



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR CIANOCOBALAMINA
POR UHPLC EN UNA SOLUCIÓN MULTIVITAMÍNICA DE
ADMINISTRACIÓN ORAL**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA
QFB. JOSÉ MOJICA REYES

TUTOR
M. EN C. JUAN MANUEL RODRÍGUEZ.
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F. MAYO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda	_____
Vocal	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez	_____
Vocal	Dra. Flora Adriana Ganem Rondero	_____
Vocal	Dra. Adriana Miriam Domínguez Ramírez	_____
Secretario	Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero	_____

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorio 10, Departamento de Farmacia, Conjunto F, Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA

M. en C Juan Manuel Rodríguez

SUSTENTANTE

QFB. José Mojica Reyes

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y la Facultad de Química, por permitirme seguir creciendo como profesionista y ser humano.

A mi tutor, el M. en C. Juan Manuel Rodríguez por su amistad, paciencia, experiencia y conocimientos compartidos.

A mis sinodales, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo cuyos comentarios permitieron mejorarlo y robustecerlo.

Agradezco al CONACYT por fomentar el desarrollo de las ciencias en México y su indispensable apoyo económico. Becario/CVU. 235532/323304

ÍNDICE GENERAL

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	3
3.	GENERALIDADES	4
3.1.	Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Eficiencia U-HPLC en el análisis de Cianocobalamina.....	4
3.2.	Extracción en Fase Sólida (EFS).....	4
3.3.	Cianocobalamina (Vitamina B12).....	8
3.3.1.	Propiedades fisicoquímicas	8
3.3.2.	Propiedades farmacológicas.....	10
3.4.	Validación de métodos analíticos.....	10
3.5.	Antecedentes en el análisis cromatográfico de cianocobalamina (Vitamina B12).	11
4.	PARTE EXPERIMENTAL	12
4.1.	Materiales, equipos e instrumentos.....	12
4.1.1.	Materiales	12
4.1.2.	Equipos e instrumentos	13
4.2.	Reactivos y sustancias de referencia.	14
4.2.1.	Reactivos.....	14
4.2.2.	Sustancias de referencia.	14
4.2.3.	Placebo y producto terminado.....	14
4.3.	Desarrollo del método analítico.	15
4.3.1.	Condiciones cromatográficas	15
4.3.2.	Método de Extracción.....	17
4.4.	Validación de la metodología analítica.	19
4.4.1.	Verificación de la adecuabilidad del sistema y preparación de soluciones estándar.	19
4.4.2.	Linealidad del sistema y rango.....	20
4.4.3.	Precisión del sistema	22
4.4.4.	Especificidad	23
4.4.5.	Estabilidad de la solución estándar y muestra	25
4.4.6.	Exactitud del método (recobro placebo adicionado).....	26
4.4.7.	Precisión del método (repetibilidad).....	27
4.4.8.	Precisión del método, precisión intermedia.	28
4.4.9.	Robustez	29
5.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	31
5.1.	Desarrollo del método analítico.	31
5.1.1.	Condiciones del detector	31
5.1.2.	Adecuabilidad del sistema	31

5.1.3. Condiciones cromatográficas	32
5.1.4. Método de extracción	33
5.2. Resultados de la validación del método analítico.	35
5.2.1. Linealidad del sistema y rango	35
5.2.2. Precisión del sistema	37
5.2.3. Especificidad.	38
5.2.4. Estabilidad de la solución estándar y muestra.	39
5.2.5. Exactitud del método.....	41
5.2.6. Precisión del método (repetibilidad).....	42
5.2.7. Precisión del método (precisión intermedia).....	42
5.2.8. Robustez.	45
5.2.8.1. Tiempo de aplicación del gradiente	45
5.2.8.2. Curva utilizada para realizar el gradiente	46
5.2.8.3. Temperatura de la columna	47
5.2.8.4. Cambio de columna (cambio de número de serie).....	48
5.2.8.5. Filtros	49
5.2.8.6. Cartuchos de extracción	50
5.2.9. Resumen de los resultados de la validación del método analítico para cuantificar Cianocobalamina en una solución multivitamínica.....	52
6. CONCLUSIONES	54
7. GLOSARIO	55
8. BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Componentes de un cartucho de extracción en fase sólida.....	5
Figura 2. Etapa I Activación del cartucho de extracción en fase sólida.....	5
Figura 3. Etapa II Carga de la muestra en el cartucho de extracción en fase sólida. ...	6
Figura 4. Etapa III Lavado del cartucho de extracción en fase sólida.	6
Figura 5. Etapa IV Elución del analito de interés del cartucho de extracción en fase sólida.	7
Figura 6. Variables a considerar en el desarrollo de una metodología EFS.	7
Figura 7. Estructura química de la vitamina B12.	9
Figura 8. Preparación de muestras para el desarrollo del método de extracción en fase sólida.	18
Figura 9. Resultados de la linealidad del sistema y rango.	37
Figura 10 Comparación de los cromatogramas de placebo, estándar y producto terminado de muestras estresadas y sin estresar.....	39
Figura 11. Exactitud del método (placebo adicionado) de la prueba de valoración	41
Figura 12 Cromatogramas obtenidos de los diferentes tiempos de aplicación del gradiente estudiados.	46
Figura 13. Cromatogramas obtenidos de la aplicación de las diferentes curvas de gradiente aplicadas.	47
Figura 14. Cromatogramas obtenidos al realizar el cambio de temperatura en las condiciones cromatográficas de análisis.	48
Figura 15. Cromatogramas obtenidos al realizar el cambio de número de serie de la columna cromatográfica.	49
Figura 16. Cromatogramas obtenidos al realizar el cambio en el tamaño de poro de la membrana del filtro.....	50
Figura 17. Cromatogramas obtenidos al realizar el cambio del cartucho de extracción en fase sólida (1).	51
Figura 18. Cromatogramas obtenidos al realizar el cambio del cartucho de extracción en fase sólida (2).	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la Cianocobalamina (Vitamina B12).....	9
Tabla 2. Características de los diferentes cartuchos evaluados para la realización de la extracción en fase sólida.....	17
Tabla 3. Parámetros de desempeño evaluados en la validación	19
Tabla 4. Preparación de soluciones estándar para evaluar la linealidad del sistema	21
Tabla 5. Preparación de soluciones estándar para evaluar la precisión del sistema	22
Tabla 6. Preparación de soluciones estándar para evaluar la exactitud del método (Recobro, placebo adicionado).	25
Tabla 7. Resumen de los cambios a las condiciones cromatográficas y a la extracción de la muestra evaluados.	30
Tabla 8. Equipo cromatográfico.	31
Tabla 9. Condiciones del detector.	31
Tabla 10. Resultados de la linealidad del sistema y rango.....	36
Tabla 11. Resultados de la precisión del sistema evaluada por dos analistas.....	37
Tabla 12. Resultados del ángulo de pureza y el ángulo de ruido en muestras estresadas y sin estresar.....	38
Tabla 13. Resultados de la exactitud del método.	40
Tabla 14. Resultados de la precisión del método.	41
Tabla 15. Resultados de la precisión de la precisión intermedia.	42
Tabla 16. Resultados de la estabilidad de la solución stock mantenida a temperatura ambiente.....	43
Tabla 17. Resultados de la estabilidad de la solución stock mantenida en refrigeración..	43
Tabla 18. Resultados de la estabilidad de la solución estándar combinada mantenida a temperatura ambiente.	43
Tabla 19. Resultados de la estabilidad de la solución estándar combinada mantenida en refrigeración	44
Tabla 20. Resultados de la estabilidad de la muestra mantenida en temperatura ambiente.	44
Tabla 21. Resultados de la estabilidad de la muestra mantenida en refrigeración.	44
Tabla 22. Resultados de cambio de tamaño de poro.	45
Tabla 23. Resultados de cambio en el intervalo de tiempo aplicación de gradiente	46

Tabla 24. Resultados de cambio de la curva gradiente empleada	47
Tabla 25. Resultados de cambio de temperatura del horno de la columna en el análisis cromatográfico.....	48
Tabla 26. Resultados de cambio de número de serie de la columna cromatográfica	49
Tabla 27. Resultados de cambio del cartucho de extracción	50
Tabla 28. Resultados de cambio del cartucho de extracción	51
Tabla 29. Resumen de resultados de la validación del método analítico	52

1. RESUMEN.

El desarrollo farmacéutico es un proceso multidisciplinario y complejo, que involucra la aplicación de un alto grado de conocimientos técnico-científicos encaminados a la obtención de un producto de calidad, eficaz y seguro para el consumo humano.

La creación de un nuevo producto atraviesa por diferentes etapas, que van desde la formulación o fase creativa (en donde se definen los espacios de diseño y compatibilidades entre los componentes de la fórmula) hasta la etapa de registro, en donde sólo una formulación ha demostrado los atributos fisicoquímicos (estabilidad) y biológicos (estudios clínicos) óptimos necesarios para ser comercializado.

Las etapas del desarrollo de la fórmula son soportadas por múltiples métodos de análisis, los cuales son susceptibles a modificaciones; a esta fase de cambios que ocurren en paralelo al desarrollo de la fórmula se le denomina “desarrollo analítico del producto”.

Por tanto, el desarrollo farmacéutico culmina con el establecimiento de una nueva forma farmacéutica así como de los métodos analíticos necesarios que atestigüen su integridad y atributos técnicos, durante el proceso de manufactura hasta la obtención del producto terminado.

El presente trabajo describe el desarrollo y la validación de un método analítico capaz de cuantificar cianocobalamina (vitamina B12) en una solución multivitamínica de administración oral orientada a la población infantil, en una concentración de 0.4 µg/mL.

Para la obtención de la muestra analítica se estableció un proceso de extracción en fase sólida (EFS) en cartuchos II RP C18 Dionex® 2.5 cm³, 500 mg. La cuantificación se realizó en un Cromatógrafo de Líquidos de Ultra Alta Eficiencia (UHPLC) marca Waters utilizando una columna Polar Advantage II 2.1 x 100 mm (2.2 µm), con una fase móvil ternaria bajo un gradiente de elución (20 minutos) con una velocidad de flujo de 0.2 mL/min. La detección fue realizada con un detector de arreglo de diodos en el intervalo visible estableciendo la longitud de onda de 550 nm para la cuantificación.

El método desarrollado fue finalmente validado de acuerdo a guías internacionales como la ICH Q2 (R1) y procedimientos internos del laboratorio. El método resultó ser específico para cianocobalamina; lineal, preciso y exacto en el intervalo de 0.17 µg/mL a 0.67 µg/mL, robusto frente a cambios en el intervalo de tiempo de gradiente y concavidad, temperatura del horno de columna así como a cambios de lote de columna, filtro de muestra y cartuchos de extracción de la muestra.

La solución stock y estándar de cianocobalamina resultaron ser estables a temperatura ambiente y en refrigeración ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$) durante 7 días, mientras que la muestra analítica demostró ser estable durante 3 días a temperatura ambiente y 7 días en refrigeración ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$).

2. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

El diseño de los equipos U-HPLC está orientado a la obtención de un máximo de respuesta con un mínimo de muestra analítica (volumen de inyección) ya que el detector realiza un mayor número de lecturas por unidad de tiempo con cada vez mejores resoluciones, en el presente trabajo se aprovecharán las bondades de sensibilidad y tiempos de análisis de los nuevos equipos para la obtención de un método analítico rápido y sensible en la región UV-Vis (200-800 nm).

La concentración de cianocobalamina en la solución multivitamínica objeto de estudio en su presentación infantil es de 0.4 µg/mL, cuatro veces menor a la concentración del mismo compuesto en cápsulas de gelatina blanda disponibles en el mercado, razón por la cual, en paralelo con el desarrollo del sistema cromatográfico U-HPLC se encontrarán las condiciones de un método analítico capaz de separar y/o concentrar a la cianocobalamina (vitamina B12) directamente de la matriz de muestra.

Objetivo general:

Desarrollar y validar un método analítico rápido, sensible y específico por cromatografía de líquidos de ultra alta eficiencia para cuantificar cianocobalamina en una solución multivitamínica infantil de administración oral.

Objetivos particulares:

1. Implementar el uso de sistemas cromatográficos de ultra alta eficiencia (U-HPLC) para minimizar los tiempos de análisis y el consumo de solventes.
2. Emplear un método analítico de extracción en fase sólida (EFS) para concentrar el analito y/o eliminar las interferencias provenientes de la matriz de muestra.

3. GENERALIDADES.

3.1. Cromatografía de líquidos de ultra alta eficiencia (U-HPLC) en el análisis de cianocobalamina.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) ha sido por mucho tiempo la herramienta analítica más utilizada por la industria química para la separación, la identificación y la cuantificación de compuestos. Los equipos de HPLC se han consolidado en la industria farmacéutica en múltiples aplicaciones, haciéndolos imprescindibles en el quehacer científico¹. Sin embargo, las nuevas tendencias en la optimización de procesos y productividad empresarial han comenzado a detectar en esta técnica limitaciones operativas asociadas con el tiempo de espera, consumo de recursos materiales y humanos².

Ante esta situación ha surgido en el mercado una nueva generación de cromatógrafos, bajo el principio de la máxima eficiencia: la denominada cromatografía de líquidos de ultra alta eficiencia (U-HPLC). La generación de las metodologías analíticas por U-HPLC representarán un avance significativo hacia la maximización de recursos³.

3.2. Extracción en fase sólida (EFS)⁴.

La extracción en fase sólida es un proceso de separación por medio del cual los compuestos que están suspendidos o disueltos en una mezcla líquida son separados de otros compuestos y de su matriz de acuerdo a sus propiedades físicas y químicas. Los laboratorios han utilizado esta técnica para la separación de compuestos inmersos en matrices complejas y concentraciones en el orden de trazas ya que ofrece las siguientes ventajas significativas:

- 1) **Limpieza de la muestra** debido a la remoción de sustancias de interferencia. Esta propiedad permite la disminución de ruido, en adición a un incremento en la selectividad durante el análisis por HPLC o U-HPLC y sistemas de detección convencionales (UV-VIS).

2) Concentración de los analitos ya sea por adición sucesiva de muestra o bien por la evaporación a sequedad del disolvente de elución.

Para desarrollar un método analítico por EFS es importante considerar que los fundamentos de separación y retención de los compuestos de interés son los mismos que en cromatografía de líquidos, es decir, que la separación se lleva a cabo debido a la existencia de equilibrios de reparto del analito en una fase sólida o estacionaria (contenida en el cartucho de extracción, figura 1) y una fase móvil, generalmente constituida por mezclas de disolventes orgánico-acuosas.

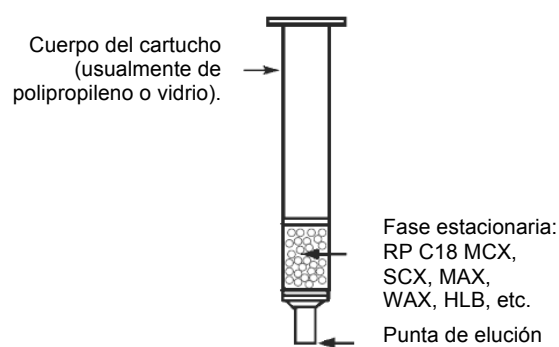


Figura 1. Componentes de un cartucho de extracción en fase sólida (reproducida y traducida de ref. 4).

La EFS comprende cuatro grandes etapas:

I. Activación del cartucho.

La fase estacionaria contenida en el cartucho (C18, WCX, SCX, SAX, WAX, Mix Mode, etc.) se acondiciona por la adición de un disolvente orgánico, generalmente metanol o acetonitrilo (aproximadamente 2 volúmenes del cartucho), seguido de la adición de agua o soluciones amortiguadoras ajustadas a un pH ácido o alcalino (aproximadamente 2 volúmenes del cartucho); la selección del pH y/o sales amortiguadoras dependerán de las propiedades de los analitos.

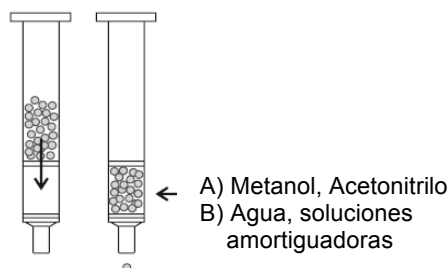


Figura 2. Etapa I Activación del cartucho de extracción en fase sólida (reproducida y traducida de ref. 4).

II. Carga de la muestra.

En esta etapa, la muestra se hace fluir a través del cartucho, si el analito presenta afinidad por la fase estacionaria se retendrá y el líquido remanente quedará libre del analito.

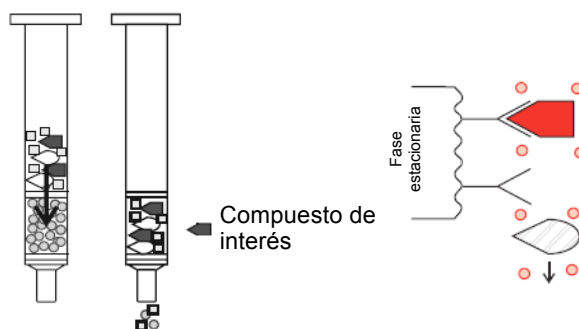


Figura 3. Etapa II Carga de la muestra en el cartucho de extracción en fase sólida (reproducida y traducida de ref. 4).

III. Lavado.

Dependiendo de la naturaleza del analito y de la fase estacionaria, pueden ser uno o varios los compuestos retenidos en el cartucho, en esta etapa es posible remover selectivamente sustancias que no son de interés, adicionando agua, disolventes orgánicos, soluciones amortiguadoras o mezclas de ellos, en donde las sustancias de interferencia presenten mucho mayor afinidad por el disolvente de lavado (para realizar el lavado se recomienda utilizar entre 1 y 2 volúmenes del cartucho).

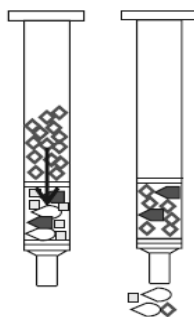


Figura 4. Etapa III Lavado del cartucho de extracción en fase sólida (reproducida de ref. 4).

IV. Elución.

Finalmente, la remoción de las sustancias de interés se logra pasando a través del cartucho una cantidad de disolvente orgánico, generalmente acetonitrilo o metanol. Al

igual que en cromatografía de líquidos en fase reversa los componentes orgánicos presentan una mayor afinidad a la fase móvil en proporciones mayores de componente orgánico.

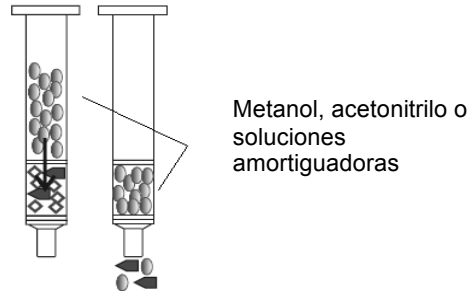


Figura 5. Etapa IV Elución del analito de interés del cartucho de extracción en fase sólida (reproducida y traducida de ref. 4).

En la figura 6 se esquematiza el flujo de las variables a considerar en el desarrollo de un método de extracción en fase sólida.

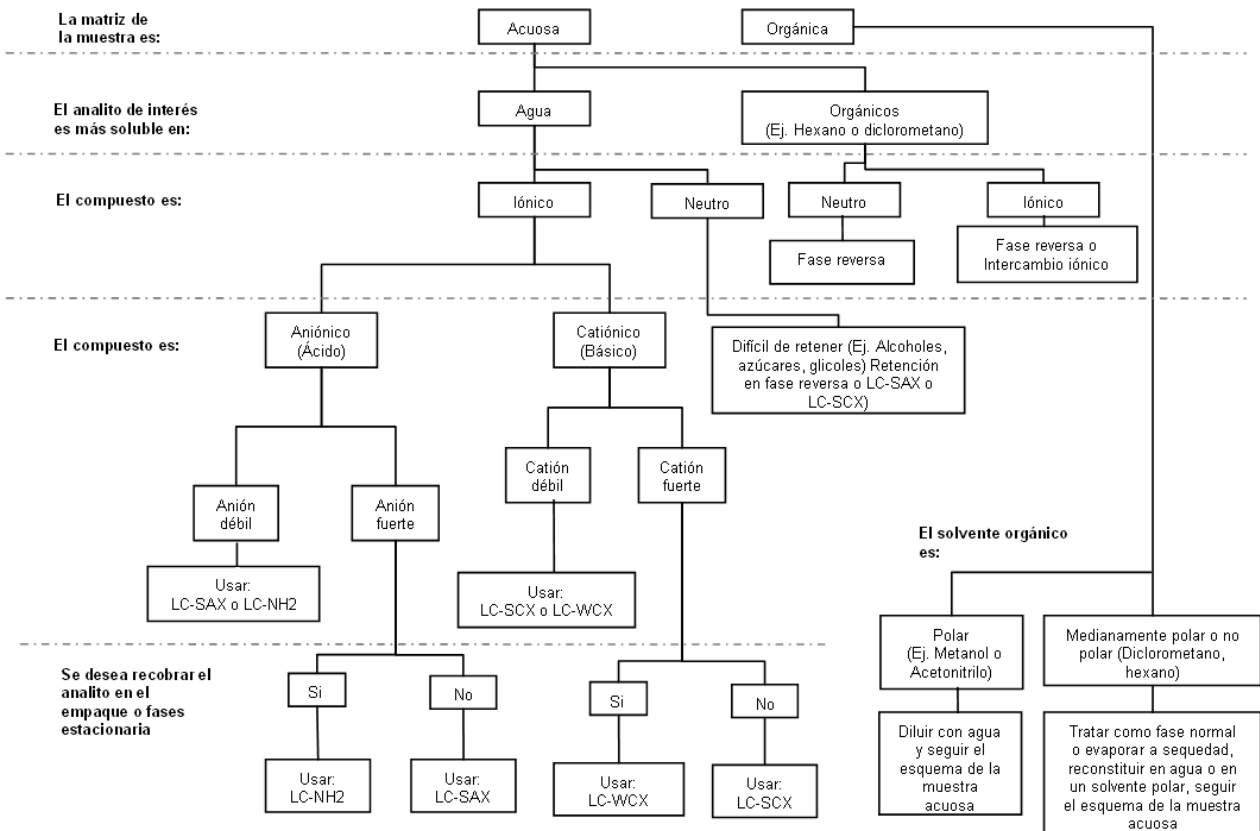


Figura 6. Variables a considerar en el desarrollo de un método de EFS (reproducida y traducida de ref. 4).

A continuación se describen las características de los cartuchos de extracción en fase sólida marca Waters⁵ que presentan mecanismos de retención selectivos:

- a) Oasis HLB: adsorbente de fase reversa con balance hidrofílico - lipofílico para todos los compuestos (por ejemplo, el profármaco y sus metabolitos polares). Adsorbente humedecible en agua, sin efectos de secado del adsorbente.
- b) Oasis MCX: adsorbente en modo mixto de fase reversa e intercambio catiónico. Alta selectividad para compuestos básicos.
- c) Oasis MAX: adsorbente en modo mixto de fase reversa e intercambio aniónico. Alta selectividad para compuestos ácidos.
- d) Oasis WCX: adsorbente en modo mixto de fase reversa e intercambio catiónico débil. Retiene y libera bases fuertes (por ejemplo, aminas cuaternarias).
- e) Oasis WAX: adsorbente en modo mixto de fase reversa e intercambio aniónico débil. Retiene y libera ácidos fuertes (por ejemplo, sulfonatos).

3.3. Cianocobalamina (vitamina B12).

3.3.1. Propiedades fisicoquímicas⁶⁻¹⁰.

La cianocobalamina es una molécula hexacoordinada de cobalto que contiene un anillo de corrina sustituido por numerosos radicales metilo, acetamido y propionamido (Figura 7). Puentes metileno unen los anillos de pirrol A con B, B con C y C con D, excepto A con D los cuales están unidos directamente. El átomo de cobalto puede asumir un estado de oxidación de (I), (II) y (III), el cual está unido por cuatro enlaces ecuatoriales coordinados con los cuatro átomos de nitrógeno de los grupos pirrol, y por un enlace coordinando axial al 5,6-dimetil-benzimidazol, el cual se expande en un enlace α -glicosídico con la ribosa-3-fosfato, el grupo fosfato está unido al anillo D de la estructura de la corrina a través de una sustitución en la cadena propionamida. El enlace coordinado axial restante en la posición -X une el anillo de cobalto con el radical ciano (-CN).

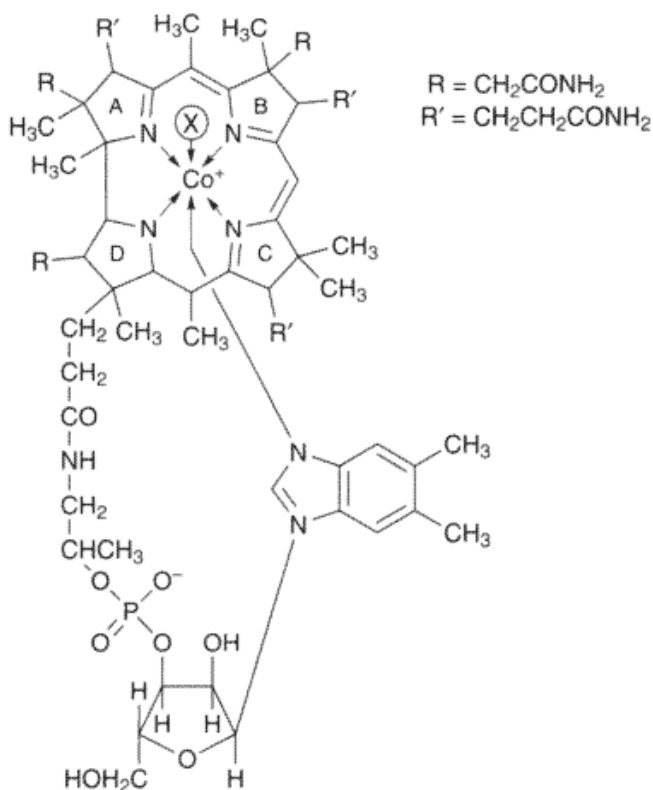


Figura 7. Estructura química de la cianocobalamina (vitamina B12).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la cianocobalamina (vitamina B12).

Nombre químico	Cianuro de α -5,6-dimetilbencimidazolilcobamida.
Descripción	Polvo cristalino de color rojo a púrpura, inodoro y altamente higroscópico (capaz de capturar hasta un 12 % de agua; es posible obtener la molécula anhidra secándola a presión reducida a 105 °C).
Sinónimos	Vitamina B12, cianocobalamina.
Fórmula molecular	$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$
Peso molecular	1355.4 g/mol
Punto de fusión	210 – 220 °C
Solubilidad ⁷	Soluble en agua (12.5 mg/mL), alcoholes, fenoles y solventes hidroxilados como etilendiol. Poco soluble en etanol, insoluble en cloroformo, acetona y éter.
Máximos UV-VIS en agua ⁸	278, 361 y 550 nm
pKa ⁹	1.59a, 6.00b y 8.93b
Log P ⁹	-0.9
Sus soluciones acuosas son neutras, con un máximo de estabilidad en un rango de pH comprendido entre 4.5 y 5.0, en este intervalo soportan condiciones de autoclave (20 minutos a 120 °C) ¹⁰ .	

3.3.2. Propiedades farmacológicas.

La cianocobalamina (vitamina B12) es un nutriente esencial que puede encontrarse en carne, productos lácteos o alimentos fermentados (derivados de bacterias). Una deficiencia de cianocobalamina afecta el crecimiento y los mecanismos de reparación de todas las células del cuerpo, particularmente, de las células hematopoyéticas y del sistema nervioso central debido a su implicación en la regeneración de mielina. En adultos la ingesta diaria recomendada es de 2.4 µg/día mientras que en infantes es de 0.4 µg/día.

La cianocobalamina absorbida es transportada por la sangre hacia el hígado y otros órganos. El hígado tiene cantidades que varían de 50 a 90 % de las reservas corporales del adulto normal; estas reservas varían entre 1 y 10 mg. El índice de recambio corporal total de la cianocobalamina es de 0.05 a 0.2 % al día, sin importar la cantidad de reserva. La cianocobalamina se excreta principalmente por la bilis y, en menor cantidad, por la orina. La cianocobalamina desarrolla una acción hematopoyética idéntica al factor antianémico del hígado. Los estudios realizados indican que es clínicamente eficaz en el control de la anemia perniciosa con o sin complicaciones neurológicas y también en el tratamiento de la anemia macrocítica nutricional resultante de una deficiencia de cianocobalamina (vitamina B₁₂). Únicamente es efectiva en ciertos casos de anemia megaloblástica de la infancia. Por otra parte la cianocobalamina (vitamina B₁₂) actúa estimulando el crecimiento y es también un factor antianémico de primer orden.

3.4. Validación del método analítico¹¹⁻¹⁷.

La validación del método analítico se llevó a cabo con base en las recomendaciones de la Conferencia Internacional de Harmonización ICH Q2 (R1), guías europeas, guías de asociaciones científicas nacionales e internacionales, publicaciones científicas y los procedimientos internos del sitio en donde se llevó a cabo esta validación.

3.5. Antecedentes en el análisis cromatográfico de cianocobalamina (vitamina B12)¹⁸⁻²⁶.

En la literatura existe una gran cantidad de métodos analíticos reportados para la cuantificación de cianocobalamina por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), todos ellos con un espacio de diseño completamente diferente al requerido para la cuantificación en la solución multivitamínica objeto de estudio, debido a la enorme complejidad de la matriz de muestra (11 vitaminas, de las cuales son 7 hidrosolubles y 4 liposolubles, además de minerales, emulsificante, saborizantes y conservadores) y los niveles de cuantificación (0.16 a 0.64 µg/mL). Se espera que el uso de tecnologías de nueva generación con sistemas de detección UV más avanzados como lo es el sistema cromatográfico de ultra alta eficiencia (U-HPLC) en conjunto con un pretratamiento a través de la extracción en fase sólida (EFS) permitirán el establecimiento de un método analítico fácil, confiable y eficaz.

4. PARTE EXPERIMENTAL.

La parte experimental se llevó a cabo en dos etapas:

1. Desarrollo del método analítico.
2. Validación del método analítico.

4.1. Materiales, equipos e instrumentos.

4.1.1. Materiales.

- ❖ Frascos de vidrio con tapa rosca de: 500, 1000 y 2000 mL
- ❖ Matraces volumétricos clase A: 1, 5, 100, 250 y 1000 mL
- ❖ Pipetas volumétricas clase A: 1, 4, 5, 10 y 20 mL
- ❖ Probetas: 50, 500 y 1000 mL
- ❖ Sistema de filtración de fases móviles
- ❖ Tubos de ensayo de 16 × 150 mm
- ❖ Viales para automuestreador de 2 mL
- ❖ Vasos de precipitados de vidrio y polipropileno: 25, 100, 250 y 1000 mL
- ❖ Cartuchos para extracción en fase sólida:
 - Backerbond Fenilo, 500 mg
 - Strata X 33 μm polymeric reversed phase 2g/20mL, Phenomenex 8B-S100-KEG-S
 - Strata XL 100 μm polymeric reversed phase 2g/12mL, Phenomenex 8B-S043-KDG-S
 - Bond Elut C18, 30mg/1cm³, Varian
 - Oasis HLB, 30mg/1cm³, Waters
 - Oasis MCX, Waters
 - II RP 18, 500mg/2.5 cm³, Dionex
- ❖ Filtros para jeringa con membrana de nylon de 0.20 μm de tamaño de poro y 13 mm de diámetro, Millex®-HN, Millipore.
- ❖ Filtros para jeringa con membrana de nylon 0.45 μm de tamaño de poro y 13 mm de diámetro, Millex®-HN, Millipore.

- ❖ Membranas de filtración de nylon, de 0.20 y 0.45 μm de tamaño de poro y de 47 milímetros de diámetro, Millipore.
- ❖ Papel filtro Whatman #41.
- ❖ Guantes de nitrilo.
- ❖ Gradillas.
- ❖ Perillas de succión.

4.1.2. Equipos e instrumentos.

- ❖ Agitador vórtex modelo 16700 Mixer.
- ❖ Balanza analítica Metler Toledo modelo AX205.
- ❖ Baño de ultrasonido Branson modelo 8510 DHT.
- ❖ Baño de agua con sistema dispensador de aire (evaporador de muestras).
- ❖ Cromatógrafo HPLC modular marca Waters.
- ❖ Cromatógrafo Acquity UPLC clase-H marca Waters acoplado a un detector de arreglo de diodos.
- ❖ Cromatógrafo Acquity UPLC marca Waters acoplado a un detector de arreglo de diodos.
- ❖ Cromatógrafo Acquity UPLC Clase-H marca Waters acoplado a un detector UV.
- ❖ Columna LiChroCart® 125-4 Lichrospher® 100 RP (5 μm) Merck.
- ❖ Columna BEH Schield C18 2.1x 100 mm (1.7 μm).
- ❖ Columna Polar Advantage II 2.1 x 100 mm (2.2 μm).
- ❖ Parrilla de agitación marca IKA.
- ❖ Pipeta repetidora Handy step.
- ❖ Potenciómetro Beckman Coulter modelo Φ 690.
- ❖ Refrigerador Sanyo modelo MPR-214F.
- ❖ Sistema de extracción sólido-líquido, Manifold Waters.
- ❖ Sistema de procesamiento de datos Empower 2.
- ❖ Sistema de purificación de agua Millipore® Milli-Q Advantage A-10®.

4.2. Reactivos y sustancias de referencia.

4.2.1. Reactivos.

- ❖ Ácido cítrico, reactivo analítico, J. T. Baker.
- ❖ Agua, Ultrapura Milli-Q.
- ❖ Alcohol isopropílico (isopropanol), grado cromatográfico, J. T. Baker.
- ❖ Pirilidin ditiocarbamato (APDC), reactivo analítico, Sigma Aldrich.
- ❖ Dimetil sulfóxido, reactivo analítico, J.T. Baker.
- ❖ Metanol, grado cromatográfico, J.T. Baker.

4.2.2. Sustancias de referencia.

Nombre	Cianocobalamina
Grado	Primario
Proveedor	USP
Pureza	Cada mg de estándar seco es equivalente a 10.4 µg de cianocobalamina
No. De lote	O0H288
Fecha de caducidad	En vigencia al momento de su uso
Secar una porción durante 4 h sobre sílica gel antes de usarse. Proteger de la luz. Almacenar en refrigeración.	

4.2.3. Placebo y producto terminado.

Nombre	Solución placebo del producto "solución multivitamínica infantil".
Proveedor	Laboratorio de desarrollo farmacéutico
No. De lote	ME-83525-0015
Fecha de caducidad	N/A
Condición de almacenamiento	Mantener en refrigeración.

Nombre	Solución multivitamínica infantil
Proveedor	Laboratorio de desarrollo farmacéutico
No. De lote	ME-83525-0016
Fecha de caducidad	Por definir

4.3. Desarrollo del método analítico.

Las principales variables consideradas en el desarrollo del método analítico fueron: condiciones cromatográficas y método de extracción de cianocobalamina de la matriz de muestra.

4.3.1. Condiciones cromatográficas.

Se buscaron las condiciones cromatográficas que permitieran la adecuada separación e identificación del analito. Los parámetros estudiados fueron:

a) Fase móvil.

En la elección de la fase móvil se consideraron los componentes, proporción y pH ya que estos factores determinan la polaridad y afinidad que el analito presenta hacia la fase estacionaria en función a sus propiedades fisicoquímicas (ej. pKa, polaridad).

Las fases estudiadas fueron mezclas a diferentes proporciones de metanol, agua e isopropanol, tomando como base datos reportados en la literatura.

b) Fase estacionaria.

La fase estacionaria en cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) y ultra alta eficiencia (U-HPLC) está constituida por columnas cromatográficas y al igual que la fase móvil, desempeña un papel importante en cromatografía, ya que la competencia entre ambas nos permite establecer las condiciones óptimas de análisis.

Se evaluaron las siguientes columnas cromatográficas: columna BEH shield C18, 2.1 × 100 mm (1.7 μm), columna polar advantage II, 2.1 × 100 mm (2.2 μm).

c) Volumen de inyección y velocidad de flujo.

Tanto el volumen de inyección (1-50 μ L) como la velocidad del flujo (0.1-0.5 mL/min) fueron seleccionados tomando en cuenta las características de la señal producida en el cromatograma.

d) Condiciones del detector.

Una variable importante a considerar en sistemas cromatográficos de ultra alta eficiencia (U-HPLC) es la velocidad de adquisición de datos o lecturas del detector por segundo, ya que entre mayor es el valor de este parámetro mayor es la definición del perfil cromatográfico con una repercusión negativa en los valores de ruido. Por tal motivo, es necesario encontrar la velocidad de adquisición que permita obtener un máximo de respuesta con un mínimo de ruido.

Se evaluaron 1, 5, 10 y 20 puntos de adquisición por segundo.

Los parámetros considerados en la elección de las mejores condiciones cromatográficas fueron:

- ◆ Especificidad.
- ◆ Sensibilidad.
- ◆ Eficiencia de la columna en la separación de los compuestos.
- ◆ Ancho del pico.
- ◆ Simetría de los picos.
- ◆ Resolución entre picos.
- ◆ Tiempo de retención de los compuestos (tiempo de corrida breve).
- ◆ Presión del sistema.
- ◆ Minimización del tiempo muerto.

4.3.2. Método de extracción.

Basándonos en la revisión bibliográfica de métodos de extracción de cianocobalamina y moléculas similares como la hidroxocobalamina perteneciente a la familia de los corrinoides, en el que se demuestra que la estructura química de la cianocobalamina, aromaticidad, dobles enlaces y gran tamaño le confieren propiedades lipofílicas, se evaluaron tres cartuchos de extracción (C18) con las características descritas a continuación (Tabla 2).

Tabla 2. Características de los diferentes cartuchos evaluados para la realización de la extracción en fase sólida.

	Dimensiones	Grupo funcional	Mecanismo de retención
Bond Elut C18 Varian	1 cm ³ , 30 mg	C18 fase reversa	Hidrofobicidad
Oasis HLB Waters	1 cm ³ , 30 mg	Polímero de N-Vinilpirrolidona, Divinilbenceno	Hidrofobicidad, debido a las características del polímero retiene compuestos con ambas polaridades
Il RP 18 Dionex	2.5 cm ³ , 500 mg	C18 fase reversa	Hidrofobicidad

Las variables que se evaluaron en el método general de extracción en fase sólida se muestran a continuación (Figura 8).

El método de extracción seleccionado fue aquel en el que se obtuvo la muestra libre de impurezas para la cuantificación así como un recobro preferentemente mayor al 90.0 %.

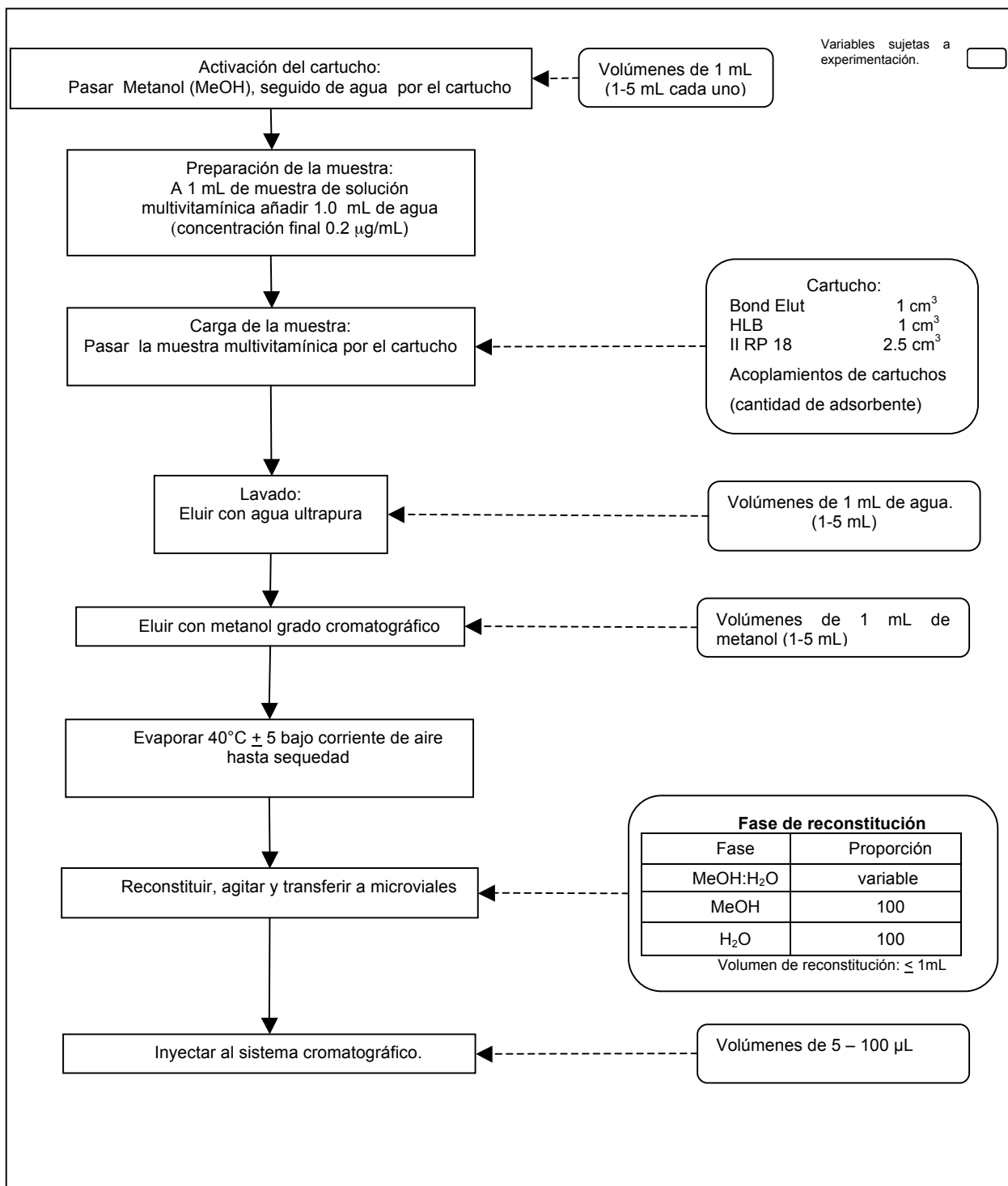


Figura 8. Establecimiento de variables a evaluar durante la preparación de muestras para el desarrollo del método de extracción en fase sólida.

4.4. Validación del método analítico.

El método analítico fue validado de acuerdo a los parámetros recomendados en la ICH Q2 (R1), apoyándose de guías europeas, guías de asociaciones científicas nacionales e internacionales, publicaciones científicas y los procedimientos internos del sitio en dónde se llevó a cabo esta validación.

Los parámetros de desempeño evaluados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros de desempeño evaluados en la validación.

Parámetro de desempeño	Evaluación
Adecuabilidad del sistema	✓
Linealidad y rango del sistema	✓
Precisión del sistema	✓
Especificidad.	✓
Exactitud del método (Recobro en placebo adicionado)	✓
Precisión del método (Repetibilidad)	✓
Precisión de método (Precisión Intermedia)	✓
Estabilidad de la solución estándar y muestra	✓
Robustez cromatográfica	✓

✓ = Requerido

4.4.1. Verificación de la adecuabilidad del sistema y preparación de soluciones estándar.

Evaluar al inicio de cada corrida analítica. Realizar 5 inyecciones consecutivas de una solución estándar de cianocobalamina, obtener los datos de; tiempo de retención, área, altura, ancho de pico, factor de capacidad, factor de coe, eficiencia y ruido. Calcular el factor respuesta de cada inyección realizada.

El coeficiente de variación (CV %) del factor respuesta de cinco inyecciones consecutivas de la solución estándar de cianocobalamina (vitamina B12) debe ser ≤ 3.0 % y el CV %

del factor de respuesta global (de todas las inyecciones de la corrida analítica) de la solución estándar de cianocobalamina 1 y 2 debe ser $\leq 4.0 \%$.

Preparación de las soluciones.

a. Disolvente de muestra: Agua ultra pura (MilliQ).

b. Solución stock 1 de cianocobalamina (0.2 mg/mL).

Nota: Previamente a la pesada de la estándar de referencia de cianocobalamina se deberá secar por 4 horas en silica gel.

Con exactitud, pesar 20.0 ± 5 mg de estándar de referencia de cianocobalamina dentro de un matraz volumétrico ámbar de 100 mL. Agregar 40 mL de disolvente y sonicar en un baño de ultrasonido durante 5 minutos, enfriar a temperatura ambiente. Diluir y llevar al aforo con disolvente, mezclar bien.

c. Dilución de la solución stock 1 de cianocobalamina (8.0 $\mu\text{g/mL}$).

Transferir 4.0 mL de la solución stock 1 de cianocobalamina (0.2 mg/mL) dentro de un matraz volumétrico ámbar de 100 mL. Diluir y llevar al aforo con disolvente, mezclar bien.

d. Solución estándar de cianocobalamina (0.4 $\mu\text{g/mL}$).

Transferir 5.0 mL de la dilución de la solución stock 1 de cianocobalamina (8.0 $\mu\text{g/mL}$) dentro de un matraz volumétrico ámbar de 100 mL. Diluir y llevar al aforo con disolvente, mezclar bien y etiquetar como solución estándar de cianocobalamina.

Evaluar la adecuabilidad del sistema con la solución estándar de cianocobalamina 0.4 $\mu\text{g/mL}$.

4.4.2. Linealidad del sistema y rango.

Verificar la linealidad del sistema y el rango de 40 - 160 % estudiando los niveles de concentración que representan el 40, 80, 100, 120 y 160 % respecto a la concentración de la solución preparada para la valoración la cual tiene una concentración de 0.4 $\mu\text{g/mL}$ de cianocobalamina.

Preparar triplicados cada nivel de concentración para evaluar el rango, preparados por dilución de una solución stock 1 de cianocobalamina (0.2 mg/mL).

a. Solución stock 1 de cianocobalamina (0.2 mg/mL).

Nota: Previamente a la pesada de la estándar de referencia de cianocobalamina se deberá secar por 4 horas en silica gel.

Con exactitud, pesar 20.0 ± 5 mg de estándar de referencia de cianocobalamina dentro de un matraz volumétrico ámbar de 100 mL. Agregar 40 mL de disolvente y sonicar en un baño de ultrasonido durante 5 minutos, enfriar a temperatura ambiente. Diluir y llevar al aforo con disolvente, mezclar bien.

b. Dilución de la solución stock 1 de cianocobalamina (8.0 µg/mL).

Transferir 4.0 mL de la solución stock 1 de cianocobalamina (0.2 mg/mL) dentro de un matraz volumétrico ámbar de 100 mL. Diluir y llevar al aforo con disolvente, mezclar bien.

Preparar las soluciones para evaluar la linealidad del sistema de acuerdo a lo descrito en la tabla 4. Diluir y llevar al aforo con disolvente. Preparar cada dilución por triplicado.

Tabla 4. Preparación de soluciones estándar para evaluar la linealidad del sistema.

Linealidad del sistema de cianocobalamina (vitamina B12)			
Nivel (%)	Dilución de la solución stock 1, 8.0 µg/mL (mL)	Volumen final (mL)	Concentración final (µg/mL)
160	8.0	100	0.64
120	6.0	100	0.48
100	5.0	100	0.40
80	4.0	100	0.32
40	2.0	100	0.16

Un segundo analista deberá repetir la linealidad del sistema un día diferente, usando un equipo diferente y soluciones preparadas de manera independiente.

Reportar:

- Cromatogramas obtenidos del análisis de ambos analistas, área de los picos de cianocobalamina para cada muestra, concentración en $\mu\text{g/mL}$ para cada muestra en todos los niveles de concentración.
- Gráfica de regresión lineal concentración vs área en la que se presente: la ecuación de la recta, regresión lineal, y-intercepto, y- intercepto como % del coeficiente de determinación.

Criterios de aceptación:

- Coeficiente de determinación (r^2) es ≥ 0.99 .
- y-intercepto es $\pm 6.0\%$ de la respuesta al nivel de concentración del estándar que represente el 100 %.

4.4.3. Precisión del sistema.

La precisión del sistema deberá ser evaluada como el coeficiente de variación del factor respuesta calculado de los resultados al 100 % del nivel de concentración del estándar (0.40 $\mu\text{g/mL}$) de cianocobalamina.

Un segundo analista deberá repetir la precisión del sistema un día diferente, utilizando un instrumento diferente y soluciones preparadas de manera independiente.

Ver preparación de la solución estándar en el apartado 4.4.1.

Preparar las soluciones estándar para evaluar la precisión del sistema como se indica en la tabla 5. Diluir y llevar al aforo con disolvente, evaluar por sextuplicado a partir de pesadas independientes.

Tabla 5. Preparación de soluciones estándar para evaluar la precisión del sistema.

Precisión del sistema de cianocobalamina			
Nivel (%)	Dilución de la solución stock 1, 8.0 $\mu\text{g/mL}$ (mL)	Volumen final (mL)	Concentración final ($\mu\text{g/mL}$)
100	5.0	100	0.40

Reportar para ambos analistas:

- Área del pico de cianocobalamina y factor respuesta para cada muestra.
- Promedio, desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (% CV) del factor respuesta.

Criterio de aceptación:

- Coeficiente de variación (% CV) del factor respuesta ≤ 4.0 % (guía AOAC).

4.4.4. Especificidad.

Someter la materia prima, el placebo y el producto multivitamínico a las siguientes condiciones de almacenamiento; 25°C/60% HR, 30°C/75% HR y 40°C/60% HR durante 28 días y a la luz a 2.4 millones de lux hora. Todas las muestras utilizadas para la validación deberán ser aquellas almacenadas en la condición o condiciones que promuevan del 2 al 5 % de degradación de la cianocobalamina.

- Preparar la materia prima y solución estándar (preparar por duplicado) como se indica en el apartado 4.4.1.
- Preparación de la solución placebo y solución del producto multivitamínico.

Utilizando una pipeta "To Contain" (TC) transferir cuantitativamente 1.0 mL de una muestra bien mezclada dentro de un tubo de ensayo de vidrio de 16 × 150 mm y registrar el volumen (V_u).

Lavar la pipeta con 2 mL de disolvente y recuperarlos dentro del tubo de ensayo.

Mezclar la solución hasta completa homogenización.

- Extracción en fase sólida (EFS).

Nota: Para la extracción de cianocobalamina se requiere emplear doble cartucho OnGuard II RP 2.5 cm³, por lo que se deberá unir dos cartuchos y adaptarse con una jeringa de 12 mL.

- a) Acondicionamiento. Utilizando un manifold de vacío para EFS, pasar 10 mL de Metanol a través de los cartuchos acoplados OnGuard II RP 2.5 cm³ seguido de 10 mL de agua ultra pura a una presión de vacío de 10-15 mmHg.

- b) Carga de la muestra. Utilizando un manifold de vacío para EFS, transferir cuantitativamente la preparación de la muestra a través de los cartuchos acoplados a una presión de vacío de 5-10 mmHg, protegiendo los cartuchos de la luz.
- c) Lavado de la muestra. Utilizando un manifold de vacío para EFS, pasar 3 mL de agua ultra pura a los cartuchos acoplados con una presión de vacío de 10-15 mmHg.
- d) Elución de la muestra. Utilizando un manifold de vacío para EFS, pasar 5 mL de Metanol a través de los cartuchos a una presión de vacío de 5-10 mmHg y coleccionar el eluato dentro de un tubo de ensayo de 16 × 150 mm.
- e) Evaporación. Evaporar el eluato de muestra a sequedad utilizando un baño de agua a 45 °C bajo flujo de aire evitando exponer las muestras a la luz.
- f) Reconstitución. Agregar al eluato seco 850 µL de agua ultra pura y mezclar bien utilizando vórtex durante 3 minutos. Transferir cuantitativamente el sobrenadante dentro de un matraz volumétrico de 1 mL, diluir y llevar al aforo con disolvente.
- g) Filtración. Filtrar las muestras empleando filtros para jeringa con membrana de nylon de 0.20 µm de tamaño de poro y 13 mm de diámetro, Millex®GN y etiquetar como muestra de cianocobalamina.

Identificación de cianocobalamina.

Comparar los perfiles cromatográficos de las muestras y el placebo sin estresar con los obtenidos de las soluciones estándar.

Reportar:

- El tiempo de retención relativo de todos los picos respecto a cianocobalamina.
- Datos de la pureza de pico, ángulo de pureza y ángulo de ruido.
- La relación de los tiempos de retención de la muestra respecto al estándar.

Criterios de aceptación:

- Los compuestos relacionados desconocidos y los productos de degradación no deben interferir significativamente con la medición de cianocobalamina.

- El tiempo de retención relativo para cianocobalamina es único comparado con otros compuestos estructuralmente similares.
- El ángulo de pureza debe ser menor que el ángulo de ruido.
- La relación del tiempo de retención de cianocobalamina en la muestra respecto a la del estándar se encuentra en el rango de 0.90 a 1.08.

4.4.5. Exactitud del método (recobro placebo adicionado).

La exactitud del método en presencia de placebo de cianocobalamina deberá ser verificado en el rango de 40-160 % considerando los niveles de concentración que representan el 40, 80, 100, 120 y 160 % de la concentración analítica (0.40 µg/mL) preparadas por dos analistas.

- Preparar por triplicado cada nivel por el método de placebo adicionado preparados por dilución a partir de la solución stock 8.0 µg/mL.
- Preparar la solución estándar (por duplicado) como se indica en el apartado 4.4.1.
- Preparar las soluciones estándar previo a la adición de placebo como se indica en la tabla 6. Diluir y llevar al aforo con disolvente.

Tabla 6. Preparación de soluciones estándar previo a la adición de placebo para evaluar la exactitud del método (recobro, placebo adicionado).

Exactitud del método (recobro, placebo adicionado)				
Nivel (%)	Dilución de la solución stock 1, 0.8 µg/mL (mL)	Volumen final (mL)	Concentración final (µg/mL)	Cianocobalamina adicionada (µg)
160	8.0	100	0.64	0.64
120	6.0	100	0.48	0.48
100	5.0	100	0.40	0.40
80	4.0	100	0.32	0.32
40	2.0	100	0.16	0.16

- Preparar las muestras de placebo adicionado como se indica en los siguientes pasos a partir de las soluciones resultantes de la tabla 6.

1. Utilizando una pipeta “To Discharge” (TD) transferir cuantitativamente 1.0 mL de las soluciones estándar de cada nivel descritas anteriormente dentro de un tubo de ensayo de vidrio de 16 × 150 mm.
2. Utilizando una pipeta “To Contain” (TC) transferir cuantitativamente 1.0 mL de placebo de la muestra de la solución multivitamínica dentro del tubo de ensayo de vidrio de 16 × 150 mm que contiene la solución estándar de cada nivel para evaluar la exactitud. Mezclar hasta homogeneizar y dejar reposar durante 1 hora.
3. Preparar cada muestra de placebo adicionado por nivel por triplicado.
4. Completar la preparación de la muestra de acuerdo a lo indicado en el punto 4.4.4. Especificidad – extracción en fase sólida.

Reportar:

- Cantidad de muestra adicionada en μg de cada nivel.
- Cantidad de muestra recuperada en μg de cada nivel.
- Porcentaje de recobro, promedio y coeficiente de variación en por ciento para cada nivel de concentración.
- Gráfica de regresión lineal de cantidad adicionada (μg) vs cantidad recuperada (μg) en la que se presente: la ecuación de la recta, regresión lineal, y-intercepto, y-intercepto como % del coeficiente de determinación.

Criterios de aceptación:

- Coeficiente de determinación (r^2) es ≥ 0.99 .
- y-intercepto es $\pm 6.0\%$ de la respuesta al nivel del 100 % del estándar de linealidad del sistema.
- El % de recobro de la valoración se encuentra en el intervalo de 90.0 a 110.0 % y el $\text{CV} \leq 8.0\%$.

4.4.6. Precisión del método (repetibilidad).

Deberá ser calculada obteniendo el CV (%) de la valoración calculado de preparaciones de la solución muestra multivitamínica producto final.

- Preparar la solución estándar (por duplicado) como se indica en el apartado 4.4.1.
- Preparar la solución muestra (por sextuplicado) como se indica en el apartado 4.4.4.

Reportar:

- Porcentaje de recobro de la prueba de valoración para cada muestra.
- Porcentaje de recobro de la prueba de valoración promedio y coeficiente de variación para las 6 muestras.

Criterios de aceptación:

- El CV del % de recobro de la valoración es ≤ 8.0 %.

4.4.7. Precisión del método, precisión intermedia.

La precisión intermedia del método deberá ser evaluada por dos analistas realizando el análisis de valoración de manera independiente (preparación de soluciones, equipo U-HPLC, columna, estándares y muestras). Se realizará de acuerdo a lo siguiente.

Analista	Día	Solución estándar	No. muestras	Total de muestras analizadas
A	1	2	3	6
A	2	2	3	
B	1	2	3	6
B	2	2	3	

- Preparar la solución estándar (por duplicado) como se indica en el apartado 4.4.1.
- Preparar la solución muestra (por triplicado) para cada día de análisis por cada analista a partir del producto terminado de la solución multivitamínica como se indica en el apartado 4.4.4.

NOTA: Los resultados de la precisión del método (repetibilidad) pueden ser utilizados como datos para el analista A para la precisión intermedia.

Reportar para ambos analistas:

- Porcentaje de recobro de la prueba de valoración para cada muestra analizada para cada día de análisis.

- Porcentaje de recobro de la prueba de valoración promedio y coeficiente de variación en por ciento para las 6 muestras analizadas para cada analista.
- Porcentaje de recobro promedio y coeficiente de variación en por ciento para las 6 muestras analizadas para cada analista.
- Diferencia absoluta del porcentaje de recobro de la valoración obtenida del promedio de las 6 muestras realizadas por analista.
- Coeficiente de variación porcentual (CV %) para las 12 muestras analizadas entre ambos analistas.

Criterios de aceptación:

- Coeficiente de variación (CV %) ≤ 8.0 % para cada analista, para ambos días.
- Diferencia absoluta del porcentaje de recobro de la valoración ≤ 8.0 %.
- Coeficiente de variación (CV %) para las 12 muestras analizadas entre ambos analistas ≤ 16.0 %.

4.4.8. Estabilidad de la solución estándar y muestra.

La preparación de las soluciones estándar y muestra deberán ser almacenadas protegidas de la luz a la temperatura ambiente del laboratorio (aprox. 25°C) y en refrigeración (5 °C \pm 3 °C). Se determinará por la prueba de valoración, los resultados serán obtenidos hasta los 7 días de almacenamiento.

- Preparar la solución estándar (por duplicado) como se indica en el apartado 4.4.1.
- Preparar la solución muestra (por triplicado) como se indica en el apartado 4.4.4.
- Determinar los resultados de las muestras del análisis de valoración en el análisis inicial.
- Realizar las fracciones necesarias de las soluciones muestra y estándar (preparadas para evaluar la condición inicial) para evaluar los periodos de estabilidad de 1, 3, 5 y 7 días posteriores al análisis inicial a la condición del laboratorio y refrigeración.
- Analizar las muestras de cada periodo y condición de almacenamiento.
- Analizar la solución estándar de cada periodo y condición de almacenamiento con dos estándares preparados el día del análisis.

Reportar:

- El porcentaje de recobro obtenido para cada muestra y condición.
- Promedio del porcentaje de recobro.
- Valor absoluto de la diferencia del valor del porcentaje de recobro obtenido de la muestra en cada tiempo y condición de análisis contra el valor inicial.

Criterio de aceptación:

- Valor absoluto de la diferencia del valor del porcentaje de recobro obtenido de la muestra en cada tiempo y condición de análisis contra el valor inicial ≤ 4.0 %.

4.4.9. Robustez.

La prueba se evaluará por medio de los análisis de valoración de las muestras de producto terminado de la solución multivitamínica obtenidas al realizar variaciones deliberadas en los parámetros del método U-HPLC. Estos parámetros fueron seleccionados con base en el impacto que pueden producir en el resultado analítico final.

- Preparar seis réplicas de la solución estándar como se indica en el apartado 4.4.1. y filtrar las soluciones a través del filtro evaluado.
- Preparar seis réplicas de la solución muestra a partir del producto terminado de la solución multivitamínica como se indica en el apartado 4.4.4 y filtrar las soluciones a través del filtro evaluado.
- Disolvente. Filtrar el disolvente por triplicado a través de cada filtro evaluado.

Filtro a evaluar:

Filtro para jeringa con membrana de nylon 0.45 μm de poro y 13 mm de diámetro Millex®-GN.

Robustez del proceso de extracción de la muestra. Proceder como se indica en el apartado 4.4.4 preparando tres réplicas de producto final de la solución multivitamínica.

Cartucho de extracción a evaluar:

- Tipo I. Strata X, 33 μm , fase reversa, polimérica 2g/20mL, giga tubes, Phenomenex.
- Tipo II. Strata-XL 100 μm , fase reversa polimérica 2g/20mL, giga tubes, Phenomenex.

Las variaciones y los valores de los parámetros evaluados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 7. Resumen de los cambios a las condiciones cromatográficas y de preparación de la muestra evaluados.

Parámetro U-HPLC extracción	Nivel bajo	Condición nominal	Nivel alto
Filtro de muestra	1 diferente tipo (nylon 0.45 μm \times 13 mm)		
Intervalo de tiempo del gradiente (minutos)	0.0 a 7.2	0.0 a 8.0	0.0 a 8.8
Curva de gradiente utilizada	5	6	7
Temperatura del horno de columna ($^{\circ}\text{C}$)	30	35	40
Columna	2 diferentes números de serie		
Cartucho de extracción	2 diferentes tipos (Strata X 33 y X100)		

En caso de que no se tenga robustez con la variable sugerida para ninguno de los parámetros de desempeño estudiados se podrá evaluar un cambio más cercano a la condición nominal.

Reportar:

- Porcentaje de recobro de la prueba de valoración para cada muestra analizada.
- Porcentaje de recobro de la prueba de valoración, promedio y coeficiente de variación en por ciento para las 3 muestras analizadas para el parámetro evaluado.
- Diferencia absoluta del porcentaje de recobro de la valoración obtenido del promedio de las 3 muestras analizadas con la condición normal y las analizadas con los niveles de los parámetros evaluados.
- Robustez del filtro: Promedio del porcentaje de recobro para las interferencias del disolvente. Promedio del porcentaje de recobro del estándar.

Criterios de aceptación:

- Diferencia absoluta del porcentaje de recobro de valoración $\leq 4.0\%$.
- Robustez del filtro: Promedio del porcentaje de recobro para las interferencias del disolvente $\leq 1.0\%$. Promedio del porcentaje de recobro del estándar $\geq 98.0\%$.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

5.1. Desarrollo del método analítico.

El equipo utilizado durante el desarrollo, la validación y el análisis de muestras se describe en la Tabla 8.

Tabla 8. Equipo cromatográfico.

	Características
Cromatógrafo	Acquity UPLC Clase-H marca Waters. Bomba Cuaternaria: Quaternary Solvent Manager (QSM). Automuestreador: Sample Manager (SM)
Detector	TUV y PDA
Horno	Column Manager (CM)

5.1.1. Condiciones del detector.

Las condiciones óptimas del detector para la cuantificación de cianocobalamina se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Condiciones del detector.

Parámetro	Valor
Velocidad de muestreo	10 puntos/segundo
Longitud de onda	550 nm
Presentación de datos	Absorbancia-MBF
Filtro (tiempo constante)	Lento (0.4 segundos)
Auto-cero (cambios en longitud de onda)	Mantener la línea base
Modo en la longitud de onda	Única (fija)

5.1.2. Adecuabilidad del sistema.

El coeficiente de variación (CV %) del factor respuesta de cinco inyecciones consecutivas de la solución estándar de cianocobalamina (vitamina B12) debe ser ≤ 3.0 % y el CV %

del factor de respuesta global (de todas las inyecciones de la corrida analítica) de la solución estándar de cianocobalamina 1 y 2 debe ser $\leq 4.0 \%$.

5.1.3. Condiciones cromatográficas.

Los criterios establecidos en la elección de las mejores condiciones cromatográficas fueron:

- ◆ Especificidad.
- ◆ Sensibilidad.
- ◆ Eficiencia de la columna en la separación de los compuestos.
- ◆ Ancho del pico.
- ◆ Simetría de los picos.
- ◆ Resolución entre picos.
- ◆ Tiempo de retención de los compuestos (tiempo de corrida breve).
- ◆ Seguimiento de la presión.
- ◆ Minimización del tiempo muerto.

Además del cumplimiento con el criterio de aceptación establecido para la adecuabilidad del sistema.

a) Fase móvil.

La fase móvil (componentes y proporción) que cumplió con los criterios establecidos fue la siguiente:

Descripción																																				
Fase móvil	A) Agua Milli-Q, B) Metanol, C) Isopropanol.																																			
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tiempo (min)</th> <th>% A</th> <th>% B</th> <th>% C</th> <th>Curva</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>90.0</td> <td>10.0</td> <td>0.0</td> <td>NA</td> </tr> <tr> <td>8.0</td> <td>40.0</td> <td>60.0</td> <td>0.0</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>9.0</td> <td>10.0</td> <td>45.0</td> <td>45.0</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>12.0</td> <td>50.0</td> <td>50.0</td> <td>0.0</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>90.0</td> <td>10.0</td> <td>0.0</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>90.0</td> <td>10.0</td> <td>0.0</td> <td>6</td> </tr> </tbody> </table>	Tiempo (min)	% A	% B	% C	Curva	0.0	90.0	10.0	0.0	NA	8.0	40.0	60.0	0.0	6	9.0	10.0	45.0	45.0	1	12.0	50.0	50.0	0.0	1	15.0	90.0	10.0	0.0	6	20.0	90.0	10.0	0.0	6
	Tiempo (min)	% A	% B	% C	Curva																															
	0.0	90.0	10.0	0.0	NA																															
	8.0	40.0	60.0	0.0	6																															
	9.0	10.0	45.0	45.0	1																															
	12.0	50.0	50.0	0.0	1																															
	15.0	90.0	10.0	0.0	6																															
20.0	90.0	10.0	0.0	6																																
NA: No aplica																																				

b) Fase estacionaria.

La columna cromatográfica y temperatura de trabajo que cumplió satisfactoriamente con los criterios establecidos fueron:

- *Columna: Acclaim RSLC Polar Advantage II 2.2 μ m, 120 A° 2.1 \times 100 mm.*
- *Temperatura de columna: 35 °C*

c) Volumen de inyección y velocidad de flujo.

Al experimentar con volúmenes mayores a 20 μ L se observaron distorsiones del pico de interés mientras que con volúmenes de 5 μ L se perdía la respuesta cromatográfica. Por otra parte, velocidades de flujo mayores a 0.2 mL/min provocaban distorsiones en la forma de pico y corrimientos en los tiempos de retención. De lo anterior el volumen de inyección y velocidad de flujo que cumplieron con los criterios de aceptación previamente establecidos fueron los siguientes.

- *Volumen de inyección: 20 μ L*
- *Velocidad de flujo: 0.2 mL/min*

Una vez determinados los parámetros cromatográficos el tiempo de retención aproximado de cianocobalamina se encontró en el intervalo de: 5 a 6 minutos.

5.1.4. Método de extracción.

El método de extracción se determinó en función al recobro obtenido (preferentemente mayor al 90.0 % y constante en el rango de concentraciones de trabajo), así como de la selectividad.

Al evaluar el método de extracción con los cartuchos Bond Elut C18 (Varian) y Oasis HLB (Waters), no se observó afinidad del analito por la fase estacionaria. Sólo en el cartucho On *Guard II RP* (Dionex) la cianocobalamina pudo retenerse permitiendo un recobro del 94.2 % al acoplar dos cartuchos de 2.5 cm³ en tandem. Este hecho puso en manifiesto, por un lado, la necesidad de aumentar la cantidad de adsorbente para generar la interacción hidrofóbica deseada y, por otro, revelar la gran complejidad de la matriz de muestra.

En cuanto al volumen de lavado se estudiaron volúmenes de 1 hasta 3 mL de agua, obteniéndose un mayor recobro y menores impurezas que con un volumen de 1 o 2 mL.

Para la reconstitución de muestras se utilizaron mezclas de soluciones orgánico-acuosas en varias proporciones y se observó que las impurezas aumentaban al incrementar la proporción de fase orgánica, por lo que se eligió agua ultra pura al 100 %.

De los resultados anteriores se estableció un método de extracción que minimiza la cantidad de impurezas y permite un recobro aceptable del analito de la muestra y que se describe a continuación:

Las muestras multivitamínicas fueron preparadas y extraídas utilizando el procedimiento de extracción en fase sólida (EFS).

1. Utilizando una pipeta "To Contain" (TC) transferir cuantitativamente 1.0 mL de una muestra bien mezclada de la solución multivitamínica dentro de un tubo de ensayo de vidrio de 16 × 150 mm y registrar el volumen (V_u).
2. Lavar la pipeta con 2 mL de disolvente y colectarlos dentro del mismo tubo de ensayo.
3. Mezclar la solución hasta completa homogenización.
4. Para la extracción de cianocobalamina se requiere emplear doble cartucho On Guard II RP, por lo que se deberá unir dos cartuchos y adaptarse con una jeringa de 12 mL.
5. Activación. Utilizando un manifold de vacío para EFS, pasar 10 mL de Metanol a través de los cartuchos acoplados OnGuard II RP 2.5 cm³ seguido de 10 mL de agua ultra pura a una presión de vacío de 10-15 mmHg.
6. Carga de la muestra. Utilizando un manifold de vacío para EFS, transferir cuantitativamente la preparación de la muestra a través de los cartuchos acoplados a una presión de vacío de 5-10 mmHg, protegiendo los cartuchos de la luz.

7. Lavado de la muestra. Utilizando un manifold de vacío para EFS, pasar 3 mL de agua ultrapura a los cartuchos acoplados con una presión de vacío de 10-15 mmHg.
8. Elución de la muestra. Utilizando un manifold de vacío para EFS, pasar 5 mL de Metanol a través de los cartuchos a una presión de vacío de 5-10 mmHg y coleccionar el eluato dentro de un tubo de ensayo de 16 × 150 mm.
9. Evaporación. Evaporar el eluato de muestra a sequedad utilizando un baño de agua a 45°C bajo flujo de aire evitando exponer las muestras a la luz.
10. Reconstitución. Agregar al eluato seco 850µL de agua ultra pura y mezclar bien utilizando vórtex durante 3 minutos. Transferir cuantitativamente el sobrenadante dentro de un matraz volumétrico de 1 mL, diluir a volumen con disolvente.
11. Filtrado. Filtrar las muestras empleando filtros para jeringa de 13 mm de diámetro con membrana de nylon de 0.20 µm (Millex®GN) y etiquetar como muestra de cianocobalamina.
12. Inyección. Inyectar 20 µL de alícuota de la muestra de cianocobalamina y de la solución estándar en el sistema cromatográfico y registrar las áreas de los picos de cada una de las inyecciones.

5.2. Resultados de la validación del método analítico.

5.2.1. Linealidad del sistema y rango.

La linealidad del sistema de cianocobalamina (vitamina B12) fue verificada en el rango de 40-160 % con los siguientes niveles de concentración 40, 80, 100, 120 y 160 % respecto a la concentración de la valoración la cual es de 0.4 µg/mL de cianocobalamina.

Un segundo analista repitió el análisis un día diferente, usando un instrumento diferente y soluciones preparadas de manera independiente.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 100 y Figura 9.

Tabla 10. Resultados de la linealidad del sistema y rango de cianocobalamina.

Linealidad del sistema y rango de cianocobalamina (vitamina B12)				
Nivel de concentración	Analista A		Analista B	
%	[Vit-B12] µg/mL	(Vit-B12) Área	[Vit-B12] µg/MI	(Vit-B12) Área
40	0.17	5614	0.16	4702
	0.17	5471	0.16	5139
	0.17	5259	0.16	5114
80	0.33	10795	0.32	10214
	0.33	10998	0.32	10132
	0.33	10714	0.32	9445
100	0.42	14038	0.40	12715
	0.42	13765	0.40	12872
	0.42	13975	0.40	12749
120	0.50	16415	0.48	14824
	0.50	15896	0.48	14804
	0.50	16318	0.48	14647
160	0.67	21777	0.65	20312
	0.67	22305	0.65	20197
	0.67	22203	0.65	19961
Pendiente	33219.25		31186.50	
Intercepto	-125.88		-63.95	
Coefficiente de determinación (r^2)	0.998		0.997	
y-intercepto %	-0.9		-0.5	
Ecuación de la recta	$y = 33219.25 x - 125.88$		$y = 31186.50 x - 63.95$	

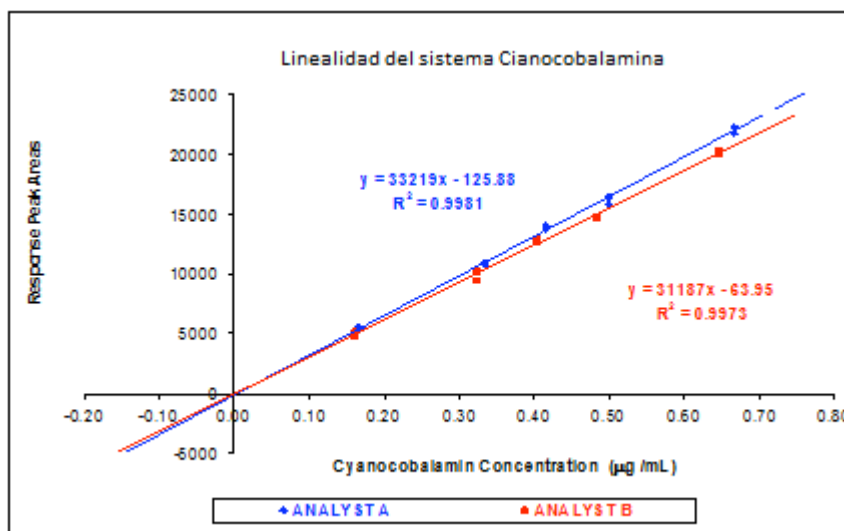


Figura 9. Resultados de la linealidad del sistema y rango de cianocobalamina.

5.2.2. Precisión del sistema.

La precisión del sistema fue demostrada con el cálculo de % CV del factor respuesta (K_{VitB12}) calculado a partir de 6 soluciones estándar (preparaciones independientes) al 100 % del nivel de concentración.

Un segundo analista repitió el análisis un día diferente, utilizando un instrumento diferente y soluciones preparadas de manera independiente. Los resultados se muestran a continuación.

Tabla 12. Resultados de la precisión del sistema evaluada por dos analistas.

Solución estándar No.	Precisión del sistema	
	Cianocobalamina	
	Factor respuesta	
	Analista A	Analista B
1	33424	31788
2	34013	30578
3	33957	30947
4	33398	31155
5	32900	31529
6	33470	30535
Promedio	33527	31089
CV (%)	1.2	1.6

5.2.3. Especificidad.

Las muestras de producto y placebos con las que se evaluó la especificidad fueron sometidas en el envase primario bajo un tiempo determinado en condiciones variables de temperatura, humedad y luz.

Para confirmar la especificidad se realizó la prueba de “pureza de pico” de cianocobalamina, la cual fue determinada utilizando un detector de arreglo de diodos, el espectro se adquirió en el rango de 350 a 650 nm.

En la prueba de pureza de pico el cromatograma de la muestra es medido a varias longitudes de onda (n), cada punto del pico es caracterizado por un espectro, el cual es matemáticamente descrito por un vector en el espacio dimensional-n de los valores de absorción (UA) a la longitud de onda n (la longitud de este vector es proporcional a la concentración del analito en la solución estudiada) se obtiene de éste el llamado ángulo de pureza.

Dos espectros determinados de la misma sustancia pueden ser diferentes, por ejemplo, por la influencia del ruido (threshold) de la línea base. Con el fin de tomar esto en cuenta, un ángulo espectral de ruido es determinado.

Cuando el ángulo de pureza es menor que el ángulo de ruido, entonces se dice que el pico es puro.

Tabla 13. Resultados del ángulo de pureza y el ángulo de ruido en muestras sometidas a diferentes condiciones de temperatura, humedad y luz.

Tabla de resultados PDA												
	Nombre de la muestra	Nombre del pico	TR (min)	Ángulo de pureza 1	Ángulo de ruido 1	Ángulo de pureza 2	Ángulo de ruido 2	Ángulo de pureza 3	Ángulo de ruido 3	Ángulo de pureza 4	Ángulo de ruido 4	Pico impuro
1	Adec. Del sistema	Vit B12	6.432	0.813	1.814	0.736	1.831	0.681	1.804	0.659	1.797	No
2	PT S/E	Vit B12	6.112	3.590	3.379	1.317	3.394	1.163	3.390	1.085	3.342	No
3	PT40°C/75%HR_7D	Vit B12	6.087	3.209	4.649	1.711	4.838	1.598	4.807	1.476	4.706	No

Identificación de Cianocobalamina.

La capacidad del método para la identificación de cianocobalamina fue demostrada por comparación de los perfiles cromatográficos en el tiempo de retención de cianocobalamina en muestras mantenidas a temperatura y humedad ambiente y aquellas sometidas en condiciones diferentes de luz, temperatura y humedad con los obtenidos de soluciones estándar.

Las soluciones de los placebos mantenidas a temperatura y humedad ambiente no mostraron interferencias en el tiempo de retención de cianocobalamina. Ver Figura 10.

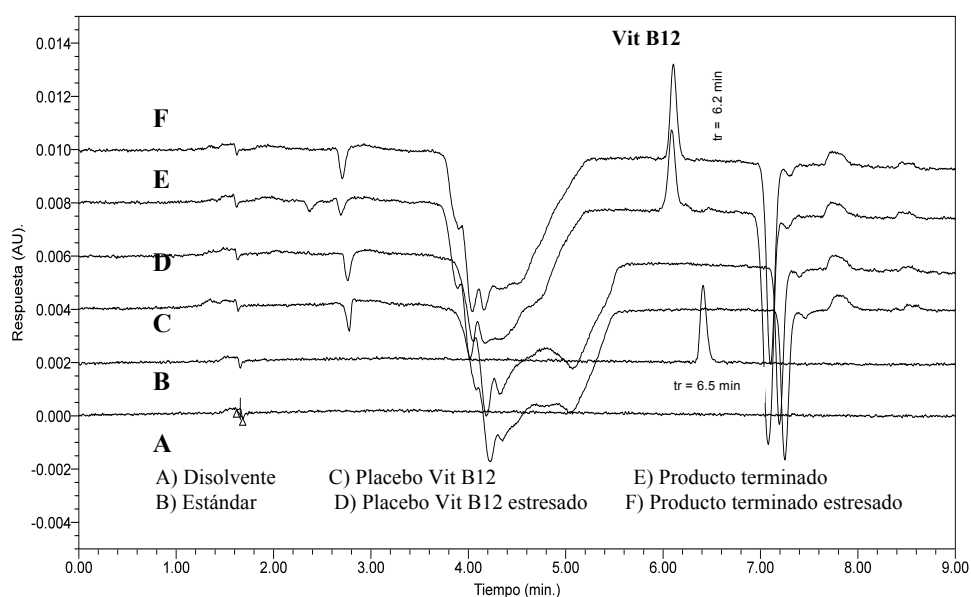


Figura 10. Comparación de los cromatogramas de placebo, estándar y producto terminado de muestras sin someter y sometidas a diferentes condiciones de luz, temperatura y humedad (condiciones de estrés).

5.2.4. Exactitud del método.

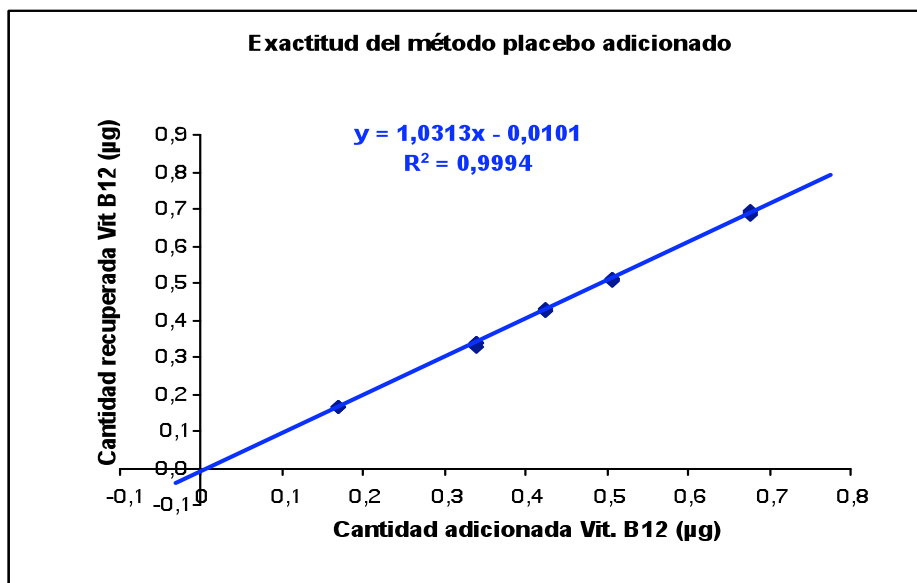
La exactitud del método empleando el placebo adicionado con cianocobalamina fue verificado en el rango de 40-160 % considerando los niveles de 40, 80, 100, 120 y 160 % de la concentración analítica (0.40 $\mu\text{g/mL}$). Ver tabla 13 y Figura 11.

Tabla 14. Resultados de la exactitud del método.

Exactitud del método (empleando el placebo adicionado con cianocobalamina)			
% LM	Analista A		
	[Vit B12] Adicionado (µg)	[Vit B12] Recobrado (µg)	[Vit B12] Recobro (%)
40	0.1691	0.1672	98.9
	0.1691	0.1649	97.5
	0.1691	0.1670	98.8
80	0.3383	0.3390	100.2
	0.3383	0.3291	97.3
	0.3383	0.3398	100.4
100	0.4228	0.4261	100.8
	0.4228	0.4305	101.8
	0.4228	0.4261	100.8
120	0.5074	0.5069	99.9
	0.5074	0.5118	100.9
	0.5074	0.5114	100.8
160	0.6766	0.6905	102.1
	0.6766	0.6956	102.8
	0.6766	0.6834	101.0

Vitamina B12	Analista A
Pendiente	1.0313
Intercepto	-0.0101
Coeficiente de correlación (r^2)	0.9994
y-intercepto (%)	-2.4
Ecuación de la recta	$y = 1.0313 x - 0.0101$
Promedio del recobro (%)	100.3
Recobro mínimo (%)	97.3
Recobro máximo (%)	102.8
CV (%)	1.6

Figura 11. Exactitud del método (método del placebo adicionado) de la prueba de valoración.



5.2.5. Precisión del método (repetibilidad).

Se determinó la precisión del método para cuantificar cianocobalamina (vitamina B12) con el cálculo del % CV obtenido a partir de los resultados de un sextuplicado del análisis de muestras preparadas por un analista.

Tabla 15. Resultados de la precisión del método.

Precisión del método de valoración(repetibilidad)	
Cianocobalamina (vitamina B12)	
Muestra No.	Valoración (%)
1	98.6
2	99.1
3	97.2
4	99.2
5	99.7
6	96.9
Promedio	98.5
CV (%)	1.2

5.2.6. Precisión del método (precisión intermedia).

La precisión intermedia del método fue evaluada por dos analistas realizando el análisis de valoración de manera independiente.

Tabla 16. Resultados de la precisión intermedia del método de valoración.

Precisión intermedia de la valoración (reproducibilidad)		
Cianocobalamina		
Muestra No- Día	Valoración (%)	
	Analista A	Analista B
M1-D1	98.6	97.3
M2-D1	99.1	96.1
M3-D1	97.2	96.9
M1-D2	96.2	98.3
M2-D2	99.6	97.2
M3-D2	97.1	97.9
Recobro _(n=6)	98.0	97.3
CV % _(n=6)	1.4	0.8
Dif. Abs del % de recobro	0.7	
CV % _(n=12)	1.1	

5.2.7. Estabilidad de la solución estándar y muestra.

La estabilidad fue demostrada por el cambio de % obtenido de cianocobalamina de la prueba de valoración al transcurrir el tiempo. Las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente (aprox. 25°C) y en refrigeración (5°C±3°C). El periodo máximo de almacenamiento de las muestras fue de 7 días, ver tablas 16-21.

Tabla 17. Resultados de la estabilidad de la solución stock mantenida a temperatura ambiente.

Resultados de la estabilidad de la solución stock Temperatura ambiente (25°C-30°C)					
Estándar	% Cianocobalamina.				
No.	Inicial	1er Día	3er Día	5to Día	7°Día
1	99.9	96.7	98.9	98.9	97.6
2	100.7	97.6	101.6	100.1	101.5
Promedio	100.3	97.2	100.3	99.5	99.6
Dif. Abs	N/A	3.2	0.0	0.8	0.8

Tabla 18. Resultados de la estabilidad de la solución stock mantenida en refrigeración.

Resultados de la estabilidad de la solución stock Refrigeración (5°C ± 3°C)					
Estándar	% Cianocobalamina.				
No.	Inicial	1er Día	3er Día	5to Día	7°Día
1	99.9	98.9	101.1	100.1	99.0
2	100.7	100.9	102.3	97.7	102.3
Promedio	100.3	99.9	101.7	98.9	100.7
Dif. Abs	N/A	0.4	1.4	1.4	0.4

Tabla 19. Resultados de la estabilidad de la solución estándar mantenida a temperatura ambiente.

Resultados de la estabilidad de la solución estándar Temperatura ambiente (25°C-30°C)					
Estándar	% Cianocobalamina.				
No.	Inicial	1er Día	3er Día	5to Día	7°Día
1	99.9	97.4	98.7	97.5	99.6
2	100.7	97.9	102.8	99.6	100.7
Promedio	100.3	97.7	100.7	98.6	100.1
Dif. Abs	N/A	2.7	0.4	1.7	0.2

Tabla 20. Resultados de la estabilidad de la solución estándar mantenida en refrigeración

Resultados de la estabilidad de la solución estándar Refrigeración (5°C ± 3°C)					
Estándar No.	% Cianocobalamina.				
	Inicial	1er Día	3er Día	5to Día	7° Día
1	99.9	101.7	98.7	99.9	102.4
2	100.7	101.0	102.8	98.9	100.5
Promedio	100.3	101.4	100.7	99.4	101.5
Dif. Abs	N/A	1.0	0.4	0.9	1.2

Tabla 21. Resultados de la estabilidad de la muestra mantenida en temperatura ambiente.

Resultados de estabilidad de la muestra. Temperatura ambiente (25°C-30°C)					
Muestra No.	% Cianocobalamina.				
	Inicial	1er Día	3er Día	5to Día	7° Día
1	99.3	99.9	97.5	95.9	94.1
2	99.5	100.5	98.5	91.8	93.5
3	100.4	98.5	100.6	95.5	92.8
Promedio	99.7	99.6	98.9	94.4	93.5
Dif. Abs	N/A	0.1	0.8	5.3 NO CUMPLE	6.2 NO CUMPLE

Especificación: Diferencia absoluta del valor del porcentaje de recobro de la muestra en cada tiempo y condición de análisis contra el valor inicial $\leq 4.0\%$

Tabla 22. Resultados de la estabilidad de la muestra mantenida en refrigeración.

Resultados de estabilidad de la muestra Refrigeración (5°C ± 3°C)					
Muestra No.	% Cianocobalamina.				
	Inicial	1er Día	3er Día	5to Día	7° Día
1	99.3	97.1	97.7	95.9	99.0
2	99.5	98.4	100.0	97.7	99.5
3	100.4	99.8	98.5	98.9	98.6
Promedio	99.7	98.4	98.7	97.5	99.0
Dif. Abs	N/A	1.3	1.0	2.2	0.7

Como se observa en la tabla de resultados de la estabilidad analítica de la muestra en la condición de temperatura ambiente posterior al tercer día de análisis no cumple con la

especificación establecida debido a la fotosensibilidad e inestabilidad reportada de cianocobalamina en solución.

5.2.8. Robustez.

La prueba se evaluó por medio de los análisis de valoración de las muestras de producto terminado de la solución multivitamínica obtenidas al realizar variaciones deliberadas en los parámetros del método U-HPLC.

5.2.8.1. Filtro de muestra.

Los resultados obtenidos para la variante de filtro evaluado muestra que no existe diferencia de los resultados del análisis de valoración para cianocobalamina.

Tabla 23. Resultados del cambio en el tamaño de poro de la membrana del filtro para la muestra.

Muestra / Parámetro		Variable de robustez: Tipo de filtro	
		Tipo I	Tipo II
Vit B12	Factor respuesta	1.1	1.0
Dil/Vit B12	Resolución	31.7	31.4
Vit B12	Factor de coleo	1.1	1.1
Vit B12	No. de platos teóricos (NPT)	60997	60782
Vit B12 Valoración	Promedio (%)	99.4	99.6
Diferencia absoluta (%)		0.2	

Tipo I: Filtro 0.20 µm Millex®-GN, membrana de nylon, 13 mm
 Tipo II: Filtro 0.45µm Millex®-HN, membrana de nylon, 13 mm

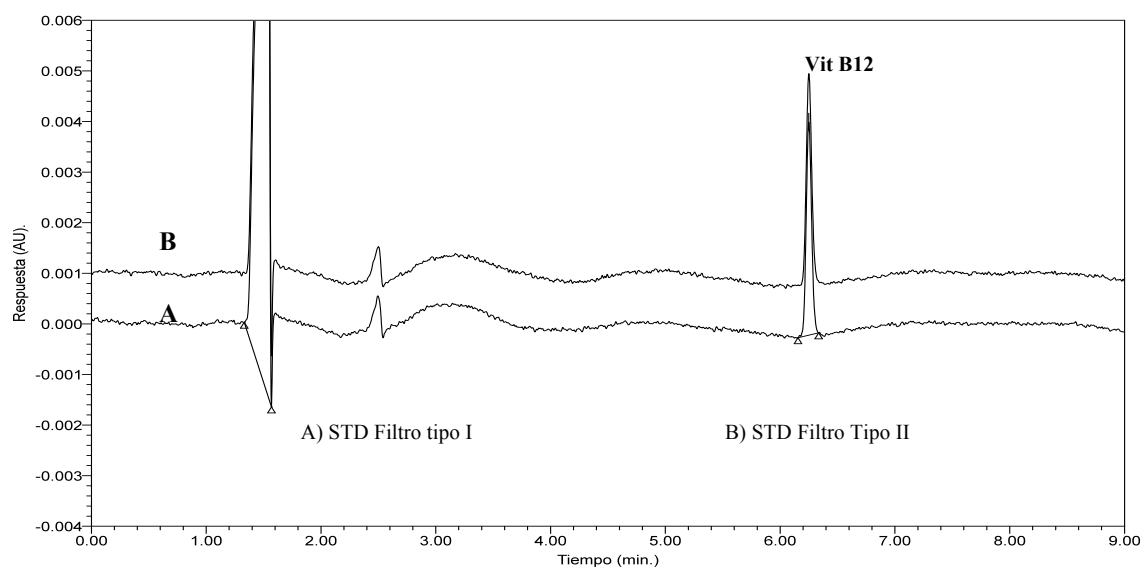


Figura 12. Cromatogramas obtenidos al realizar el cambio en el tamaño de poro de la membrana del filtro.

5.2.8.2. Intervalo de tiempo del gradiente.

Tabla 24. Resultados del cambio en el intervalo de tiempo de aplicación del gradiente.

Muestra/Parámetro		Tiempo de aplicación del gradiente estudiado		
		0.0 a 7.2	0.0 a 8.0	0.0 a 8.8
Vit B12	Factor respuesta	1.2	1.0	2.0
Dil/Vit B12	Resolución	30.0	31.7	32.2
Vit B12	Factor de coeio	1.1	1.1	1.1
Vit B12	No. De platos teóricos (NPT)	61183	60997	62476
Vit B12 Valoración	Promedio (%)	98.8	99.4	99.9
Diferencia absoluta (%) respecto a la condición nominal (0.0 a 8.0)		0.6		0.5

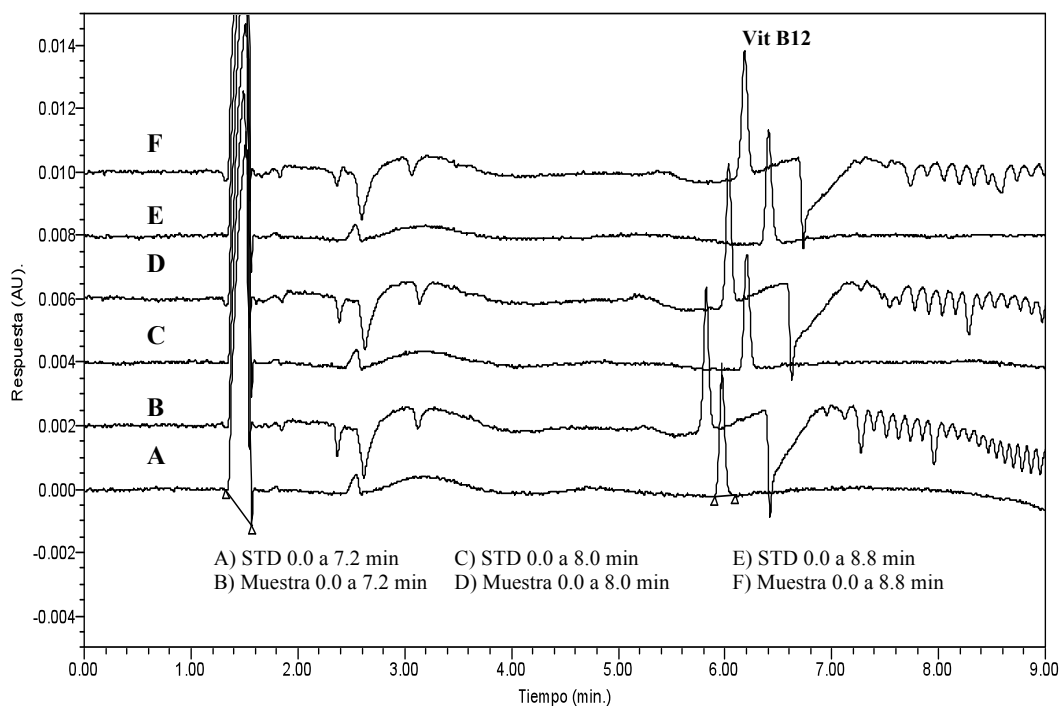


Figura 13. Cromatogramas obtenidos de los diferentes intervalos de tiempo del gradiente estudiados.

5.2.8.3. Curva de gradiente.

Los resultados obtenidos para el cambio de curva utilizada para aplicación del gradiente muestran que no existe diferencia de los resultados del análisis de valoración para cianocobalamina.

Tabla 25. Resultados del cambio de la curva de gradiente empleada.

Muestra /Parámetro		Curva utilizada para el gradiente estudiado		
		Curva 5	Curva 6	Curva 7
Vit B12	Factor respuesta	0.8	1.0	1.6
Dil/Vit B12	Resolución	21.9	31.7	40.4
Vit B12	Factor de coleo	1.1	1.1	1.1
Vit B12	No. de platos teóricos (NPT)	61278.8	60997	114252
Vit B12 Valoración	Promedio (%)	99.7	99.4	100.5
Diferencia absoluta (%) respecto a la condición nominal (curva 6)		0.3		1.1

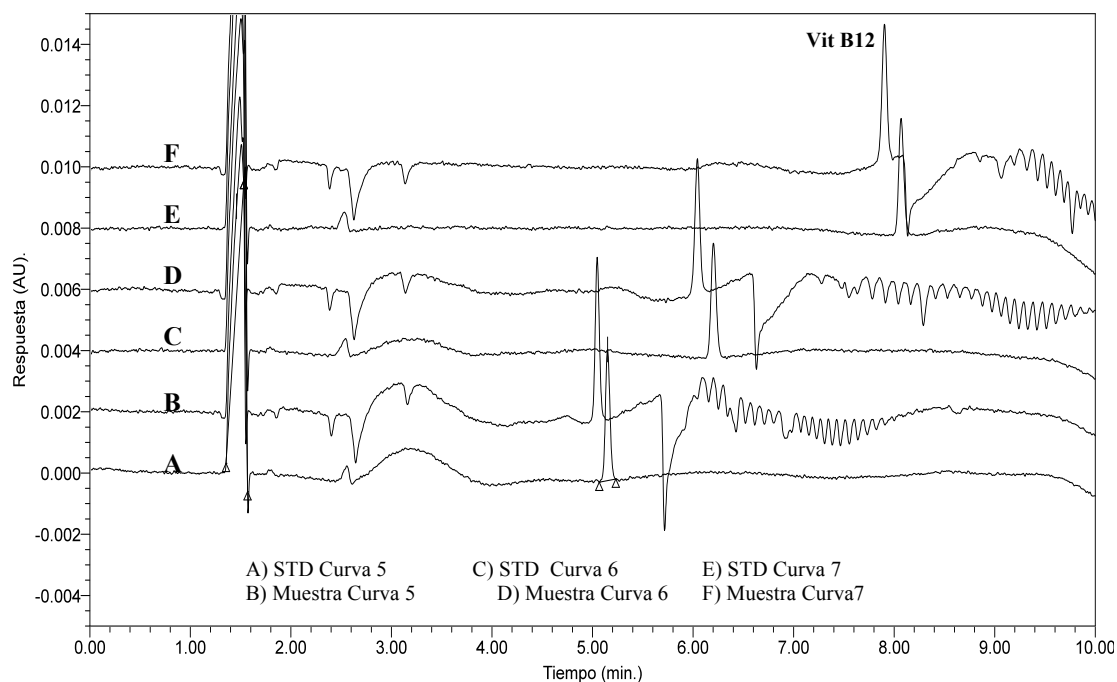


Figura 14. Cromatogramas obtenidos de la aplicación de las diferentes curvas de gradiente.

5.2.8.4. Temperatura del horno de la columna.

Los resultados obtenidos para las temperaturas del horno de la columna evaluadas muestran que no existe diferencia de los resultados del análisis de valoración para cianocobalamina.

Tabla 26. Resultados del cambio de temperatura del horno de la columna en el análisis cromatográfico.

Muestra / Parámetro		Variable de robustez: Temperatura del horno de la columna		
		30°C	35°C	40°C
Vit B12	Factor respuesta	1.2	1.0	1.4
Dil/Vit B12	Resolución	33.2	31.7	28.1
Vit B12	Factor de coleo	1.1	1.1	1.1
Vit B12	No. de platos teóricos (NPT)	59201	60997	62053
Vit B12 Valoración	Promedio (%)	99.8	99.4	98.4
Diferencia absoluta (%) respecto a la condición nominal (35°C)		0.4		1.0

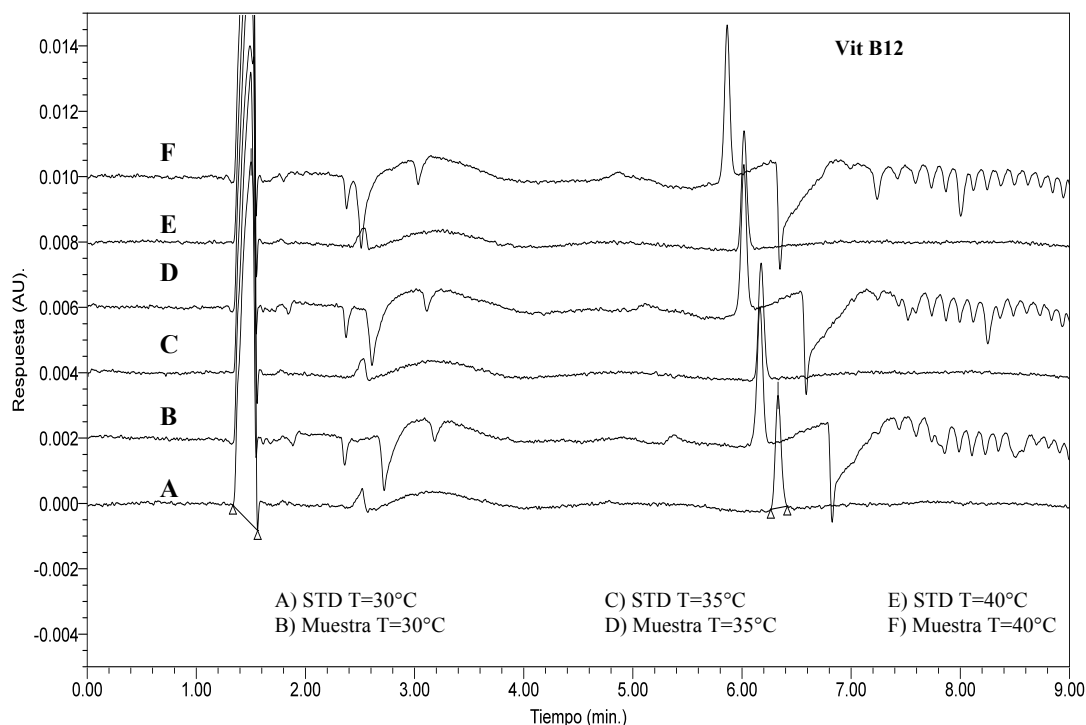


Figura 15. Cromatogramas obtenidos al realizar el cambio de temperatura en el horno de la columna en las condiciones cromatográficas de análisis.

5.2.8.5. Columna (cambio de número de serie).

Los resultados obtenidos para las dos columnas utilizadas con diferente número de serie muestran que no existe diferencia de los resultados del análisis de valoración para cianocobalamina.

Tabla 27. Resultados del cambio de número de serie de la columna cromatográfica.

Muestra/ Parámetro		Variable de robustez	
		Columna ID 2010-052	Columna ID 2010-051
Vit B12	Factor respuesta	1.0	1.4
Dil/Vit B12	Resolución	31.7	32.3
Vit B12	Factor de coleo	1.1	1.0
Vit B12	No. de platos teóricos (NPT)	60997	80986
Vit B12 Valoración	Promedio (%)	99.4	99.6
Diferencia absoluta (%)		0.2	

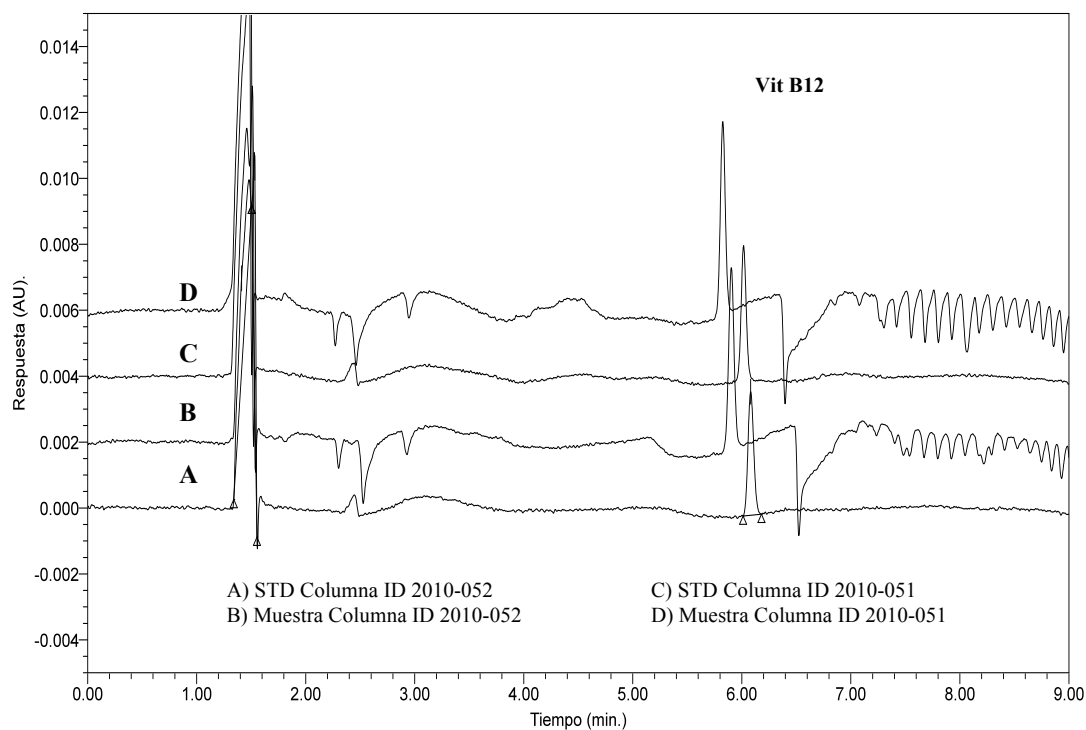


Figura 16. Cromatogramas obtenidos al realizar el cambio de número de serie de la columna cromatográfica.

5.2.8.6. Cartuchos de extracción.

Los resultados obtenidos para la variante de cartucho evaluado muestra que no existe diferencia en el resultado del análisis de valoración para cianocobalamina.

Tabla 28. Resultados del cambio de cartucho de extracción en fase sólida, prueba de valoración.

Muestra / Parámetro		Cartucho de extracción	
		Tipo I (nominal)	Tipo II
Vit B12	Factor respuesta	1.0	1.0
Dil/Vit B12	Resolución	31.7	29.7
Vit B12	Factor de coleo	1.1	1.1
Vit B12	No. de platos teóricos (NPT)	60997	61982
	Promedio (%)	99.4	98.0
	Diferencia absoluta (%)		1.4
Tipo I	On Guard II RP 2.5 cm ³ (Dionex)		
Tipo II	Strata X, 33 µm RP Polimérica 2g/20mL (Phenomenex)		

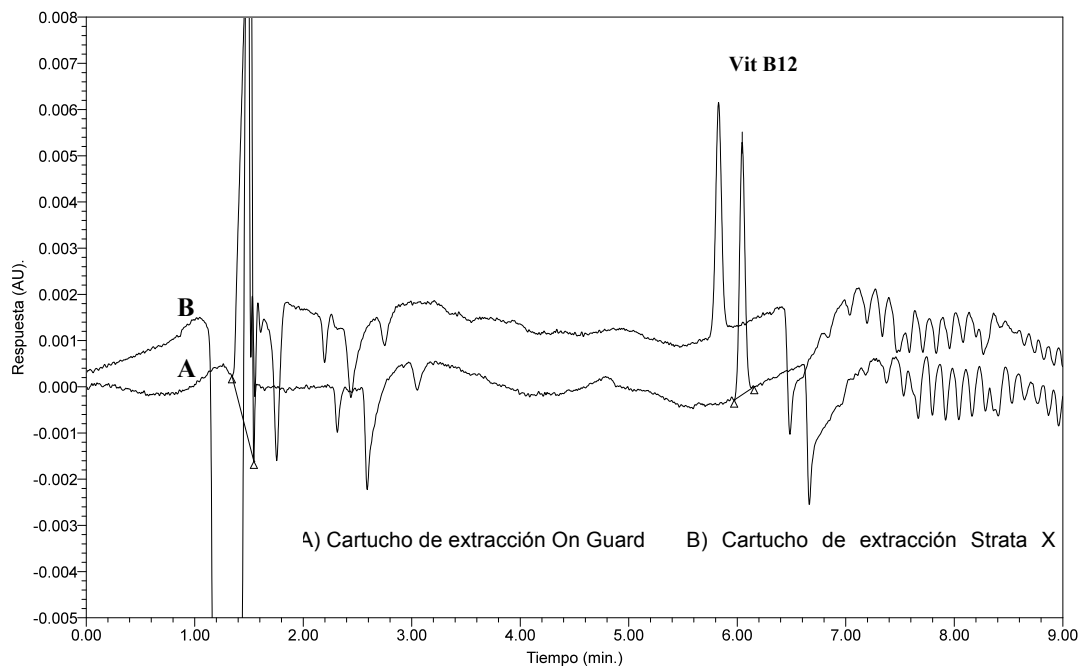


Figura 17. Cromatogramas obtenidos en la muestra al realizar el cambio de cartucho de extracción en fase sólida del tipo I (nominal) al tipo II.

Tabla 29. Resultados del cambio de cartucho de extracción en fase sólida, prueba de valoración.

Muestra /Parámetro		Cartucho de extracción	
		Tipo I (nominal)	Tipo III
Vit B12	Factor respuesta	1.0	1.0
Dil/Vit B12	Resolución	31.7	31.4
Vit B12	Factor de coleo	1.1	1.1
Vit B12	No. de platos teóricos (NPT)	60997	61782
Vit B12	Promedio (%)	99.4	98.5
Diferencia absoluta (%)			1.9
Tipo I	On Guard II RP 2.5 cm ³ (Dionex)		
Tipo III	Strata XL 100 µm RP Polimérico 2g/12mL (Phenomenex)		

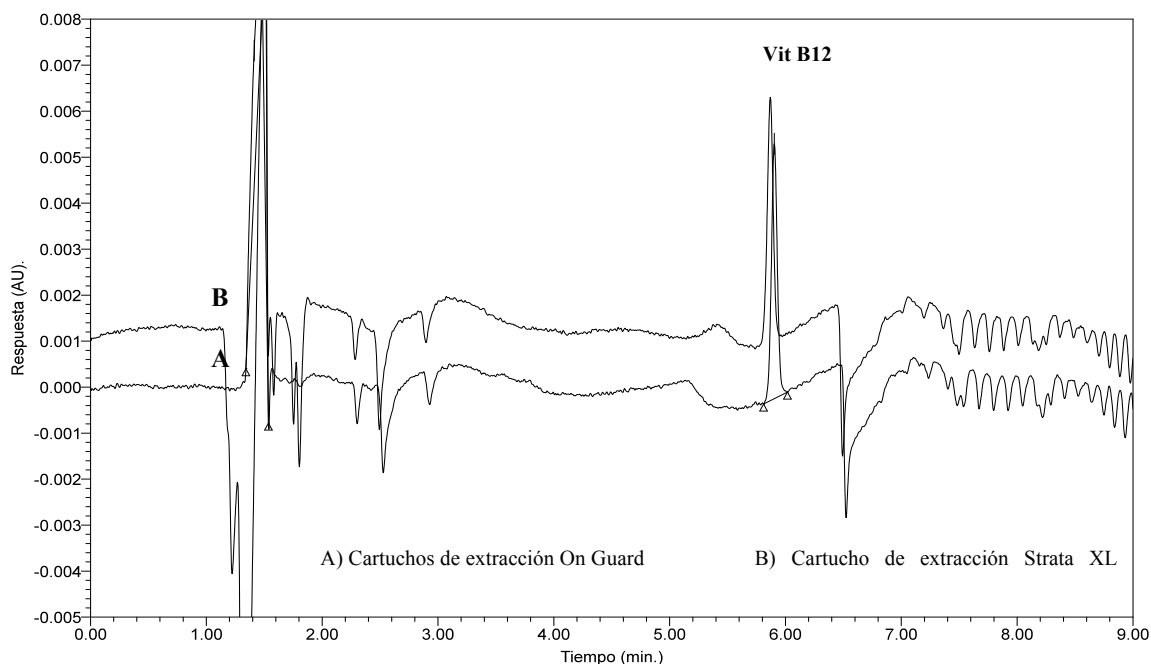


Figura 18. Cromatogramas obtenidos al realizar el cambio de cartucho de extracción en fase sólida del tipo I (nominal) al tipo III.

5.2.9. Resumen de los resultados de la validación del método analítico para cuantificar Cianocobalamina en una solución multivitamínica.

Tabla 30. 31 Resumen de resultados de la validación de la metodología analítica para cuantificar cianocobalamina en una solución multivitamínica.

Parámetro de validación	Criterio de aceptación	Resultado	
Adecuabilidad del sistema	CV de 5 inyecciones consecutivas ≤ 3.0 % CV del factor de respuesta global ≤ 4.0 %	CV de 5 inyecciones consecutivas ≤ 3.0 % CV del factor de respuesta global ≤ 4.0 % Número de platos teóricos ≥ 2000 Factor de coileo ≤ 2.0	
Linealidad del sistema y rango	r^2	Analista A	0.998
		Analista B	0.997
	y-intercepto es ± 6.0% de la respuesta al 100% de la concentración de valoración	Analista A	-0.9 %
		Analista B	-0.5 %
Precisión del sistema	CV (%) del factor respuesta es ≤ 4.0 %	Analista A	1.2 %
		Analista B	1.6 %
Especificidad	El ángulo de pureza debe ser menor que el umbral de ruido para ser considerado que el espectro es homogéneo y pueda interpretarse que se trata de un pico espectralmente puro	El ángulo de pureza de cianocobalamina es menor que el ángulo de ruido en todas las soluciones de prueba	

Continuación **Tabla 2932**. Resumen de resultados de la validación de la metodología analítica para cuantificar cianocobalamina en una solución multivitáminica

Parámetro de validación		Criterio de aceptación	Resultado	
Exactitud del método (placebo adicionado)		$r^2 \geq 0.99$	0.999	
		y-intercepto es $\pm 6.0\%$ de la respuesta al 100 %	-2.4 %	
		Recobro entre: 90.0 % a 110.0 %	94.2 % (97.3 % a 102.8%)	
		Recobro CV $\leq 8.0\%$	1.6 %	
Precisión del método (repetibilidad)		Recobro CV $\leq 8.0\%$	1.2 %	
Precisión del método (precisión intermedia)		Para n=6.(Analista A y B) Recobro CV $\leq 8.0\%$	Analista A	1.4 %
			Analista B	0.8 %
		Diferencia de recobro absoluto entre analistas $\leq 2.0\%$	Analista A	0.7 %
			Analista B	
Estabilidad de la solución stock		La diferencia en cada tiempo de estabilidad es $\pm 4.0\%$ (absoluto) respecto al valor inicial	7 días en condiciones ambientales del laboratorio. Dif. Abs. = 0.8 %	
			7 días en condiciones de refrigeración (5 \pm 3°C) Dif. Abs. = 0.4 %	
Estabilidad de la solución estándar		El cambio en cada tiempo de estabilidad es $\pm 4.0\%$ (absoluto) respecto al valor inicial	7 días en condiciones ambientales del laboratorio. Dif. Abs. = 0.2 %	
			7 días en condiciones de refrigeración (5 \pm 3°C) Dif. Abs. = 1.2 %	
Estabilidad de la muestra		El cambio en cada tiempo de estabilidad es $\pm 4.0\%$ (absoluto) respecto al valor inicial	3 días en condiciones ambientales del laboratorio. Dif. Abs. = 0.8 %	
			7 días en condiciones de refrigeración (5 \pm 3°C) Dif. Abs. = 0.7%	
Robustez	Intervalo de tiempo del gradiente	Cumplimiento de la adecuabilidad del sistema Para n = 3 La diferencia absoluta en la recuperación promedio de cianocobalamina es $\pm 4.0\%$	El método es robusto de: 0.0-7.2 a 0.0- 8.8 min Dif. Abs. = 0.6 -0.5 %	
	Curva de gradiente		El método es robusto de: Curvas de gradiente 5 a 7 Dif. Abs. = 0.3 – 1.1 %	
	Temperatura del horno de la columna (°C)		El método es robusto de: 30°C a 40°C Dif. Abs. = 0.4 - 1.0 %	
	Columna		El método es robusto en: 2 diferentes lotes Dif. Abs. = 0.2 %	
	Filtro de muestra		El método es robusto utilizando: 1 Tipo diferente de filtro Dif. Abs. = 0.2 %	
	Cartucho de extracción		El método es robusto utilizando: 2 diferentes tipos de cartucho Dif. Abs. = 1.4 %	

6. CONCLUSIONES.

Se desarrolló y validó un método analítico para cuantificar cianocobalamina en una solución multivitamínica de administración oral por cromatografía de líquidos de ultra alta eficiencia (U-HPLC), bajo las recomendaciones establecidas en la ICH Q2 (R1), publicaciones científicas y procedimientos internos del laboratorio.

El método analítico validado fue utilizado para soportar los análisis de la fórmula final (estudio de estabilidad acelerada del producto terminado) para finalmente obtener el registro correspondiente ante las entidades regulatorias a nivel nacional.

Fue posible implementar un método analítico confiable utilizando cromatografía de ultra alta eficiencia U-HPLC en combinación con la extracción en fase sólida, permitiendo la reducción en tiempos de análisis así como la disminución de costos y cuidado del medio ambiente debido al ahorro en disolventes orgánicos utilizados convencionalmente en el análisis.

7. GLOSARIO

Adecuabilidad del sistema. Prueba utilizada para verificar que el sistema cromatográfico es adecuado para el análisis que se pretende utilizar.

Analito. Componente específico en una muestra a medir en un análisis.

Corrida analítica. Secuencia de inyecciones realizada bajo las mismas condiciones de análisis.

Especificidad. Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.

Exactitud. Concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

Estabilidad analítica de la muestra. Propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Intervalo. Concentraciones incluidas entre la concentración superior e inferior del analito (incluyendo éstas), para las cuales se ha demostrado que el método analítico es preciso, exacto y lineal.

Límite de cuantificación. Concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y la exactitud establecidas en el método.

Límite de detección. Mínima concentración de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas.

o

Linealidad. Capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra.

Placebo analítico. Muestra que contiene todos los componentes de un producto a excepción del analito.

Precisión. Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.

Precisión del método (precisión intermedia). Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, pero diferentes analistas, en distintos días.

Recobro. Cantidad del analito determinada en el placebo adicionado o muestra adicionada, empleando el método analítico.

Repetibilidad. Precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones (realizadas por un sólo analista, usando los mismos instrumentos y método).

Reproducibilidad. Precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios.

Robustez. Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método.

Sustancia de referencia (estándar de referencia). Sustancia de uniformidad reconocida destinada a utilizarse en comprobaciones analíticas, físicas, químicas o microbiológicas en el transcurso de las cuales sus propiedades se comparan con las sustancias en evaluación.

Tolerancia. Reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación como pueden ser: equipos y columnas. La robustez y la tolerancia son conceptos diferentes, ya que el primero se refiere a la influencia de los factores internos del método, mientras que la tolerancia, se refiere a los factores externos al método.

Validación del método analítico. Proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.

8. BIBLIOGRAFÍA.

1. Snyder Lloyd R., Practical HPLC Method Development, Second Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1997.
2. G. Wang Perry, High-Throughput Analysis in the Pharmaceutical Industry, First Edition, CRC Press, Taylor and Francis Group, New York, 2009.
3. Kazakevich Yuri, HPLC for Pharmaceutical Scientists, First Edition, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2007.
4. Simpson Nigel J.K., Solid-Phase Extraction, Principles, techniques and applications, Marcel Dekker Inc., First Edition, USA 2000.
5. Waters Corporation, Simple preparation products, page web:<http://www.waters.com>, Octubre de 2011.
6. George F. M., Vitamins in foods; analysis, bioavailability and stability", CRC Taylor & Francis Group, 2006, pp 275-285.
7. E. Lester Smith, S. Ball, D. M. Ireland, B12 Vitamins (cobalamins), neutral, basic and acidic cobalamins, Glaxo Laboratories Limited, Greenford, Middlesex, 1952.
8. Izhar A. Ansari, Faiyaz H.M. Vaid and Iqbal Ahmad, Spectral study of photolysis of aqueous cyanocobalamin solutions in presence of vitamins B and C, Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences Vol. 17, No.2, Julio 2004, pp. 93-99.
9. Hiroshi Iwase and Ichiro Ono, Determination of cyanocobalamin in foods by high-performance liquid chromatography with visible detection after solid-phase extraction and membrane filtration for the precolumn separation of lipophilic species, Journal of Chromatography A, Volume 771, Issues 1-2 (1997), pág. 127-134.
10. Remington, Farmacia, 20a Edición Tomo 2, Editorial Médica Panamericana, Argentina 2003, págs. 2175,2176.

-
11. ICH-Q2R (1) "Validation of Analytical Procedures, Text and Methodology". November 2005. <http://www.ich.org>
 12. Eurachem guide, The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, First Edition, 1998. <http://www.eurachem.org>
 13. AOAC, International Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods of Dietary Supplements and Botanicals, página web: <http://www.aoac.org>
 14. Isabel Taverniers, Marc De Loose, Erik Van Bockstaele, Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 23, No. 8, 2004, pp 535-552.
 15. Guía de Validación de Métodos Analíticos, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, AC. 2002.
 16. Chung Chow Chan, Herman Lam, Y. C. Lee, Xue-Ming Zhang, Analytical method validation and instrument performance verification, John Wiley & Sons, Inc., 1a Edición, New Jersey, 2004.
 17. Michael Thompson, Stephen L. R. Ellison and Roger Wood, Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis, *Pure Applied Chemistry*, Vol. 74, No. 5, 2002 pp. 835–855.
 18. Dabre R., Azad N., Schwämmle A., Lämmerhofer M., Lindner W., Simultaneous separation and analysis of water- and fat-soluble vitamins on multi-modal reversed-phase weak anion exchange material by HPLC-UV, *Journal of Separation Science*. Vol. 34, No. 7, 2011, 761–772.
 19. Chen P., Wolf W. R., Castanheira I. Sanches Silva A., A LC/UV/Vis method for determination of cyanocobalamin (VB12) in multivitamin dietary supplements with on-line sample clean-up, *Analytical Methods*, 2010, 2, 1171–1175.
 20. Zafra Gómez A., Garballo A., Morales J. C., García Ayuso L. E., Simultaneous Determination of Eight Water-Soluble Vitamins in Supplemented Foods by Liquid

-
- Chromatography, Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 54, 2006, 4531-4536.
21. Markopoulou C.K., Kagkadis K.A., Koundourellis J.E., An optimized method for the simultaneous determination of vitamins B1, B6, B12, in multivitamin tablets by high performance liquid chromatography, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 30 (2002) 1403-1410.
 22. Moreno P., Salvadó V., Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography, Journal of Chromatography A, Vol. 870 No.1-2, 2000, pp 207–215.
 23. Albalá-Hurtado S., Veciana-Nogués M.T, Izquierdo-Pulido M, Mariné-Font A., Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography, Journal of Chromatography A, Vol. 778 No. 1-2, 1997, pp 247-253.
 24. Iwase H., Ono I., Determination of cyanocobalamin in foods by high-performance liquid chromatography with visible detection after solid-phase extraction and membrane filtration for the precolumn separation of lipophilic species, Journal of Chromatography A, Vol. 771 No. 1-2 , 1997, pp 127-134.
 25. Dalbacke J. Dahlquist I., Determination of vitamin B12 in multivitamin-multimineral tablets by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction, Journal of Chromatography A, Vol. 541, 1991, pp 383-392.
 26. Frenkel E. P., High-Performance Liquid Chromatographic separation of Cobalamins, Journal of Chromatography A, Vol. 174 No. 2, 1979, pp 393-400.
 27. Reference Library (Manuals, Literature, Support, Applications” P/N: 053891-33, October 2008 Dionex Corp. página web: <http://www.dionex.com>. Octubre 2011.