

Validación del método por cromatografía líquida de alta resolución para ácido ascórbico en tabletas de producción nacional

Validation of ascorbic acid tablets of national production by high-performance liquid chromatography method

Yaslenis Rodríguez Hernández^I; Yania Suárez Pérez^{II}; Adalberto Izquierdo Castro^{III}

^I Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

^{II} Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Profesor Auxiliar. Doctor en Ciencias Farmacéuticas. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

^{III} Licenciado en Ciencias Farmacéuticas. Máster en Tecnología y Control de Medicamentos. Especialista A en control de Medicamentos. Laboratorios Novatec. Laboratorio Químico-Físico. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Se realizó la validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución, para la determinación de ácido ascórbico en tabletas de vitamina C, el cual se diseñó como método alternativo para el control de calidad y para el seguimiento de la estabilidad química del principio activo, pues las técnicas oficiales para el control de calidad del ácido ascórbico en las tabletas, no son selectivas frente a los productos de degradación. El método se modificó con respecto al reportado en la USP 28, 2005 para el análisis del inyectable. Se empleó una columna RP-18 de 250 x 4,6 mm 5 µm con detector UV a 245 nm. Su validación fue necesaria para ambos propósitos, teniendo en cuenta los parámetros exigidos para los métodos de las categorías I y II. El método fue suficientemente lineal, exacto y preciso en el rango de 100-300 µg/mL. Además fue selectivo frente a los restantes componentes de la matriz y a los posibles productos de degradación obtenidos en condiciones de estrés. Se calcularon los límites de detección y cuantificación. Una vez validado el método se aplicó a la cuantificación de ácido ascórbico en 2 lotes de

tabletas envejecidas, y se detectó una marcada influencia del envase en la degradación del principio activo transcurridos 12 meses a temperatura ambiente.

Palabras clave: Ácido ascórbico, cromatografía líquida de alta resolución, control de calidad, estudios de estabilidad, validación, tabletas de vitamina C.

ABSTRACT

We validate an analytical method by high-performance liquid chromatography to determine ascorbic acid proportion in vitamin C tablets, which was designed as an alternative method to quality control and to follow-up of active principle chemical stability, since official techniques to quality control of ascorbic acid in tablets are not selective with degradation products. Method was modified according to that reported in USP 28, 2005 for analysis of injectable product. We used a RP-18 column of 250 x 4.6 mm 5 μ m with a UV detector to 245 nm. Its validation was necessary for both objectives, considering parameters required for methods of I and II categories. This method was enough linear, exact, and precise in the rank of 100-300 μ g/mL. Also, it was selective with remaining components of matrix and with the possible degradation products achieved in stressing conditions. Detection and quantification limits were estimated. When method was validated it was applied to ascorbic acid quantification in two batches of expired tablets and we detected a marked influence of container in active degradation principle after 12 months at room temperature.

Key words: Ascorbic acid, high-performance liquid chromatography, quality control, stability studies, validation, vitamin C tablets.

INTRODUCCIÓN

La vitamina C es la más popular de las vitaminas hidrosolubles por los innumerables beneficios que reporta. El ácido ascórbico se considera un poderoso enemigo de los agentes virales por lo que sirve de apoyo al sistema inmunológico. Además es un valioso agente antioxidante que protege al organismo de diversas enfermedades y mejora la salud en general a dosis elevadas.¹

La vitamina C se afecta con facilidad por factores como: la humedad, la luz, el aire, el calor, los iones metálicos como hierro y cobre, el oxígeno y el medio alcalino. Tras su descomposición bajo estas condiciones se transforma fácilmente en diferentes compuestos como son: el ácido oxálico, ácido L-treónico, ácido L-xilónico, ácido L-lixónico y ácido dehidroascórbico, y a su vez este último se transforma irreversiblemente en ácido 2.3 diceto-L glucónico, el cual constituye su principal producto de degradación.²

Dentro de los métodos oficiales descritos para el análisis de la vitamina C en tabletas, uno de los más empleados es la valoración directa con 2,6-diclorofenol indofenol por resultar simple y rápido.³ El método es válido si se conoce que en la

composición de la muestra no existen sustancias interferentes y la concentración de ácido dehidroascórbico es inapreciable, por tanto, se puede aplicar a una muestra recién preparada, pero no resulta de utilidad en estudios de estabilidad de la vitamina C.^{4,5}

En un estudio anterior,⁵ se llevó a cabo el desarrollo preliminar de 4 nuevas formulaciones de tabletas de vitamina C 500 mg de producción nacional, con el propósito de mejorar su estabilidad química. A partir de resultados preliminares obtenidos por cromatografía en capa delgada, se seleccionó la mejor formulación. El estudio incluyó 2 tipos de envases: blister y frasco plástico. Dicha formulación fue sometida a condiciones aceleradas de temperatura y humedad.

No obstante, en la etapa actual de la investigación, resulta imprescindible contar con un método cuantitativo capaz de diferenciar entre la respuesta analítica del principio activo y sus posibles productos de degradación en la formulación de tabletas seleccionadas,⁵ con el propósito de realizar los estudios de estabilidad exigidos para lograr el registro de esta nueva formulación. Teniendo en cuenta estos antecedentes, el presente trabajo se propone desarrollar un método cuantitativo de análisis por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) para el ácido ascórbico en las tabletas de producción nacional para su aplicación tanto en el control de calidad como en estudios de estabilidad de las mismas.

MÉTODOS

Evaluación del método por CLAR reportado para el inyectable para su aplicación en las tabletas de ácido ascórbico 500 mg

Se utilizó el método por CLAR para cuantificar ácido ascórbico en solución inyectable,³ al cual se le realizaron algunas modificaciones relacionadas con el tratamiento de la muestra previo a la cuantificación y la velocidad de flujo. Se mantuvo la misma fase móvil y la λ de 245 nm para la cuantificación.

El cromatógrafo empleado estaba constituido por bomba K-1001, inyector manual con *loop* de 20 μ L, prefiltro, precolumna ODS 4 x 4, columna luna 5 μ RP18, 100 A°, 250 x 4.6 mm, diámetro interno (DI) 5 mm y detector UV variable K-2500 acoplado a una computadora para la adquisición de los cromatogramas mediante el software CHROMGATE (versión 3.1).

Todas las evaluaciones se realizaron a temperatura constante de 37 ± 2 °C ajustada con un horno para columna del propio cromatógrafo y se utilizó una velocidad de flujo de 1 mL/min en lugar de 0,6 mL/min.

Teniendo en cuenta que el método se destina a la cuantificación de ácido ascórbico en una matriz diferente (tabletas de 500 mg), se diseñó un procedimiento sencillo previo a la cuantificación. Se pesó con exactitud la cantidad de polvo equivalente a 25 mg de ácido ascórbico, se trasvasó cuantitativamente a un volumétrico de 50 mL, se añadieron 25 mL de fase móvil y se agitó en baño ultrasónico. Se estudió el tiempo requerido para obtener el analito totalmente disuelto. Se evaluó simultáneamente en una solución de referencia (SR) y en muestras procesadas a partir de la forma terminada. Posteriormente se completó el volumen con fase móvil. Para el análisis se empleó una alícuota de 4 mL tomada con ayuda de una

jeringa, previamente filtrada "in situ", completando a volumen con fase móvil en un volumétrico de 10 mL. Se inyectó en el cromatógrafo 20 µL.

Validación del método para control de calidad

Se llevó a cabo la validación del método para control de calidad teniendo en cuenta los parámetros mínimos exigidos para la categoría I³ así como las regulaciones actuales de carácter nacional.⁶

Linealidad del sistema: Se realizó mediante el análisis de 5 concentraciones de ácido ascórbico materia prima por triplicado, en un rango de 50-150% de la cantidad teórica declarada como 100 % (200 µg/mL), equivalentes a 100, 150, 200, 250 y 300 µg/mL respectivamente.

A partir de estos resultados se construyó una curva de calibración de AUC vs. concentración teórica (%). Los resultados se procesaron estadísticamente a través del software STATISTICA for Windows versión 6.01 (opción regresión lineal múltiple) y se determinó: r (coeficiente de correlación lineal), r^2 (coeficiente de determinación), a (intercepto) y b (pendiente), para el 95 % de confianza.

Criterios de aceptación:

- Ecuación de la recta: $y = bx + a$
- $r \geq 0,99$.
- $r^2 \geq 0,98$.
- Prueba de proporcionalidad del método analítico o hipótesis nula de la ordenada en el origen $a = 0$.
- Se empleó la prueba estadística de la t de Student para $n-2$ grados de libertad, siendo n el número total de valores donde: $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$.
- Prueba de la hipótesis nula de la pendiente: $b = 0$. Se determinó a partir de una prueba ANOVA de la regresión, teniendo en cuenta la probabilidad asociada al valor de la pendiente, es decir, si la $p < 0,05$, el valor de "b" difiere significativamente de cero. Además la desviación estándar relativa de la pendiente ($S_{b_{\text{relativa}}}$) debe ser menor del 2 %.
- Se calcularon los factores de respuesta (f) y se determinó el valor medio (\bar{f}), la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV). El CV debe ser menor que 5 %.

Selectividad: Se prepararon placebos del producto mezclando los excipientes en las proporciones equivalentes a la muestra de análisis, los cuales se procesaron por triplicado. Se registró el cromatograma obtenido para el placebo y se comparó con el cromatograma de una solución de referencia de ácido ascórbico a la concentración equivalente al 100 %.

Criterio de aceptación: No deben aparecer señales analíticas en el cromatograma del placebo en la zona de interés para el ácido ascórbico.

Linealidad del método: Se evaluaron placebos del producto, cargados con el 50, 75, 100, 125 y 150 % del principio activo equivalentes a 100, 150, 200, 250 y 300 µg/mL respectivamente.

En cada nivel de concentración se analizaron 3 muestras. Se construyó la curva de calibración correspondiente a los resultados de los 15 puntos experimentales. Se aplicó el mismo procesamiento estadístico descrito para la linealidad del sistema, así como los mismos criterios de aceptación.

Exactitud: Se analizaron por triplicado placebos cargados con cantidades equivalentes al 75, 100 y 125 % con respecto a la cantidad teórica declarada. Se construyó una curva de recuperación de % recuperado (Y) vs. % añadido (X). Los resultados fueron procesados estadísticamente de igual forma que la curva de calibración de la linealidad del sistema y del método. Además se calculó el porcentaje de recobro (R). Se incluyó la determinación del recobro medio \bar{R} y del CV total.

Criterios de aceptación: $\bar{R} 97-103$ % y $CV \leq 2,0$ %.

Además, se realizó la prueba G de Cochran, para determinar si el factor concentración tiene alguna influencia en los resultados. Si $G_{exp} < G_{tab}$ las varianzas de las 3 concentraciones son equivalentes, o lo que es igual, el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

Por último, se aplicó la prueba de la t de Student para demostrar que no existen diferencias significativas entre el valor medio de recobro obtenido y el 100 %.

Siendo: n-1 los grados de libertad y $\alpha = 0,05$.

Precisión:

- **Repetibilidad:** Se evaluaron por triplicado placebos cargados con la concentración equivalente al 100 % y un valor bajo y otro alto comprendido dentro del rango de la linealidad del método, 75 y 125 % respectivamente. Se calculó el CV en estos 3 niveles de concentración y se comparó con el criterio establecido. Las determinaciones las realizó el mismo analista en las mismas condiciones de trabajo. Además se llevó a cabo el análisis sextuplicado de SR al 100 %, en las mismas condiciones de trabajo y se calculó igualmente el CV. De esta forma se evaluó la repetibilidad de la respuesta analítica. Criterio de aceptación: $CV \leq 1,5$ %.

- **Precisión intermedia:** En este estudio participaron dos analistas, en dos días diferentes, en el mismo laboratorio. Se analizaron por triplicado en cada caso muestras equivalentes al 100 %. Se calculó el CV total. Criterio de aceptación: $CV \leq 2,0$ %.

Además se realizó la prueba F de Snedecor y de la t de Student, para comparar varianzas y medias respectivamente.

Rango: Se estableció el intervalo en que se cumplieron los criterios de linealidad, exactitud y precisión del método.

Validación del método para estudios de estabilidad: Se evaluaron adicionalmente los parámetros sugeridos para los métodos cuantitativos de la categoría II.^{3,6}

Selectividad: Se preparó una solución de ácido ascórbico equivalente al 100 %, la cual se contaminó con una alícuota de 1 mL de una solución de ácido oxálico en fase móvil de 0,02 mg/mL y se registró el cromatograma, determinando la posibilidad de interferencia del único producto de degradación disponible en el laboratorio comercialmente.

Además se realizó el análisis de una solución que contenía 0,1 mg/mL de ácido oxálico en fase móvil y se verificó a través del cromatograma su posible interferencia en el método en estudio. Se procesaron muestras de ácido ascórbico disolviendo 500 mg de mp en los diferentes medios planteados a continuación. Además se analizaron cantidades equivalentes de placebos del producto, en las siguientes condiciones degradativas:

- Luz UV: 500 mg + 10 mL de agua.
- Oxidación: 500 mg + 10 mL de H₂O₂ 30 %.
- Hidrólisis básica: 500 mg + 10 mL de solución de NaOH 1N.
- Hidrólisis ácida: 500 mg + 10 mL de solución de HCl 1N.

En cada caso se analizaron 20 µL previamente filtrados. El tiempo máximo de exposición de las muestras fue de 2 h. Además se realizó un muestreo intermedio a los 60 min. Para cada muestra se registró el cromatograma y se comparó con el de la solución de ácido ascórbico al 100 % tanto cualitativa como cuantitativamente.

Criterio de aceptación: No deben aparecer señales interferentes atribuidas a los posibles productos de degradación, que coincidan con el tiempo de retención (tr) del patrón de analito, o que estén muy cercanas a la zona de interés analítico para el ácido ascórbico. No deben ocurrir modificaciones superiores al 1 % en el resultado cuantitativo del analito respecto al tiempo inicial.

Sensibilidad: La evaluación de este parámetro se realizó estimando el límite de cuantificación (Lc) y el límite de detección (Ld) a partir de la curva de regresión, aplicando el procedimiento tradicional.⁷ Para realizar la comprobación experimental del Lc calculado anteriormente, se analizaron por triplicado placebos cargados con concentración equivalentes a 0,438 µg. Se determinó la media y DE

Aplicación del método al estudio de estabilidad de tabletas envejecidas

Se realizó el análisis de 2 lotes (5950055 y 10640072) almacenados a temperatura ambiente durante 1 año. En ambos lotes el envase fue el estuche de cartulina que contenía un frasco de polietileno de alta densidad, formato 6 adquirido a través de FRASPLAST, con tapa de rosca y sello de inviolabilidad. Cada uno contenía 30 tabletas revestidas con la diferencia de que en el lote 5950055 la tapa tenía además sílica gel, mientras que en el otro no. Se realizaron 3 réplicas. Se registraron los cromatogramas y se cuantificó el contenido de principio activo por comparación contra patrón. Se calculó la X y DE.

RESULTADOS

Para lograr tener al analito listo para su análisis por CLAR, que en su forma de presentación se encuentra en estado sólido, se propuso un procedimiento muy rápido y sencillo para el tratamiento de la muestra. En este se consideró la metodología recomendada para formas sólidas, seguida de la agitación en baño ultrasónico y separación por filtración de las sustancias auxiliares insolubles.

Se comprobó que en la SR, al aplicar solo 1 min de agitación se lograba el 100 % de recuperación del analito. No obstante, se plantea una agitación de 3 minutos para mayor seguridad. A partir de que comienza la agitación, se produce la rápida disolución del principio activo. Con solo 1 min se logra recuperar el 98 % del analito. No obstante, fue a partir de los 5 min que se obtuvo la total recuperación, fijando este intervalo de tiempo como el seleccionado para análisis posteriores.

Resultados de la validación

Teniendo en cuenta que aunque se trata de un método oficial se han realizado algunas modificaciones, fue necesario llevar a cabo su validación para poder aplicarlo como método alternativo al control de calidad de las tabletas. Los resultados de validación se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados de la validación del método

Parámetro	Resultados	Criterios
Linealidad del sistema	$Y = 161,51X + 264,67$ $r = 0,9991, r^2 = 0,9982,$ $n = 13 \rightarrow t_{exp} = 1,333,$ $t_{tab} = 2,16$ $b = 161,51 \rightarrow t = 86,287,$ $p = 0,0000$ $Sb_{relativa} = ,011$ $CV_f = 1,588 \%$	$y = bx + a$ $r \geq 0,99, r^2 \geq 0,98$ $t_{exp} < t_{tab}: \text{no significativo}$ $b \approx 1, t \text{ alta}, p \leq 0,005, \text{significativa.}$ $Sb_{relativa} < 2 \%$ $CV_f \leq 5 \%$
Linealidad del método	$Y = 162600X - 427000$ $r = 0,9975, r^2 = 0,9951,$ $n = 13 \rightarrow t_{exp} = -1,278,$ $t_{tab} = 2,16$	$y = bx + a$ $r \geq 0,99, r^2 \geq 0,98$ $t_{exp} < t_{tab}: \text{no significativo}$

	$b = 162600 \rightarrow t = 51,530,$ $p = 0,0000$ $Sb_{relativa} = 0,019$ $CV_f = 2,808 \%$	$b \approx 1, t \text{ alta}, p \leq 0,005, \text{ significativa.}$ $Sb_{relativa} < 2 \%$ $CV_f \leq 5 \%$									
Exactitud	$Y = 1,0308X - 3,782$ $r = 0,9984 \quad r^2 = 0,9969,$ $n = 7 \rightarrow t_{exp} = -1,699,$ $t_{tab} = 2,36$ $b = 1,0308 \rightarrow t = 47,280,$ $p = 0,0000$ $CV_f = 1,872 \%$ $R_{total} = 99,400 \%, CV = 1,872 \%$ $G_{tab} = 0,8709$ $G_{exp} = 0,410$ $t_{exp} (0,237) < t_{tab}$	$y = bx + a$ $r \geq 0,99, r^2 \geq 0,98$ $t_{exp} < t_{tab}: \text{ no significativo}$ $b \approx 1, t \text{ alta}, p \leq 0,005, \text{ significativa}$ $CV_f \leq 5 \%$ $R_{total} = 96-104 \%, CV \leq 3 \%$ Prueba de Cochran $G_{exp} < G_{tab}, \alpha = 0,05 \quad K = 3$ $n = 3$ Prueba de la t de Student (comparación del R con el 100 %) $t_{exp} < t_{tab} (12,71)$									
Repetibilidad	$CV_{75 \%} = 1,415 \%$ $CV_{100 \%} = 1,299 \%$ $CV_{125 \%} = 0,649 \%$	$CV \leq 1,5 \%$									
Precisión intermedia	$CV_{total} = 0,870 \%$	$CV_{total} \leq 3 \%$									
	<table border="0"> <tr> <td>Entre analistas</td> <td>Entre días</td> </tr> <tr> <td>$F_{exp} = 1,183$</td> <td>$F_{exp} = 2,159$</td> </tr> <tr> <td>$F_{tab} = 5,05$</td> <td>$F_{tab} = 5,05$</td> </tr> <tr> <td>$t_{exp} = 0,383$</td> <td>$t_{exp} = 4,438 \times 10^{-4}$</td> </tr> <tr> <td>$t_{tab} = 2,23$</td> <td></td> </tr> </table> <p>No hay diferencias significativas</p>	Entre analistas	Entre días	$F_{exp} = 1,183$	$F_{exp} = 2,159$	$F_{tab} = 5,05$	$F_{tab} = 5,05$	$t_{exp} = 0,383$	$t_{exp} = 4,438 \times 10^{-4}$	$t_{tab} = 2,23$	
Entre analistas	Entre días										
$F_{exp} = 1,183$	$F_{exp} = 2,159$										
$F_{tab} = 5,05$	$F_{tab} = 5,05$										
$t_{exp} = 0,383$	$t_{exp} = 4,438 \times 10^{-4}$										
$t_{tab} = 2,23$											
Sensibilidad	Pendiente de la curva de calibración del método (b)										
- Límite de detección	$Y_{bl} = -19800$										
	$S_b = 24849$										
	$L_d = 0,179 \mu\text{g}$										

- Límite de cuantificación	Lc= 0,438 µg	
----------------------------	--------------	--

En la [figura 1](#) se muestra el cromatograma obtenido para el placebo procesado por el método en estudio y en presencia del principio activo. Los resultados demuestran que el método fue selectivo frente a los componentes de la formulación.



Fig. 1. Selectividad para control de calidad. Análisis de placebo (A) y análisis de placebo + 100 % de analito (B).

Los placebos degradados no mostraron ninguna señal adicional, por lo que en todas las condiciones evaluadas los cromatogramas fueron similares al presentado con anterioridad. Las muestras sometidas a condiciones drásticas mantuvieron adecuada estabilidad, excepto para el medio oxidante. En este caso solo se obtuvo una señal adicional atribuida por comparación al ácido oxálico ([fig. 2, A](#)).

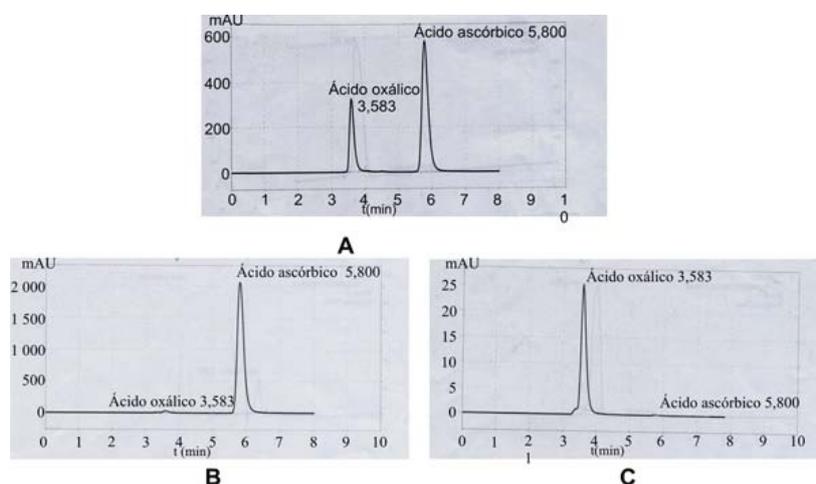


Fig. 2. Cromatogramas obtenidos para: (A) Muestras sometidas a oxidación con H₂O₂ durante 2 h; (B) ácido oxálico sustancia de referencia a menor concentración (0,02 mg/mL) + AA 100 % y (C) ácido oxálico sustancia de referencia a mayor concentración (0,1 mg/mL).

En la [figura 2](#) (B y C), además se reflejan los resultados obtenidos para la muestra de ácido ascórbico al 100 % cargada con una concentración de ácido oxálico de 0,02 mg/mL, único producto de degradación del cual se disponía como sustancia de referencia y la muestra de ácido oxálico sola a una concentración de 0,1 mg/mL.

Resultados de la aplicación del método a tabletas envejecidas

En la [tabla 2](#) se muestran los resultados obtenidos. Como se observa el método fue suficientemente selectivo y sensible para determinar el contenido de ácido ascórbico en tabletas degradadas de producción nacional y para detectar las señales analíticas atribuidas a los posibles productos de degradación. No se registraron interferencias en el rango de interés analítico del principio activo.

Tabla 2. Resultados de la cuantificación por CLAR del ácido ascórbico en las tabletas envejecidas

Parámetro	Lote-5950055		Lote-10640072	
	AUC	Resultado (%)	AUC	Resultado (%)
Contenido de ácido ascórbico (%)	15225501	99,352	12316456	80,352
	14854026	96,928	12507666	81,600
	15245755	99,485	12398760	80,889
Media	-	98,589	-	80,947
DE	-	1,439	-	0,626
CV	-	1,460	-	0,773

DISCUSIÓN

El método para control de calidad de las tabletas reportado oficialmente³ es volumétrico y se basa en un proceso REDOX. Además utiliza indicador visual y requiere de gran manipulación. Considerando las limitaciones de las técnicas volumétricas para llevar a cabo los estudios de estabilidad; ya que carecen de la selectividad requerida y operan en el rango de la macroescala, por lo que tampoco cuentan con suficiente sensibilidad, se valoró la técnica por CLAR como la mejor opción.

Se utilizó el mismo método por CLAR propuesto para el control de calidad del ácido ascórbico en el inyectable³ adaptado a la nueva matriz.

Se propone incrementar la velocidad de flujo a 1 mL/min con el objetivo de reducir el tiempo necesario para realizar cada análisis.

El análisis de una nueva matriz implica cambios en cuanto a concentración de analito y con respecto a la composición. Se consideró adecuado para el estudio un rango de concentración de analito alrededor de 200 µg/mL, por lo que se introducen en la técnica las diluciones necesarias.

La metodología de trabajo con formas farmacéuticas sólidas, implica tomar una muestra representativa de la forma terminada, que por trituration y homogenización en un mortero se convierte en polvo fino. A partir del cálculo del peso promedio y conociendo la dosis de las tabletas, se puede conocer con exactitud la cantidad de polvo de tabletas que equivale a la concentración de analito que teóricamente se debe analizar.

El ácido ascórbico es soluble en agua,¹⁻⁵ mientras que los restantes componentes de la matriz son sustancias auxiliares totalmente insolubles.⁵ Teniendo en cuenta la

polaridad de la fase móvil empleada, se impone introducir pasos previos que permitan separar estas sustancias insolubles del analito.

Por esta razón se plantea, en primer lugar la agitación en baño ultrasónico y posteriormente la separación de las sustancias auxiliares por filtración. La agitación en baño ultrasónico tiene como objetivo liberar el analito de la matriz y de esta forma garantizar su total disolución en la fase móvil.

Validación del método

El sistema fue lineal en el rango de 50-150 %, ya que se cumplieron todos los criterios estadísticos establecidos al procesar los resultados por regresión lineal. Se obtuvo una elevada proporcionalidad entre la respuesta obtenida y la concentración del analito.

Como se observa, el tratamiento aplicado y el procedimiento cromatográfico, garantizan la adecuada selectividad del método frente a los demás componentes de la matriz, por lo que el método puede aplicarse al control de calidad del ácido ascórbico en las tabletas de producción nacional.

El procesamiento estadístico de los resultados de la linealidad del método, dio resultados satisfactorios, tal como se muestra en la tabla 1. La correlación lineal alcanzada entre la concentración de analito y la respuesta analítica cumple los criterios establecidos, por lo que el efecto de la matriz no fue significativo desde el punto de vista estadístico, resultados que están en perfecta correspondencia con los obtenidos en la selectividad para control de calidad y para la exactitud del método.

El método fue exacto ya que el recobrado medio no excedió el límite de 97-103 %. Además el CV total quedó comprendido en el rango de aceptación acotado por un límite superior igual al 2 %. Adicionalmente se evaluó la influencia de la concentración de analito en la varianza (S) de los resultados a través de la prueba de G de Cochran (tabla 1). Como la $G_{exp} < G_{tab}$, las varianzas de los tres niveles de concentración evaluados fueron equivalentes. Es decir, no influyó el factor concentración en la exactitud del método. Por su parte, la prueba de la t de Student corroboró la exactitud, ya que la t obtenida fue inferior a la tabulada, por lo que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre el recobrado medio y el 100 %. De modo que podemos afirmar que la técnica fue exacta y no se afectó por errores sistemáticos de forma significativa.

Para la repetibilidad del método se reportaron CV bajos, inferiores al 1,5 % establecido como límite. Además se demostró la repetibilidad de la respuesta analítica al 100 %.

En la precisión intermedia se obtuvo un CV= 0,87 inferior al criterio de aceptación. Este análisis se complementó con las pruebas de Fischer y de la t de Student. En ambos análisis la $F_{exp} < F_{tab}$, por lo que no existieron diferencias significativas entre las precisiones de los analistas, independientemente del día en que se efectuó el ensayo. Los valores de las t_{exp} resultaron menores que las t_{tab} en cada caso, por lo que no existieron diferencias significativas entre los valores medios obtenidos por los analistas. El conjunto de dichos resultados permitió asegurar que estos fueron homogéneos, lo que ratifica la precisión del método en estudio ya que los errores aleatorios no repercutieron apreciablemente.

Como el objetivo fundamental de este método es llevar a cabo el seguimiento de la estabilidad química del ácido ascórbico en las tabletas, se impone demostrar en la etapa de validación que es un método suficientemente selectivo frente a los posibles productos de degradación, tanto del principio activo como de los demás componentes de la formulación. Por esta razón fue necesario someter a condiciones degradativas al principio activo y a muestras placebo.

A partir de la separación cromatográfica aplicada se logró una adecuada separación del analito y sus productos de degradación (fig. 2).

Una vez estimado teóricamente el Lc, se comprobó experimentalmente y se obtuvieron resultados satisfactorios. La recuperación promedio fue de $98,97 \pm 0,23$ %. El método fue suficientemente sensible para el propósito con que fue desarrollado, pues es capaz de cuantificar una cantidad equivalente al 99,78 % de degradación del principio activo, es decir, puede cuantificarse prácticamente hasta el 100 % de degradación.

Aplicación del método a tabletas envejecidas

Las tabletas no presentaron señales analíticas adicionales, lo cual se evidenció en los cromatogramas, donde solo se obtuvo el pico correspondiente al analito. Sin embargo, fueron perceptibles organolépticamente manchas oscuras atribuibles a la oxidación de ácido ascórbico, descrita como la principal vía de degradación de este compuesto.²⁻⁵ Estos resultados se confirmaron desde el punto de vista cuantitativo. Las tabletas analizadas presentaron adecuada estabilidad en los envases que contenían sílica gel y aproximadamente un 20 % de degradación en ausencia de desecante.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aristizábal CL; Aristizábal M, Montoya SL. Las vitaminas. 1997, Lucas Morea/Sinexi S.A. Monografía.com. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos11/lasvitam/lasvitam.shtml>
2. Yang JH, Lee SY, Han YS, Park KC, Choy JH. Efficient Transdermal Penetration and Improved Stability of L-Ascorbic Acid Encapsulated in an Inorganic Nanocapsule. Bull Korean Chem Soc. 2003;24(4).
3. USP 28. United States Pharmacopoeia XXVIII and National Formulary 25st: United States Pharmacopeial Convention. Versión Electrónica. 2005.
4. Castiñeira M. Métodos de análisis aplicados a la vitamina C. Rev Cubana Farm. 1989;23(2).
5. Cedeño Y, González T, Iraizoz A, Barrios MA, Suárez Y. Estudios preliminares de formulaciones de tabletas de vitamina C 500 mg. Tesis en opción al título de Licenciado en Ciencias Farmacéuticas. IFAL. UH, La Habana, 2005.
6. Regulación No.41-2006. Validación de métodos analíticos. República de Cuba, Ministerio de Salud Pública, Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED), La Habana, 2006.

7. Quatrocchi A, Abelairra de Andizzi I, Laba F. Introducción a la HPLC. Aplicación práctica. Buenos Aires: Artes gráficas Farro SA; 1992. p. 1025.

Recibido: 2 de marzo de 2009.

Aprobado: 7 de abril de 2009.

Lic. *Yaslenis Rodríguez Hernández*. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. . Ave 23 No. 21 425 e/ 214 y 222, La Coronela, municipio La Lisa, La Habana, Cuba. Correo electrónico: yania_as@yahoo.es