

Artículo original

Desarrollo y validación de un método analítico por HPLC para la determinación de vitaminas hidrosolubles (tiamina, riboflavina, nicotinamida, piridoxina y ácido ascórbico) en un jarabe, en la empresa Neofármaco Cia. Ltda.

Development and validation of an analytical method by HPLC for the determination of water-soluble vitamins (thiamine, riboflavin, nicotinamide, pyridoxine and ascorbic acid) in a syrup at Neofármaco Cia. Ltda.

Dávila C, Santillán R, Pazmiño C*

Laboratorio Neofármaco. Avda Atahualpa y Noboa y Caamaño, Ambato. Ecuador

*Correspondencia: pazminoc@neofarmaco.net

Recibido: 28.05.21; aceptado: 21.07.21

Resumen: El presente trabajo describe el desarrollo, optimización y validación de un método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de fase reversa acoplado con un detector ultravioleta visible (UV-VIS) mediante la técnica de par iónico conjugado (PIC), para la cuantificación de ácido ascórbico, tiamina, riboflavina, nicotinamida y piridoxina en un jarabe multivitamínico. Se utilizó una columna LiChrospher® 100 RP-18 (125 x 4,6 mm, 5 µm). La detección UV se realizó con gradiente de 0,0-6,0 min a 267 nm, 6,1-12,0 min a 290 nm, 12,1-18 min a 248 nm, y de 18,1-24 min a 340 nm. La fase móvil consistió en un buffer PIC 7 pH 2,0, metanol y acetonitrilo usando el gradiente: 0-16 min (80:17,5:2,5), 16-21 min (17,5:80:2,5), y 21-24 min (80:17,5:2,5). El flujo fue de 1 mL/min a 35 °C. El volumen de inyección de la muestra fue de 10 µl. Después del desarrollo y optimización del método se procedió a validarlo, de acuerdo a los parámetros establecidos en el libro de validación de métodos analitos de la Asociación Española de Farmacéuticos en la Industria (AEFI), demostrando ser selectivo con un porcentaje de discrepancia menor al 3,5 %, lineal ($r > 0,998$), preciso (RSD < 1,8247), exacto (recuperación del 97,3 % para ácido ascórbico, 98,4 % para tiamina, 99,9 % para riboflavina, 97,9 % para nicotinamida y 99,0 % para piridoxina), idóneo y robusto. De acuerdo con estos resultados, se demostró que el método analítico desarrollado, optimizado y validado es apropiado para la identificación y cuantificación de vitaminas hidrosolubles en una forma farmacéutica líquida y puede ser aplicado para el control de rutina en el laboratorio.

Abstract: This work describes the development, optimization and validation of a reversed phase high-performance liquid chromatography (HPLC) method coupled with an ultraviolet visible detector (UV-VIS) by means of the conjugated ion pair technique (CIP), for the quantification of ascorbic acid, thiamine, riboflavin, nicotinamide and pyridoxine in combined standard and loaded placebo. A LiChrospher® 100 RP-18 column (125 x 4,6 mm, 5 µm) was used. UV detection was performed with a gradient of 0,0-6,0 min at 267 nm, 6,1-12,0 min at 290 nm, 12,1-18 min at 248 nm, and 18,1-24 min at 340 nm. The mobile phase consisted of a CIP 7 buffer pH 2,0, methanol and acetonitrile using the gradient: 0-16 min (80:17,5:2,5), 16-21 min (17,5:80:2,5), and 21-24 min (80:17,5:2,5). The flow was 1 mL/min at 35 °C. The injection volume of the sample was 10 µl. After the development and optimization of the method, it was validated, according to the parameters established in the book of validation of analyte methods of the Spanish Association of Pharmacists in Industry (AEFI), proving to be selective with a

percentage of discrepancy less than 3,4 %, linear ($r > 0,998$), precise ($RSD < 1,8$), accurate (recovery of 97,3 % for ascorbic acid, 98,4 % for thiamine, 99,9 % for riboflavin, 97,9 % for nicotinamide and 99,0 % for pyridoxine), suitable and robust. According to these results, it was demonstrated that the analytical method developed, optimized and validated is appropriate for the identification and quantification of water-soluble vitamins in a liquid pharmaceutical form and can be applied for routine control in the laboratory.

Palabras clave: Par iónico, Cromatografía, Validación, Método Analítico, Multivitaminas. **Keywords:** Ion pair, Chromatography, Validation, Analytical Method, Multivitamin.

1. Introducción

Los suplementos dietéticos pueden incluir minerales, vitaminas, enzimas, aminoácidos y hierbas; además, se presentan en diversas formas farmacéuticas con el fin de que el organismo obtenga lo necesario para su correcto funcionamiento [1, 2].

En la Farmacopea de Estados Unidos (USP) no se describe un método analítico único para la determinación de varias vitaminas en un suplemento dietético. Debido a ello, se presenta la necesidad de desarrollar un método que permita identificar y cuantificar estos componentes en un jarabe multivitamínico.

La industria farmacéutica maneja altos estándares de calidad asegurando que el producto que llega al paciente sea seguro y eficaz. Esto conlleva métodos de validación en varios procesos entre las cuales están las metodologías analíticas. La validación de dichos procesos es considerado vital al mantener la calidad en los productos farmacéuticos [3, 4].

Tras la importancia mencionada anteriormente, el presente trabajo permitirá verificar que los

datos obtenidos durante los análisis de control de calidad del jarabe multivitamínico cumplan con las especificaciones requeridas, mediante su análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC). El uso de HPLC como método analítico para la cuantificación de vitaminas hidrosolubles se justifica por su elevada sensibilidad, fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, por su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y la sociedad en general [5-7].

El método analítico ha de demostrar selectividad, exactitud, precisión, linealidad y rango, según lo establecido por la Asociación Española de Farmacéuticos en la Industria (AEFI) y así garantizar la fiabilidad de los datos sometidos a las condiciones establecidas en la validación [3].

2. Materiales y métodos

2.1. Instrumental y Reactivos

Los equipos, solventes y reactivos utilizados se detallan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Requerimientos para efectuar la validación.

EQUIPOS/INSTRUMENTOS						
Equipo / Instrumento	Marca	Modelo Nº	Nº Serie	Código	Equipo calificado	Fecha de última calibración
Balanza Analítica	Sartorius	BP2105	70804614	E-CC-061	Cumple	Febrero 2019
Pipeta electrónica	Brand	HandyStep	17E55612	E-CC-075	Cumple	Febrero 2019
Agitador ultrasónico	VWR Scientific Products	75T	17E55612	E-CC-004	NA	NA
Sorbona	WEMA Labortechnik	-----	-----	-----	Cumple	NA

pH-metro		Mettler Toledo	Seven Easy pH	-----	-----	Cumple	Febrero 2019
Conductímetro		Mettler Toledo	Conductivity S230	-----	-----	Cumple	Febrero 2019
HPLC (Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia)		HITACHI	CRO-MASTER VWR	1549043	E-CC-006	Cumple	Febrero 2019
MÓDULOS	Unidad Bomba	HITACHI	CM5160	1533-009		Cumple	Febrero 2019
	Autosampler (Automuestreador)	HITACHI	CM5260	1533-020		Cumple	Febrero 2019
	Horno-Columna	HITACHI	CM5310	1552-016		Cumple	Febrero 2019
	Detector UV-VIS	HITACHI	CM5420	1527-012		Cumple	Febrero 2019
ESTÁNDARES DE REFERENCIA							
Estándar de Referencia	Lote		% Pureza	Proveedor		% Humedad	Fecha de Expiración
Clorhidrato de tiamina	Y01201905022		101,9 %	Gilbert Strategic Partnering S.A.		NA	05/mayo/2022
Riboflavina	SLL/R/0619039		101,1 %	Gilbert Strategic Partnering S.A.		NA	30/abril/2021
Nicotinamida	RNM221812023		98,4 %	Gilbert Strategic Partnering S.A.		NA	08/diciembre/2021
Piridoxina	PH18036120		100,8 %	Gilbert Strategic Partnering S.A.		NA	28/marzo/2022
Ácido ascórbico	1909L8-CO1		102,0 %	Serviquimika S.A.		NA	17/septiembre/2022
COMPOSICIÓN DE PLACEBO							
Excipientes	Lote		Proveedor			Fecha de Expiración	
EDTA disódica	88485797V0		TOP TRADING CIA LTDA.			28/mayo/2022	
Benzoato de sodio	1908V2		RESIQUIM S.A.			17/febrero/2022	
Glicerina	GR902A2006130200		DISAN ECUADOR S.A.			13/diciembre/2021	
Goma xantana	2546114		RESIQUIM S.A.			03/marzo/2023	
Sucralosa	202005026		SERVIQUIMIKA S.A.			13/mayo/2023	
Sorbitol USP	0001700730		DISAN ECUADRO S.A.			02/julio/2022	
Tween 80	200330M095204		PROVEQUIM C.A.			30/marzo/2021	
Esencia naranja fl. apétito	OP-010911		FLORASINTESIS CIA. LTDA			05/noviembre/2021	
REACTIVOS							
Reactivo / Estándar			Marca / Proveedor			Lote / F. Expiración	
Acetonitrilo Grado HPLC			Merck			1864530648 30-Nov-2019	
Metanol			Merck			K46148063446 30-Nov-2019	
Trietilamina Grado HPLC			Merck			S4870452 742 30-Nov-2019	
Agua Grado HPLC <0,5 µS/cm			NEO-FÁRMACO			N/A	

Ácido hexanosulfónico	Fisher Chemicals	168195 Abril/2023
Ácido ortofosfórico	Merck	1.00573.2500 31-Octubre-2021

2.2. Desarrollo del método analítico

En el desarrollo del método analítico, se tomó en cuenta el pretratamiento de la muestra, selección del método cromatográfico, selección del detec-

tor, elección de las condiciones de separación, identificación de principios activos, solución de problemas potenciales hasta llegar a las condiciones óptimas descritas en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Ensayos preliminares.

	Prueba preliminar 1	Prueba preliminar 2	Prueba preliminar 3	Prueba preliminar 4	Método Final
Fase móvil	Buffer pH 2.0:Meta- nol	Buffer pH 2.0:Meta- nol:ACN	Buffer pH 2.0:Meta- nol:ACN	Buffer pH 2.0:Meta- nol:ACN	Buffer pH 2.0:Meta- nol:ACN
Gradiente	(80:20)	Tiempo A:B:C* (72,5:20:7,5)	Tiempo (min) A:B:C* 0-15 (80:17,5:2,5) 15,1-60 (50:43,8:6,3) 60,1-70 (80:17,5:2,5)	Tiempo A:B:C* 0-15 (80:17,5:2,5) 20-23 (17,5: 80:2,5) 27:30 (80:17,5:2,5)	Tiempo (min) A:B:C* Inicial (80:17,5:2,5) 06 (80:17,5:2,5) 16 (17,5:80:2,5) 18 (17,5:80:2,5) 21 (80:17,5:2,5) 24 (80:17,5:2,5)
Tiempo de ejecución	20 min	60 min	70 min	30 min	24 min
Flujo	1 mL/min	1 mL/min	1 mL/min (isocrático) 1,2 mL/min (gradi- ente)	1 mL/min	1 mL/min
Temperatura	35 °C	35 °C	35 °C	35 °C	35 °C
Volumen de inyección	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL

* A: Buffer PIC 7 pH 2.0 B: Metanol y C: Acetonitrilo

Para la correcta separación de las vitaminas, se empleó un cartucho cromatográfico LiChrospher® 100 RP-18 (150 x 4,6 mm, 5 µm), a temperatura de 35 °C. La fase móvil del sistema HPLC, a un flujo de 1,0 mL/min, consistió en A: buffer PIC 7 pH 2,0, B: Metanol y C: Acetonitrilo, en donde el buffer se encontró conformado por agua grado HPLC y ácido heptano sulfónico 50 mM, que a su vez fue ajustado a pH 2,0 con ácido orto-fosfórico.

Se utilizó un gradiente de varias etapas, comenzando en A:B:C con una composición de 80:17,5:2,5 durante 16 min; a continuación, se realizó un cambio de gradiente a 17,5:80:2,5 res-

pectivamente durante 5 min; y por último, se cambió a condiciones iniciales hasta alcanzar los 24 min.

Se empleó un detector de matriz de fotodiodos; sin embargo, la cuantificación se realizó a distintas longitudes de onda máxima para cada vitamina, presentando tiempos de retención como se expone en la **Tabla 3**. La identificación de los picos resueltos en las muestras se ha ejecutado comparando sus espectros con los obtenidos de las soluciones estándares [8].

El volumen de inyección fue de 10 µL. Las condiciones cromatográficas se eligieron teniendo

Tabla 3. Condiciones de operación para la determinación de vitaminas hidrosolubles por HPLC.

Fase estacionaria:	Columna Lichrospher® 100 RP-18, 5 µm						
Fase móvil:	Buffer PIC 7 pH 2,0:Metanol:Acetonitrilo						
Flujo:	1.0 mL/min						
Gradiente:		Tiempo (min)	Buffer pH 2	Metanol	Agua	ACN	Flujo
		Inicial	80,00	17,50	0,00	2,5	1,00
		6,00	80,00	17,50	0,00	2,5	1,00
		16,0	17,5	80,0	0,00	2,5	1,00
		18,0	17,5	80,0	0,00	2,5	1,00
		21,0	80,00	17,50	0,00	2,5	1,00
		24,0	80,00	17,50	0,00	2,5	1,00
	Detector:		Tiempo (min)	UV-VIS (nm)			
		0,0-6,0	267 nm				
		6,1-12,0	290 nm				
		12,1-18,0	248 nm				
		18,1-24,0	400 nm				
Volumen de inyección:	10 µL						
Temperatura de la columna:	35 °C						
Tiempo	24 minutos						

en cuenta la forma de pico, eficiencia de la columna, tiempo de análisis cromatográfico, selectividad y resolución.

2.3. Preparación de las soluciones

Las alícuotas y aforos utilizados para la preparación de soluciones se detallan en la **Tabla 4**. Todas las soluciones se almacenaron en refrigeración, cubiertas con papel de aluminio para protegerlos de la luz.

2.3.1. Estándar combinado

Los estándares de trabajo fueron preparados el día del análisis tomando alícuotas para su dilución a partir de las soluciones madre de concentración 10 mg/mL.

2.3.2. Placebo cargado

El placebo cargado se preparó de acuerdo a la composición del jarabe, exceptuando las vitaminas analizadas, siguiendo el procedimiento propio del laboratorio.

2.3.3. Solución buffer pH 2,0

Para preparar 1 litro de solución buffer 50 mM

de PIC 7, se pesaron 10,112 g de ácido 1-heptanosulfónico y se ajustó a pH 2,0 con ácido orto-fosfórico al 85 %. Filtrar por 0,22 µm y sonicar.

2.4. Validación del método analítico

El método descrito en este artículo ha sido evaluado bajo los ensayos de selectividad, linealidad y rango, precisión, exactitud y robustez, expuestos en el libro de validación de métodos analíticos de la AEFI.

2.4.1. Selectividad

La selectividad es la capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultánea o separadamente los analitos de interés, de forma inequívoca en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz [3].

En una valoración, la demostración de selectividad requiere evidencia de que el procedimiento no resulta afectado por la presencia de impurezas o excipientes. Cuando se utilizan procedimientos cromatográficos, deberán presentarse cromatogramas representativos para demostrar

Tabla 4. Preparación de soluciones.

Ensayo	Diluciones			C (mg/mL)	Factor de dilución	
Valoración	Aforo (mL) Solución madre 10 mg/mL 50:50 H ₂ O:Metanol	Alícuota (mL)	Aforo (mL) Fase móvil			
Estándar	10	0,058	25*	0,023	4310,340	
	10	0,082		0,039	3048,780	
	10	0,588		0,235	425,170	
	10	0,073		0,029	3424,660	
	10	3,000		1,200	83,330	
Placebo cargado	3 mL solución madre ácido ascórbico			25*	1,200	83,330
	0,058 mL solución madre tiamina				0,023	4310,340
	0,082 mL solución madre riboflavina				0,033	3048,780
	0,588 mL solución madre nicotinamida				0,235	425,170
	0,073 mL solución madre pirodoxina				0,029	3424,660
Placebo			25*	0,140	25	

el grado de selectividad y los picos deberán identificarse adecuadamente.

La determinación de la selectividad se realizó comparando el resultado (área bajo la curva) entre la solución de estándar combinado y placebo cargado. El criterio de aceptación se evaluó con el porcentaje de discrepancia, que debe ser inferior al 4 %, y se calcula con la siguiente fórmula:

$$\%RSD = \frac{AUC \text{ placebo cargado} - AUC \text{ estándar combinado}}{AUC \text{ estándar combinado}} \times 100$$

2.4.2. Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales a la concentración de analito en muestras dentro de un intervalo dado [3].

La linealidad fue ejecutada por una serie de estándares mixtos de las vitaminas, que abarcan el

rango de trabajo completo; se realizó el análisis a siete niveles de concentración en el rango de 50 % a 250 %. Cada solución fue inyectada tres veces. El análisis de regresión reveló ecuaciones de calibración con los respectivos coeficientes de correlación, la intersección con el eje de ordenadas, la pendiente de la línea de regresión y la suma de los cuadrados residuales (Tabla 5).

2.4.3. Rango

El rango de un procedimiento analítico es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito (incluyendo estos niveles) en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad, utilizando el procedimiento según se describe por escrito. El rango del procedimiento se valida verificando que el procedimiento analítico proporciona precisión, exactitud y linealidad aceptables cuando se aplica a muestras que contienen el analito en los extremos del intervalo, al igual que dentro del mismo (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados del análisis de validación de vitaminas hidrosolubles.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN		VITAMINAS					DECISIÓN
		AC. ASCÓRBICO	NICOTINAMIDA	PIRIDOXINA	RIBOFLAVINA	TIAMINA	
SELECTIVIDAD							
Porcentaje de discrepancia	≤ 4,0 % (Áreas)	1,4	3,4	1,6	3,5	1,6	Cumple
Porcentaje de discrepancia	≤ 4,0 % (Tiempos)	0,5	0,6	0,6	0,5	0,2	Cumple
Tiempo de retención promedio	Informativo	1,146	4,219	9,888	2,868	14,652	Cumple
LINEALIDAD							
Coeficiente de correlación	r ≥ 0,998	Estándar	Estándar	Estándar	Estándar	Estándar	Cumple
		0,999	0,999	0,999	0,999	0,999	
Coeficiente de determinación	≥ 0,990	Placebo cargado	Cumple				
		0,999	0,999	0,999	0,999	0,998	
Coeficiente de variación de los factores respuesta	El coeficiente de variación de los factores respuesta debe ser ≤ 2,0 %	Estándar	Estándar	Estándar	Estándar	Estándar	Cumple
		0,4	0,3	0,6	0,4	1,0	
Regresión lineal	La regresión es estadísticamente representativa, la pendiente es distinta de 0	Placebo cargado	Cumple				
		0,4	0,4	0,8	0,7	0,9	
Homogeneidad de varianzas	p (valor) ≥ 0,05 Test de Levene Permite indicar si el factor concentración tiene alguna influencia en la variabilidad de los resultados	Estándar	Estándar	Estándar	Estándar	Estándar	Cumple
		0,6	0,5	0,6	0,6	0,7	
Homocedasticidad	Revisión de residuos	Placebo cargado	Cumple				
		1,0	0,8	0,8	0,9	0,8	
No hay tendencias, la gráfica de residuos muestra una distribución aleatoria de los puntos							
El factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados	p(valor) ≥ 0,05	Estándar	Estándar	Estándar	Estándar	Estándar	Cumple
		0,6	0,5	0,6	0,7	0,7	
Comparación placebo cargado vs estándar	p(valor) ≥ 0,05	Placebo cargado	Cumple				
		1,0	0,8	0,8	0,9	0,8	
Comparación placebo cargado vs estándar	p(valor) ≥ 0,05	Estándar	Estándar	Estándar	Estándar	Estándar	Cumple
		0,9	0,9	1,0	1,0	0,9	

Pendiente	Correlación lineal significativa $b \neq 0$	Estándar P (valor) 0,0000 Placebo cargado P (valor) 0,0000	Estándar P(valor) 0,0000 Placebo cargado P (valor) 0,0000	Estándar P (valor) 0,0000 Placebo cargado P (valor) 0,0000	Estándar P (valor) 0,0000 Placebo cargado P (valor) 0,0000	Estándar P (valor) 0,0000 Placebo cargado P (valor) 0,0000	Cumple	
RANGO								
Precisión Repetibilidad	El coeficiente de variación de los factores respuesta debe ser $\leq 2,0 \%$	50 %	0,92	1,37	1,59	0,29	0,19	Cumple
		75 %	0,20	0,33	0,61	0,48	0,70	Cumple
		100 %	2,0	0,65	0,35	0,86	1,2	Cumple
		125 %	0,50	0,52	0,21	0,48	0,18	Cumple
		150 %	0,66	0,60	0,10	0,62	0,32	Cumple
		200 %	0,23	0,44	0,80	0,43	0,68	Cumple
		250 %	0,22	0,30	0,42	0,68	0,86	Cumple
Exactitud Porcentaje de recuperación	97 % - 103 %	50 %	97,30	97,23	98,05	97,86	98,15	Cumple
		75 %	97,76	99,83	98,39	99,66	97,15	Cumple
		100 %	97,48	98,21	98,80	100,42	98,29	Cumple
		125 %	97,38	97,80	99,63	100,17	99,63	Cumple
		150 %	97,55	98,19	99,56	101,16	98,06	Cumple
		200 %	99,24	97,35	99,01	100,95	99,20	Cumple
		250 %	99,12	98,45	99,23	99,97	98,31	Cumple
EXACTITUD								
Porcentaje de recuperación	97 % - 103 %	97,3 %	97,9 %	99 %	99,9 %	98,4 %	Cumple	
PRECISIÓN								
Repetibilidad del sistema	Coeficiente de variación $\leq 2,0 \%$	0,6	1,7	1,1	1,8	0,8	Cumple	
Repetibilidad del método	Coeficiente de variación menor o igual a 2 %	0,2	0,5	0,9	0,3	0,9	Cumple	
Precisión intermedia	Coeficiente de variación $\leq 4 \%$	0,5	0,3	1,3	1,8	3,2	Cumple	
	$p \text{ (valor)} \geq 0,05$	0,06	0,15	0,80	0,09	0,12	Cumple	

ESTABILIDAD DE LA SOLUCIÓN									
% Diferencia absoluta (AUC) Estándar combinado	RSD 2 %	AMBIENTE	4	0,055	0,055	0,632	0,415	0,765	Cumple
			12	0,172	0,172	3,266	9,116	0,044	No Cumple
			24	1,003	1,003	4,884	9,073	6,915	No Cumple
		REFRIGERACIÓN	4	0,120	0,120	0,195	0,432	0,345	Cumple
			12	3,028	3,028	6,335	3,705	2,582	No Cumple
			24	1,328	1,328	6,253	7,046	9,132	No Cumple
		CONGELACIÓN	4	0,040	0,040	0,047	0,398	0,045	Cumple
			12	1,656	1,656	7,836	5,977	3,407	No Cumple
			24	2,181	2,181	7,899	0,294	11,807	No Cumple
% Diferencia absoluta (AUC) Placebo cargado	RSD 2 %	AMBIENTE	4	0,2054	0,8317	0,4716	0,4351	1,6621	Cumple
			12	1,5553	2,3171	16,6641	0,2949	13,7231	No Cumple
			24	4,4217	5,9414	7,3071	7,6266	9,5200	No Cumple
		REFRIGERACIÓN	4	1,3139	1,4489	0,5853	3,7041	0,3691	Cumple
			12	4,5968	0,0939	5,6023	1,1274	2,3201	No Cumple
			24	1,2240	1,0838	9,5419	4,9963	14,6838	No Cumple
		CONGELACIÓN	4	0,0587	0,1001	0,2485	0,2499	0,2767	Cumple
			12	0,6886	0,2810	14,5087	1,2792	14,0834	No Cumple
			24	2,1945	2,8505	13,7976	1,0482	16,3286	No Cumple
IDONEIDAD DEL SISTEMA									
PRECISIÓN DEL SST	RSD ≤ 2,0 %	0,41 %	0,56 %	1,93 %	0,30 %	0,76 %	Cumple		
NÚMERO DE PLATOS TEÓRICOS	N>1000	1451	3972	10712	1594	61264	Cumple		
RESOLUCIÓN	> 2,0	-----	8,697	7,776	1,074	2,110	Cumple		
ASIMETRÍA	< 2,0	3,51	2,00	1,27	1,45	2,9	Cumple		
INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN									
INCERTIDUMBRE COMBINADA	< 2,0 %	0,032 %	0,057 %	0,048 %	0,066 %	0,044 %	Cumple		
INCERTIDUMBRE EXPANDIDA	< 2,0 %	0,065 %	0,011 %	0,097 %	0,13 %	0,088 %	Cumple		

2.4.4. Precisión (Intermedia)

La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestras homogéneas [3].

La precisión intermedia (también conocida como tolerancia o fortaleza) expresa la variación dentro de un laboratorio, por ejemplo, en diferentes días, con diferentes analistas o con equipos diferentes dentro del mismo laboratorio [3].

La determinación se realiza usando un mínimo

de seis determinaciones al 100 % de la concentración de prueba, con un coeficiente de variación de las respuestas (área bajo la curva) máximo del 4 %.

$$\%RSD = \frac{\text{Desviación estándar relativa}}{\text{Promedio}} \times 100$$

2.4.5. Precisión (Repetibilidad)

La repetibilidad se refiere a la utilización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un período corto por el mismo analista con el mismo equipo [3].

La determinación se realizó usando un mínimo de seis determinaciones al 100 % de la concentración de prueba, con un coeficiente de variación de las respuestas (área bajo la curva) máximo del 2 %.

$$\%RSD = \frac{\text{Desviación estándar relativa}}{\text{Promedio}} \times 100$$

2.4.6. Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero. La exactitud de un procedimiento analítico debe establecerse en todo su intervalo. Se determina con la recuperación del analito (porcentaje de recuperación) en todo el intervalo de la valoración, o evaluando la linealidad de la relación entre las concentraciones estimadas y las reales. El criterio de aceptación establecido es de 97 a 103 % y se calcula a partir de la siguiente fórmula [3]:

$$\%RSD = \frac{AUC \text{ placebo cargado}}{AUC \text{ estándar combinado}} \times \frac{\text{Conc. estándar vitamina}}{\text{Conc. muestra vitamina}} \times 100$$

2.4.7. Robustez

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no ser afectado por variaciones pequeñas, aunque deliberadas, en los parámetros del procedimiento indicados en la documentación, y provee una indicación de su aptitud durante condiciones normales de uso. La robustez puede determinarse durante la etapa de desarrollo del procedimiento analítico [3, 4].

En el diseño experimental de superficie respuesta (Tabla 6), los experimentos se desarrollaron en los niveles bajo y alto de cada factor, en el nivel central la mitad entre el nivel bajo y alto, y (para algunos diseños) en una distancia más pequeña

arriba del nivel bajo y abajo del nivel alto utilizado; el diseño utilizado fue el de Draper-Lin el cual es un diseño en el que una porción central es menor que una resolución V y que consiste en un factorial fraccionado o Plackett-Burman, más unos puntos estrella [9].

2.4.8. Estabilidad

En el ensayo de estabilidad de la solución, se evaluó la desviación estándar relativa de áreas de estándares combinados y placebo cargado al someter las muestras a condiciones de temperatura: ambiente, refrigeración y congelación, en un tiempo de almacenamiento de 4, 12 y 24 horas de almacenamiento.

$$\%RSD = \frac{\text{Desviación estándar relativa}}{\text{Promedio}} \times 100$$

2.4.9. Aptitud del sistema

Las pruebas de aptitud del sistema se basan en el concepto de que el equipo, el sistema electrónico, las operaciones analíticas y las muestras a analizar constituyen un sistema integral que puede evaluarse como tal. Son especialmente importantes en el caso de procedimientos cromatográficos [3].

Las inyecciones repetidas de una preparación estándar u otras soluciones estándares se comparan entre sí para determinar si se cumplen los requisitos de precisión. La determinación se realizó evaluando la desviación estándar relativa (RSD), que no debe ser mayor a 2 %, resolución mayor a 2, asimetría menor a 2 y eficiencia de platos teóricos mayor a 2000 de 6 inyecciones repetidas al 100 % [3].

$$\%RSD = \frac{\text{Desviación estándar relativa}}{\text{Promedio}} \times 100$$

Tabla 6. Espacio de diseño evaluado en robustez.

Factor	Unidades	Bajo	Alto
Flujo	mL/min	0,8	1,2
Temperatura	°C	33	37
Orgánico	%	80	85
pH	-	1,8	2,2

2.5. Incertidumbre de la medición

Es una estimación que va paralela al resultado de un ensayo, y se define como el intervalo de valores donde se afirma que se encuentra el valor verdadero [10].

Para el cálculo de incertidumbre, se tiene en cuenta maquinaria, material y mano de obra como principales factores que influyen sobre el cálculo de este parámetro. Se calcula el porcentaje de incertidumbre de la medición al sumar los porcentajes de error individuales de cada factor.

2.6. Procesamiento de datos

Se utilizó el paquete estadístico Statgraphics V18.1 (**Anexo A**), y el software Libre office para el procesamiento de los datos.

Anexo A. Licencia de uso de Software Statgraphics.

3. Resultados y discusión

3.1. Desarrollo del método analítico

En el desarrollo del método analítico se evaluaron varios parámetros físico-químicos (pKa, solubilidad, pH) que permitieron desarrollar un método analítico adecuado para ser validado; en conjunto con una revisión bibliográfica adecuada, se establecieron las condiciones de operación (**Tabla 2**).

Al tener una mezcla compleja de vitaminas con características físico-químicas distintas, se evaluó la incidencia de los factores: pH, concentración de orgánico, temperatura de la columna y flujo sobre la separación de las mismas. El pH ácido de la fase móvil repercute en el estado de ionización de las vitaminas, el pKa de cada



vitamina va a determinar si es un ácido o una base, las especies básicas o ligeramente básicas se van a encontrar en su forma ionizada reaccionando con el reactivo PIC, en consecuencia, aumentando su retención en la fase estacionaria. En las primeras etapas del desarrollo analítico se fueron probando distintos valores de pH para determinar el valor óptimo al cual se logra una separación adecuada; los tiempos de ejecución del análisis superaban los 60 min por lo que se aplicó un gradiente de elución que redujo significativamente los tiempos de ejecución. La secuencia de estos eventos cromatográficos se encuentra resumida en el **Anexo B**. Finalmente se aumentó el área de respuesta individualizando la longitud de onda de cada vitamina desde el primer ensayo preliminar hasta obtener el método final optimizado [5, 6].

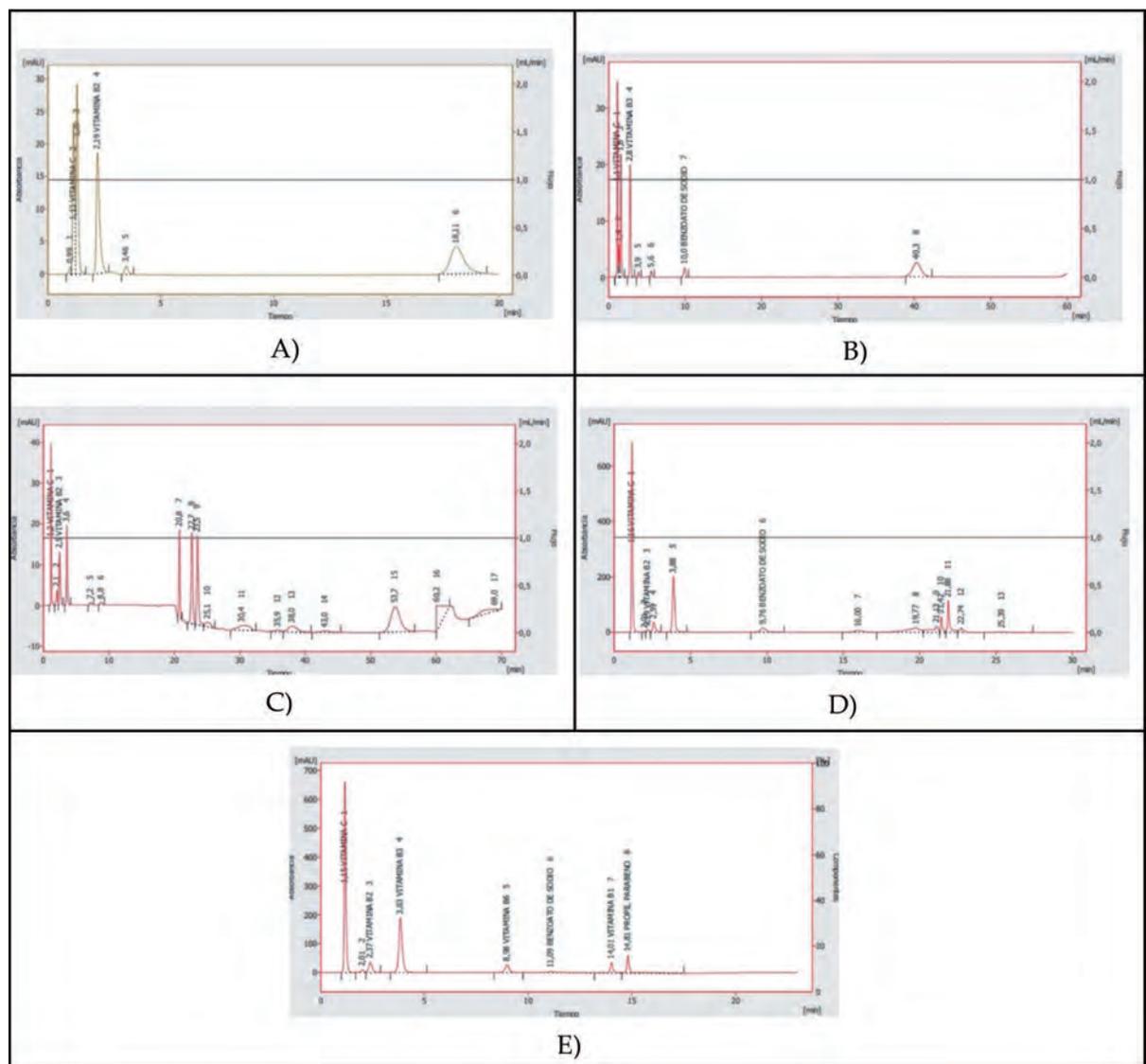
3.2. Validación del método analítico

3.2.1. Selectividad

En la **Tabla 5** se muestra el porcentaje de discrepancia de cada vitamina hidrosoluble. El objetivo del ensayo fue poder determinar si el método posee la capacidad de medir y valorar al mismo tiempo o a distinto tiempo los analitos de interés [11]. Para las vitaminas de interés, se determinaron porcentajes de discrepancia de áreas y tiempos de retención, siendo para tiamina 1,6 y 0,2 %, riboflavina 3,5 y 0,5 %, nicotinamida 3,4 y 0,6 %, piridoxina 1,6 y 0,6 % y ácido ascórbico 1,4 y 0,5 %.

Estos resultados indican que no existe una mayor interferencia entre los elementos del placebo y las vitaminas y se encuentran dentro de los

Anexo B. Pruebas preliminares: A) tiempo de ensayo 20 min. B) tiempo de ensayo 60 min. C) tiempo de ensayo 70 min. D) tiempo de ensayo 30 min. E) tiempo de ensayo 24 min.

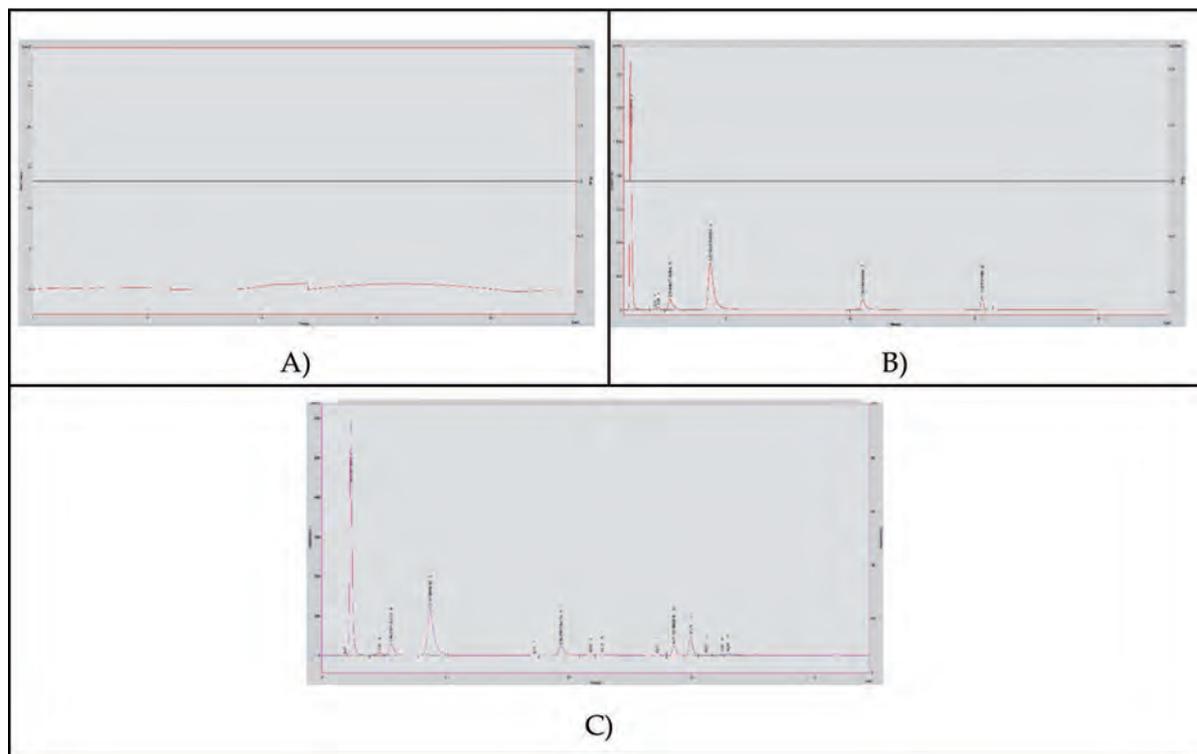


rangos establecidos; sin embargo, el porcentaje de discrepancia de las áreas de riboflavina y nicotinamida es mayor a las demás; esto se debe a la degradación por condiciones ambientales a las cuales se encuentran expuestas las muestras y estándares; el aumento casi similar de las dos vitaminas se debe a que ambas eluyen en tiempos muy cercanos. En los cromatogramas expuestos en el **Anexo C** se observa el blanco de la fase móvil y el placebo que no interfiere con la elución de los principios activos y no genera sobreposición entre los picos.

3.2.2. Linealidad

El ensayo de linealidad en la validación demostró que el método HPLC proporciona una respuesta lineal de acuerdo a las concentraciones a las cuales se evaluó cada vitamina. Se ha analizado la respuesta de soluciones estándares combinados (linealidad del sistema) y soluciones placebo cargado (linealidad del método) a concentraciones de 50 %, 75 %, 100 %, 125 %, 150 %, 200 % y 250 %. Los resultados se presentan en la **Tabla 5**.

Anexo C. Selectividad. A) Blanco de fase móvil; B) Estándar combinado; C) Placebo cargado.



Los cromatogramas expuestos en los **Anexos D** y **E** muestran un crecimiento proporcional a la concentración de cada vitamina; la riboflavina presenta coelución con su componente 5-fosfato al aumentar la concentración, como se observa en los cromatogramas de 200 % y 250 % debido a la poca resolución que tienen entre sí.

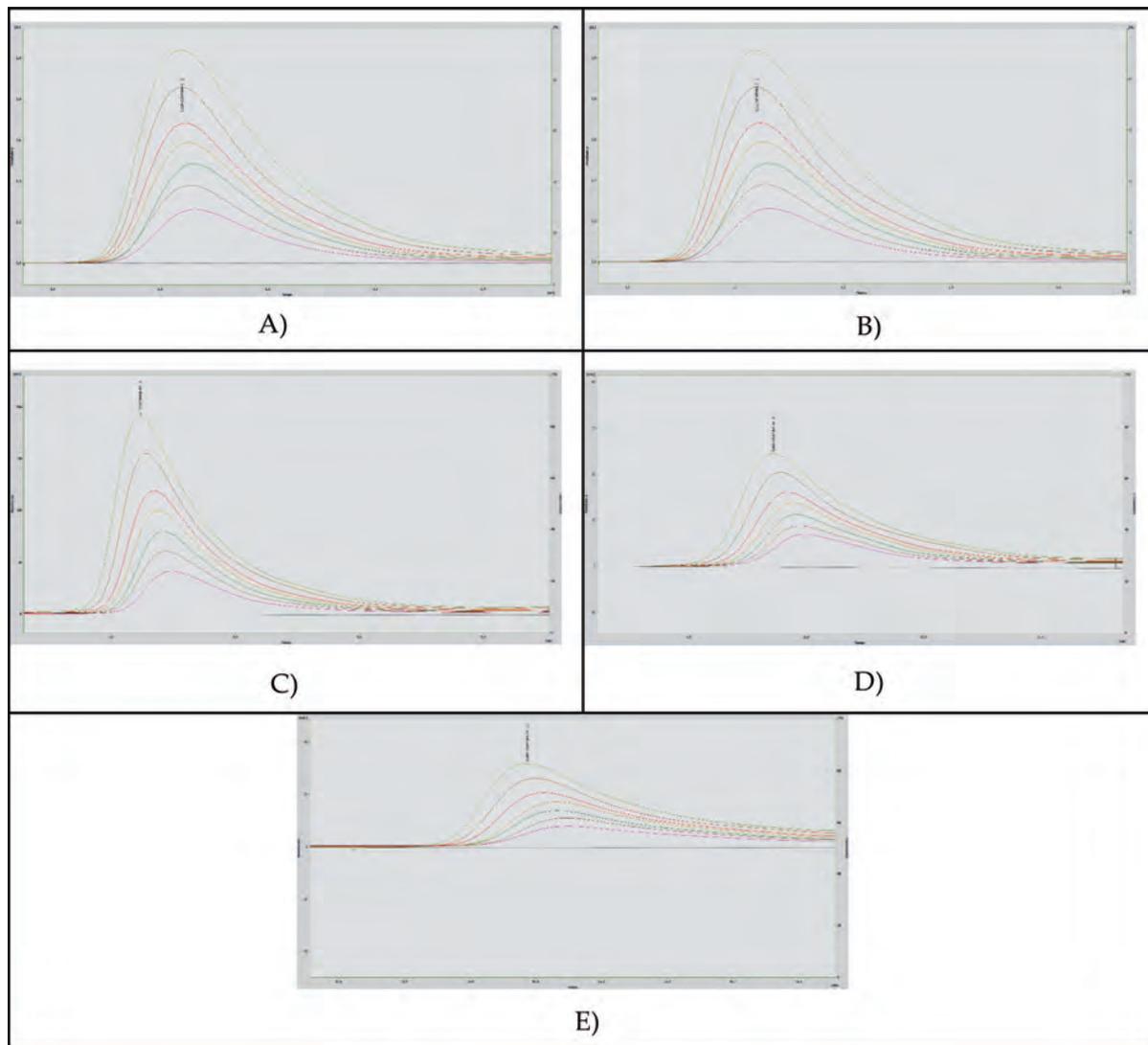
El coeficiente de correlación entre las muestras analizadas oscila entre $r=0,999$ a $r=0,999$ para el estándar combinado y entre $r=0,998$ a $r=0,999$ para el placebo cargado; el ensayo de coeficiente de determinación en las muestras analizadas oscila entre $r=0,998$ a $r=0,999$ para el estándar combinado y entre $r=0,997$ a $r=0,999$ para el placebo cargado, las cuales cumplen con el criterio de $r^2 \geq 0,990$; el coeficiente de variación del factor respuesta tiene un

criterio de aceptación menor o igual al 5 %, considerándose como falta de linealidad los valores que excedan este rango. Todas las respuestas obtenidas se encontraron dentro del rango menor a 5 %.

El siguiente criterio evaluado es la pendiente (b), la cual se encuentra relacionada con la sensibilidad del método, de forma que a mayor pendiente mayor sensibilidad (respuesta del método frente a los cambios de la concentración del analito). Este valor proviene de la regresión lineal y debe ser significativamente diferente de cero.

Para determinar la homogeneidad de varianzas, se aplicó el test de Levene, que permite indicar si el factor concentración tiene alguna influencia en la variabilidad de los resultados;

Anexo D. Linealidad del método. Rango de 50 a 250 %: A) ácido ascórbico, tiempo de retención 1,14 min. B) riboflavina, tiempo de retención 2,78 min. C) nicotinamida, tiempo de retención 4,30 min. D) piridoxina, tiempo de retención 10,18 min. E) tiamina, tiempo de retención 15,25 min.



se aplicó tanto a estándar combinado como a placebo cargado y se considera aceptado cuando p (valor) es mayor a 0,05. La varianza residual (homocedasticidad) aporta información sobre la validez del modelo. En este parámetro se evaluó la distribución aleatoria de los puntos representados en el gráfico de residuos, los cuales no reflejan ninguna tendencia. Esta distribución aleatoria se refleja en los gráficos de residuos para cada vitamina de la solución estándar combinado y placebo cargado en los **Anexos F y G**, respectivamente.

Finalmente, se compararon las medias entre el placebo cargado y el estándar combinado con una prueba de t -student para determinar si exis-

ten diferencias significativas entre ambas muestras; se considera aprobado cuando el p (valor) es mayor a 0,05 al 95 % de confianza; para todas las vitaminas el p (valor) es mayor a 0,05.

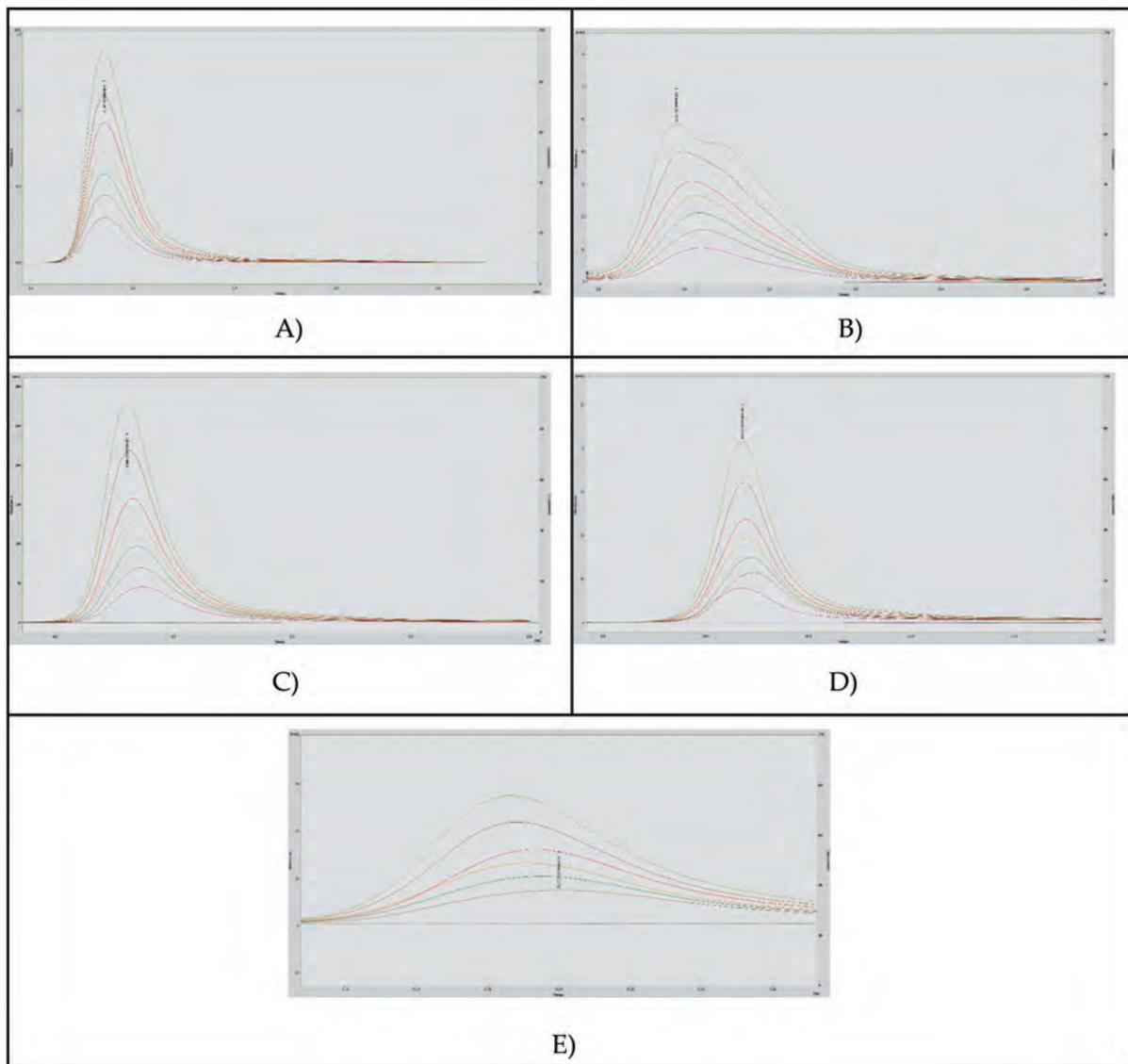
3.2.3. Rango

Se evaluó la exactitud y precisión en función del coeficiente de variación y el porcentaje de recuperación, respectivamente, en el rango de 50 % a 250 % de cada vitamina, encontrándose dentro de los valores establecidos, como se detalla en la **Tabla 5**.

3.2.4. Exactitud

En el ensayo de exactitud, se determinó el porcentaje de recuperación del estándar en el placebo

Anexo E. Linealidad del sistema. Rango de 50 a 250 %: A) ácido ascórbico, tiempo de retención 1,12 min. B) riboflavina, tiempo de retención 2,66 min. C) nicotinamida, tiempo de retención 4,12 min. D) piridoxina, tiempo de retención 9,86 min. E) tiamina, tiempo de retención 15,04 min.



cargado según a especificación de 97 % - 103 % de cada una de las vitaminas analizadas. Como se detalla en la **Tabla 5**, el porcentaje de recuperación de todas las vitaminas hidrosolubles se encuentra dentro del rango de aceptación.

3.2.5. Precisión

En el ensayo de precisión, se evaluó repetibilidad y precisión intermedia del sistema y del método en etapas distintas. Los resultados obtenidos en este ensayo se encuentran plasmados en la **Tabla 5**.

El coeficiente de variación de riboflavina, en el análisis de repetibilidad del sistema fue 1,8, valor que, aunque no se encuentra fuera del rango establecido para este ensayo, se debe a la natura-

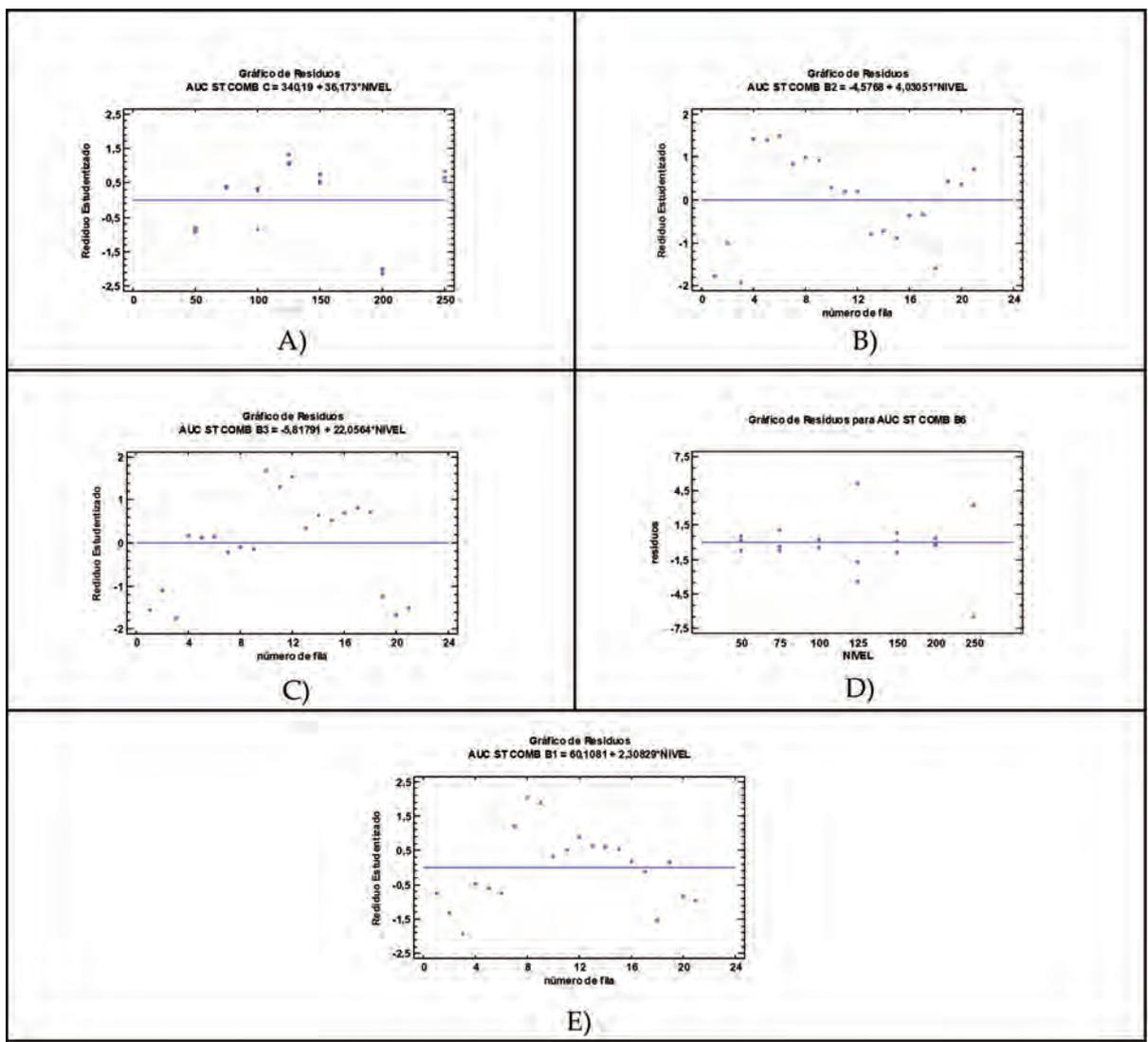
leza inestable de la vitamina frente a condiciones ambientales, observándose variación en el área bajo la curva de las muestras inyectadas.

Para el ensayo de repetibilidad del método, el coeficiente de variación más elevado es el de la piridoxina, con un 0,9 %, que se encuentra dentro del rango establecido.

La precisión intermedia evalúa la variación del método al realizar inyecciones consecutivas sobre la misma muestra en condiciones operativas diferentes, para lo cual se evaluó la variación entre analistas y días distintos.

Estadísticamente se evaluó la diferencia significativa de medias entre el analista A y el analista B para un 95 % de confianza y se determinó que

Anexo F. Gráficos de dispersión de estándar combinado: A) ácido ascórbico B) riboflavina C) nicotinamida D) piridoxina E) tiamina.



no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos analistas.

3.2.6. Estabilidad

El ensayo de estabilidad de la solución se realizó a 4, 12 y 24 horas. En la **Tabla 5** se detalla el porcentaje de degradación de principios activos evaluados frente a factores como temperatura ambiente, refrigeración y congelación en comparación con las condiciones normales de tiempo y temperatura del método analítico.

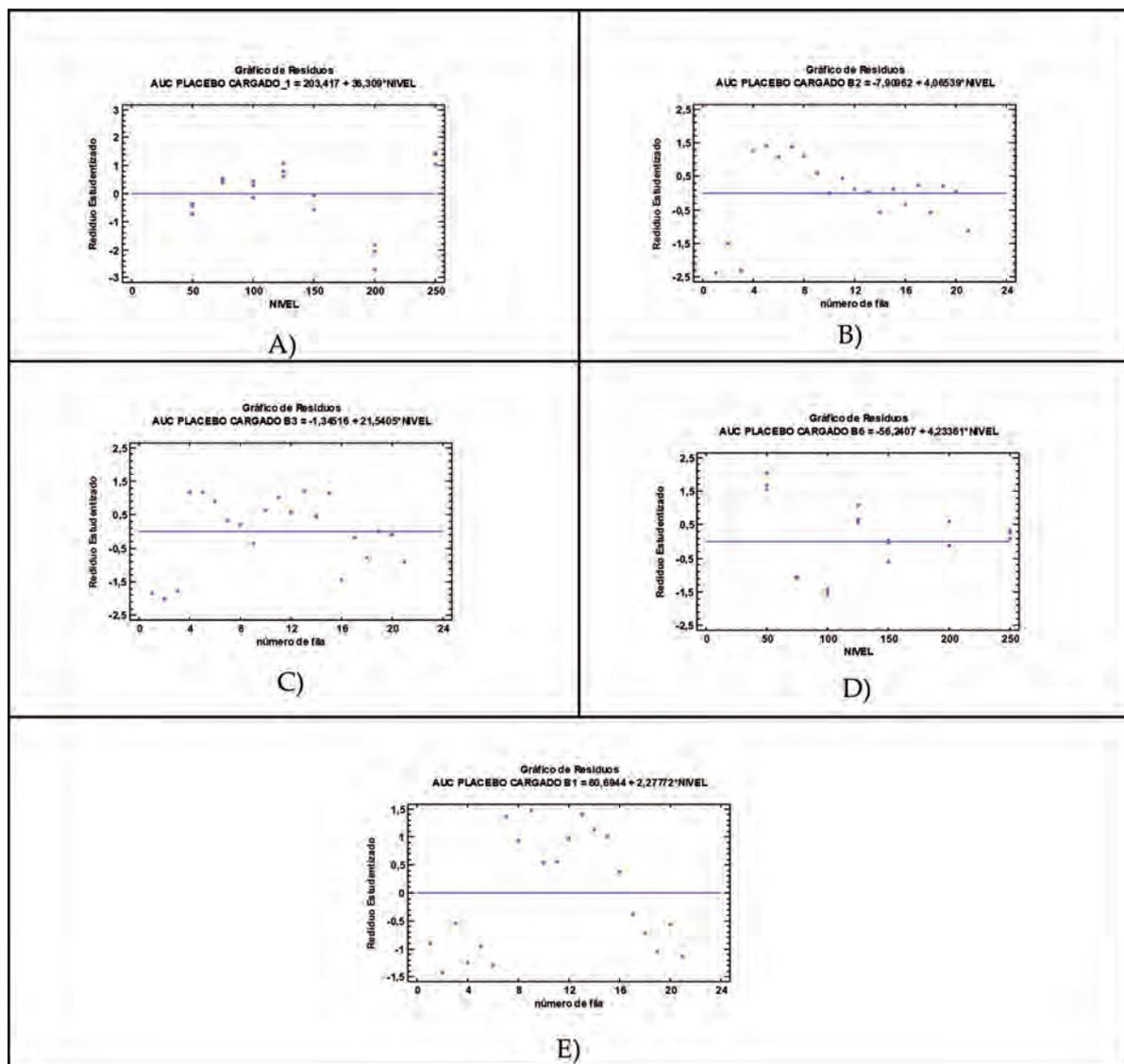
Se ha demostrado que las muestras a temperatura ambiente (20 a 25 °C), refrigeración (2 a 8 °C), y congelación (≤ 2 °C) presentan un porcentaje de degradación inferior a 2 % hasta por 4 horas en dichas condiciones, tanto para el estándar combinado como para el placebo cargado. Así

mismo, se puede inferir que pasadas las 4 horas en las 3 condiciones evaluadas, las muestras tienden a degradarse mucho más, a excepción de la riboflavina, que presenta un porcentaje de variación mayor al 2 % debido a la inestabilidad que ésta presenta a la luz; por ello, no es recomendable almacenarlas por un tiempo mayor a lo indicado [12].

3.2.7. Robustez

Se evaluó el flujo, la temperatura de la columna, el porcentaje de orgánico y el pH para determinar si ha existido diferencia significativa en los factores tiempo de retención, número de platos teóricos y resolución de los picos de las vitaminas analizadas. La variable flujo afectó al tiempo de retención de la tiamina y la piridoxina

Anexo G. Gráficos de dispersión de placebo cargado: A) ácido ascórbico B) riboflavina C) nicotinamida D) piridoxina E) tiamina.



na, la variable temperatura de la columna afectó significativamente al número de platos teóricos de la riboflavina y la nicotinamida, el porcentaje de orgánico afectó al tiempo de retención de la tiamina, mientras que la variación del pH afectó significativamente a los factores tiempo de retención para la riboflavina y piridoxina, resolución para la riboflavina y nicotinamida y el número de platos teóricos a la tiamina y piridoxina, todo dentro del espacio de diseño (Tabla 7).

3.2.8. Idoneidad del sistema

Se ha demostrado que el sistema cromatográfico es adecuado para cumplir la determinación para la que se ha establecido. El ácido ascórbico y la riboflavina no cumplen con el criterio establecido para número de platos teóricos debido a que

eluyen a menor tiempo de retención que las otras vitaminas, siendo este directamente proporcional al número de platos teóricos; la resolución de la riboflavina es menor al 2,0 % ya que se utilizó un estándar de riboflavina-5-fosfato cuya sal eluye a un tiempo de retención cercano al pico principal, por lo que pierde resolución; la asimetría del ácido ascórbico se encuentra debajo del criterio establecido del 2 % debido a la anchura del pico principal, mientras que la asimetría de la tiamina se ve afectada por el gradiente utilizado antes de la elución de la misma.

3.2.9. Incertidumbre de la medición

En el análisis de la incertidumbre se han evaluado las fuentes de error del análisis en relación a las 6M de Ishikawa. Para ello, se realizó

Tabla 7. Evaluación de factores flujo, temperatura, porcentaje de orgánico y pH para las variables: Número de platos teóricos (N), Tiempo de retención (TR) y Resolución (R).

Vitaminas	Criterio de aceptación	Flujo			Temperatura			% Orgánico			pH		
		TR	RS	N	TR	R	N	TR	R	N	TR	R	N
Vitamina C	p (valor) \geq 0,05	0,17	NA	0,90	0,99	NA	0,85	0,97	NA	0,98	0,97	NA	0,18
Tiamina		0,00	0,64	0,14	0,25	0,3565	0,28	0,02	0,46	0,99	0,80	0,97	0,04
Riboflavina		0,68	0,98	0,99	0,55	0,7496	0,03	0,67	0,06	0,96	0,02	0,02	0,97
Nicotinamida		0,88	0,55	0,83	0,46	0,1473	0,02	0,86	0,44	0,38	0,66	0,00	0,13
Piridoxina		0,04	0,88	0,35	0,07	0,8877	0,50	0,99	0,77	0,57	0,00	0,85	0,01

la suma de las incertidumbres individuales de los factores evaluados para obtener las incertidumbres combinada y expandida en porcentaje de las muestras analizadas, que permite evaluar de mejor manera la influencia de dichos factores en el análisis (Tabla 5).

4. Conclusiones

Se desarrolló y optimizó un método analítico por HPLC de fase reversa para separar, identificar y determinar vitaminas hidrosolubles (tiamina, riboflavina, nicotinamida, piridoxina y ácido ascórbico) en un jarabe. Al variar los parámetros físico-químicos como pH del buffer, % de orgánico, flujo y temperatura en el desarrollo y optimización del método, se logró reducir el tiempo de ejecución del ensayo en un 50 % y se observó una mejora significativa en las variables cromatográficas, como tiempo de retención, resolución y eficiencia de platos teóricos. Además, no existió interacción de los principios activos con los conservantes propilparabeno y benzoato de sodio utilizados en la formulación. El método validado de acuerdo a AEFI demostró ser selectivo con un porcentaje de discrepancia menor al 4 % sin que exista interacción entre los picos principales, lineal con un $r > 0,998$, preciso $RSD < 1,8$, exacto con una recuperación del 97,3 % para ácido as-

córbico, 98,4 % para tiamina, 99,9 % para riboflavina, 97,9 % para nicotinamida y 99,0 % para piridoxina dentro del rango evaluado de 50-250 %, cumpliendo con criterios de idoneidad del sistema y con una incertidumbre menor al 2 %. Además, demostró ser robusto dentro del espacio de diseño evaluado mediante el diseño experimental de superficie respuesta de Draper-Lin. Las muestras y estándares son estables dentro del tiempo de 4 horas a condiciones de ambiente, con un valor de RSD menor al 2 %. De acuerdo con estos resultados, se demostró que el método analítico desarrollado, optimizado y validado es apropiado para la separación, identificación y cuantificación de vitaminas hidrosolubles en una forma farmacéutica líquida y puede ser aplicado para el control de rutina en el laboratorio.

Agradecimientos

A Laboratorio Neofármaco del Ecuador, por abrirnos sus puertas y darnos la oportunidad de desarrollar este trabajo de investigación, por brindarnos todas las herramientas necesarias para lograr este objetivo. Al Real e Ilustre Colegio Oficial de Farmacéuticos de Sevilla por la oportunidad de publicar nuestra investigación en su prestigiosa revista RESCIFAR. A Carlitos Pazmiño por toda su ayuda incondicional en la búsqueda del conocimiento, y la inspiración para descubrir la ciencia cada día.

Referencias bibliográficas

1. ARCSA. Normativa Sanitaria para el control de suplementos alimenticios. 2017;1–20.
2. FDA. Suplementos dietéticos. Nurs (Ed española). 2010;28(5):15.

3. AEFI. Validación de Métodos Analíticos. 1ª edición. Barcelona; 2001.
4. The United States Pharmacopeial Convention. USP 42/NF 37. 42nd ed. 2019.
5. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. Introduction to Modern Liquid Chromatography (3ª ed.). New Jersey: John Wiley & Sons; 2010.
6. Fanali S, Haddad PR, Poole CF, Riekkola ML. Liquid chromatography: applications. Netherlands: Elsevier Inc.; 2017.
7. Fanali S, Haddad PR, Poole C, Lloyd DK. Liquid chromatography: fundamentals and instrumentation (2ª ed.). Netherlands: Elsevier Inc.; 2017.
8. Legaz ME, Sacristán M, Díaz EM, Alarcón B, Vicente C. Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Prácticas de laboratorio y cuestiones teórico-prácticas. Parte I. Introducción y práctica de laboratorio : cálculo de la eficiencia y representación gráfica de la ecuación de van Deemter. Reduca. Serie Técnicas y Métodos. 2011;4(3):1-32.
9. STATGRAPHICS. Diseño de Experimentos – Diseño de Superficie de Respuesta [Internet]. 2006 [cited 2021 Jul 13]. Available from: <https://www.statgraphics.net/wp-content/uploads/2011/12/tutoriales/DDE - Diseno de Superficies de Respuesta.pdf>
10. Moroto A. Incertidumbre en métodos analíticos de rutina [Internet]. Tarragona; 2002 [cited 2021 Jul 13]. Available from: https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8987/tesis_Alicia_Maroto.PDF?sequence=1&isAllowed=y
11. Aguilar B, Hernández R. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. Rev Cuba Farm. 1996;30(1). Disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75151996000100009&lng=es&nrm=iso
12. Such A, Sánchez C, Gomis P, Herreros de Tejada A. Estabilidad de vitaminas en nutrición parenteral. Nutr. Hosp. [Internet]. [citado 2021 Jul 12]. 2009;24(1):1-9. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112009000100001&lng=es.

Este trabajo debe ser citado como:

Dávila C, Santillán R, Pazmiño C. Desarrollo y validación de un método analítico por HPLC para la determinación de vitaminas hidrosolubles (tiamina, riboflavina, nicotinamida, piridoxina y ácido ascórbico) en un jarabe, en la empresa Neofármaco Cia. Ltda. Rev Esp Cien Farm. 2021;2(1):79-97.