

## Validación de método analítico para el control de la calidad de vitamina B<sub>12</sub> 10 000 inyección

### Validation of analytical method for quality control of B12 Vitamin-10 000 injection

Martha Botet García<sup>I</sup>; Caridad Margarita García Peña<sup>II</sup>; Yenilen Troche Concepción<sup>III</sup>; Téc. Yanara Cañizares Arencibia<sup>IV</sup>; Bárbara Moreno Correoso<sup>V</sup>

<sup>I</sup>Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Máster en Tecnología y Control de Medicamentos. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). La Habana, Cuba.

<sup>II</sup>Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Máster en Tecnología y Control de Medicamentos. Investigadora Agregada. CIDEM. La Habana, Cuba.

<sup>III</sup>Licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Máster en Tecnología y Control de Medicamentos. (CIDEM). La Habana, Cuba.

<sup>IV</sup>Técnico Medio en Tecnología de la Salud. CIDEM. La Habana, Cuba.

<sup>V</sup>Técnico Medio en Química. CIDEM. La Habana, Cuba.

---

#### RESUMEN

Se validó el método analítico reportado en la Farmacopea de los Estados Unidos, para el control de la calidad de vitamina B<sub>12</sub> 10 000 U (cianocobalamina) inyectable, por espectrofotometría ultravioleta, por ser este un método más sencillo, económico y que permite controlar la calidad del producto terminado. La curva de calibración se realizó en el intervalo de 60 al 140 %, donde fue lineal con un coeficiente de correlación igual a 0,9999; la prueba estadística para el intercepto y la pendiente se consideró no significativa. Se obtuvo un recobrado del 99,97 % en el intervalo de concentraciones estudiado, y las pruebas de Cochran (G) y Student (t) resultaron no significativas. El coeficiente de variación en el estudio de la repetibilidad fue igual a 0,59 % para las 6 réplicas ensayadas, mientras que en los análisis de la precisión intermedia las pruebas de Fischer y Student no resultaron significativas. El método analítico resultó lineal, preciso, específico y exacto en el intervalo de concentraciones estudiadas.

**Palabras clave:** Espectrofotometría ultravioleta, cianocobalamina, validación, inyectables.

## ABSTRACT

Analytical method reported by USA Pharmacopeia was validated for quality control of injectable B<sub>12</sub> Vitamin (10 000 U) by UV spectrophotometry because this is a simpler and low-cost method allowing quality control of finished product. Calibration curve was graphed at 60 to 140 % interval, where it was linear with a correlation coefficient similar to 0, 9999; statistical test for interception and slope was considered non-significant. There was a recovery of 99.7 % in study concentrations interval where the Cochran (G) and Student(t) test were not significant too. Variation coefficient in repetition study was similar to 0.59 % for the 6 assayed replies, whereas in intermediate precision analysis, the Fisher and Student tests were not significant. Analytical method was linear, precise, specific and exact in study concentrations interval.

**Key words:** UV spectrophotometry, cyanocobalamin, validation, injectable.

---

## INTRODUCCIÓN

La vitamina B<sub>12</sub> se indica en el tratamiento de anemias macrocíticas con alteración neurológica o sin esta; profilaxis de anemia macrocítica asociada a deficiencia de vitamina B<sub>12</sub>; anemia perniciosa; malabsorción de vitamina B<sub>12</sub>; toxicidad por cianuro (coadyuvante en terapia con nitroprusiato sódico) y desórdenes ópticos (atrofia óptica de Leber, ambliopía por tabaco).<sup>1</sup>

En este trabajo se valida el método analítico por espectrofotometría ultravioleta (UV), aplicable al control de la calidad, por ser este un método sencillo, económico y que permite controlar la calidad del producto terminado, así como el cumplimiento de las buenas prácticas al emplear un método analítico previamente validado, lo cual demuestra que el método es seguro para obtener los resultados previstos. La validación del método de análisis reportado en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) 30, tiene como objetivo demostrar el desempeño del método en las condiciones del laboratorio y con la formulación nacional.

Se realizó una comparación estadística entre los resultados por el método espectrofotométrico, en el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM) y en la Empresa Farmacéutica "Julio Trigo", demostrándose que no existían diferencias significativas entre ambos laboratorios.

La espectrofotometría UV es un poderoso instrumento en una variedad de problemas analíticos. Aunque en muchas oportunidades tiene el inconveniente de la falta de especificidad, debido a la interferencia con los productos de degradación, los cuales en ocasiones pueden presentar un espectro idéntico al componente sin degradar, y en otras las concentraciones a determinar son muy pequeñas y están por debajo del límite de sensibilidad del método o dentro de su error experimental.<sup>2</sup>

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas de que el método es lo suficientemente fiable para producir el resultado esperado.<sup>2-</sup>

<sup>4</sup> Los parámetros analíticos que pueden ser considerados en la validación de un método analítico, según se expresa en la USP 30, son exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango, tolerancia y robustez.<sup>4</sup> El presente trabajo tiene como objetivo validar el método analítico que se emplea para el control de la calidad de vitamina B<sub>12</sub> inyectable.

## MÉTODOS

Se validó un método de análisis por espectrofotometría para la cuantificación de cianocobalamina en el control de la calidad de vitamina B<sub>12</sub> inyectable, reportado en la USP 30, 2007.

Descripción del método empleado para el estudio:

- Aparato: espectrofotómetro UV-VIS (SPECTROGENESIS, Alemania).
- Cubetas: cuarzo, con 1 cm de paso óptico.
- Longitud de onda: 361 nm.
- Blanco: agua destilada.
- La sustancia de referencia química de cianocobalamina fue suministrada por el grupo de sustancias de referencia del CIDEM, la cual fue analizada por el método cromatográfico establecido para realizar el control de la calidad de la materia prima, con una pureza de 99,5 %.
- El producto terminado en forma de inyectable, fue elaborado en la Empresa Farmacéutica "Julio Trigo", identificado como el lote 7001, fabricado en enero de 2007, el cual cumplió con las especificaciones de calidad establecidas para el control de la calidad del inyectable.
- Concentración de trabajo de la sustancia de referencia química: 20 µg/mL.
- Preparación de la muestra: Se tomó 1 mL de muestra, se trasvasó a un matraz aforado de 100 mL, se disolvió en agua destilada.

La validación fue realizada según la categoría I (USP 30), y se evaluaron los parámetros que a continuación se describen:<sup>2</sup>

### Linealidad

Para el análisis de la linealidad se realizó el modelo de 3 determinaciones para 5 concentraciones diferentes: 50, 80, 100, 120, y 150 %. Se determinó la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación, la prueba de significación estadística de significación de la pendiente  $S_b$  rel(%), los coeficiente de variación de los factores de respuesta y el ensayo de proporcionalidad.

### Exactitud

Para el análisis de exactitud se realizó el modelo de 3 réplicas para 3 concentraciones diferentes: 80, 100, 120 %; se determinó el porcentaje de recuperación, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Se aplicó además el ensayo de Gochran con vistas a comprobar si la variación de la concentración producía diferencias significativas en los resultados y el ensayo de Student para determinar diferencias significativas entre la recuperación media y el 100 %.

### **Precisión**

Para el estudio de la precisión se siguió el modelo de repetibilidad con el empleo de 6 réplicas. Con ellas se determinaron los valores medios, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

De igual manera para el ensayo de la precisión intermedia se emplearon 2 analistas en 2 días diferentes. Se aplicó el ensayo de Fisher y de la t de Student para determinar si existían diferencias significativas entre los resultados al variar las condiciones de análisis.

### **Especificidad**

Para el estudio de especificidad se analizó la sustancia de referencia de cianocobalamina, el placebo, las muestras de producto terminado.

Criterio de aceptación: El valor de absorbancia del placebo debe ser menor del 1 % con respecto a los valores de absorbancia de las muestras y las sustancias de referencia química.

## **RESULTADOS**

En la [tabla 1](#) se reportan los resultados del estudio de la linealidad del sistema; la ecuación de la recta resultó ser  $Y = 0,432x + 0,12$ , el coeficiente de regresión lineal fue de 0,9998 y el coeficiente de variación del factor de respuesta resultó igual a 4,03 %.

**Tabla 1.** Estudio de linealidad

Parámetros	Resultados	Límites
Ecuación de la recta	$Y = 0,432 x + 0,12$	
Coefficiente de regresión lineal	$r = 0,9999$	$r \geq 0,990$
Coefficiente de determinación	$r^2 = 0,9998$	$r^2 \geq 0,980$
Significación estadística de la varianza de la pendiente (b)		
Desviación estándar relativa de la pendiente	$Sb \text{ rel}(\%) = 0,99$	$Sb \text{ rel}(\%) \leq 2\%$
Coeficiente de variación de los factores de respuesta		
Coefficiente de variación del factor de respuesta	$CV_f = 4,03 \%$	$CV_f \leq 5 \%$

Y: absorbancia; x: concentración; b: pendiente; a: intercepto; r: coeficiente de regresión lineal;  $r^2$ : coeficiente de determinación; Sb rel: desviación estándar relativa de la pendiente; CV<sub>f</sub>: coeficiente de variación del factor de respuesta.

El resultado del estudio de precisión del método desarrollado aparece reportado en la [tabla 2](#). En el estudio de repetibilidad realizado el coeficiente de variación fue de 0,59 %; mientras que los valores de F calculadas y los valores de t calculadas obtenidos en el estudio de precisión intermedia realizado fueron menores que los valores tabulados, para un 95 % de confianza, para cada uno de los niveles estudiados.

**Tabla 2.** Estudio de la precisión intermedia del método analítico

Analista 1 (%)		Analista 2 (%)	
Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
102,4	102,5	101,9	102,3
102,3	102,4	102,4	102,9
102,8	102,6	102,6	101,4
101,8	102,1	101,6	101,6
101,1	102,8	102,3	102,8
Análisis entre analistas:			
$t_{cal} = 0,29$ ; $t_{tab} (5 \%) = 2,07$			
$F_{cal} = 1,08$ ; $F_{tab} (5 \%) = 2,97$			
Análisis entre días:			
$t_{cal} = 0,65$ $t_{tab} (5 \%) = 2,07$			
$F_{cal} = 1,08$ $F_{tab} (5 \%) = 2,97$			

%: los datos corresponden al porcentaje de principio activo en la formulación.

En la [tabla 3](#) aparecen reportados los resultados del estudio de exactitud. La recuperación media fue de 99,97 %, y los valores de t calculada (2,109) y de G calculada (0,733) fueron menores que los valores tabulados, para un 95 % de confianza, t tabulada 2,306 y G tabulada 0,871.

**Tabla 3.** Estudio de exactitud

Niveles	Recuperación (%)	Resultados	Límites
80 %	99,8	$R_{media} = 99,97 \%$	98,0-102,0 %
	100,3		
	100,2		
100 %	100,0	$t_{calc} = 2,109$ $t_{tab} = 2,306$	$t_{exp} \leq t_{tab}$
	99,9		
	100,2		
120 %	99,7	$G_{calc} = 0,733$ $G_{tab} = 0,871$	$G_{exp} \leq G_{tab}$
	99,7		
	99,8		

$R_{media}$ : recuperación media; %: los datos corresponden al porcentaje de recuperación.

## DISCUSIÓN

Los resultados del estudio de validación realizado permiten demostrar la confiabilidad del método de análisis y brinda una seguridad al laboratorio ya que se obtienen las pruebas documentales de que el método es fiable para obtener los resultados previstos en la determinación del principio activo en el producto terminado.<sup>2,4</sup>

La realización de este estudio permite contar con un método validado aplicable al control de la calidad y al estudio de estabilidad de la vitamina B<sub>12</sub>, que hasta el momento se utilizaba en el laboratorio sin habersele realizado la evaluación del desempeño, del método reportado en la literatura, en nuestras condiciones de trabajo y en la formulación de pilocarpina al 2 % colirio de producción nacional, y demostrar la especificidad, la linealidad, la precisión y la exactitud del método en cuestión, para dar cumplimiento a las Buenas Prácticas de Laboratorio, donde la validación de los métodos de análisis constituyen el eslabón principal.

El método validado es sencillo, rápido y barato al compararlo con otros métodos analíticos, tales como: métodos por cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía gaseosa, ya que el tiempo de análisis es menor, se emplea como disolvente y blanco agua destilada, se obtiene la respuesta analítica con mayor rapidez, además brinda la posibilidad de su uso en el control de la calidad y el estudio de estabilidad del producto terminado.<sup>3</sup>

Los resultados del estudio de linealidad realizado muestran coeficientes de regresión y de determinación superiores a los exigidos por la USP 30, 2007 y la Regulación 41-2007 del CIDEM, 0,99 y 0,98 respectivamente, lo cual demuestra con el valor del coeficiente de correlación obtenido, cercano a la unidad, la existencia de correlación, así como el grado de relación entre las variables concentración y respuesta detectada por el equipo empleado. También el coeficiente de variación de los factores de respuesta y la desviación estándar relativa de la pendiente fueron inferiores al normado como máximo para estos indicadores: 5 y 2 %, respectivamente, ambos son considerados estimadores

puntuales que permiten caracterizar la variabilidad. El valor obtenido del  $CV_f$  permite demostrar que existe variabilidad en la relación respuesta y concentración para cada nivel evaluado. El intervalo de confianza del intercepto incluye al cero, lo que permite excluir la significación del error del intercepto. Se demuestra con los resultados la linealidad del método propuesto para el control de la calidad y el estudio de estabilidad del producto terminado.<sup>2,4</sup>

En el estudio de la repetibilidad realizado a una misma muestra, por el mismo analista, el mismo día, a través de 6 réplicas, se alcanzó un coeficiente de variación adecuado (0,59 %), lo que demostró la buena precisión del método según el límite para los métodos espectrofotométricos:  $CV \leq 3,0\%$ , lo cual evidencia que el método era repetible en las condiciones del laboratorio.

Los valores que se obtienen en el estudio de precisión intermedia, de las pruebas de Fischer y t de Student, demostraron que no existían diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días, para una probabilidad de 0,05 %, ya que los valores de F calculados son menores que la F tabulada (tabla 3). Al realizar la prueba de la t de Student los valores calculados resultaron ser menores que el tabulado para una probabilidad de 0,05, lo cual demostró que no existían diferencias significativas entre las medias alcanzadas, con un nivel de significación de un 5 %.<sup>2,4</sup> Los resultados de este estudio demostraron que el método era reproducible y no existían diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los resultados al variar las condiciones de análisis, analistas y días, lo que evidencia la precisión del método en cuestión.

En la influencia del factor concentración sobre la variabilidad de los resultados de la exactitud al aplicar la prueba de Cochran se obtuvo que G calculada fue menor que la G tabulada para una probabilidad de 0,05,  $k=3$  y  $n= 3$ ; por lo tanto, las varianzas de las concentraciones empleadas son equivalentes, lo cual indica que la concentración no influyó en la variabilidad de estos. Al realizar la prueba de significación entre la recuperación media y el 100,0 % de recuperación, con un coeficiente de variación de 0,15 %, se obtuvo una t calculada menor que la t tabulada. En el intervalo seleccionado en el estudio de exactitud, los valores de porcentaje de recobrado estuvieron dentro de los límites establecidos para los métodos espectrofotométricos (98-102 %) y los valores del coeficiente de variación para cada uno de los niveles de concentración estudiados, fueron menores que el 2 %.<sup>2,4</sup>

Los resultados del estudio de especificidad, permitieron afirmar que el método fue específico en relación con los excipientes que componían la solución y que era aplicable al control de la calidad y al estudio de estabilidad del producto terminado, porque no se observó interferencia de estos en la determinación del principio activo, ya que los valores de absorbancia correspondientes al placebo son menores del 1 %, con respecto al valor de la sustancia de referencia, por lo que se demuestra la especificidad del método.<sup>2,4</sup>

El método analítico validado por espectrofotometría UV para la cuantificación del principio activo del inyectable de vitamina B<sub>12</sub> para el control de la calidad y el estudio de estabilidad resultó ser lineal, preciso, exacto, robusto y específico, en el intervalo de concentraciones establecido y puede ser establecido como método de control de calidad químico al producto terminado.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rosenstein E. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. Edición 47 ed. México DF: PLM, SA de CV; 2001.
2. United States Pharmacopoeial Convention. USP 30. United States Pharmacopoeia and National Formulary 25. Copyright. Inc. Versión Electrónica (CD). 2007.
3. Dierksneier G. Métodos cromatográficos. La Habana: Ed. Científico-Técnica; 2005. p. 1-4, 256-412.
4. International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures. Technical Requirements For The Registration of Pharmaceuticals For Human Use. Geneva: ICH-Q2A; 1995.

Recibido: 16 de julio de 2009.

Aprobado: 20 de agosto de 2009.

Lic. *Caridad Margarita García Peña*. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Ave. 26 No. 1605 entre Boyeros y Puentes Grandes, municipio Plaza de la Revolución, CP. 10 600, La Habana, Cuba. Correo electrónico: [caridadgp@infomed.sld.cu](mailto:caridadgp@infomed.sld.cu)