los compuestos de interés de las muestras a partir del tratamiento de datos.<sup>13</sup>



---

El análisis multivariante comprende un conjunto de técnicas que permiten el tratamiento simultáneo de numerosas observaciones y variables. La importancia y la utilidad de los métodos multivariados aumentan al incrementar el número de variables que se están midiendo y el número de unidades experimentales que se están evaluando.

A menudo el objetivo primario de los análisis multivariados es resumir grandes cantidades de datos por medio de relativamente pocos parámetros. El tema subyacente de muchas técnicas multivariadas es la simplificación. El interés del análisis multivariado es encontrar relaciones entre las variables de respuesta, las unidades experimentales y ambas.<sup>14</sup>

### **1.13. CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE.**

La calibración multivariante comprende un conjunto de pasos matemáticos que permiten de forma selectiva y confiable extraer la máxima información química del análisis de muestras a partir de señales o respuestas instrumentales.

El objetivo de los métodos de calibración multivariante es establecer modelos de calibración que sean capaces de predecir el valor de la propiedad estudiada para nuevas muestras a las que se han asociado una señal analítica.<sup>13</sup>

La calibración multivariante significa entonces utilizar simultáneamente numerosas variables  $X(x_1, x_2, \dots, x_n)$  para determinar cierta(s) variable(s)  $Y$ . Como su propósito fundamental en química analítica es establecer la fórmula de predicción  $Y = F(x)$ , se asume que  $X$  corresponde a las mediciones instrumentales y  $Y$  a la cantidad del analito.<sup>14</sup>

#### **1.13.1. Métodos de Calibración Multivariante.**

Existen diferentes tipos de calibración multivariante, por lo cual la elección del más adecuado depende del tipo de la muestra a analizar, el conocimiento del sistema y de los datos disponibles. Algunos de los métodos más utilizados actualmente se muestran a continuación:

- 
- ♣ **Regresión lineal Múltiple Clásica** (CLS, Classic Least Square): Asume el cumplimiento de la ley Lambert-Beer para cada uno de los componentes de la mezcla, en todo el intervalo de trabajo y la aditividad de las absorbancias en las muestras. La señal debida a una muestra es función de la concentración de cada componente por un coeficiente de proporcionalidad.
  
  - ♣ **Regresión Lineal Múltiple Inversa** (ILS, Inverse Least Squares): Asume una relación entre la absorbancia y la concentración que es inversa a la Ley Lambert-Beer. La concentración es función de la absorbancia a cada longitud de onda. La principal ventaja es que no es necesario conocer la concentración o contribución de todas las especies absorbentes de la mezcla para la cuantificación de los analitos de interés.
  
  - ♣ **Análisis de Componentes Principales PCA:** Este método consiste en buscar un conjunto de vectores tal que cuando se multipliquen entre ellos se produzca la matriz de datos original. Este análisis permite la reducción de dimensionalidad y se utiliza para analizar variables y buscar asociaciones entre ellas, tendencias y también se puede utilizar para analizar muestras.
  
  - ♣ **Mínimos Cuadrados Parciales MCP** (PLS, Partial Least-Squares Regression): Este método intenta que los primeros componentes contengan la mayor información para la predicción de las muestras en los primeros compuestos principales. Es un método de análisis de espectro completo en el que no se requiere conocer a todos los componentes de la mezcla y analiza a un componente químico sin la necesidad de su separación.<sup>13</sup>

#### 1.14. MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (MCP).

El método de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS, por sus siglas en inglés) fue desarrollado por Herman Wold en 1975, para ser aplicada en ciencias económicas y sociales. Sin embargo gracias a las contribuciones de Svante Wold, ha ganado popularidad en el área de la química conocida como *Quimiometría*, en donde se analizan datos que se caracterizan por muchas variables predictorias, con problemas de multicolinealidad y pocas unidades experimentales en estudio.<sup>15</sup>

---

La metodología PLS generaliza y combina características del Análisis de Componentes Principales y Análisis de Regresión Múltiple. El cual es útil para construcción de modelos de predicción cuando los factores son muchos y altamente colineales, además de ser una herramienta útil cuando el objetivo es la predicción y no existe una necesidad práctica de limitar el número de factores medidos.

Mínimos cuadrados parciales es un método de calibración multivariante el cual es capaz de relacionar la concentración de elementos directamente con espectros medidos(o porciones de ellos). En donde las variables espectrales son colectadas como una matriz  $X$  con número de filas igual al número de muestras y el número de columnas igual al número de canales en el espectro.<sup>16</sup>

La diferencia con el PCA es que intenta que los primeros componentes contengan la mayor información para la predicción de la matriz  $Y$ . Para ello, durante la etapa de la calibración, el algoritmo PLS utiliza tanto la información contenida en la matriz de datos (matriz  $X$ , por ejemplo datos cinéticos, espectrofotométricos) como la información contenida en la matriz de la propiedad a determinar (matriz  $Y$ , por ejemplo concentraciones) obteniéndose unas variables auxiliares llamadas variables latentes, factores o componentes, que tienen un gran parecido a los componentes principales que se hallan a partir de un PCA.<sup>13</sup>

El algoritmo de MCP es una poderosa técnica para el control de procesos estadísticos multivariados. La base del algoritmo es primero definir los vectores de peso que determinan las direcciones de proyección, en seguida utilizan las variables latentes derivadas de los vectores de peso para construir finalmente el modelo.<sup>14</sup>

#### **1.14.1. Algoritmo para el método de MCP.**

El algoritmo utilizado para el método de MCP es el establecido por Haaland, el cual realiza un análisis de la calibración y la predicción para un solo componente a la vez. Lo cual significa que solo se emplea la concentración de un solo componente de interés en los datos de la calibración, mientras que las demás concentraciones de los componentes no se incluyen en el análisis. Sin embargo, si se desea conocer la concentración de algún otro componente presente en la mezcla, lo único que se debe hacer es realizar el análisis en donde se incluya este componente en los datos de calibración.<sup>17</sup>

---

El algoritmo de MCP consta de dos etapas:

- A) Calibración
- B) Predicción

**A) CALIBRACIÓN:** <sup>18,19</sup>

En esta primera etapa, se relacionan las absorbancias obtenidas a diferentes longitudes de onda y la concentración del componente químico de interés se estima por medio de un conjunto de soluciones de referencia que incluyen las posibles combinaciones de los componentes que se encuentran dentro de la mezcla. De la cual se obtienen dos sistemas matriciales, una matriz A en donde se encuentran los valores de absorbancia a las diferentes longitudes de onda y un vector C en donde se encuentran el número de soluciones.

Una vez establecido lo anterior, se elabora el modelo para MCP resolviendo el sistema de matrices conforme al siguiente algoritmo:

**1) Pretratamiento de Datos:** Se centran A y C. Sacando el promedio de la matriz A y del vector C, el cual se resta a cada uno de los valores de absorbancia y concentración respectivamente.

**2) Formación del vector cargador de peso( $W_h$ ):**

Modelo:  $A = C W_h' + E_A$

Solución:  $W_h = A' C / C' C$

Este paso es en realidad una Calibración de Mínimos Cuadrados Clásicos (MCC), en el cual se asume que se conoce la concentración de uno de los componentes de la muestra analítica. Una vez obtenidos los valores de  $W_h$ , estos deben ser normalizados.

**3) Formación del Vector indicador o variable latente( $t_h$ ):**

Modelo:  $A = t_h W_h' + E_A$

Solución:  $t_h = A W_h$

---

El vector  $t_h$  representa la cantidad o intensidad del primer vector de carga en las muestras de calibración para un sistema coordinado de MCP. En donde cada vector  $t_h$  esta relacionado tanto por A como por C y no solamente por A como en PCA.

**4) Relación del vector indicador con las concentraciones:**

Modelo:  $C = V_h t_h + e_c$

Solución:  $V_h = t_h' C / t_h' t_h$

**5) Formación del vector de carga  $b_h$  para A:**

Modelo:  $A = t_h b_h' + E_A$

Solución:  $b_h = A t_h' / t_h' t_h$

**6) Cálculo de residuales en A y C:**

Espectros Residuales:  $E_A = A - t_h b_h'$

Concentraciones Residuales:  $e_c = C - V_h t_h$

El producto del vector indicador  $t_h$  y el vector de carga  $b_h$  es una aproximación de MCP para el espectro de calibración. El producto de  $V_h$  por  $t_h$  es una estimación de la concentración del componente de interés por el método de MCP basado en el espectro.

**7) Incrementar h**, sustituyendo  $E_A$  por A y  $e_c$  en C en el paso 2 y continuar para obtener tantos factores como sea necesario para optimizar el modelo.

**B) PREDICCIÓN:**<sup>18,19</sup>

En esta etapa, se estima la concentración del componente de interés a partir del espectro obtenido para una muestra problema, aplicando cualquiera de los dos métodos de predicción establecidos para MCP como se describen a continuación:

---

## B.1. Método 1:

Este método involucra el cálculo de las intensidades espectrales ( $t_h$ ) del espectro de la muestra problema en el nuevo sistema de coordenadas obtenido durante la etapa de calibración. Teniendo como principio básico la generación de “residuales espectrales”, que no es más que minimizar la suma de cuadrados de las diferencias entre los valores espectrales estimados por el modelo y los valores espectrales medidos experimentalmente.

**1) Centrar datos de “a”:** usando los datos de la calibración, es decir, se sustrae la media de los datos de la calibración de cada uno de los valores espectrales.

**2) Cálculo de la variable latente  $t_h$ :**

$$t_h = a - W_h$$

**3) Cálculo de la concentración:**

$$C_h = C_{h-1} + V_h t_h$$

**4) Cálculo de Residuales:** Donde  $e_h$  es el error asociado al vector de las absorbancias y  $e_{h-1}$  es el error asociado a una de las calibraciones.

$$e_h = e_{h-1} - t_h b_h'$$

**5) Incremento de h:** sustituir  $e_h$  por “a” y repetir desde el paso 2, hasta calcular el número óptimo de factores empleados en la calibración.

## B.2. Método 2:

En este método para poder predecir la concentración del componente de interés, se realiza a partir del espectro obtenido para una muestra problema, involucra el cálculo y el uso del vector del coeficiente de regresión final  $\mathbf{k}$ , el cual tienen las mismas dimensiones que un espectro normal, el cual puede calcularse de la siguiente forma:

---

1) Después de la etapa de calibración para MCP, **calcular el coeficiente de regresión final k:**

$$k = W(B^T W)^{-1} V^{-1}$$

2) **Cálculo del residual  $e_c$ :**

$$e_c = c_0 - a_0 k$$

3) **Cálculo de la concentración:**

$$c = ak + e_c$$

En este método los valores de  $a$  no son centrados, mientras que  $W$  y  $B$  son las matrices obtenidas en la etapa de calibración que contienen los vectores  $W_h$  y  $b$  obtenidos hasta el número de factores óptimo para el modelo;  $v$  es el vector obtenido utilizando todos los  $v_h$  óptimos calculados para el modelo y  $a_0 =$  el vector de la media del espectro obtenida en la etapa de calibración.

### 1.15. VALIDACIÓN DEL MODELO.

Validar un modelo significa aplicar el modelo calculado a un número limitado de muestras de las cuales se conoce la propiedad que el modelo predice. Los resultados obtenidos mediante el modelo se comparan estadísticamente con los valores de referencia, comprobando que ambos resultados no difieren estadísticamente, es decir, que el modelo predice correctamente y por lo tanto es válido para la determinación de la propiedad.

Para poder asegurar la bondad de un modelo en la predicción de muestras distintas a las utilizadas en la calibración, es necesario un proceso de validación. Esta validación puede ser externa o interna.

La validación externa es la que suele utilizar dos grupos de muestras, uno llamado propiamente de calibración y otro llamado conjunto de prueba o *test set*. En donde el número de las muestras *test set* ha de ser elevado, y deben ser muestras independientes de las del conjunto de la calibración pero representativas del mismo y de las futuras muestras a analizar.

---

Cuando el número de muestras es relativamente pequeño, se utiliza un método de validación interna, denominada Validación Cruzada (*cross validation*). La cual es utilizada para evaluar el modelo, utilizando muestras del propio conjunto de calibración.<sup>20</sup>

### **1.16. VALIDACIÓN CRUZADA.**

Mediante este método, el conjunto de muestras de calibración se divide en varios bloques o segmentos. El modelo se construye reservando uno de los segmentos como conjunto de datos para comprobar los resultados y el resto para construir el modelo. El proceso se repite tantas veces como el número repetido de segmentos se ha elegido, de forma que cada vez que se deja un segmento fuera del calibrado, el resto se utiliza para medir el modelo.

Así la validación cruzada tiene dos propósitos:

- ♣ Se emplea como un método para determinar la cantidad de muestras que deben ser incluidas en la calibración y,
- ♣ Para conocer la capacidad predictiva del modelo.

Y los puntos que se determinan para evaluar el modelo son los siguientes:

#### **1.16.1. Selección del Número óptimo de Factores.**

Una de las tareas más difíciles en la aplicación del método de MCP es la determinación del número de repeticiones óptimo de los cálculos del algoritmo de MCP para modelar los datos. Si se utilizan muy pocas repeticiones de los cálculos, las predicciones de las concentraciones son pobres al no analizar todas las variaciones espectrales importantes. Conforme se incorpora un mayor número de repeticiones se incorporan más vectores al estudio, los cuales reordenan por grado de importancia para el modelo de MCP.<sup>17</sup>

La finalidad de esta prueba es obtener el número de factor óptimo que permita calcular la concentración de futuras muestras de forma que, para cada muestra  $i$  y analito  $j$ , el



---

residual de la concentración,  $f_{ij}$ , sea el menor posible:  $(f_{ij} = Y'_{ij} - Y_{ij})$ , donde  $Y'_{ij}$  es la concentración calculada.

Con esta medición se desea minimizar algún tipo de error de predicción para la población a la que se aplicará la calibración. Y para evaluar esta capacidad predictiva, se suele utilizar la sumatoria del cuadrado de los residuales:

$$\text{SCERP} = (\sum(ij - Y_{ij})^2)$$

Denominado habitualmente SCERP (*Suma de los cuadrados de los errores residuales de predicción*) o su valor medio, obtenido dividiendo el SCERP por el número de muestras MSE. Los valores de SCERP son indicador de que tan bien se esta estimando la concentración de las soluciones de la calibración con cada número de factores.<sup>20</sup>

### **1.16.2. Selección del Número de Estándares para la Calibración.<sup>17</sup>**

Para poder seleccionar las soluciones que van a constituir la calibración es necesario tomar en cuenta las siguientes consideraciones:

- ♣ Las soluciones preparadas deben contener tantas variables como fuentes de variación relevantes. Así, debe de haber por lo menos tantas muestras como componentes de interés y generalmente muchas más que estos.
- ♣ Las soluciones preparadas deberán incluir todo el intervalo de concentraciones esperadas para las muestras problema.
- ♣ Las variables seleccionadas para la matriz, debe contener varianza correlacionada con todas y cada una de las variables.
- ♣ Debe existir correlación entre las variables seleccionadas.

### **1.16.3. Detección de Muestras Desechables (Outliers).<sup>17</sup>**

La detección de muestras desechables es otra parte importante de la validación ya que por medio de esta, se detectan si una o más muestras de la calibración son erróneas o dan lugar a grandes desviaciones, las cuales puedan dar resultados falsos

---

en la predicción de las concentraciones de los componentes de interés de las muestras reales o muestras problemas.

#### **1.16.4. Selección de la Región Espectral.** <sup>17</sup>

Una de las ventajas de utilizar el método de MCP es que se puede utilizar el espectro completo para la construcción del modelo, solo con el conocimiento de los espectros de los componentes puros de interés. La elección de un número grande de longitudes de onda puede originar un trabajo laborioso y largo, además que ciertas longitudes de onda pueden contener mucho ruido espectral o simplemente información poco relevante, por lo cual es importante seleccionar longitudes de onda que aporten información relevante para cada especie de interés. Lo cual se puede realizar de forma empírica por medio de la obtención del coeficiente Kw.

A continuación se explica un sencillo procedimiento que puede ser utilizado para seleccionar o eliminar algunas longitudes de onda, el cual esta basado en la obtención del coeficiente de regresión final Kw:

1) Realizar el algoritmo de calibración y predicción para MCP con los datos de calibración estandarizados. Posteriormente determinar el número de factores óptimos a incluir en el modelo por medio de la validación cruzada y el análisis SCERP. La ecuación de la estandarización es:

$$Kw = (a_j - \hat{a}) / s^2$$

Donde  $a_i$  es cada uno de los vectores espectrales,  $\hat{a}$  es la media del espectro de calibración y  $s^2$  es la desviación estándar al cuadrado.

2) Realizar el gráfico del coeficiente de regresión final estandarizado (Kw) contra la longitud de onda.

3) Seleccionar las longitudes de onda que tengan valores de Kw equidistantes entre si, o eliminar la región de longitudes de onda que presenten valores de Kw negativos grandes

4) Realizar el algoritmo de calibración y predicción para MCP con los datos centrados y las longitudes de onda seleccionadas.

---

5) El número óptimo de longitudes de onda se determina cuando se obtiene el valor más pequeño de SCERP con el menor número de factores calculados.

De esta forma, se puede elaborar un modelo de predicción adecuado para MCP utilizando pocas longitudes de onda y eliminando las variables que no son relevantes para el modelo.

## **1.17. VALIDACIÓN.**

La fuerte competitividad de la que somos testigos actualmente ha revolucionado el concepto de la calidad, aumentado la importancia que ésta ya había tenido tradicionalmente. Hoy en día, la calidad se utiliza como sello de garantía de cualquier producto industrial.<sup>20</sup>

Y los avances tecnológicos en los últimos años han obligado a la industria farmacéutica a poner mayor énfasis en el mejoramiento de los sistemas de producción, para lo cual es importante el uso de técnicas y procedimientos validados.<sup>21</sup>

### **1.17.1. Definiciones de Validación.**

La NOM-059-SSA.1991 Define Validación: Como la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y atributos de calidad establecidos.<sup>22</sup>

Validar un procedimiento de ensayo es documentar su calidad, para lo cual es necesario verificar experimentalmente que dicho procedimiento cumple los criterios de calidad establecidos por el cliente o usuario del procedimiento.<sup>23</sup>

La validación de un procedimiento analítico: Es el procedimiento para establecer por medio de estudios de laboratorio una base de datos que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas.

---

Implica la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y el error sistemático y al azar de un procedimiento, no solo de la calibración sino en el análisis de las muestras reales.<sup>24</sup>

### **1.17.2. Objetivos de la Validación.**

Los objetivos de una validación analítica son:

- ♣ Revisar sistemáticamente las etapas esenciales en el desarrollo y fabricación de los productos farmacéuticos para obtener medicamentos de calidad.
- ♣ Demostrar que un procedimiento determinado, realizado bajo condiciones de producción o control apropiadas, conducen a un producto que cumple con las especificaciones establecidas.<sup>21</sup>
- ♣ Caracterizar métodos y Herramientas Analíticas.
- ♣ Asegurar la calidad y constancia de la calidad de la información obtenida.
- ♣ Facilitar las auditorías de calidad.

Uno de los requisitos básicos para llegar al cumplimiento de estos objetivos es que el laboratorio en donde se realicen estos ensayos, trabaje con Buenas Prácticas de Manufactura que garanticen la seguridad de los resultados obtenidos. Estas normas enfatizan la importancia de una buena organización, personal calificado, instalaciones apropiadas, equipos y aparatos adecuados y calificados, métodos escritos, actualizados y disponibles, y un registro adecuado de los resultados y una posterior supervisión y verificación de los mismos.<sup>20</sup>

### **1.17.3. Importancia de la Validación.**

La importancia de la validación de un método analítico reside en asegurar y garantizar la calidad del producto. La cual es importante debido a que:

---

Es un requisito que debe ser cumplido por parte de la Industria Farmacéutica y la cual deriva de la Ley General de Salud y de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM's). Proporciona un alto grado de confianza, seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados.

Permite un conocimiento profundo del método, así como sus características de funcionamiento. Este conocimiento y seguridad en el método analítico que ha sido validado se traduce en: disminución en el número de fallas y repeticiones, con el consiguiente ahorro de los costos asociados y consecuentemente cumplir con los plazos previstos de análisis.<sup>20</sup>

## **1.18. TIPOS DE VALIDACIÓN.**

### **1.18.1. Validación Prospectiva.**

Es la evidencia documentada realizada antes de que el producto salga al mercado, demostrando que las operaciones se encuentran bajo control y que a través de un proceso determinado se obtienen productos de la calidad diseñada. Se le considera como la parte integral de un programa cuidadosamente planeado y lógico del desarrollo de un producto o proceso.<sup>21</sup>

Este tipo de validación se aplica cuando se elabora un nuevo método analítico. Es típico en los laboratorios de investigación y desarrollo, y se realiza de acuerdo con un protocolo perfectamente planificado. Comprende el estudio de todos los criterios necesarios para demostrar el buen funcionamiento del método.<sup>23</sup>

Esta validación lleva acabo una función técnica, ya que toma en cuenta la documentación de ingeniería y calificación del proceso y del equipo, además puede dar a conocer que condiciones del proceso pueden ser controladas y que variables pueden ser monitoreadas para mostrar que el proceso de manufactura es controlado.<sup>21</sup>

---

### **1.18.2. Validación Retrospectiva.**

Es la evidencia documentada en los datos acumulados de producción (datos históricos), análisis y control, de un producto que ya está siendo fabricado. Es la forma más utilizada para validar un proceso que ya genera una gran cantidad de datos altamente significativos y con un costo más efectivo.<sup>21</sup>

Se realiza cuando el proceso o método analítico, se basa en la garantía constatada a través de los datos analíticos de un producto ya comercializado. Se aplica a métodos no validados previamente y de los que se tiene una amplia historia de resultados. Este tipo de validación se aplica para métodos por: Cromatografía Líquida, métodos Espectrofotométricos y métodos Volumétricos.<sup>23</sup>

### **1.18.3. Revalidación.**

La introducción de algún cambio que pueda afectar la idoneidad del método analítico establecido por la validación, podrá exigir una nueva validación, es decir una revalidación total o parcial de dicho método analítico.<sup>23</sup>

Según la Federación Internacional Farmacéutica (FIP), la revalidación es necesaria:

- ♣ En caso de modificación de la composición, del procedimiento o tamaño de lote.
- ♣ En caso de cambiar de fabricante, o de localidad de las materias primas.
- ♣ En caso de alteraciones en las instalaciones que participan en el proceso.
- ♣ Cambio de nuevo equipo e instalaciones.
- ♣ Cuando se modifican parámetros del proceso.
- ♣ Cuando se modifican los métodos de control.
- ♣ Y cuando así lo exijan los resultados de los controles en proceso y los controles finales.<sup>21</sup>

---

## **1.19. CARACTERÍSTICAS DE VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS.**

Para que un método de análisis pueda ser validado, es necesario la determinación y evaluación de una serie de características que definen la calidad de un método de ensayo. El desempeño de un método analítico se expresan en función de las siguientes características:

### **1.19.1. Exactitud:**

Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.<sup>7</sup> La exactitud de un método analítico expresa la proximidad entre los valores obtenidos por dicho método con los valores reales (obtenidos mediante un estándar) o bien con valores obtenidos por un método de referencia adecuado. En algunos textos el concepto de exactitud se denomina veracidad, siendo entendida la exactitud como un concepto superior dependiente de la veracidad y la exactitud. Esto se deriva del hecho que puede interpretarse que la obtención de valores exactos, estos deban ser próximos al valor real pero además sean determinados de forma precisa.<sup>20</sup>

### **1.19.2. Precisión:**

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de la muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.<sup>10</sup>

Es la medida de un error aleatorio asociado al método analítico. Expresa la proximidad de una serie de resultados obtenidos a partir de distintas tomas de muestras de un producto perfectamente homogéneo.

Los resultados pueden expresarse en términos de desviación estándar absoluta o bien relativa (%CV). El nivel de exigencia de los resultados dependerá del tipo de muestra y del método utilizado. Según la ICH existen tres niveles distintos en la evaluación de la precisión:

---

---

♣ **Repetibilidad:**

Expresa la precisión de un método bajo las mismas condiciones de operación y en un intervalo de tiempo corto. En donde las condiciones de repetibilidad deben incluir: el mismo procedimiento, analista, ubicación, instrumentos y condiciones de medición.

La repetibilidad puede ser expresada cuantitativamente en términos de los parámetros de dispersión de los resultados (desviación estándar, varianza, coeficiente de variación).<sup>20</sup>

♣ **Precisión Intermedia:**

Expresa el grado de reproducibilidad de una serie de resultados cambiando las condiciones operacionales normales. Factores típicos que se estudian son: diferentes analistas, días, reactivos, temperatura, etc. No es necesario el estudio de cada uno de los factores por separado. Por lo general, la precisión intermedia se expresa mediante un CV global, de resultados obtenidos variando estos factores.<sup>20</sup>

♣ **Reproducibilidad:**

Es un estudio de precisión intermedia, ampliando como factor adicional distintos laboratorios. Este parámetro es de obligada consideración para la estandarización del método de análisis, para que adopte un carácter de método oficial.<sup>20</sup>

**1.19.3. Selectividad:**

La selectividad de un método también conocida como *especificidad* por algunas guías de validación, es la capacidad de un método para evaluar únicamente al principio activo de forma exacta y específica, en presencia de otros componentes que pueden estar presentes, como por ejemplo: impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.<sup>25</sup>



---

#### **1.19.4. Límite de Detección:**

El límite de detección se define como la cantidad más pequeña de analito que puede ser detectada en una muestra, aunque no sea posible determinarla exactamente a ese nivel de concentración. La determinación de este valor depende de la naturaleza del método de análisis. Existen diversas aproximaciones para obtener este valor:

- ♣ Inspección visual en métodos no instrumentales, como cromatografía de capa fina o en valoraciones.
- ♣ Cálculos estadísticos basados en la relación señal/ruido, aplicables a métodos con línea base.
- ♣ Cálculos basados en la desviación estándar de la respuesta obtenida, ya sea de los valores obtenidos o bien de parámetros de la curva de calibración o del blanco.<sup>24</sup>

#### **1.19.5. Límite de Cuantificación:**

Es el nivel de concentración mínimo que puede ser determinado de forma exacta y precisa bajo condiciones operacionales normales. Es una relación entre la concentración del analito, la precisión y la exactitud deseada.

#### **1.19.6. Linealidad:**

Capacidad del método analítico para generar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito o valor del parámetro de la muestra, dentro de un rango.<sup>25</sup>

Demostrar la linealidad del método implica obtener, en todo intervalo de concentración estudiado, una respuesta proporcional entre la concentración del analito y la magnitud física medida, descrita correctamente por el modelo o ecuación de calibración. En casos de calibraciones univariadas, la evaluación de la linealidad es directa: obtener

---

una relación lineal entre la concentración y el parámetro medido (absorbancia a una longitud de onda, área o pico).

Cuando se trabaja con calibraciones multivariadas, resulta más complicado evaluar la linealidad. Adoptando lo propuesto por las guías ICH, para comprobar la linealidad de un método multivariable se puede proceder representando los valores obtenidos por el método frente a valores de referencia perfectamente conocidos.<sup>24</sup>

#### **1.19.7. Rango:**

Es el intervalo entre los niveles extremos de concentraciones que puede ser determinado de forma precisa, exacta y lineal. Este parámetro deriva generalmente de los estudios de linealidad, exactitud y precisión. Dependiendo del tipo de análisis que se realice, el intervalo de concentraciones mínimo a cubrir varía. La ICH aconseja cubrir los intervalos de 80-120% para análisis cuantitativo o bien 70-130% para test de uniformidad de contenido.<sup>23</sup>

#### **1.19.8. Tolerancia:**

Es la capacidad del método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal.<sup>10</sup>

#### **1.19.9. Estabilidad:**

La estabilidad de una muestra analítica, es la propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis.

---

---

## 1.20. CRITERIOS DE VALIDACIÓN EN FUNCIÓN DEL TIPO DE MÉTODO ANALÍTICO.<sup>10</sup>

Debido a que existen diferentes métodos analíticos, es lógico pensar que se requieren diferentes características de validación para cada método. Los cuales se pueden clasificar de la siguiente forma:

**Categoría I:** Métodos Analíticos que requieren la cuantificación de componentes mayores de sustancias o activos (incluyendo conservadores) en productos farmacéuticos terminados.

**Categoría II:** Métodos analíticos que requieren la determinación de impurezas y productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos métodos incluyen ensayos cuantitativos y pruebas para determinar si estas se encuentran dentro de los límites especificados.

**Categoría III:** Métodos Analíticos para determinar las características del producto terminado (ejemplo: pruebas de disolución y liberación del principio activo).

**Categoría IV:** Pruebas de Identificación. Se realiza para asegurar la identidad de un analito en una muestra comparando con un estándar de referencia.

En la siguiente tabla se muestran los elementos que normalmente se requieren para cada una de las categorías de ensayos:

Tabla No.5 Características de Validación Utilizadas en Función del Método Analítico.<sup>USP</sup>

Características Analíticas	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Cuantitativas	Pruebas límites		
Exactitud	Si	Si	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
Limite de Detección	No	No	Si	*	No
Limite de Cuantificación	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Rango	Si	Si	*	*	No

- Pueden requerir, dependiendo de la naturaleza o de la prueba específica.

---

# **CAPÍTULO 2:**

# **DESARROLLO**

# **EXPERIMENTAL**

---

## 2.1. MATERIALES, REACTIVOS, EQUIPO Y SOFTWARE UTILIZADO EN EL DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

### 2.1.1. Material:

- ♣ Matraces volumétricos de 10, 25 y 100ml.
- ♣ Pipetas volumétricas de 1,2 y 3ml.
- ♣ Vasos de precipitado de 20, 250 y 500ml
- ♣ Agitadores de vidrio
- ♣ Celdas para espectrofotómetro(cuarzo 10mm)
- ♣ Termómetro (100°C)

### 2.1.2. Reactivos:

- ♣ Estándar de Cianocobalamina (Pureza 89.04%)
- ♣ Estándar de Clorhidrato de Piridoxina (Pureza 99.58%)
- ♣ Estándar de Clorhidrato de Tiamina (Pureza 95.33%)
- ♣ Materia Prima de Cianocobalamina
- ♣ Materia Prima de Clorhidrato de Piridoxina
- ♣ Materia Prima de Clorhidrato de Tiamina
- ♣ Hidróxido de Sodio G.R.
- ♣ Metabisulfito de Sodio
- ♣ EDTA disódico
- ♣ Fosfato monobásico de sodio
- ♣ Fosfato dibásico de sodio heptahidratado

### 2.1.3 Equipo:

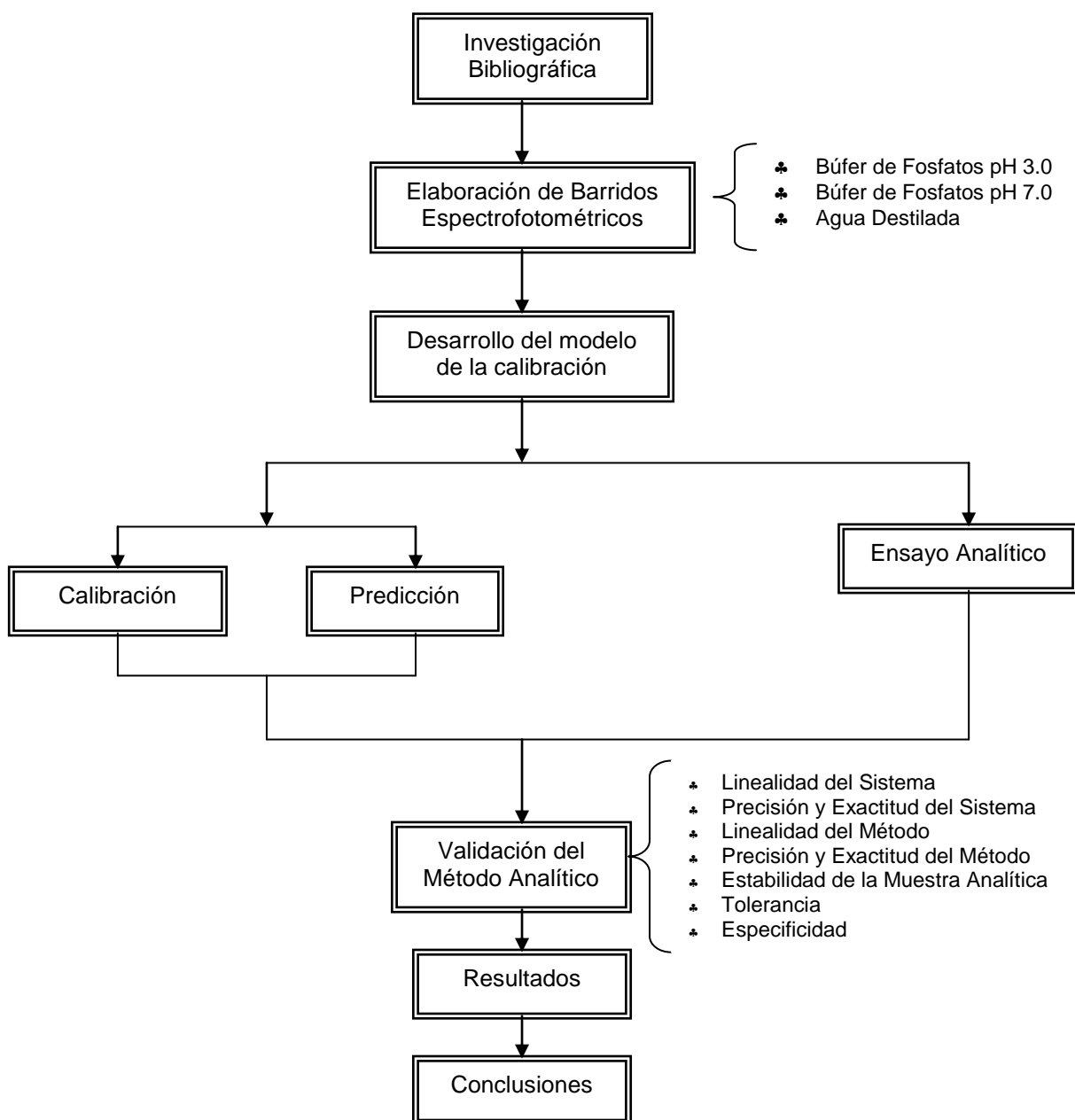
- ♣ Espectrofotómetro UV Varian Cary 100
- ♣ Balanza analítica

---

#### 2.1.4. Software:

- ♣ Espectros de Absorción: Programa "Cary Scan"
- ♣ Calibración: Programa "Cary Simple Read"
- ♣ Tratamiento de datos por el algoritmo de MCP: Programa ISHEJA INC.

#### 2.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL.



---

### 2.3. ELABORACIÓN DE LOS ESPECTROS DE ABSORCIÓN.

La elaboración de los espectros de absorción se realizaron a partir de soluciones stock de Clorhidrato de Tiamina (50µg/ml), Clorhidrato de Piridoxina (50µg/ml) y Cianocobalamina (100µg/ml), con un rango de longitud de onda de 200 a 600nm y en tres diferentes medios de disolución, los cuales fueron: agua destilada, búfer de fosfatos pH 3 y Búfer de Fosfatos pH 7 (Ver Anexo A y B). Los cuales se muestran a continuación:

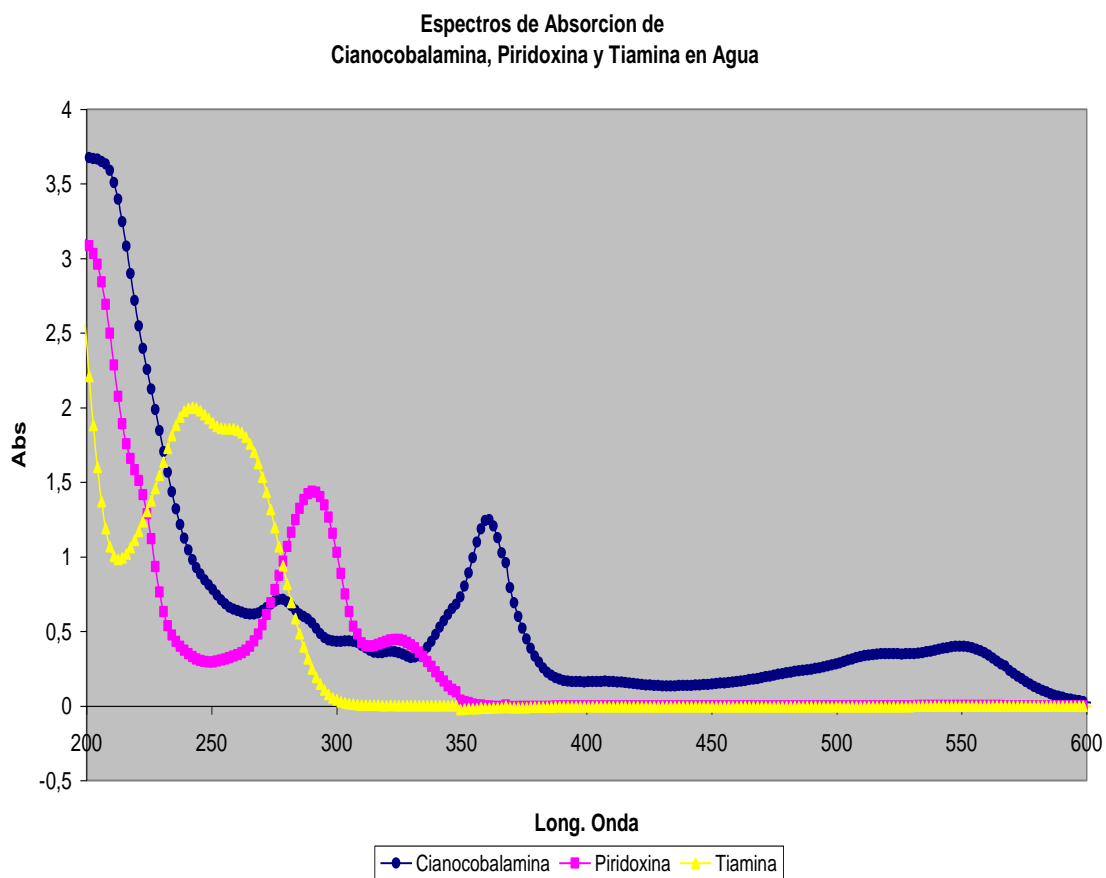


Figura No. 1 Espectros de Absorción de las soluciones de Clorhidrato de Tiamina (50µg/ml), Clorhidrato de Piridoxina (50µg/ml) y Cianocobalamina (100µg/ml) en el medio de disolución de agua destilada.

Nota: Las concentraciones para la elaboración de los espectros de absorción fueron elegidas para obtener valores de absorbancia alrededor de 2.0, lo cual permitiera obtener respuestas confiables para la determinación de cada una de las vitaminas.

---

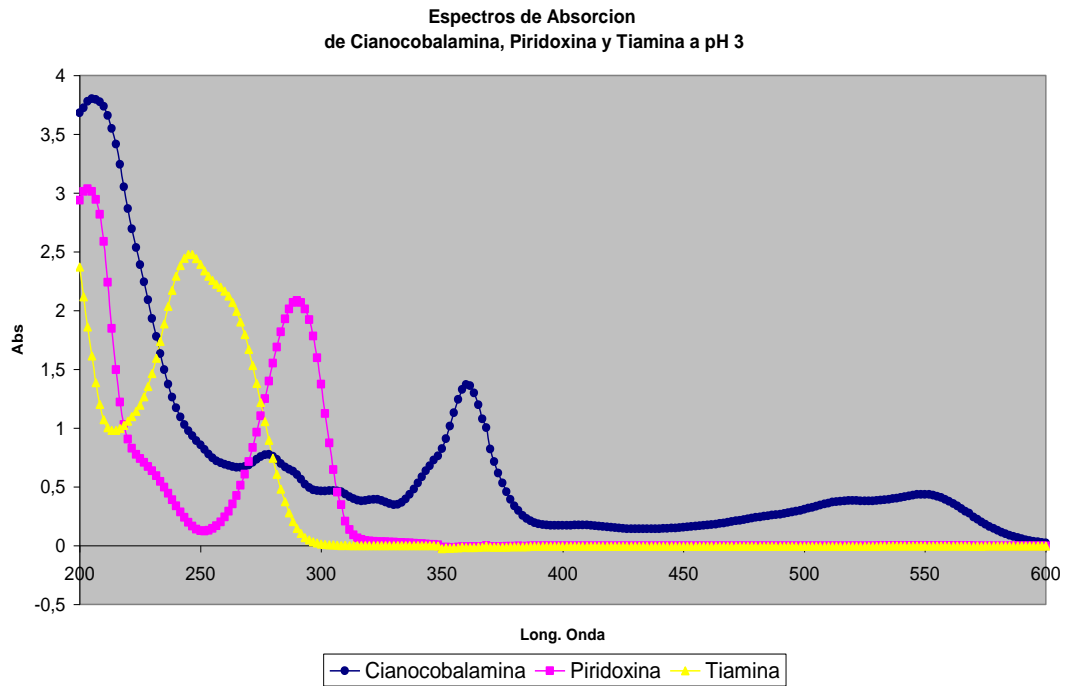


Figura No.2 Espectros de Absorción de las soluciones de Clorhidrato de Tiamina (50µg/ml), Clorhidrato de Piridoxina (50µg/ml) y Cianocobalamina (100µg/ml) en el medio de disolución de búfer de fosfatos pH 3.

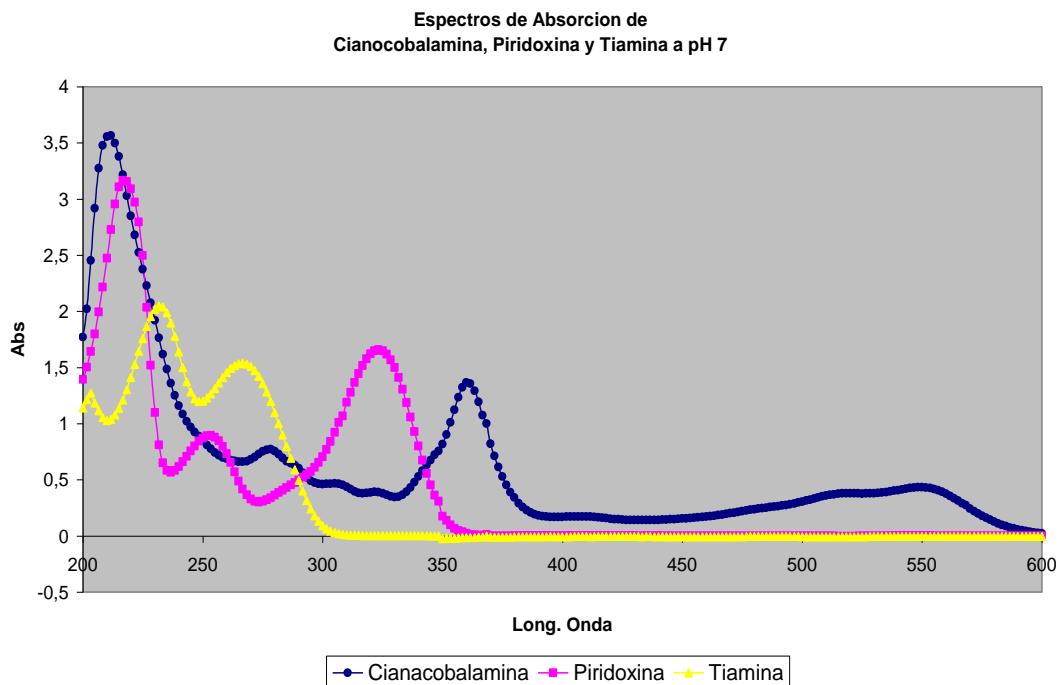


Figura No.3 Espectros de Absorción de las soluciones de Clorhidrato de Tiamina (50µg/ml), Clorhidrato de Piridoxina (50µg/ml) y Cianocobalamina (100µg/ml) en el medio de disolución de búfer de fosfatos pH 7.



---

## **2.4. SELECCIÓN DEL MEDIO DE DISOLUCIÓN Y LONGITUDES DE ONDA.**

A partir de los espectros de absorción realizados se determinó que el medio de disolución adecuado para trabajar fue el agua destilada ya que todos los activos son solubles, estables y sus valores de absorción son buenos, además de presentar la ventaja de tener un fácil manejo y un bajo costo.

También con estos datos se determinaron las longitudes de onda óptimas para incluir en la calibración, las cuales fueron seleccionadas considerando las longitudes de onda en las cuales los principios activos tienen valores de absorbancia más significativos como lo son: puntos máximos, mínimos, puntos de inflexión y hombros.

Para la Tiamina y Piridoxina se puede observar que presentan mayor absorción en la región del espectro UV, por lo cual para su determinación se tomaron en cuenta solo longitudes de onda de la región del espectro UV, las cuales fueron las siguientes: 224, 240, 242, 252, 258, 262, 265, 278, 286, 290, 295 Y 298 nm.

Mientras que la Cianocobalamina presenta absorción en la región del espectro visible y en la región UV. Sin embargo se eligió determinarla en la región del espectro visible, ya que aunque esta no presenta mucha absorción, la presencia de las otras dos vitaminas no le causan mayor interferencia debido a que la absorción es mínima, y por lo tanto se puede decir que la absorbancia a estas longitudes de onda está dada únicamente por la Cianocobalamina. En donde las longitudes de onda elegidas fueron las siguientes: 501, 509, 516, 519, 526, 542, 549, 550, 552, 555, 560 y 564 nm.

## **2.5. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES PARA FORMAR LA CALIBRACIÓN.**

La selección de las concentraciones para formar la calibración se realizó por medio de la construcción de una tabla de combinación de concentraciones de los tres principios activos como se indica a continuación:

1) Primero se investigaron límites en los cuales se pueden encontrar cada uno de los principios activos dentro de la formulación, según lo indicado por la farmacopea.

2) Se eligieron cinco niveles de concentración diferentes para cada uno de los principios activos, en los cuales se incluyeron: la concentración al 100%, los límites inferiores y superiores indicados por la farmacopea y otro valor de concentración inferior y superior al de los límites.

3) Construcción de una tabla de 3 dimensiones en la cual se coloquen los cinco niveles de concentración elegidos para cada uno de los principios activos y las posibles combinaciones que pueden existir entre ellos, como se puede observar en la siguiente tabla:

Tabla No.6 Tabla de combinación de concentraciones de tres principios activo

Piridoxina (µg/ml)																
Tiamina (µg/ml)	120 µg/ml			110 µg/ml (Limite Superior)			100 µg/ml (100%)			90 µg/ml (Limite Inferior)			80 µg/ml			Cianocobalamin µg / ml
120 µg/ml	120	120	7	120	110	7	120	100	7	120	90	7	120	80	7	7 µg/ml
	120	120	6	120	110	6	120	100	6	120	90	6	120	80	6	6 µg/ml (LS)
	120	120	5	120	110	5	120	100	5	120	90	5	120	80	5	5 µg/ml
	120	120	4	120	110	4	120	100	4	120	90	4	120	80	4	4 µg/ml (L.)
	120	120	3	120	110	3	120	100	3	120	90	3	120	80	3	3 µg/ml
110 µg/ml (Limite Superior)	110	120	7	110	110	7	110	100	7	110	90	7	110	80	7	7 µg/ml
	110	120	6	110	110	6	110	100	6	110	90	6	110	80	6	6 µg/ml (LS)
	110	120	5	110	110	5	110	100	5	110	90	5	110	80	5	5 µg/ml
	110	120	4	110	110	4	110	100	4	110	90	4	110	80	4	4 µg/ml (L.)
	110	120	3	110	110	3	110	100	3	110	90	3	110	80	3	3 µg/ml
100 µg/ml (100%)	100	120	7	100	110	7	100	100	7	100	90	7	100	80	7	7 µg/ml
	100	120	6	100	110	6	100	100	6	100	90	6	100	80	6	6 µg/ml (LS)
	100	120	5	100	110	5	100	100	5	100	90	5	100	80	5	5 µg/ml
	100	120	4	100	110	4	100	100	4	100	90	4	100	80	4	4 µg/ml (L.)
	100	120	3	100	110	3	100	100	3	100	90	3	100	80	3	3 µg/ml
90 µg/ml (Limite Inferior)	90	120	7	90	110	7	90	100	7	90	90	7	90	80	7	7 µg/ml
	90	120	6	90	110	6	90	100	6	90	90	6	90	80	6	6 µg/ml (LS)
	90	120	5	90	110	5	90	100	5	90	90	5	90	80	5	5 µg/ml
	90	120	4	90	110	4	90	100	4	90	90	4	90	80	4	4 µg/ml (L.)
	90	120	3	90	110	3	90	100	3	90	90	3	90	80	3	3 µg/ml
80 µg/ml	80	120	7	80	110	7	80	100	7	80	90	7	80	80	7	7 µg/ml
	80	120	6	80	110	6	80	100	6	80	90	6	80	80	6	6 µg/ml (LS)
	80	120	5	80	110	5	80	100	5	80	90	5	80	80	5	5 µg/ml
	80	120	4	80	110	4	80	100	4	80	90	4	80	80	4	4 µg/ml (L.)
	80	120	3	80	110	3	80	100	3	80	90	3	80	80	3	3 µg/ml

Nota: Para poder realizar la tabla de combinaciones se tomaron en cuenta los valores de concentración de la muestra al 100% y los límites superiores e inferiores según lo indica la farmacopea.

---

4) Una vez construida la tabla de todas las posibles combinaciones se eligieron 9 combinaciones, teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

- ♣ Seleccionar las combinaciones de concentraciones que puedan ser más probables o que más se puedan presentar.
- ♣ Combinaciones en las cuales la absorbancia no sea mayor a la permitida por el instrumento.
- ♣ Concentraciones que no sean tan pequeñas que se puedan confundir con el ruido o señal.

## **2.6. ELABORACIÓN DE LA CALIBRACIÓN.**

Una vez que se eligieron las longitudes de onda y las diferentes concentraciones de los tres principios activos para formar la calibración, se realizó la calibración como se indica a continuación:

1.- Preparar una solución Stock de Cianocobalamina de 1,000 $\mu$ g/ml y una solución Stock de Tiamina y Piridoxina de 20,000 $\mu$ g/ml cada una, como se encuentra indicado en el anexo C de Preparación de Soluciones Stock para la Calibración.

2.- Etiquetar 9 matraces volumétricos de 10ml, con la numeración del 1 al 9 los cuales contendrán las soluciones de Calibración.

3.- A partir de las soluciones stocks preparados tomar los diferentes volúmenes como se indica en la siguiente tabla con ayuda de pipetas volumétricas para formar los diferentes sistemas de la calibración:

---

Tabla No. 7 Volúmenes de Solución stock de Tiamina, Piridoxina y Cianocobalamina necesarios para realizar los diferentes sistemas de la calibración

<b>Sistema</b>	<b>Sol. Stock Piridoxina (20,000µg/ml)  (ml)</b>	<b>Sol. Stock Tiamina (20,000µg/ml)  (ml)</b>	<b>Sol. Stock Cianocobalamina (1,000µg/ml)  (ml)</b>	<b>Volumen final (ml)</b>
<b>1</b>	3	3	1	10
<b>2</b>	3	3	2	10
<b>3</b>	3	3	3	10
<b>4</b>	2	2	1	10
<b>5</b>	2	2	2	10
<b>6</b>	2	2	3	10
<b>7</b>	1	1	1	10
<b>8</b>	1	1	2	10
<b>9</b>	1	1	3	10

4.- Llevar a volumen de aforo con agua destilada cada uno de los sistemas preparados.

5.- Leer la absorbancia de cada uno de los sistemas en la región del espectro Visible para poder determinar a la Cianocobalamina a las siguientes longitudes de onda: 501, 509, 516, 519, 526, 542, 549, 550, 552, 555, 560 y 564 nm.

6.- La determinación de la Piridoxina y Tiamina se realizó en la región del espectro UV, por lo cual se deberá realizar una dilución de cada uno de los sistemas preparados anteriormente, tomando 1ml de cada matraz y transferirlo a un matraz volumétrico de 100ml.

7.- Llevar a volumen de aforo con agua destilada cada uno de los nuevos sistemas preparados.

8.- Leer las absorbancia de estas nuevas soluciones en la región del espectro U.V. a las siguientes longitudes de onda: 224, 240, 242, 252, 258, 262, 265, 278, 286, 290, 295 Y 298 nm.

## 2.7. ANÁLISIS DE LA CALIBRACIÓN.

Los valores de concentración y absorbancia obtenidos de la calibración se analizaron por el método de Mínimos Cuadrados Parciales por medio del Programa ISHEJA INC., del cual se obtuvieron los siguientes resultados:

### 2.7.1. Análisis SCERP.

El primer paso en el análisis de la calibración fue la determinación del número del factor “h” adecuado para Cianocobalamina con la calibración en la región del espectro Visible y de Piridoxina y Tiamina con la calibración en la región del espectro *U.V.*

#### \* Análisis SCERP para Cianocobalamina

Tabla No. 8 Valores de SCERP  
para Cianocobalamina

# FACTOR	VALOR DE PRESS
h 1	1,01E+00
h 2	8,14E-01
h 3	3,93E-01
h 4	2,22E-01
h 5	1,54E-01
h 6	1,37E-02
h 7	7,64E-04
h 8	5,92E-25
h 9	6,79E-26
h 10	1,78E-26
h 11	1,78E-26
h 12	1,78E-26
h 13	1,78E-26
h 14	1,78E-26
h 15	1,78E-26
h 16	1,78E-26
h 17	1,78E-26
h 18	1,78E-26
h 19	1,78E-26
h 20	1,78E-26

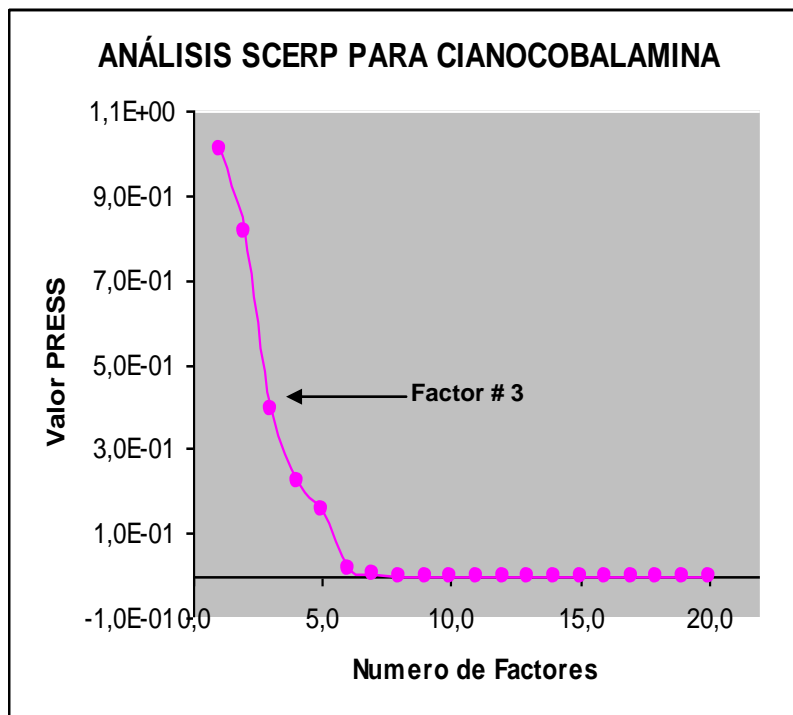


Figura No. 4 Grafico del Valor de SCERP en función del número de Factores para Cianocobalamina

• **Análisis SCERP para Tiamina y Piridoxina**

Tabla No. 9 Valores de SCERP para Piridoxina y Tiamina

# FACTOR	VALOR SCERP	
	PIRIDOXINA	TIAMINA
h 1	7,13E+00	7,03E+00
h 2	6,59E-01	6,50E-01
h 3	1,33E-01	1,31E-01
h 4	1,19E-01	1,18E-01
h 5	7,03E-02	6,93E-02
h 6	2,08E-02	2,05E-02
h 7	5,08E-03	5,01E-03
h 8	1,14E-28	1,64E-28
h 9	2,78E-28	1,26E-28
h 10	2,65E-28	1,14E-28
h 11	2,65E-28	1,14E-28
h 12	2,65E-28	1,14E-28
h 13	2,65E-28	1,14E-28
h 14	2,65E-28	1,14E-28
h 15	2,65E-28	1,14E-28
h 16	2,65E-28	1,14E-28
h 17	2,65E-28	1,14E-28
h 18	2,65E-28	1,14E-28
h 19	2,65E-28	1,14E-28
h 20	2,65E-28	1,14E-28

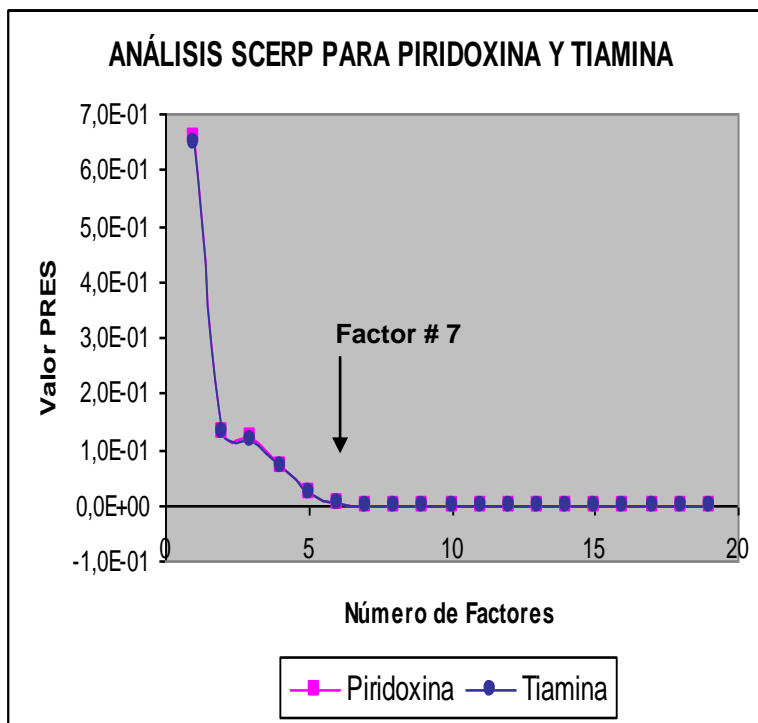


Figura No. 5 Gráfico del Valor de SCERP en función del número de Factores para Piridoxina y Tiamina

Para el análisis de Cianocobalamina se determinó que el número de factor SCERP adecuado para su determinación fue el número “3”, el cual es un punto donde se observa un cambio brusco en la tendencia del gráfico, el cual a pesar de ser un factor pequeño en el número de repeticiones es esperado debido a que se determinando a un analito y las interferencias espectrales debidas a los otros analitos presentes es casi nula ya que la absorbtividad de estos en la región del espectro visible es casi cero.

Mientras que para la Piridoxina y la Tiamina el número de factor de repeticiones elegido fue el numero “7”, en el cual se observa que la tendencia del gráfico es lineal a partir de este factor. Este es un factor más grande, ya que en este caso se tienen que incluir mas variaciones espectrales tanto de los dos analitos que se van a determinar, así como las variaciones en muy pequeña proporción de la cianocobalamina que se encuentra presente en la muestra.

---

### 2.7.2. Análisis de Linealidad.

Una vez que se determinó el número de factor “h” adecuado para cada determinación, es necesario analizar la linealidad que presenta el sistema en el número de factor elegido.

#### \* *Linealidad para Cianocobalamina con el factor H= 3*

Tabla No. 10 Análisis de Regresión lineal  
para Cianocobalamina

	H3
REGRESIÓN	CIANOBALAMINA
PROMEDIO	1,000000
DESVEST	0,001230
C.V.	0,122530
INTERCEPTO	0,001350
PENDIENTE	0,999990
COEF.CORR.	0,999990

#### \* *Linealidad para Piridoxina y Tiamina con el factor H= 7*

Tabla No. 11 Análisis de Regresión lineal  
para Piridoxina y Tiamina

	H7	
REGRESIÓN	PIRIDOXINA	TIAMINA
PROMEDIO	1,0000	1,0000
DESVEST	0,0012	0,0012
C.V.	0,1223	0,1223
INTERCEPTO	0,0001	0,0001
PENDIENTE	1,0000	1,0000
COEF.CORR.	1,0000	1,0000

Se puede observar que el factor H=3 elegido para la determinación de la Cianocobalamina es adecuado ya que presenta una desviación estándar pequeña y su coeficiente de variación es bajo. En el caso de la Piridoxina y Tiamina los valores de la regresión lineal también son apropiados para su determinación con el factor H= 7.

---

### 2.7.3. Análisis de Muestras Desechables (Outliers).

El análisis de muestras desechables se debe realizarse con el número de factor “h” elegido para cada determinación, con la finalidad de detectar las muestras que han sido preparadas erróneamente o que fueron manipuladas de forma incorrecta.

#### \* *Outliers para la determinación de Cianocobalamina*

Tabla No. 12 Outliers para Cianocobalamina

OUTLIERS	CIANOCOBALAMINA
CONC. 1	-0,12%
CONC. 2	-0,11%
CONC. 3	-0,17%
CONC. 4	0,33%
CONC. 5	0,22%
CONC. 6	-0,02%
CONC. 7	0,20%
CONC. 8	-0,31%
CONC. 9	0,15%

#### \* *Outliers para la determinación de Piridoxina y Tiamina*

Tabla No. 13 Outliers para Piridoxina y Tiamina

OUTLIERS	PIRIDOXINA	TIAMINA
CONC. 1	-1,19%	-1,19%
CONC. 2	-1,64%	1,64%
CONC. 3	1,54%	1,54%
CONC. 4	1,72%	1,72%
CONC. 5	1,21%	1,21%
CONC. 6	-1,34%	-1,34%
CONC. 7	-1,12%	-1,12%
CONC. 8	1,13%	1,13%
CONC. 9	-1,51%	-1,51%

En este análisis se puede observar que la desviación de las muestras tanto para la determinación de la Cianocobalamina, Piridoxina y Tiamina es menor al 2%, lo cual indica que los sistemas fueron preparados apropiadamente y por lo tanto que la calibración resulta útil para la predicción de nuevas concentraciones de los analitos de interés presentes en la muestra.



---

## **2.8. ENSAYO ANALÍTICO.**

### ***A. Preparación de la muestra.***

- 1.- Vaciar el contenido de 3 ampollitas de Tribedoce Compuesto a un vaso de precipitado de 50ml
- 2.- Mezclar con una varilla de vidrio hasta obtener una solución homogénea.
- 3.- Tomar una alícuota de la solución anterior con una pipeta volumétrica de 1ml , y transferirla a un matraz volumétrico de 25ml.
- 4.- Llevar a volumen de aforo con agua destilada. (Sol. A )
- 5.-De la solución A tomar una alícuota con una pipeta volumétrica de 1ml y transferirla a un matraz volumétrico de 100ml.
- 7.- Llevar a volumen de aforo con agua destilada (Sol. B).

### ***B. Lectura en la región del espectro visible.***

- 8.- De la solución A, tomar una alícuota y leer su absorbancia en la región del espectro visible a 501, 509, 516, 519, 526, 542, 549, 550, 552, 555, 560 y 564 nm.

### ***C. Lectura en la región del espectro U.V.***

- 9.- De la solución B tomar una alícuota y leer su absorbancia en la región del espectro U.V. a las longitudes de onda de 224, 240, 242, 252, 258, 262, 265, 278, 286, 290, 295 Y 298 nm.

---

## 2.9. VALIDACIÓN.

En la validación del método analítico, se evaluaron los siguientes parámetros para asegurar la calidad del método: linealidad del sistema, precisión del sistema, linealidad del método, precisión y exactitud del método, estabilidad de la muestra analítica, tolerancia y especificidad.

### 2.9.1. Linealidad del Sistema.

La linealidad del sistema se evaluó a partir de soluciones stock a tres niveles de concentración: 50, 100 y 150% de Cianocobalamina, Piridoxina y Tiamina esperadas para cada muestra real. Cada sistema por triplicado.

#### \* *Análisis de linealidad para Cianocobalamina*

Tabla No. 14 Concentración Real y la Concentración estimada de Cianocobalamina en el análisis de linealidad del Sistema

Concentración Real (µg/ml)	Concentración Estimada(µg/ml)	Razón de Concentraciones
101,000	102,297	1,0128
101,000	101,142	1,0014
101,000	101,583	1,0058
202,000	202,348	1,0017
202,000	201,814	0,9991
202,000	201,714	0,9986
303,000	302,629	0,9988
303,000	304,113	1,0037
303,000	303,692	1,0023
101,000	101,331	1,0033
101,000	100,874	0,9988
101,000	100,709	0,9971
202,000	201,489	0,9975
202,000	201,641	0,9982
202,000	201,796	0,9990
303,000	303,938	1,0031
303,000	301,744	0,9959
303,000	303,396	1,0013
101,000	101,317	1,0031
101,000	101,051	1,0005
101,000	100,330	0,9934
202,000	200,635	0,9932
202,000	202,449	1,0022
202,000	200,961	0,9949
303,000	302,395	0,9980
303,000	303,603	1,0020
303,000	303,009	1,0000

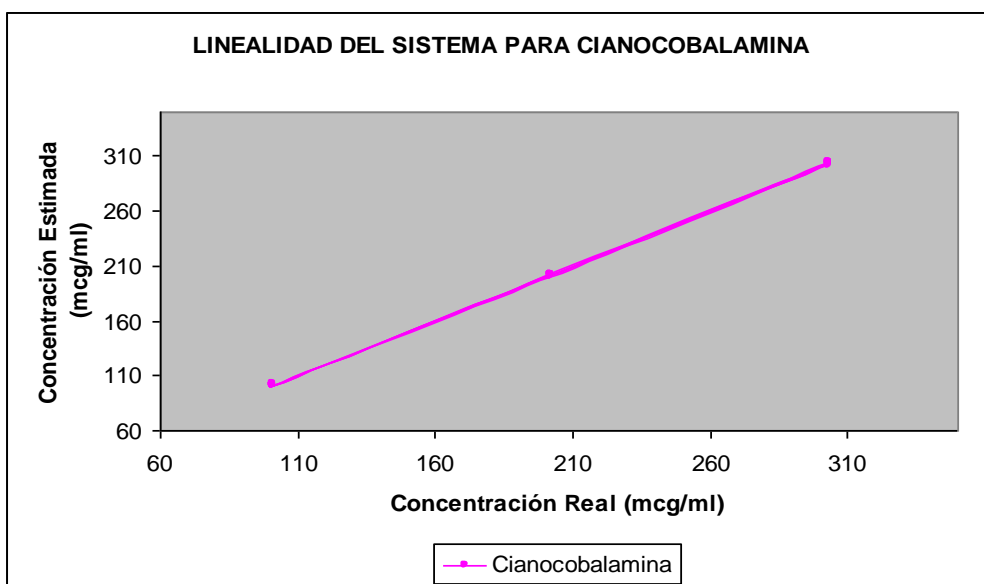


Figura No. 6 Esta gráfica muestra la concentración VS concentración estimada de Cianocobalamina.

Tabla No. 15 Análisis de Regresión  
Lineal del Sistema para Cianocobalamina

<b>DATOS DE REGRESIÓN</b>	
<b>PROMEDIO</b>	1,00021
<b>DESVEST</b>	0,00404
<b>C.V.</b>	0,40365
<b>INTERCEPTO</b>	0,01299
<b>PENDIENTE</b>	0,99994
<b>COEF.CORR. (R)</b>	0,99997
<b>COEF.DET (R<sup>2</sup>)</b>	0,99994

Tabla No. 16 Límites del intercepto  
para Cianocobalamina

<b>Cianocobalamina</b>		
	<b>Inferior 95%</b>	<b>Superior 95%</b>
<b>Intercepción</b>	-0,7079	0,7339

En la Figura No.6 se puede observar que existe un comportamiento lineal entre la concentración real y la concentración estimada para la determinación de cianocobalamina, lo cual demuestra que a todo el intervalo de las concentraciones analizadas existe una respuesta proporcional entre la concentración estimada y la concentración real. La cual cumple con los criterios de linealidad con un C.V. menor al 2% , un coeficiente de correlación de 0.99 y la ordenada al origen incluida dentro de los límites de confianza.

• **Análisis de Linealidad de Piridoxina y Tiamina**

Tabla No. 17 Concentración Real y Concentración estimada de Tiamina y Piridoxina en el análisis de linealidad del Sistema.

Concentración Real (µg/ml)		Concentración Estimada(µg/ml)		Razón de Concentraciones	
Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina
60,021	59,856	59,939	59,774	0,9986	0,9986
60,021	59,856	60,509	60,343	1,0081	1,0081
60,021	59,856	60,420	60,254	1,0067	1,0067
60,021	59,856	59,891	59,727	0,9978	0,9978
60,021	59,856	59,493	59,330	0,9912	0,9912
60,021	59,856	60,137	59,971	1,0019	1,0019
60,021	59,856	59,762	59,598	0,9957	0,9957
60,021	59,856	59,732	59,567	0,9952	0,9952
60,021	59,856	60,196	60,030	1,0029	1,0029
40,014	39,904	40,263	40,153	1,0062	1,0062
40,014	39,904	39,098	38,991	0,9771	0,9771
40,014	39,904	39,760	39,650	0,9936	0,9936
40,014	39,904	40,448	40,337	1,0108	1,0108
40,014	39,904	40,288	40,177	1,0069	1,0069
40,014	39,904	40,341	40,230	1,0082	1,0082
40,014	39,904	39,865	39,755	0,9963	0,9963
40,014	39,904	40,314	40,203	1,0075	1,0075
40,014	39,904	39,832	39,723	0,9955	0,9955
20,007	19,952	20,241	20,185	1,0117	1,0117
20,007	19,952	19,854	19,799	0,9923	0,9923
20,007	19,952	19,943	19,888	0,9968	0,9968
20,007	19,952	19,831	19,777	0,9912	0,9912
20,007	19,952	19,997	19,942	0,9995	0,9995
20,007	19,952	20,226	20,170	1,0109	1,0109
20,007	19,952	20,099	20,043	1,0046	1,0046
20,007	19,952	20,274	20,218	1,0133	1,0133
20,007	19,952	19,627	19,573	0,9810	0,9810

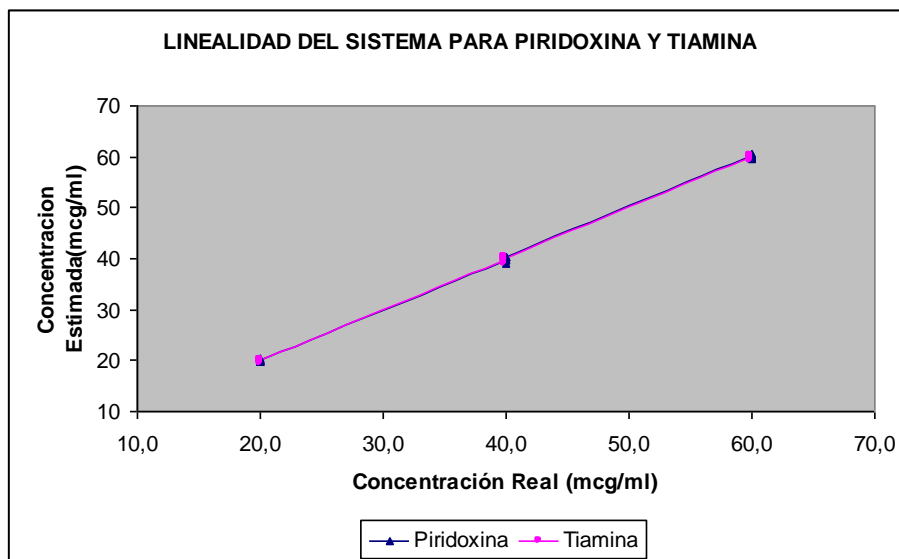


Figura No. 7 Esta gráfica muestra la concentración real VS concentración estimada de Piridoxina y Tiamina.

Tabla No. 18 Análisis de Regresión Lineal del Sistema para Piridoxina y Tiamina

<b>DATOS DE REGRESIÓN</b>		
	<b>PIRIDOXINA</b>	<b>TIAMINA</b>
<b>PROMEDIO</b>	1,0001	1,0001
<b>DESVEST</b>	0,0091	0,0091
<b>C.V.</b>	0,9061	0,9062
<b>INTERCEPTO</b>	0,0153	0,0153
<b>PENDIENTE</b>	0,9996	0,9996
<b>COEF.CORR. (R)</b>	0,9998	0,9998
<b>COEF.DET (R<sup>2</sup>)</b>	0,9996	0,9996

Tabla No. 19 Límites del intercepto para Piridoxina y Tiamina

	<b>Piridoxina</b>		<b>Tiamina</b>	
	<b>Inferior 95%</b>	<b>Superior 95%</b>	<b>Inferior 95%</b>	<b>Superior 95%</b>
<b>Intercepción</b>	-0,333	0,3637	-0,332	0,362

Para el análisis de linealidad del sistema de Piridoxina y Tiamina, también se puede ver que existe un comportamiento lineal entre la concentración real y estimada, a los diferentes niveles de concentración elegidos para la calibración. Las cuales cumplen con los criterios de aceptación, teniendo un C.V. alrededor del 1%, una  $R^2$  de 0.99 y un intercepto que se encuentra dentro de los límites de confianza.

### 2.9.2. Precisión del Sistema.

La precisión del sistema se determinó realizando seis ensayos con tres niveles de concentraciones diferentes, correspondientes al 80, 100 y 120% de Cianocobalamina, Piridoxina y Tiamina esperadas para cada muestra real. Preparados a partir de las soluciones stock como se indica en el Anexo C.

#### \* **Precisión del Sistema para Cianocobalamina**

Tabla No. 20 Análisis de Precisión del Sistema para Cianocobalamina

Placebo	Concentración Real (µg/ml)	Concentración Estimada (µg/ml)	% Desviación
80%	160,64	163,181	1,58%
	160,64	162,821	1,36%
	160,64	162,886	1,40%
	160,64	163,853	2,00%
	160,64	164,462	2,38%
	160,64	164,215	2,23%
	PROMEDIO	163,569	1,82%
	DS	0,703	
	CV	0,429	
100%	200,8	200,012	-0,39%
	200,8	195,381	-2,70%
	200,8	195,929	-2,43%
	200,8	196,66	-2,06%
	200,8	199,465	-0,67%
	200,8	197,414	-1,69%
	PROMEDIO	197,476	-1,66%
	DS	1,888	
	CV	0,956	
120%	240,96	236,164	-1,99%
	240,96	233,013	-3,30%
	240,96	236,154	-1,99%
	240,96	232,583	-3,48%
	240,96	234,411	-2,72%
	240,96	235,683	-2,19%
	PROMEDIO	234,667	-2,61%
	DS	1,589	
	CV	0,677	

Como se puede observar en la tabla No.20 las estimaciones de concentración de Cianocobalamina a los tres diferentes niveles de concentración preparados, tienen una desviación menor a 2 y un coeficiente de variación menor al 2%, por lo cual se puede decir que existe precisión en el sistema para la determinación de Cianocobalamina.

• **Precisión del sistema para Piridoxina y Tiamina.**

Tabla No. 21 Análisis de Precisión del Sistema para Piridoxina y Tiamina

Placebo	Concentración Real (µg/ml)		Concentración Estimada (µg/ml)		% Desviación	
	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina
80%	32,003	32,014	32,255	32,210	0,79%	0,61%
	32,003	32,014	31,981	31,936	-0,07%	-0,24%
	32,003	32,014	32,200	32,155	0,61%	0,44%
	32,003	32,014	32,832	32,786	2,59%	2,41%
	32,003	32,014	31,546	31,502	-1,43%	-1,60%
	32,003	32,014	32,718	32,673	2,23%	2,06%
		PROMEDIO	32,255	32,210	0,79%	0,61%
	DS	0,4751	0,4744			
	CV	0,0147	0,0147			
100%	40,004	40,018	40,248	40,192	0,61%	0,47%
	40,004	40,018	40,933	40,876	2,32%	2,18%
	40,004	40,018	41,052	40,994	2,62%	2,48%
	40,004	40,018	39,953	39,897	-0,13%	-0,27%
	40,004	40,018	39,129	39,074	-2,19%	-2,33%
	40,004	40,018	40,264	40,208	0,65%	0,51%
		PROMEDIO	40,262	40,206	0,65%	0,51%
	DS	0,7005	0,6996			
	CV	0,0174	0,0174			
120%	48,005	48,0216	48,995	48,926	2,06%	1,92%
	48,005	48,0216	49,520	49,450	3,16%	3,01%
	48,005	48,0216	48,506	48,438	1,04%	0,90%
	48,005	48,0216	48,202	48,135	0,41%	0,27%
	48,005	48,0216	48,764	48,696	1,58%	1,44%
	48,005	48,0216	48,567	48,500	1,17%	1,03%
		PROMEDIO	48,758	48,690	1,57%	1,43%
	DS	0,4570	0,4564			
	CV	0,0093	0,0093			

Los resultados de concentración estimada de las soluciones Stock al 80%, 100% y 120% de Piridoxina y Tiamina, muestran que tienen una desviación estándar menor al 1% y un C.V, también menor al 1%, lo cual indica que existe proximidad en los resultados obtenidos experimentalmente y por lo tanto el sistema es preciso.

### 2.9.3. Linealidad del Método.

La linealidad del método se evaluó realizando 6 ensayos con placebos cargados a 5 niveles de concentración diferentes, correspondientes al 80, 90, 100, 110 y 120% de Cianocobalamina, Piridoxina y Tiamina del contenido normal de la muestra, los cuales se prepararon de acuerdo al Anexo D(Preparación de Placebos Cargados) y Anexo E(Preparación de Solución Vehículo).

#### \* *Linealidad del Método para la determinación de Cianocobalamina*

Tabla No. 22 Concentración Real y Estimada de Cianocobalamina para la linealidad del Método

Concentración Real ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentración Estimada( $\mu\text{g/ml}$ )	Razón de Concentraciones
121,46	120,212	0,9897
121,46	119,328	0,9824
121,46	119,158	0,9810
121,46	118,981	0,9795
121,46	118,782	0,9779
121,46	120,623	0,9931
160,516	157,5835	0,9817
160,516	157,0452	0,9783
160,516	157,0498	0,9784
200,488	199,0242	0,9926
200,488	198,4439	0,9898
200,488	197,3871	0,9845
200,488	200,3054	0,9990
200,488	198,6081	0,9906
200,488	199,9102	0,9971
240,44	237,8374	0,9891
240,44	239,7751	0,9972
240,44	237,8387	0,9891
280,296	283,254	1,0105
280,296	281,676	1,0049
280,296	281,856	1,0055
280,296	280,977	1,0024
280,296	282,727	1,0086
280,296	281,772	1,0052



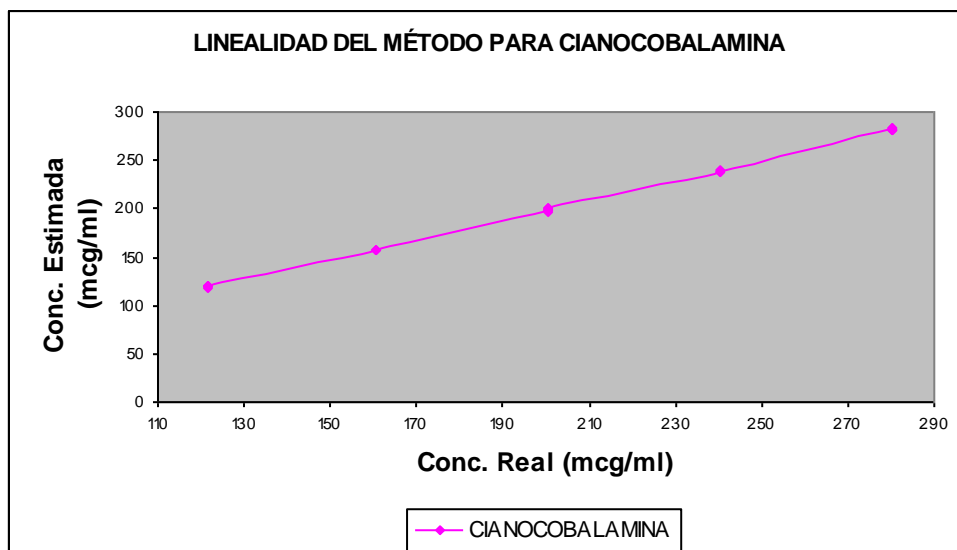


Figura No. 8 Concentración Real VS Concentración estimada de Cianocobalamina

Tabla No. 23 Análisis de Regresión para Cianocobalamina

<b>DATOS DE REGRESIÓN</b>	
<b>PROMEDIO</b>	0,992
<b>DESVEST</b>	0,010
<b>C.V.</b>	1,048
<b>INTERCEPTO</b>	-5,620
<b>PENDIENTE</b>	1,023
<b>COEF.CORR. (R)</b>	1,000
<b>COEF. DET (R<sup>2</sup>)</b>	1,000

Tabla No. 24 Límites del intercepto para Cianocobalamina

<b>Cianocobalamina</b>		
	<b>Inferior 95%</b>	<b>Superior 95%</b>
<b>Intercepción</b>	-7,663	-3,577

En la linealidad del método para determinar Cianocobalamina se puede observar que existe un comportamiento lineal entre la concentración real y la concentración estimada, con resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra. Y por medio del análisis de regresión lineal se comprobó que esta prueba cumplía con los criterios de aceptación, teniendo un CV aproximadamente del 1%, una R<sup>2</sup> de 1 y el intercepto se encuentra dentro de los límites calculados.

• **Linealidad del Método para la determinación de Piridoxina y Tiamina**

Tabla No. 25 Concentración Real y Estimada de Piridoxina y Tiamina para la linealidad del Método

Concentración Real( $\mu\text{g/ml}$ )		Concentración Estimada ( $\mu\text{g/ml}$ )		Razón de Concentraciones	
Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina
31,976	31,981	33,276	33,376	1,040630	1,043597
31,976	31,981	32,948	33,047	1,030376	1,033313
31,976	31,981	32,673	32,771	1,021791	1,024705
36,026	36,000	37,282	37,394	1,034864	1,038708
36,026	36,000	36,683	36,793	1,018229	1,022014
36,026	36,000	36,472	36,581	1,012375	1,016136
36,026	36,000	36,288	36,396	1,007256	1,011000
36,026	36,000	36,263	36,372	1,006579	1,010319
36,026	36,000	36,470	36,579	1,012314	1,016075
40,049	40,040	40,536	40,658	1,012156	1,015442
40,049	40,040	40,670	40,792	1,015505	1,018801
40,049	40,040	40,204	40,325	1,003859	1,007118
40,049	40,040	40,128	40,248	1,001952	1,005205
40,049	40,040	40,668	40,790	1,015440	1,018736
40,049	40,040	40,180	40,301	1,003262	1,006521
44,000	44,011	45,141	45,277	1,025931	1,028761
44,000	44,011	44,111	44,244	1,002522	1,005287
44,000	44,011	45,739	45,877	1,039522	1,042392
44,000	44,011	43,861	43,992	0,996831	0,999582
44,000	44,011	44,993	45,128	1,022572	1,025394
44,000	44,011	45,255	45,391	1,028510	1,031349
47,975	48,022	48,087	48,231	1,002316	1,004348
47,975	48,022	49,018	49,165	1,021724	1,023795
47,975	48,022	48,940	49,087	1,020110	1,022179

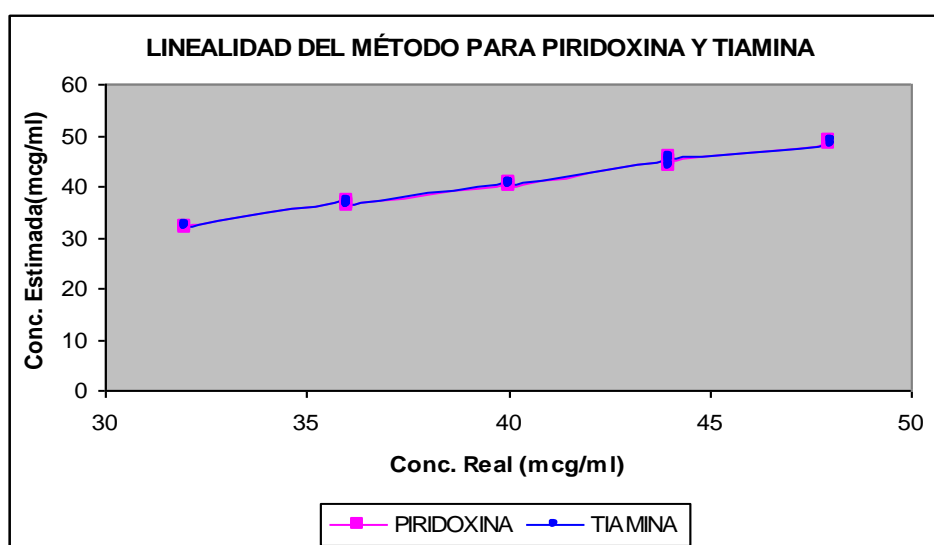


Figura No. 9 Concentración Real VS Concentración estimada de Piridoxina y Tiamina

Tabla No. 26 Análisis de Regresión para Piridoxina y Tiamina

DATOS DE REGRESIÓN		
	PIRIDOXINA	TIAMINA
PROMEDIO	1,0165	1,0196
DESVEST	0,0124	0,0124
C.V.	1,2227	1,2160
INTERCEPTO	0,6303	0,7581
PENDIENTE	1,0005	1,0003
COEF.CORR. (R)	0,9952	0,9953
COEF. DETER (R <sup>2</sup> )	0,9905	0,9907

Tabla No. 27 Límites del intercepto para Piridoxina y Tiamina

	Piridoxina		Tiamina	
	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	-2,562	0,725	-2,152	1,118

En la Figura No.9 se puede ver que los resultados obtenidos de concentración estimada de los placebos cargados a los 5 diferentes niveles de concentración, presentan una respuesta proporcional a la concentración de Piridoxina y Tiamina presentes en la muestra, los cuales cumplen también con los criterios de aceptación, teniendo valores de C.V. aproximadamente de 1.3%, una R<sup>2</sup> de 0.99 y el intercepto dentro de los límites establecidos.

#### 2.9.4. Exactitud del Método.

Para medir la exactitud de este método se realizaron 6 ensayos con placebos cargados a tres niveles de concentración diferentes correspondientes al 90, 100 y 110% de Cianocobalamina, Piridoxina y Tiamina del contenido normal de la muestra, los cuales fueron preparados de acuerdo al Anexo D y E.

#### \* *Exactitud para la determinación de Cianocobalamina*

Tabla No. 28 Concentración estimada de Cianocobalamina, % de Recobro y Análisis de la prueba t , para los diferentes niveles de concentración de placebos cargados

Placebo	Concentración Real (µg/ml)	Concentración Estimada (µg/ml)	% Recobro	Cianocobalamina	
90%	160,516	158,582	98,795	Promedio	99,116
	160,516	160,303	99,867	D.S.	0,40887
	160,516	159,124	99,133	C.V.	0,41252
	160,516	159,238	99,204	Tcal	-2,162
	160,516	158,815	98,940	Tcrit	2,571
	160,516	158,520	98,756		
100%	200,488	201,317	100,414	Promedio	100,386
	200,488	201,182	100,346	D.S.	0,27015
	200,488	200,223	99,868	C.V.	0,26911
	200,488	201,651	100,580	Tcal	1,428
	200,488	201,621	100,565	Tcrit	2,571
	200,488	201,574	100,542		
110%	240,440	238,670	99,264	Promedio	99,343
	240,440	239,220	99,493	D.S.	0,30714
	240,440	238,744	99,295	C.V.	0,30917
	240,440	237,642	98,836	Tcal	-2,1377
	240,440	239,011	99,406	Tcrit	2,571
	240,440	239,881	99,767		

Tabla No. 29 Análisis de Varianza para Cianocobalamina

ANÁLISIS DE VARIANCIA					
Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Tratamiento	1	25006,962	25006,962	66055,048	4,380749
Error	19	7,1929745	0,378577		
Total	20	25014,155			

La tabla No.28 muestra que los porcentajes de recuperación para Cianocobalamina en los tres niveles de concentración analizados se encuentran dentro de los límites especificados del 98 al 102% de recuperación para principios activos en medicamentos, y mediante el análisis de t de student, se determinó que el método es exacto para cuantificar Cianocobalamina, ya que los valores de Tcal son menores a los de Tcrit en los diferentes niveles de concentración analizada con un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ .

• **Exactitud para la determinación de Piridoxina y Tiamina**

Tabla No. 30 Concentración estimada de Piridoxina y Tiamina, % de Recobro y Análisis de la prueba t, para los diferentes niveles de concentración de placebos cargados

Placebo	Concentración Real (µg/ml)		Concentración Estimada (µg/ml)		% Recobro				
	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina		Piridoxina	Tiamina
90	36,026	36,000	36,194	36,238	100,466	100,659	Promedio	100,603	100,797
	36,026	36,000	36,364	36,408	100,937	101,131	D.S	0,3329	0,3337
	36,026	36,000	36,280	36,323	100,703	100,896	C.V.	0,3309	0,3311
	36,026	36,000	36,027	36,071	100,002	100,197	Tcal	1,813	2,389
	36,026	36,000	36,266	36,310	100,665	100,859	Tcrit	2,571	2,571
	36,026	36,000	36,331	36,375	100,847	101,041			
100	40,049	40,040	40,216	40,265	100,415	100,562	Promedio	100,2691	100,2911
	40,049	40,040	40,177	40,127	100,320	100,217	D.S	0,2812	0,4140
	40,049	40,040	40,297	40,046	100,618	100,017	C.V.	0,2805	0,4128
	40,049	40,040	40,063	40,212	100,033	100,430	Tcal	0,9570	0,7031
	40,049	40,040	40,136	40,185	100,217	100,363	Tcrit	2,571	2,571
	40,049	40,040	40,054	40,102	100,012	100,157			
110	44,000	44,011	44,130	44,184	100,294	100,393	Promedio	100,6658	100,7478
	44,000	44,011	44,450	44,504	101,023	101,120	D.S	0,5215	0,5020
	44,000	44,011	44,144	44,198	100,327	100,425	C.V.	0,5181	0,4983
	44,000	44,011	44,275	44,287	100,624	100,628	Tcal	1,2766	1,4898
	44,000	44,011	43,546	43,599	98,969	99,064	Tcrit	2,571	2,571
	44,000	44,011	45,214	45,268	102,759	102,857			

Tabla No. 31 Análisis de Varianza para Piridoxina y Tiamina

ANÁLISIS DE VARIANCIA					
Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Tratamiento	2	0,96452079	0,48226039	0,07949767	3,25944631
Error	36	218,388454	6,06634593		
Total	38	219,352974			

---

---

Los resultados para Piridoxina y Tiamina en la tabla No.30 muestran que los porcentajes de recuperación se encuentran dentro de los límites permitidos por la industria farmacéutica que van del 98 al 102%, con un coeficiente de variación menor al 2% para cada nivel de concentración. En donde el análisis de la prueba t con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ , indican que los valores de  $t_{cal} < t_{crit}$ , por lo cual se puede afirmar que el método es exacto, ya que existe proximidad entre los valores teóricos y los experimentales.

#### **2.9.5. Precisión del Método.**

##### **A) Repetibilidad.**

El parámetro de repetibilidad de este método se evaluó con placebos cargados a 3 diferentes niveles de concentración correspondientes al 80, 100 y 120% de la concentración normal de la muestra, realizando tres ensayos por cada nivel de concentración.

• **Repetibilidad para la determinación de Cianocobalamina**

Tabla No. 32 Concentración estimada de Cianocobalamina al 80%, 100% y 120%

Placebo	Concentración Real (µg/ml)	Concentración Estimada (µg/ml)	% Desviación
80%	121,46	120,212	-1,03%
	121,46	119,328	-1,76%
	121,46	119,158	-1,90%
	PROMEDIO	119,566	-1,56%
	DS	0,5657	
	CV	0,4731	
100%	200,488	199,024	-0,73%
	200,488	198,443	-1,02%
	200,488	197,387	-1,55%
	PROMEDIO	198,285	-1,10%
	DS	0,83	
	CV	0,4186	
120%	280,296	283,254	1,06%
	280,296	281,676	0,49%
	280,296	281,856	0,56%
	PROMEDIO	282,262	0,70%
	DS	0,8637	
	CV	0,306	

• **Repetibilidad para la determinación de Piridoxina y Tiamina**

Tabla No. 33 Concentración estimada de Piridoxina y Tiamina al 80%, 100% y 120%

Placebo	Concentración Real (µg/ml)		Concentración Estimada (µg/ml)		% Desviación	
	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina
80%	31,976	31,981	32,348	32,596	1,20%	1,90%
	31,976	31,981	31,866	32,110	-0,30%	0,40%
	31,976	31,981	32,107	32,353	0,40%	1,20%
		PROMEDIO	32,1069	32,3527	0,41%	1,16%
		DS	0,24110001	0,24295		
		CV	0,75092973	0,75094119		
100%	40,049	40,040	40,536	40,658	1,20%	1,50%
	40,049	40,040	40,670	40,792	1,60%	1,90%
	40,049	40,040	40,204	40,325	0,40%	0,70%
		PROMEDIO	40,47	40,592	1,05%	1,38%
		DS	0,24	0,241		
		CV	0,593	0,593		
120%	47,9754	48,022	48,0865	48,2308	0,2%	0,4%
	47,9754	48,022	49,0176	49,1647	2,2%	2,4%
	47,9754	48,022	48,9402	49,0871	2,0%	2,2%
		PROMEDIO	48,681	48,828	1,47%	1,68%
		DS	0,517	0,518		
		CV	1,061	1,061		

Con los resultados de la tabla No.32 se puede ver que la concentración estimada de Cianocobalamina a los tres diferentes niveles de concentración analizados, tienen una desviación estándar y un coeficiente de variación menor al 1%, con lo cual se demuestra que existe precisión en el método cuando se analiza una muestra bajo las mismas condiciones: como lo son el mismo laboratorio, el mismo analista, el mismo equipo y reactivo y durante un tiempo corto.

Los datos de la tabla No.33 muestran que el método también es preciso para la determinación de Tiamina y Piridoxina bajo las mismas condiciones de análisis, cumpliendo con los criterios de aceptación de la prueba, teniendo una desviación estándar y un coeficiente de variación menor al 1% para cada caso.

### B) Reproducibilidad.

La prueba de reproducibilidad se evaluó realizando 3 ensayos con la solución del placebo cargado al 100%, analizada por dos analistas en dos días diferentes.

#### \* *Reproducibilidad para la determinación de Cianocobalamina*

Tabla No. 34 Concentración Estimada de Cianocobalamina por 2 analistas en 2 días diferentes

	ANALISTA 1			ANALISTA 2		
	Concentración Real (µg/ml)	Concentración Estimada (µg/ml)	% Recobro	Concentración Real (µg/ml)	Concentración Estimada (µg/ml)	% Recobro
DÍA 1	200,488	200,305	99,909	200,488	202,722	101,114
	200,488	199,024	99,270	200,488	202,242	100,875
	200,488	199,910	99,712	200,488	202,722	101,114
	PROMEDIO	199,746	99,630	PROMEDIO	202,5618	101,034
	DS	1,0564		DS	0,2766	
	CV	0,5310		CV	0,1366	
DÍA 2	200,488	201,442	100,476	200,488	202,144	100,826
	200,488	203,286	101,396	200,488	202,968	101,237
	200,488	203,624	101,564	200,488	202,259	100,884
	PROMEDIO	202,784	101,145	PROMEDIO	202,457	100,982
	DS	1,1744		DS	0,4462	
	CV	0,5791		CV	0,2204	



Tabla No. 35 Análisis factorial para Cianocobalamina

ANÁLISIS FACTORIAL					
Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadros	Cuadrados Medios	Fcal	Fcrit
Analista	1	1,1554	1,1554	0,33522314	161
Día	1	3,4468	3,4468	3,32193089	5,32
Error	8	1,0376	0,1297		
Total	11				

En los resultados de reproducibilidad para la determinación de Cianocobalamina se puede observar que los coeficientes de variación para todas las determinaciones son menores al 1%, lo cual nos indica que el método es preciso para obtener resultados analíticos en una muestra homogénea. Y para poder evaluar la influencia de los factores día y analista, se realizó un análisis factorial anidado con un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ , en el cual el valor de F calculado es menor que F crítica, lo cual nos indica que no hay diferencias significativas entre analistas y días de análisis.

✱ **Reproducibilidad para la determinación de Piridoxina y Tiamina**

Tabla No. 36 Concentración Estimada de Piridoxina y Tiamina por 2 analistas en 2 días diferentes

	Concentración Real ( $\mu\text{g/ml}$ )	ANALISTA 1				ANALISTA 2				
		Concentración Estimada ( $\mu\text{g/ml}$ )		% Recobro		Concentración Estimada ( $\mu\text{g/ml}$ )		% Recobro		
DÍA1	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina
	40,049	40,039	40,204	40,324	100,387	100,712	40,585	40,395	101,338	100,889
	40,049	40,039	40,127	40,248	100,195	100,522	40,627	40,438	101,443	100,997
	40,049	40,039	40,180	40,300	100,327	100,652	40,188	40,485	100,347	101,114
		PROMEDIO	40,170	40,291	100,303	100,629	40,467	40,439	101,043	101,000
		DS	0,0394	0,0389			0,3685	0,3713		
	CV	0,6304	0,6304			0,908	0,908			
DÍA2	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina
	40,049	40,039	40,704	40,420	101,635	100,952	40,706	40,422	101,640	100,957
	40,049	40,039	39,858	39,580	99,523	98,854	40,045	39,766	99,990	99,318
	40,049	40,039	40,242	39,962	100,482	99,808	40,117	39,837	100,170	99,495
		PROMEDIO	40,268	39,987	100,547	99,871	40,289	40,008	100,600	99,923
		DS	0,4236	0,4206			0,3626	0,3600		
	CV	1,0519	1,0518			0,9001	0,8998			

Tabla No. 37 Análisis Factorial para Piridoxina

<b>ANÁLISIS FACTORIAL</b>					
<b>Fuente de Variación</b>	<b>Grados de Libertad</b>	<b>Suma de Cuadros</b>	<b>Cuadrados Medios</b>	<b>Fcal</b>	<b>Fcrit</b>
<b>Analista</b>	1	0,4719	0,4719	1,2311	161
<b>Día</b>	1	0,3833	0,3833	0,6625	5,32
<b>Error</b>	8	4,6283	0,5785		
<b>Total</b>	11				

Tabla No. 38 Análisis Factorial para Tiamina

<b>ANÁLISIS FACTORIAL</b>					
<b>Fuente de Variación</b>	<b>Grados de Libertad</b>	<b>Suma de Cuadros</b>	<b>Cuadrados Medios</b>	<b>Fcal</b>	<b>Fcrit</b>
<b>Analista</b>	1	0,2687	0,2687	0,1034	161
<b>Día</b>	1	2,5990	2,5990	5,3026	5,32
<b>Error</b>	8	3,9212	0,4901		
<b>Total</b>	11				

En el análisis de reproducibilidad para Piridoxina y Tiamina se puede ver que la estimación de las concentraciones es muy cercana a las concentraciones reales con un C.V. menor al 2%, por lo cual se puede decir que el método es preciso. Y por medio del análisis factorial anidado también se pudo determinar que los resultados analíticos no difieren mucho entre analistas y días de análisis y por lo tanto el método es reproducible.

#### **2.9.6. Estabilidad de la Muestra Analítica.**

La estabilidad de la muestra analítica se realizó con 12 ensayos a partir de la solución de placebo cargado al 100%. Fraccionando cada ensayo en 3 muestras de 8ml, para tener un total de 36 muestras. Las cuales fueron divididas en dos bloques de 18 muestras cada uno y se analizaron bajo dos condiciones: Temperatura ambiente sin protección de la luz y temperatura ambiente protegidas de la luz. Analizando 6 muestras de cada condición a las 0, 24 y 48hrs después de su preparación (Ver Anexo F).

• **Análisis de Estabilidad de Cianocobalamina**

Tabla No. 39 Estabilidad de Cianocobalamina a T° ambiente + luz y T° ambiente sin Luz

Tiempo	Concentración Real (µg/ml)	CONDICIÓN 1: T° AMBIENTE + LUZ		CONDICIÓN 2: T° AMBIENTE SIN LUZ	
		Concentración Estimada (µg/ml)	% Desviación	Concentración Estimada (µg/ml)	% Desviación
0 hrs	200,488	199,024	-0,73%	203,442	1,47%
	200,488	198,444	-1,02%	203,286	1,40%
	200,488	197,387	-1,55%	204,129	1,82%
	200,488	200,305	-0,09%	204,251	1,88%
	200,488	198,608	-0,94%	203,624	1,56%
	200,488	199,910	-0,29%	204,041	1,77%
	PROMEDIO	198,946	-0,77%	203,795	1,65%
	DS	1,056		0,3982	
	CV	0,531		0,1954	
24 hrs	200,488	194,573	-2,95%	203,493	1,50%
	200,488	197,830	-1,33%	204,158	1,83%
	200,488	196,955	-1,76%	203,594	1,55%
	200,488	195,216	-2,63%	204,433	1,97%
	200,488	197,295	-1,59%	203,476	1,49%
	200,488	198,806	-0,84%	202,052	0,78%
	PROMEDIO	196,779	-1,85%	203,535	1,52%
	DS	1,601		0,8249	
	CV	0,814		0,4053	
48 hrs	200,488	196,028	-2,22%	201,731	0,62%
	200,488	198,278	-1,10%	200,807	0,16%
	200,488	196,394	-2,04%	202,272	0,89%
	200,488	195,651	-2,41%	202,138	0,82%
	200,488	198,080	-1,20%	203,573	1,54%
	200,488	196,903	-1,79%	202,361	0,93%
	PROMEDIO	196,889	-1,80%	202,147	0,83%
	DS	1,083		0,9015	
	CV	0,550		0,4459	

De acuerdo a los resultados de estabilidad de Cianocobalamina se puede ver que el % de desviación en la estimación de la concentración de la muestra a cada tiempo, es menor al 2% con respecto a la muestra analítica al tiempo cero, bajo las condiciones de temperatura ambiente sin protección de la luz y a temperatura ambiente protegida de la luz, durante un tiempo de 48hrs después de su preparación. Por lo cual se puede decir que la Cianocobalamina permanece estable durante el tiempo de análisis de la muestra.

• **Análisis de Estabilidad para Piridoxina y Tiamina**

Tabla No. 40 Estabilidad de Piridoxina y Tiamina a T° ambiente + luz y T° ambiente sin Luz

Tiempo	Concentración Real (µg/ml)		CONDICIÓN 1: T° AMBIENTE + LUZ				CONDICIÓN 2: T° AMBIENTE SIN LUZ			
			Concentración Estimada (mg/ml)		% Desviación		Concentración Estimada (µg/ml)		% Desviación	
	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina
0 hrs	40,049	40,040	40,536	40,658	1,22%	1,54%	40,585	40,896	1,34%	2,14%
	40,049	40,040	40,670	40,792	1,55%	1,88%	41,106	41,421	2,64%	3,45%
	40,049	40,040	40,204	40,325	0,39%	0,71%	40,627	40,939	1,44%	2,25%
	40,049	40,040	40,128	40,248	0,20%	0,52%	40,188	40,496	0,35%	1,14%
	40,049	40,040	40,668	40,790	1,54%	1,87%	40,848	41,160	1,99%	2,80%
	40,049	40,040	40,180	40,301	0,33%	0,65%	40,162	40,469	0,28%	1,07%
		PROMEDIO	40,398	40,519	0,87%	1,20%	40,586	40,897	1,34%	2,14%
	DS	0,2547	0,2554			0,3685	0,3713			
	CV	0,6305	0,6304			0,9080	0,9080			
24hrs	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina
	40,049	40,040	40,737	40,859	1,72%	2,05%	40,321	40,630	0,68%	1,45%
	40,049	40,040	40,191	40,312	0,35%	0,68%	41,031	41,345	2,45%	3,24%
	40,049	40,040	39,073	39,190	-2,44%	-2,12%	41,333	41,649	3,20%	3,99%
	40,049	40,040	40,227	40,348	0,44%	0,77%	40,227	40,535	0,44%	1,21%
	40,049	40,040	39,369	39,487	-1,70%	-1,38%	39,710	40,014	-0,85%	-0,09%
	40,049	40,040	39,565	39,684	-1,21%	-0,89%	40,101	40,408	0,13%	0,89%
	PROMEDIO	39,860	39,980	-0,47%	-0,15%	40,454	40,764	1,01%	1,81%	
	DS	0,6263	0,6281			0,6087	0,6133			
	CV	1,5711	1,5711			1,5047	1,5046			
48 hrs	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina
	40,049	40,040	39,559	39,678	-1,22%	-0,90%	39,599	39,902	-1,13%	-0,34%
	40,049	40,040	39,536	39,655	-1,28%	-0,96%	40,613	40,924	1,41%	2,21%
	40,049	40,040	39,640	39,759	-1,02%	-0,70%	39,599	39,902	-1,13%	-0,34%
	40,049	40,040	39,714	39,833	-0,84%	-0,52%	41,178	41,493	2,82%	3,63%
	40,049	40,040	39,607	39,726	-1,10%	-0,78%	40,613	40,924	1,41%	2,21%
	40,049	40,040	39,611	39,730	-1,09%	-0,77%	40,896	41,209	2,11%	2,92%
	PROMEDIO	39,611	39,730	-1,09%	-0,77%	40,416	40,726	0,92%	1,71%	
	DS	0,0628	0,0629			0,6670	0,6722			
	CV	0,1584	0,1583			1,6504	1,6505			

Como se puede ver en la tabla No.40 los resultados de estabilidad para Tiamina y Piridoxina muestran que las dos vitaminas, son estables al conservarlas a las condiciones de temperatura ambiente protegidas de la luz y temperatura ambiente sin protegerlas de la luz durante un tiempo de 48hrs después de su preparación, teniendo un % de desviación y un coeficiente de variación menor al 2% con respecto a la muestra analítica del tiempo cero.

---

### 2.9.7. Tolerancia.

La prueba de tolerancia se evaluó determinando las variaciones más significativas que pueden afectar a este método, como lo son la pureza del agua y las longitudes de onda, por medio del siguiente procedimiento:

#### **a) Pureza del agua:**

1.- Para determinar como influye la pureza del agua se prepararon 6 ensayos con agua destilada y 6 ensayos con agua desionizada, de la forma habitual como lo indica el procedimiento de ensayo.

#### **b) Longitud de onda:**

1.-Para evaluar este parámetro se realizaran variaciones de 0.2 nm a las longitudes de onda ya seleccionadas en el ensayo tanto en la región del espectro visible para la cianocobalamina, así como para la región U.V para la determinación de la Tiamina y Piridoxina. Como se muestra a continuación:

Tabla No. 41 Longitudes de onda para la determinación de Cianocobalamina en la región del Espectro Visible

REGIÓN DEL ESPECTRO VISIBLE												
Long. Onda	501	509	516	519	526	542	549	550	552	555	560	564
-0.2nm	500.8	507.8	515.8	518.8	525.8	541.8	548.8	549.8	551.8	554.8	559.8	563.8
Variación	501.2	509.2	516.2	519.2	526.2	542.2	549.2	550.2	552.2	555.2	560.2	564.2
+0.2nm												

Tabla No. 42 Longitudes de onda para lá determinación de Piridoxina y Tiamina en lá región del U.V.

REGIÓN DEL ESPECTRO U.V												
Long. Onda	224	240	242	252	258	262	265	278	286	290	295	298
-0.2nm	223.8	239.8	241.8	251.8	257.8	261.8	264.8	277.8	285.8	289.8	294.8	297.8
Variación												
+0.2nm	224.2	240.2	242.2	252.2	258.2	262.2	265.2	278.2	286.2	290.2	295.2	298.2

2.- Las lecturas se realizarón de forma aleatoria formando dos conjuntos en los cuales contenga valores arriba y debajo de la longitud de onda normal. A partir de los ensayos preparados con agua destilada como con agua desionizada, para las longitudes del espectro visible así como para las de la región de espectro U.V.

• **Análisis de tolerancia para la determinación de Cianocobalamina**

Tabla No. 43 Determinación de Cianocobalamina con el Factor H= 3, con agua destilada y desionizada y con variaciones en las longitudes de onda

FACTOR H = 3					
Pureza Del Agua	Conjunto 1			Conjunto 2	
	Concentración Real (µg/ml)	Concentración Estimada (µg/ml)	% Desviación	Concentración Estimada (µg/ml)	% Desviación
Agua Destilada	200,488	224,656	12,05%	187,945	-6,26%
	200,488	223,765	11,61%	190,491	-4,99%
	200,488	225,703	12,58%	190,896	-4,78%
	200,488	226,114	12,78%	189,593	-5,43%
	200,488	225,36	12,41%	189,664	-5,40%
	200,488	226,997	13,22%	190,283	-5,09%
	PROMEDIO	225,432	12,44%	189,811	-5,33%
	DS	1,1292		1,0407	
CV	0,5009		0,5483		
Agua Desionizada	200,488	193,177	-3,65%	192,497	-3,99%
	200,488	191,292	-4,59%	193,509	-3,48%
	200,488	195,084	-2,70%	191,800	-4,33%
	200,488	196,474	-2,00%	192,678	-3,90%
	200,488	196,265	-2,11%	192,991	-3,74%
	200,488	196,900	-1,79%	193,045	-3,71%
	PROMEDIO	194,865483	-2,80%	192,753367	-3,86%
	DS	2,2069		0,5818	
CV	1,1325		0,3018		

Tabla No. 44 Determinación de Cianocobalamina con el Factor H= 1 con agua destilada y desionizada y con variaciones en las longitudes de onda

FACTOR H = 1					
Pureza Del Agua	Conjunto 1			Conjunto 2	
	Concentración Real (µg/ml)	Concentración Estimada (µg/ml)	% Desviación	Concentración Estimada (µg/ml)	% Desviación
Agua Destilada	200,488	206,069	2,78%	206,058	2,78%
	200,488	206,469	2,98%	206,235	2,87%
	200,488	206,083	2,79%	206,272	2,89%
	200,488	206,075	2,79%	206,279	2,89%
	200,488	206,285	2,89%	206,504	3,00%
	200,488	206,248	2,87%	206,495	3,00%
	<b>PROMEDIO</b>	<b>206,2048</b>	<b>2,85%</b>	<b>206,3069</b>	<b>2,90%</b>
	<b>DS</b>	<b>0,1602</b>		<b>0,1693</b>	
	<b>CV</b>	<b>0,5009</b>		<b>0,5483</b>	
Agua Desionizada	200,488	195,469	-2,50%	191,728	-4,37%
	200,488	191,999	-4,23%	193,996	-3,24%
	200,488	196,994	-1,74%	195,941	-2,27%
	200,488	197,125	-1,68%	195,982	-2,25%
	200,488	194,215	-3,13%	191,430	-4,52%
	200,488	193,001	-3,73%	195,566	-2,46%
	<b>PROMEDIO</b>	<b>194,8004</b>	<b>-2,84%</b>	<b>194,1070</b>	<b>-3,18%</b>
	<b>DS</b>	<b>2,1020</b>		<b>2,0900</b>	
	<b>CV</b>	<b>1,1325</b>		<b>0,3018</b>	

Como podemos ver en la tabla No.43 la pureza del agua como las variaciones en las longitudes de onda establecidas en la calibración, son factores que afectan en la determinación de la Cianocobalamina, dando desviaciones muy altas en el cálculo de las concentraciones estimadas de la muestra.

Pero si lleva acabo el ajuste necesario eligiendo otro factor de SCERP en la etapa de predicción, como se muestra en la tabla No.44, podemos ver que el método sí es tolerante para llevar acabo la determinación de Cianocobalamina con agua destilada y con variaciones en las longitudes de onda. Sin embargo con el agua desionizada se puede observar que aunque se cambie de factor, el método no es capaz de determinar a la Cianocobalamina de forma adecuada.

• **Análisis de tolerancia para la determinación de Piridoxina y Tiamina**

Tabla No. 45 Determinación de Piridoxina y Tiamina con el Factor H= 7 con agua destilada y desionizada y con variaciones en las longitudes de onda

FACTOR H = 7										
Pureza del agua	Concentración Real (µg/ml)		Conjunto 1				Conjunto 2			
			Concentración Estimada (µg/ml)		% Desviación		Concentración Estimada (µg/ml)		% Desviación	
	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina
Agua Destilada	40,049	40,040	37,745	37,730	-5,75%	-5,77%	37,815	37,800	-5,58%	-5,59%
	40,049	40,040	38,773	38,758	-3,19%	-3,20%	37,698	37,682	-5,87%	-5,89%
	40,049	40,040	38,342	38,326	-4,26%	-4,28%	37,658	37,643	-5,97%	-5,99%
	40,049	40,040	38,891	38,875	-2,89%	-2,91%	38,316	38,300	-4,33%	-4,34%
	40,049	40,040	38,717	38,702	-3,33%	-3,34%	38,487	38,472	-3,90%	-3,92%
	40,049	40,040	38,860	38,844	-2,97%	-2,99%	38,463	38,448	-3,96%	-3,98%
		PROMEDIO	38,554	38,539	-3,73%	-3,75%	38,072	38,057	-4,94%	-4,95%
		DS	0,4431	0,4429			0,3905	0,3903		
	CV	1,14937	1,1494			1,0258	1,0258			
Agua Deseionizada	40,049	40,040	41,657	41,641	4,01%	4,00%	42,733	42,716	6,70%	6,68%
	40,049	40,040	42,045	42,028	4,98%	4,97%	42,750	42,733	6,74%	6,73%
	40,049	40,040	42,176	42,160	5,31%	5,29%	42,956	42,939	7,26%	7,24%
	40,049	40,040	42,022	42,005	4,93%	4,91%	42,560	42,543	6,27%	6,25%
	40,049	40,040	42,582	42,565	6,32%	6,31%	42,425	42,408	5,93%	5,91%
	40,049	40,040	42,231	42,214	5,45%	5,43%	42,627	42,610	6,44%	6,42%
		PROMEDIO	42,1188	42,1019	5,17%	5,15%	42,6752	42,6581	6,56%	6,54%
		DS	0,3026	0,3025			0,1820	0,1820		
	CV	0,7185	0,7185			0,4266	0,4267			

Tabla No. 46 Determinación de Piridoxina y Tiamina con el Factor H= 5 con agua destilada y desionizada y con variaciones en las longitudes de onda

FACTOR H = 5										
Pureza del agua	Concentración Real (µg/ml)		Conjunto 1				Conjunto 2			
			Concentración Estimada (µg/ml)		% Desviación		Concentración Estimada (µg/ml)		% Desviación	
	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina	Piridoxina	Tiamina
Agua Destilada	40,049	40,040	39,100	39,084	-2,37%	-2,41%	39,407	39,391	-1,60%	-1,64%
	40,049	40,040	39,974	39,958	-0,19%	-0,23%	39,650	39,634	-1,00%	-1,04%
	40,049	40,040	39,584	39,568	-1,16%	-1,20%	39,505	39,489	-1,36%	-1,40%
	40,049	40,040	40,094	40,078	0,11%	0,07%	39,963	39,947	-0,22%	-0,26%
	40,049	40,040	39,967	39,951	-0,21%	-0,25%	39,670	39,655	-0,95%	-0,99%
	40,049	40,040	40,075	40,059	0,06%	0,02%	40,158	40,142	0,27%	0,23%
		PROMEDIO	39,799	39,783	-0,63%	-0,67%	39,7254	39,7096	-0,81%	-0,85%
		DS	0,3891	0,3890			0,2836	0,2835		
	CV	0,9777	0,9778			0,7138	0,7139			



---

La Piridoxina y la Tiamina no se pudieron determinar de forma adecuada cuando estas se encontraron en el medio de agua desionizada y cuando se variaron las longitudes de onda. Pero en el medio de agua destilada si se pudieron determinar aun cuando se hagan variaciones en las longitudes de onda, lo cual es posible haciendo un ajuste en el número de factor SCERP para la predicción de la concentración como se observa en la tabla No. 46.

---

### 2.9.8. Especificidad.

1.- Para determinar la especificidad del método primero se degradó una muestra utilizando el placebo cargado al 100%, el cual fue sometido a tres condiciones de degradación: Temperatura (80°C), Temperatura (80°C) mas agua oxigenada y Temperatura mas Hidróxido de Sodio.

2.- Una vez que se degradó la muestra, se preparó un placebo nuevo, pesando la cantidad correspondiente de cada activo y se le adicionó la muestra degradada como solución vehiculo, con la finalidad de determinar si el método analítico es capaz de determinar a los analitos presentes en la muestra de forma específica y exacta en presencia de sus productos de degradación.

#### \* *Degradación de Cianocobalamina.*

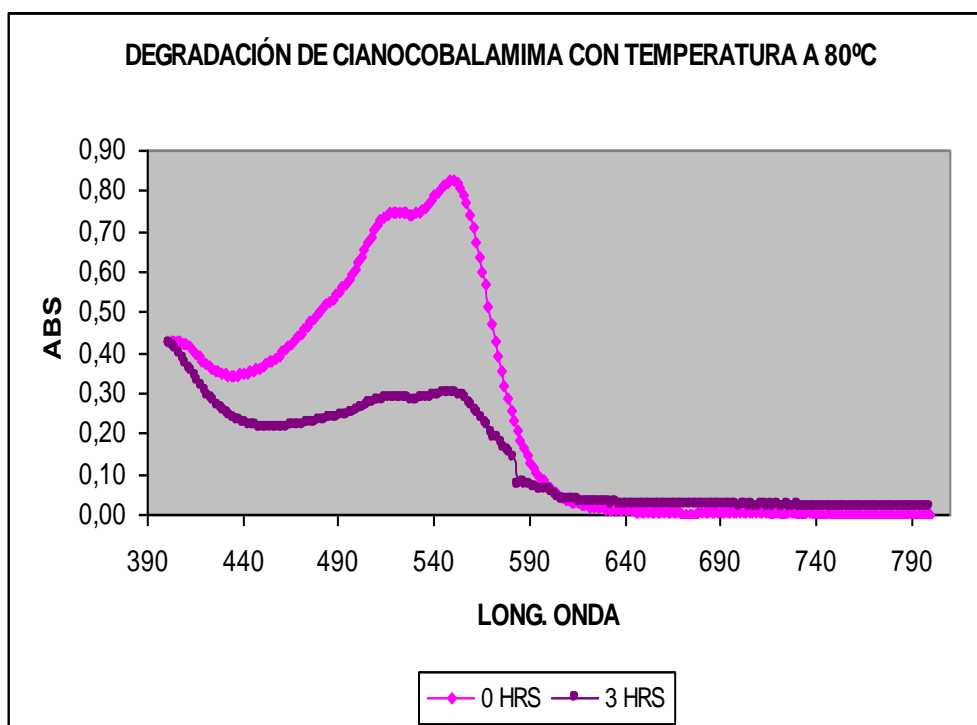


Figura No. 10 Degradación de Cianocobalamina con Temperatura a 80°C a las 0 hrs y 3 hrs.

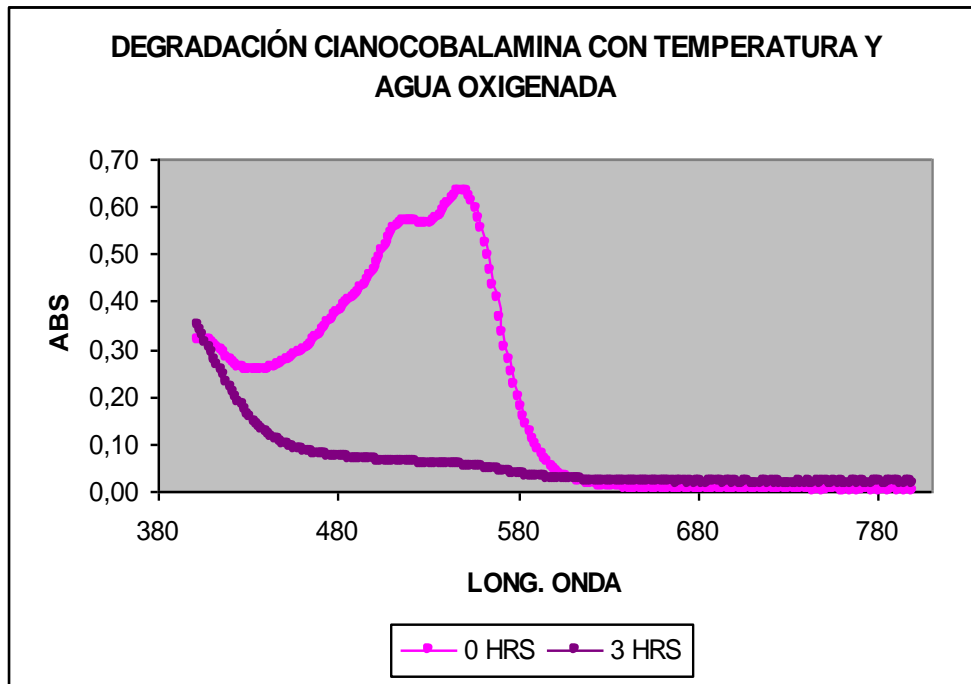


Figura No. 11 Degradación de Cianocobalamina con Temperatura (80°C) y agua oxigenada a las 0hrs y 3 hrs.

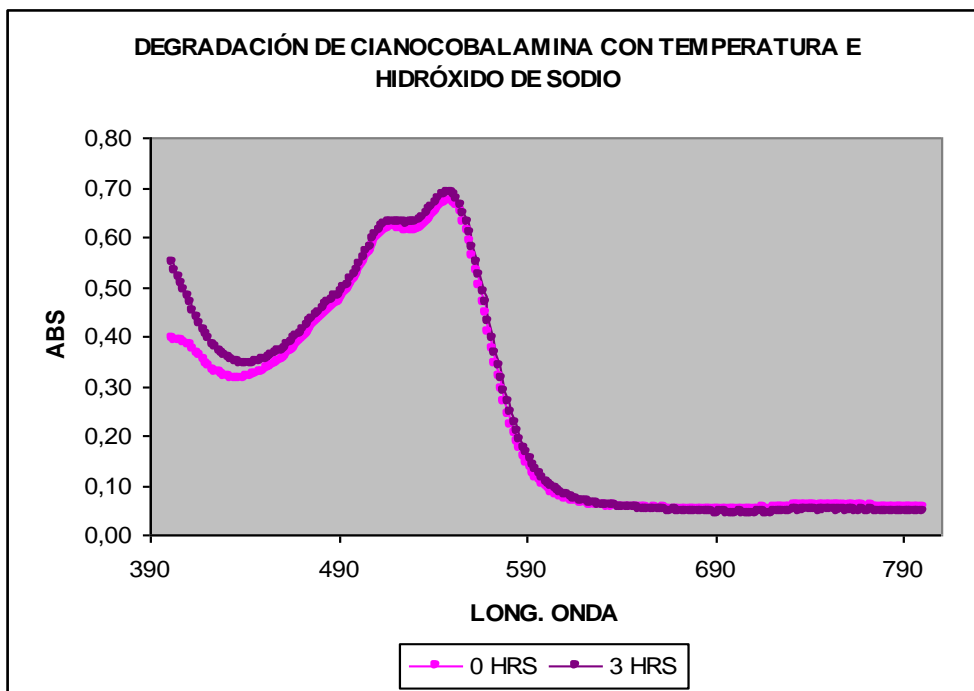


Figura No. 12 Degradación de Cianocobalamina con Temperatura (80°C) e Hidróxido de Sodio a las 0 hrs y 3 hrs.

• Degradación de Piridoxina y Tiamina

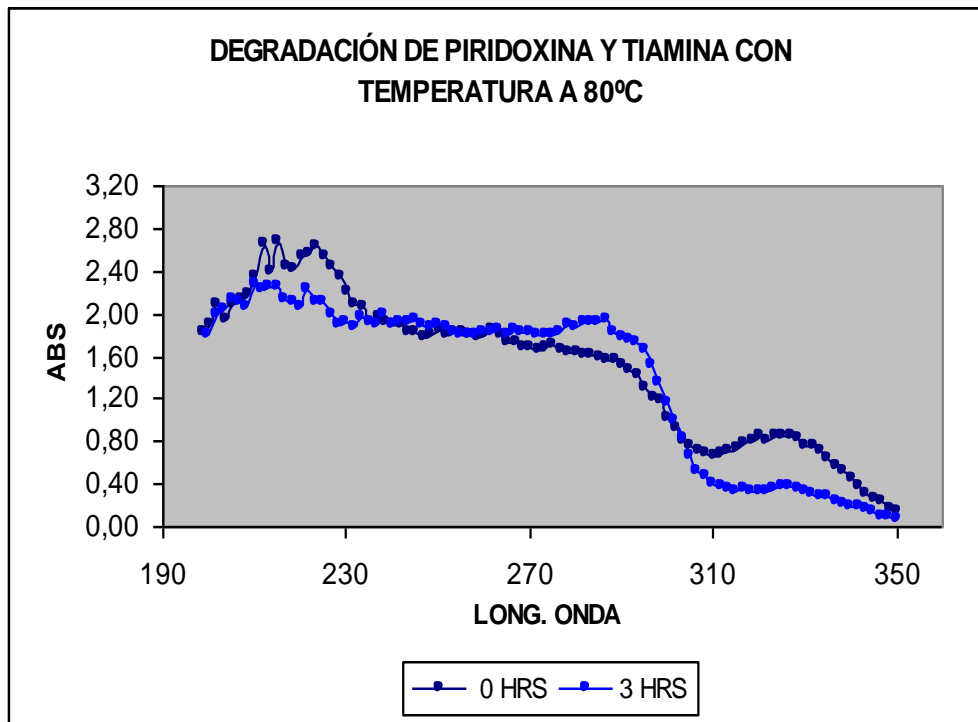


Figura No. 13 Degradación de Piridoxina y Tiamina con Temperatura a 80°C a las 0 hrs y 3 hrs.

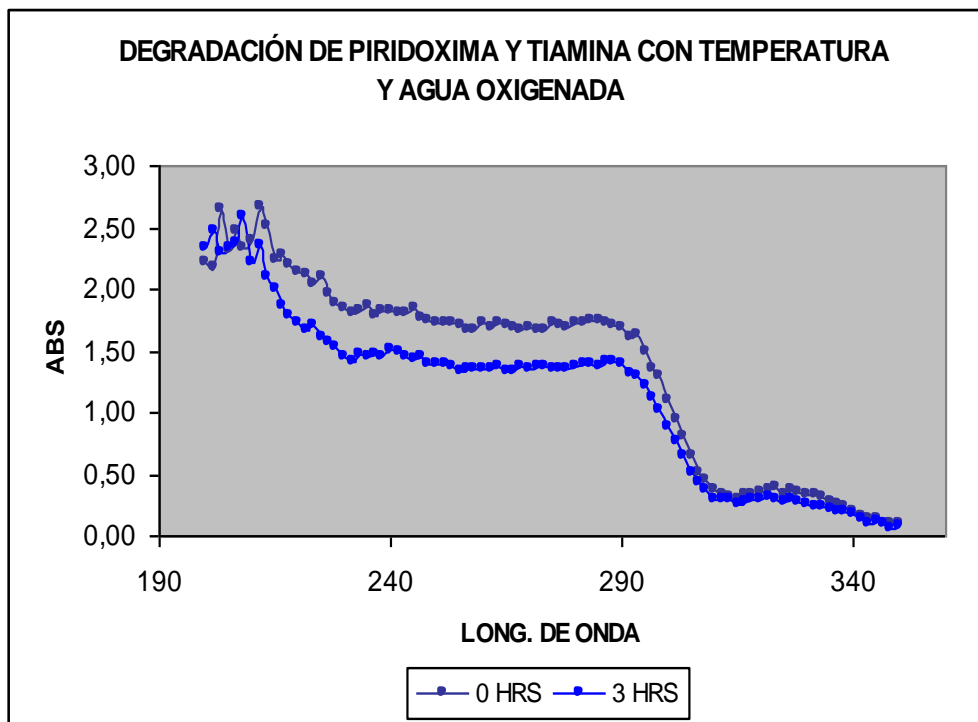


Figura No. 14 Degradación de Piridoxina y Tiamina con Temperatura (80°C) y agua oxigenada a las 0 hrs y 3 hrs.

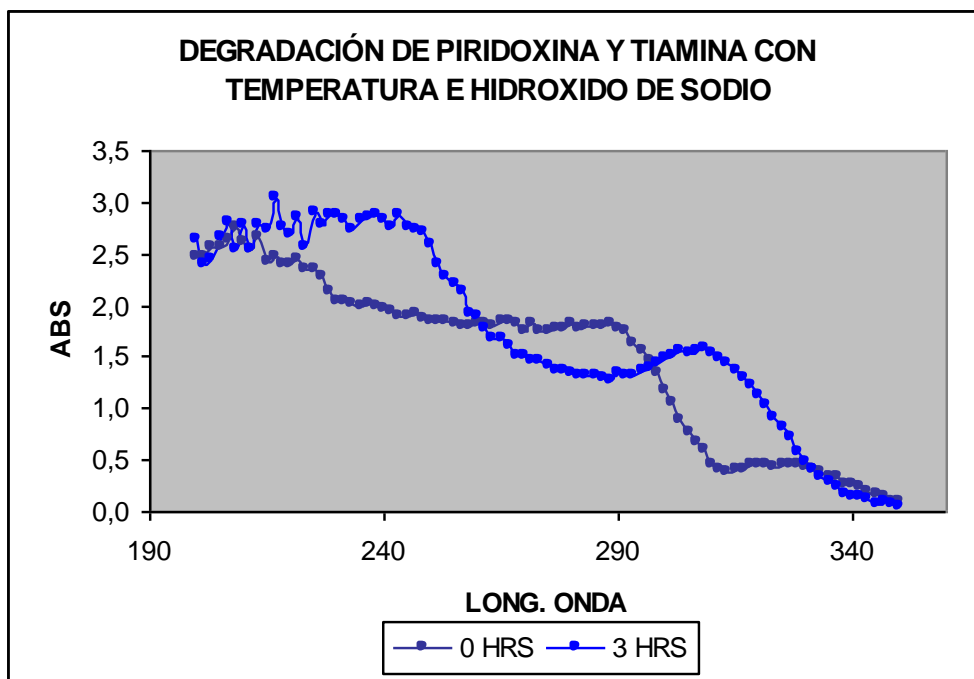


Figura No. 15 Degradación de Piridoxina y Tiamina con Temperatura (80°C) e Hidróxido de Sodio a las 0hrs y 3 hrs.

En la Figura No.10 se puede observar que la Cianocobalamina se puede degradar a más de la mitad de concentración inicial sometiéndola a una temperatura de 80°C durante un tiempo de 3hrs. Sin embargo si a esta muestra se le adiciona agua oxigenada y se calienta hasta 80°C durante 3hrs, la degradación de Cianocobalamina es casi total, como se muestra en la Figura No.11 y en la figura No.12, puede verse que la Cianocobalamina no se degrada al adicionarle hidróxido de Sodio y someterla a calentamiento.

La degradación para Tiamina y Piridoxina es casi mínima cuando la muestra se somete a temperatura de 80°C durante tres horas, como se puede observar en la Figura No.13. Al adicionarle agua oxigenada a la muestra y someterla a calentamiento la degradación es un poco mayor que por calentamiento, pero sin embargo esta sigue siendo poca. Y al someter esta muestra a calentamiento con Hidróxido de Sodio, tampoco se observa degradación de la muestra, como lo indica la figura No.15

En el caso de Tiamina y Piridoxina no se pudo degradar la muestra a más del 25% de la concentración inicial bajo estas condiciones, por lo cual no se pudo determinar si la presencia de los productos de degradación de los principios activos o de los excipientes de la muestra interfieren en el método para poder medir de forma exacta y específica a los analitos de interés.

---

La especificidad para Cianocobalamina se determinó preparando un nuevo placebo, al cual se le adicionó la muestra degradada con temperatura y agua oxigenada, en el cual se obtuvieron los siguientes resultados:

- **Placebo de Cianocobalamina al 100% con muestra degradada con temperatura y agua oxigenada.**

Tabla No. 47 Determinación de Especificidad para Cianocobalamina, con placebo cargado al 100% y con muestra degradada.

<b>PLACEBO AL 100%</b>		
<b>Concentración Real (µg/ml)</b>	<b>Concentración Estimada (µg/ml)</b>	<b>% Desviación</b>
199,52	200,403	0,44%
199,52	201,841	1,16%
199,52	201,667	1,08%
199,52	200,927	0,71%
199,52	200,975	0,73%
199,52	198,642	-0,44%
<b>PROMEDIO</b>	<b>200,743</b>	<b>0,61%</b>
<b>DS</b>	<b>1,1555</b>	
<b>CV</b>	<b>0,5756</b>	

En la tabla No.47 se puede ver que el C.V para la determinación de Cianocobalamina es menor al 2%, lo cual nos dice que el método analítico es capaz de determinar de forma específica a la Cianocobalamina aun en presencia de los productos de degradación de la muestra.

---

# **CONCLUSIONES**

- 
- 
- \* Las condiciones espectrofométricas adecuadas para la cuantificación simultánea de Piridoxina, Tiamina y Cianocobalamina presentes en un inyectable son: medio de disolución agua destilada, elección de 11 longitudes de onda en la región del espectro visible para la determinación de Cianocobalamina y elección de 11 longitudes de onda en la región del espectro UV para la determinación de Piridoxina y Tiamina, con un rango de concentraciones de 100 a 300 $\mu$ g/ml para Cianocobalamina y de 20 a 60 $\mu$ g/ml para Piridoxina y Tiamina,
  
  - \* Se desarrolló un modelo de calibración el cual permitió cuantificar a Cianocobalamina en la región del espectro visible y a Piridoxina y Tiamina en región del espectro UV de forma simultánea
  
  - \* Se validó el método analítico, el cual cumplió con los siguientes parámetros: linealidad del sistema, precisión del sistema, linealidad del método, precisión del método, exactitud del método, estabilidad de la muestra analítica, tolerancia y especificidad.
  
  - \* El método de Mínimos Cuadrados parciales es aplicable para la cuantificación simultánea de Piridoxina (B<sub>6</sub>), Tiamina ( B<sub>1</sub>), y Cianocobalamina(B<sub>12</sub>) presentes en un inyectable, de forma precisa y exacta, sin tener una previa separación de la muestra, con un menor costo y tiempo de análisis.



---

# **ANEXOS**

---

---

## **ANEXO A. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE DISOLUCIÓN.**

### **\* *Búfer de Fosfatos pH 3, 0.1M (Fosfato Monobásico de Sodio Dihidratado)***

- 1.-Pesar en un vaso de precipitado de 100ml aproximadamente exacto 15.6g de fosfato monobásico de Sodio Dihidratado.
- 2.- Agregar 50ml de agua destilada y disolver.
- 3.- Transferir la solución anterior a un matraz volumétrico de 1000ml.
- 4.- Agregar al matraz 850ml de agua destilada y agitar la solución.
- 5.- Medir el pH de la solución.
- 6.- Adicionar ácido fosfórico hasta ajustar a pH 3.0.
- 7.- Llevar a volumen de aforo con agua destilada

### **\* *Búfer de fosfatos pH 7, 0.1M ( Fosfato Dibásico de Sodio Heptahidratado- Fosfato Monobásico de Sodio)***

#### **Solución A.**

- 1.-Pesar en un vaso de precipitado de 100ml aproximadamente exacto 17.9g de Fosfato Dibásico Heptahidratado.
- 2.-Adicionar agua destilada y disolver.
- 3.- Transferir la solución anterior a un matraz volumétrico de 500ml.
- 4.- Llevar a volumen de aforo con agua destilada.

#### **Solución B.**

- 1.- Pesar en un vaso de precipitado de 100ml aproximadamente exacto 6.8g de Fosfato Monobásico de Potasio.
- 2.- Adicionar agua destilada y disolver.
- 3.- Transferir la solución anterior a un matraz volumétrico de 500ml
- 4.- Llevar a volumen de aforo con agua destilada.

A un volumen de 200ml de la solución A, adicionar 100ml de la solución B. Y medir el pH de la solución y ajustar a pH 7, adicionando un volumen de la solución B.

---

---

## **ANEXO B. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK PARA LOS BARRIDOS.**

### **\* Solución Stock de Piridoxina (50µg/ml)**

- 1.- Pesar en un vaso de precipitado de 50ml aproximadamente exacto 12.5mg de estándar de Clorhidrato de Piridoxina.
- 2.- Agregar aproximadamente 5ml de agua destilada y disolver
- 3.- Transferir la solución anterior a un matraz volumétrico de 10ml.
- 4.- Llevar a volumen de aforo con medio de disolución.
- 5.- Tomar una alícuota de la solución anterior con una pipeta volumétrica de 1ml y transferirla a un matraz volumétrico de 25ml.
- 6.- Llevar a volumen de aforo con medio de disolución.

### **\* Solución Stock de Tiamina (50µg/ml)**

- 1.- Pesar en un vaso de precipitado de 50ml aproximadamente exacto 12.5mg de estándar de Clorhidrato de Tiamina.
- 2.- Agregar aproximadamente 5ml de agua destilada y disolver
- 3.- Transferir la solución anterior a un matraz volumétrico de 10ml.
- 4.- Llevar a volumen de aforo con medio de disolución.
- 5.- Tomar una alícuota de la solución anterior con una pipeta volumétrica de 1ml y transferirla a un matraz volumétrico de 25ml.
- 6.- Llevar a volumen de aforo con medio de disolución.

### **\* Solución Stock de Cianocobalamina (100µg/ml)**

- 1.- Pesar en un vaso de precipitado de 50ml aproximadamente exacto 25mg de estándar de Cianocobalamina.
- 2.- Agregar aproximadamente 5ml de agua destilada y disolver
- 3.- Transferir la solución anterior a un matraz volumétrico de 10ml.
- 4.- Llevar a volumen de aforo con medio de disolución.
- 5.- Tomar una alícuota de la solución anterior con una pipeta volumétrica de 1ml y transferirla a un matraz volumétrico de 25ml.
- 6.- Llevar a volumen de aforo con medio de disolución.

**Nota:** La preparación de las soluciones stock se realizará con los tres diferentes medios de disolución: agua, búfer de Fosfatos pH 3, Búfer de Fosfatos pH 7 y con agua destilada, para cada uno de los principios activos.

---

---

## **ANEXO C. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK PARA LA CALIBRACIÓN.**

### **\* Solución Stock de Piridoxina (20,000µg/ml)**

- 1.- Pesar en un vaso de precipitado de 50ml, en forma aproximadamente exacta, 500mg de estándar de Clorhidrato de Piridoxina.
- 2.- Agregar aproximadamente 10ml de agua destilada con una pipeta graduada y agitar con una varilla de vidrio hasta disolver.
- 3.- Transferir la solución anterior a un matraz volumétrico de 25ml.
- 4.- Llevar a volumen de aforo con agua destilada.

### **\* Solución Stock de Tiamina (20,000µg/ml)**

- 1.- Pesar en un vaso de precipitado de 50ml, en forma aproximadamente exacta, 500mg de estándar de clorhidrato de Tiamina.
- 2.- Agregar aproximadamente 10ml de agua destilada con una pipeta graduada y agitar con una varilla de vidrio hasta disolver.
- 3.- Transferir la solución anterior a un matraz volumétrico de 25ml.
- 4.- Llevar a volumen de aforo con agua destilada.

### **\* Solución Stock de Cianocobalamina (1000µg/ml)**

- 1.- Pesar en un vaso de precipitado de 50ml, en forma aproximadamente exacta, 50mg de estándar de Cianocobalamina.
- 2.- Agregar aproximadamente 10ml de agua destilada con una pipeta graduada y agitar con una varilla de vidrio hasta disolver.
- 3.- Transferir la solución anterior a un matraz volumétrico de 50ml.
- 4.- Llevar a volumen de aforo con agua destilada.

---

---

## ANEXO D. PREPARACIÓN DE PLACEBOS CARGADOS.

### Preparación de Placebos Cargados

PLACEBOS <i>Cianocobalamina / Piridoxina / Tiamina (µg/ml)</i>	CANTIDAD A PESAR		
	<i>Materia Prima Cianocobalamina (g)</i>	<i>Materia Prima Clorhidrato de Piridoxina (g)</i>	<i>Materia Prima Clorhidrato de Tiamina (g)</i>
<b>1</b> (6 / 80 / 80)	0.6	8.0	8.0
<b>2</b> (7 / 90 / 90)	0.7	9.0	9.0
<b>3</b> (5 / 100 / 100)	0.5	10.0	10.0
<b>4</b> (3 / 110 / 110)	0.3	11.0	11.0
<b>5</b> (4 / 120 / 120)	0.4	12.0	12.0

\* El procedimiento que se indica a continuación es la metodología de forma general que nos permite preparar cualquier placebo utilizando diferentes proporciones de las vitaminas de Cianocobalamina, Piridoxina y Tiamina como se muestra en la tabla No.

- 1.- Pesar en un vaso de precipitado de 50ml, aproximadamente exacto una cantidad determinada de Materia Prima de Clorhidrato de Piridoxina.
- 2.- Adicionar al vaso de precipitado aproximadamente 20ml de solución vehiculo, y agitar hasta disolver.
- 3.- Pesar en otro vaso de precipitado de 50ml, aproximadamente exacto, una cantidad determinada de Materia Prima de Clorhidrato Tiamina.
- 4.- Adicionar la cantidad pesada de Clorhidrato de Tiamina al vaso de precipitado que contiene el clorhidrato de Piridoxina del paso No.1
- 5.- Adicionar aproximadamente 20ml de la solución vehiculo y agitar hasta su disolución.
- 6.- Pesar en otro vaso de precipitado de 50ml, aproximadamente exacto, una cantidad determinada de Materia Prima de Cianocobalamina.
- 7.- Adicionar la cantidad pesada de Cianocobalamina al vaso de precipitado que contiene el Clorhidrato de Tiamina y Piridoxina del paso No. 4.
- 8.- Agitar la solución anterior y calentar a una temperatura menor a 40°C hasta lograr su disolución.
- 9.- Verter la solución anterior a un matraz volumétrico de 100ml.
- 10.- Llevar a volumen de aforo con la solución vehiculo.

---

## **ANEXO E. PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN VEHÍCULO.**

- 1.- Pesar en un vaso de precipitado de 50ml aproximadamente exacto 0.5g de EDTA sódico.
- 2.- Adicionar aproximadamente 20ml de agua destilada y agitar.
- 3.- Transferir la solución anterior a un matraz volumétrico de 1000ml (Solución Vehículo).
- 4.- Pesar en un vaso de precipitado de 50ml aproximadamente exacto 1.2g de Metabisulfito de Sodio.
- 5.- Adicionar aproximadamente 20ml de agua destilada y agitar.
- 6.- Transferir la solución al matraz volumétrico del paso No.3 del procedimiento.
- 7.- Pesar en un vaso de precipitado de 50ml aproximadamente exacto 3.0g de Hidróxido de Sodio G.R.
- 8.- Adicionar aproximadamente 20ml de agua destilada y agitar.
- 9.- Transferir la solución al matraz volumétrico del paso No.3 del procedimiento.
- 10.- Llevar a volumen de aforo al matraz volumétrico con agua destilada.

---

---

## ANEXO F. PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR LA ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA.

### A) Estabilidad para Cianocobalamina

- 1.- Preparar 12 ensayos a partir de la solución de placebo cargado que contenga el 100% de la concentración del contenido normal de la muestra.
- 2.- Para determinar la estabilidad de la Cianocobalamina se realizará a partir de la primera dilución del ensayo en donde se lleva a un volumen de aforo de 25ml.
- 3.- Fraccionar cada uno de los ensayos preparados en 3 muestras de 8ml, para obtener un total de 36 muestras.
- 4.- Dividir las muestras en dos bloques de 18 muestras cada uno, conservando un bloque a temperatura ambiente sin protección de la luz y el otro bloque a temperatura ambiente protegido de la luz, como se indica en la siguiente tabla:

#### *Fracciones para determinar la estabilidad de la cianocobalamina en la muestra*

Tiempo	BLOQUE I T° Ambiente + Luz						BLOQUE II T° Ambiente sin Luz					
	Ensayos						Ensayos					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
<b>0hrs</b>	m <sub>1,1</sub>	m <sub>2,1</sub>	m <sub>3,1</sub>	m <sub>4,1</sub>	m <sub>5,1</sub>	m <sub>6,1</sub>	m <sub>7,1</sub>	m <sub>8,1</sub>	m <sub>9,1</sub>	m <sub>10,1</sub>	m <sub>11,1</sub>	m <sub>12,1</sub>
<b>24hrs</b>	m <sub>1,2</sub>	m <sub>2,2</sub>	m <sub>3,2</sub>	m <sub>4,2</sub>	m <sub>5,2</sub>	m <sub>6,2</sub>	m <sub>7,2</sub>	m <sub>8,2</sub>	m <sub>9,2</sub>	m <sub>10,2</sub>	m <sub>11,2</sub>	m <sub>12,2</sub>
<b>48hrs</b>	m <sub>1,3</sub>	m <sub>2,3</sub>	m <sub>3,3</sub>	m <sub>4,3</sub>	m <sub>5,3</sub>	m <sub>6,3</sub>	m <sub>7,3</sub>	m <sub>8,3</sub>	m <sub>9,3</sub>	m <sub>10,3</sub>	m <sub>11,3</sub>	m <sub>12,3</sub>

- 5.- El efecto de la luz a temperatura ambiente en la muestra, se evaluará analizando una muestra de cada ensayo a las 0hrs, 24hrs y 48hrs después de su preparación.
- 6.- Para evaluar la estabilidad de la muestra a temperatura ambiente protegida de la luz, se realizará analizando una muestra de cada ensayo a las 0hrs, 24hrs y 48hrs después de su preparación.

---

---

## B) Estabilidad para Piridoxina y Tiamina

- 1.- Preparar 12 ensayos a partir de la solución de placebo cargado que contenga el 100% de la concentración del contenido normal de la muestra.
- 2.- Para determinar la estabilidad de Piridoxina y Tiamina se realizó a partir de la segunda dilución del ensayo en donde se lleva a un volumen de aforo de 100ml.
- 3.- Fraccionar cada uno de los ensayos preparados en 3 muestras de 8ml, para obtener un total de 36 muestras.
- 4.- Dividir las muestras en dos bloques de 18 muestras cada uno, conservando un bloque a temperatura ambiente sin protección de la luz y el otro bloque a temperatura ambiente protegido de la luz, como se indica en la siguiente tabla:

### *Fracciones para determinar la estabilidad de la cianocobalamina en la muestra*

Tiempo	BLOQUE I T° Ambiente + Luz						BLOQUE II T° Ambiente sin Luz					
	Ensayos						Ensayos					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
0hrs	m <sub>1,1</sub>	m <sub>2,1</sub>	m <sub>3,1</sub>	m <sub>4,1</sub>	m <sub>5,1</sub>	m <sub>6,1</sub>	m <sub>7,1</sub>	m <sub>8,1</sub>	m <sub>9,1</sub>	m <sub>10,1</sub>	m <sub>11,1</sub>	m <sub>12,1</sub>
24hrs	m <sub>1,2</sub>	m <sub>2,2</sub>	m <sub>3,2</sub>	m <sub>4,2</sub>	m <sub>5,2</sub>	m <sub>6,2</sub>	m <sub>7,2</sub>	m <sub>8,2</sub>	m <sub>9,2</sub>	m <sub>10,2</sub>	m <sub>11,2</sub>	m <sub>12,2</sub>
48hrs	m <sub>1,3</sub>	m <sub>2,3</sub>	m <sub>3,3</sub>	m <sub>4,3</sub>	m <sub>5,3</sub>	m <sub>6,3</sub>	m <sub>7,3</sub>	m <sub>8,3</sub>	m <sub>9,3</sub>	m <sub>10,3</sub>	m <sub>11,3</sub>	m <sub>12,3</sub>

- 5.- El efecto de la luz a temperatura ambiente en la muestra, se evaluó analizando una muestra de cada ensayo a las 0hrs, 24hrs y 48hrs después de su preparación.
- 6.- Para evaluar la estabilidad de la muestra a temperatura ambiente protegida de la luz, se realizará analizando una muestra de cada ensayo a las 0hrs, 24hrs y 48hrs después de su preparación.



**ANEXO G. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN.**

**Criterios de Aceptación**

<b>PARÁMETRO A EVALUAR</b>	<b>FACTOR DE EVALUACIÓN</b>	<b>CRITERIOS DE ACEPTACIÓN</b>
<b>Linealidad del Sistema</b>	Coeficiente de Variación (C.V.) Coeficiente de Correlación(r) Coeficiente de Determinación(r <sup>2</sup> ) Intercepto (b)	≤ 2% = 0.99 = 0.99 = 0
<b>Precisión del Sistema</b>	Coeficiente de Variación (C.V.)	≤ 2%
<b>Linealidad del Método</b>	Coeficiente de Variación (C.V.) Coeficiente de Correlación(r) Coeficiente de Determinación(r <sup>2</sup> ) Intercepto (b)	≤ 2% = 0.99 = 0.99 = 0
<b>Exactitud del Método</b>	% de Recobro Prueba t de Student	98 al 102% $T_{cal} < t_{crit} (\alpha=0.05, 5 \text{ g.l.})$
<b>Precisión del Método:</b> <b>a) Repetibilidad</b> <b>b) Reproducibilidad</b>	Coeficiente de Variación (C.V.) Modelo Factorial Anidado	≤ 2% Analista= $F_{cal} < F_{crit} (\alpha=0.05)$ Día= $F_{cal} < F_{crit} (\alpha=0.05)$
<b>Estabilidad de la muestra analítica</b>	Coeficiente de Variación (C.V.)	≤ 2%
<b>Tolerancia</b>	Coeficiente de Variación (C.V.)	≤ 2%
<b>Especificidad</b>	Coeficiente de Variación (C.V.)	≤ 2%

---

# **BIBLIOGRAFÍA**

---

---

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- ALCALA Delfín Alma, Biomoléculas, UNAM. Campus Iztacala, México, 1998.
- 2.- GENNARO R. Alfonso, Rémington Farmacia, Tomo 2, 20ª ed, Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires 2003.
- 3.- WILLIAM O. FOYE, Principios de Química Farmacéutica, Reverte, España, 1984.
- 4.- ZUBIRÁN Salvador, Ingestión diaria recomendada (IDR) de proteínas, vitaminas y nutrimentos inorgánicos para la población mexicana, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, México 2001.
- 5.- IVERLIS Díaz Polanco y Ofelia Fariñas Suárez, Validación del método analítico para la determinación de 3 vitaminas hidrosolubles en un suplemento vitamínico, 2001
- 6.- Directrices para Complementos Alimentarios de Vitaminas y/o Minerales, CAC/GL 55, México, 2005.
- 7.- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Volumen II, 8º Ed, México, 2004.
8. - EINTMILLER R. Ronald, Vitamin Analysis for the Health y Food Sciences, CRC Press, Washington D.C., 1999.
9. - CLARKE`s , Issolation and Identification of Drugs, 2º Ed, The Pharmaceutical PRESS, Inglaterra, 1986.
10. - USP 26, The Official Compendia of Standars, 2003.
- 11.- RAMIS Ramos Guillermo, Quimiometría, Síntesis, Madrid, 2001.
- 12.- MONGAY Fernández Carlos, Quimiometría, Valencia Universidad, Madrid, 2005.
- 13.-PORCEL García Marta, Tesis de Doctorado: Aplicación de Técnicas Quimiométricas para el desarrollo de nuevos métodos Cinético-Espectrométricos de Análisis, Barcelona, 2001.

---

14.-GUERRERO Barrera Araceli, Tesis a Licenciatura: Desarrollo y Validación de un Método Analítico para Perfiles de disolución de Lisinopril e Hidroclotiazida en tabletas, UNAM, Estado de México, 2004.

15.-VEGA Vilca José Carlos, Tesis de Doctorado: Generalizaciones de Mínimos Cuadrados Parciales con Aplicación en Clasificación Supervisada, Universidad de Puerto Rico, 2004.

16.-ARAUJO-ANDRADE, Modelo de Predicción basado en el análisis multivariante para la determinación de concentración de azúcar en solución, Revista Mexicana de Física, México, Diciembre 2005.

17.-BARRERA Galicia Mauricio, Tesis a Licenciatura: Aplicación de métodos de calibración multivariante en la cuantificación simultánea por espectrofotometría U.V. de Acetaminofen y Naproxeno presentes en un medio de disolución, UNAM, Estado de México, 2004.

18.- HAALAND M. D, Thomas EV, Partial Least Squares Methods for Spectral Analysis 2. Application to Simulated and Glass Spectral Data, Analytical Chemistry, Vol 60, 1998.

19.-HAALAND M. D, Thomas EV, Partial Least Squares Methods for Spectral Analysis 1, Relation to other quantitative calibration methods and the extraction for quantitative information, Analytical Chemistry, Vo. 60, 1998.

20.-ROMERO Gamero Miguel Ángel, Tesis de Doctorado: Desarrollo de Nuevas Metodologías Analíticas en el Control de Calidad de la Industria Farmacéutica, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, 2001.

21.- ROJA Garduño Jehová Héctor, Tesis a Licenciatura: Validación prospectiva del proceso de fabricación de bolos de liberación prolongada de Sulfametazina Sódica UNAM, Estado de México, 2002.

22.-NOM -059-SSA1-1993, Buenas Practicas de Fabricación para establecimientos de Industria Químico Farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos, México, 1993.

---

23.- MORALES de la Cruz Cesar, Tesis de Licenciatura: Desarrollo y Validación Prospectiva de una Técnica Analítica por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para Enalpril 10mg tabletas recubiertas, UNAM, Estado de México, 2001.

24.-Guía de Validación de Métodos Analíticos, Organismo Argentino de Validación, Argentina, 2003.

25.- OGEA, Política de Selección y Validación de Métodos de Ensayo, Guatemala, 2004.

26.- Guía de Validación de Métodos Analíticos, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, 2001.

**Artículos:**

TENORIO López Alejandro, Validación de un Método Analítico Espectrofotométrico para la cuantificación de Amofilina en Solución Inyectable, Volumen 36, Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, México, 2005.

C. ARAUJO – ANDRADE, Modelo de Predicción basado en el análisis multivariante para la determinación de concentración de azúcar en solución, Revista Mexicana de Física, San Luís Potosí, México, 2005.

FERNANDEZ-CARDENAS, Determinación de vitaminas del Complejo B en *Arthrospira maxima* por Cromatografía líquida de alta resolución, Instituto de Farmacia y Alimentos, La Habana Cuba, 2001.

BARTUS C. Rosangela- MAZO H. Luis, Simultaneous determination of vitamins C, B6 and PP in pharmaceuticals using differential pulse voltammetry with a glassy carbon electrode an multivariate calibration tools, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, ELSEVIER, Brazil, 2004.