

Desarrollo de la formulación Compvit-B[®] inyectable

Development of Compvit-B[®] injectable formulation

Lic. Olivia Teresa González Gay,^I Lic. Publio Rodríguez Guzmán,^{II} Dra. Cs. Liliana Francis Turner,^{II} Dr. Cs. Jorge Alberto Bergado Rosado^{III}

^I Empresa de Producción de Biológicos "Carlos J. Finlay". La Habana, Cuba.

^{II} Facultad de Ciencias. Universidad del Tolima, Colombia.

^{III} Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN). La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: el incremento de la incidencia de las polineuropatías en Cuba a principio de la década de los 90 del pasado siglo, hizo necesario la aplicación de medicamentos con propiedades antineuríticas, compuestos por vitaminas del grupo B, que hasta el momento no existían en el país por los altos precios a los que se comercializan internacionalmente.

Objetivo: obtener una formulación que en su composición contenga una asociación de altas dosis de las vitaminas B₁, B₆ y B₁₂, cuyos efectos positivos en el tratamiento de las neuropatías ya son conocidos.

Métodos: se evaluaron integralmente ocho variantes diferentes de una formulación inyectable, con la presencia o no de etilendiaminotetraacético (EDTA) y alcohol bencílico, y el proceso de liofilización incluido o no en su flujo productivo de acuerdo con la propuesta de la tecnología del fabricante.

Resultados: se seleccionó la variante 8, la que cumple con los parámetros establecidos por la tecnología del fabricante y el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Se obtuvo un producto farmacéutico inyectable, liofilizado de factura nacional llamado Compvit-B[®], compuesto por 100 mg de B₁, 100 mg de B₆ y 5 000 µg de B₁₂, que cumple con las especificaciones propuestas y que exigen los órganos regulatorios en la producción de medicamentos para uso humano.

Conclusiones: La variante seleccionada permitió desarrollar el producto farmacéutico Compvit-B[®] que es un medicamento farmacológicamente estable y de calidad, y cuya licencia sanitaria para su generalización y producción fue otorgada por el CECMED.

Palabras clave: vitaminas B, Compvit-B[®], B₁, B₆, B₁₂.

ABSTRACT

Introduction: at the beginning of the 1990's, the increased incidence of polyneuropathies in Cuba made it necessary to apply vitamin B group-derived drugs with neuroprotective properties. this kind of drugs was infrequent in the country at that time because of their high prices at the international market.

Objectives: to obtain a formulation containing a combination of high dose of vitamins B₁, B₆ and B₁₂ which have known positive effects on the treatment of neuropathies.

Methods: comprehensive assessment of eight different variants of injectable formulation, with or without ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and benzyl alcohol, and of the lyophilization process included in the flow of production or not, in line with the technology suggested by the manufacturer.

Results: the variant number 8 was selected since it meets the set parameters according to the manufacturer's technology and to the Center for the State Quality Control of Drugs. A Cuban-made injectable and lyophilized pharmaceutical called Compvit-B[®], made up of 100 mg B₁, 100 mg B₆ and 5 000 µg B₁₂, was obtained. It meets the established specifications and the requirements by the regulatory bodies for the manufacture of drugs for human use.

Conclusions: the selected variant allowed developing the Compvit-B[®] pharmaceutical, which is a pharmacologically stable drug of quality, and the health licensing for the general use and the production of this drug was granted by the Center for the State Quality Control of Drugs (CEDMED)

Key words: vitamins B, Compvit-B[®], B₁, B₆, B₁₂.

INTRODUCCIÓN

La deficiencia de micronutrientes es un problema que afecta entre el 20 y el 30 % de la población mundial, especialmente a la de los países subdesarrollados. Como consecuencia de estas deficiencias se deterioran las capacidades físicas y mentales, la función inmune y se produce un aumento de la morbilidad y la mortalidad.¹ Las vitaminas del complejo B participan como cofactores en importantes procesos metabólicos de las células nerviosas imprescindibles para su intenso metabolismo energético, así como para la síntesis de neurotransmisores y de la mielina. Es bien conocido y demostrado que los estados carenciales de las vitaminas del grupo B, traen consigo trastornos de diferentes tipos en el sistema nervioso central y periférico.^{2,3}

A principios de la década de los 90 se incrementó en Cuba la incidencia de casos de pacientes con polineuropatías óptica y periférica, vinculadas a las deficiencias de las vitaminas del grupo B originadas por los cambios dietéticos a los que se sometió la población durante el llamado "Período Especial".⁴ De acuerdo con los resultados de los estudios realizados en pacientes enfermos con polineuritis en ese periodo, los investigadores recomendaron la suplementación alimentaria a los grupos de edad

vulnerables, así como el desarrollo de formulaciones multivitamínicas para la terapia de estas afecciones.⁵⁻⁷ Sin embargo, la importación de medicamentos vitaminados para el tratamiento de la polineuritis en los pacientes resulta sumamente costoso a la economía nacional, por lo que fue necesario el diseño y estudio de formulaciones compuestas por altas dosis de las vitaminas B₁, B₆ y B₁₂ de factura nacional. La adecuada selección de las técnicas para el análisis de las muestras de los lotes y la evaluación integral de la formulación seleccionada, formaron parte del trabajo realizado con el objetivo de obtener y desarrollar un producto farmacéutico inyectable, liofilizado de factura nacional llamado Compvit-B, compuesto por 100 mg de B₁, 100 mg de B₆ y 5 000 µg de B₁₂ para ofertar a la población cubana y mejorar su calidad de vida.

MÉTODOS

Se desarrolló en la Planta de Producción de Inyectables de la Empresa de Producción de Biológicos "Carlos J. Finlay". Se estudiaron las características y propiedades de las vitaminas seleccionadas como ingredientes farmacéuticamente activos de la formulación y la evaluación de esta al incluir el etilendiaminotetraacético de sodio (EDTA sódico) como agente quelante y el alcohol bencílico en calidad de preservativo, con el objetivo de obtener una formulación con la mayor estabilidad integral posible.

Se propusieron a estudio ocho variantes de una formulación básica compuesta por 100 mg de la vitamina B₁, 100 mg de la vitamina B₆ y 5 000 µg de la vitamina B₁₂, las que se describen en el cuadro 1.

Cada variante descrita contiene 1 000 bulbos con el producto para el análisis. La calidad farmacéutica de los ingredientes de la formulación aparece en el cuadro 2.

Cuadro 1. Variantes de la formulación básica propuesta con diferentes opciones en cuanto a su composición química y estado físico

Variante	Formulación	Estado físico
1	B ₁ +B ₆ +B ₁₂ + EDTA	Líquido
2	B ₁ +B ₆ +B ₁₂ + EDTA	Liofilizado
3	B ₁ +B ₆ +B ₁₂ + alcohol bencílico	Líquido
4	B ₁ +B ₆ +B ₁₂ + alcohol bencílico	Liofilizado
5	B ₁ +B ₆ +B ₁₂ + EDTA + alcohol bencílico	Líquido
6	B ₁ +B ₆ +B ₁₂ + EDTA + alcohol bencílico	Liofilizado
7	B ₁ +B ₆ +B ₁₂	Líquido
8	B ₁ +B ₆ +B ₁₂	Liofilizado

Cuadro 2. Calidad farmacéutica de los ingredientes de la formulación

Ingredientes farmacéuticamente activos	Calidad farmacéutica
Vitamina B ₁ en forma de clorhidrato de tiamina	BP 27 ⁸
Vitamina B ₆ en forma de clorhidrato de piridoxina	BP 27 ⁸
Vitamina B ₁₂ en forma de cianocobalamina	USP 30 ⁹
Etilendiaminotetraacético (EDTA) sódico	Calidad para análisis
Alcohol bencílico	Calidad para análisis

En las variantes 1, 2, 5 y 6, el EDTA sódico se empleó en la proporción de 0,05 g/100 mL, y en las variantes 3, 4, 5 y 6, el alcohol bencílico se aplicó en las cantidades de 0,5 mL/100 mL de la formulación básica.

Se diseñaron dos propuestas de flujos productivos:

1. Preparación, lavado y esterilización de materiales, formulación, llenado y retapado.
2. Preparación, lavado y esterilización de materiales, formulación, llenado, liofilización y retapado.

El material de envase primario utilizado fue: bulbos de tubería 6 R, Norma Din, calidad hidrolítica 1, boca Ø 20 mm, tapón de 20 mm para liofilizar de clorobutilo y para no liofilizar de bromobutilo, (según variante) y sello de aluminio anodizado con opérculo Ø de 20 mm.

A las muestras de los bulbos resultantes de cada variante se les realizó un estudio de estabilidad acelerada a temperaturas de 45 ± 2 °C durante 2 meses, con una frecuencia de muestreo de 5 días, se evaluaron las características organolépticas del producto y la identificación de las vitaminas mediante la aplicación de la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). También se chequearon los valores de pH a las variantes estudiadas.

Cromatografía: los equipos empleados fueron un cromatógrafo marca Hitachi; columna Lichospher 100 RP 18, 250 a 254 mm (5 µm); jeringuilla Hamilton de 50 µL para la inyección de las muestras.

Soluciones: la solución utilizada para la vitamina B₁₂ fue de 0,3 moles/L de dihidrógeno fosfato de potasio-agua-acetonitrilo en proporción (65, 20, 15) a 260 nm, v/v, y durante el análisis de las vitaminas B₁ y B₆ se empleó una mezcla ternaria (30; 69,5; 0,5) de agua, ácido ortofosfórico 0,1 M y 5 µm de hexanosulfonato de sodio, a 270 nm. Como referencia de emplearon patrones de cada vitamina. Los resultados de los cromatogramas se compararon y se tuvieron en cuenta los tiempos de retención de las vitaminas analizadas, altura del pico obtenido en los gráficos, área bajo la curva y la presencia o no de productos degradados.

Características organolépticas: se evaluó el olor, color, transparencia, presencia de precipitado, en las variantes líquidas y en las variantes liofilizadas se tuvo en cuenta el color, la textura de la tableta y la velocidad de reconstitución.

Análisis de pH: se controlaron los valores de pH de las muestras de las variantes estudiadas.

Se formularon tres lotes experimentales correspondientes a la variante seleccionada y se tomaron muestras, las cuales fueron analizadas por CLAR; se evaluaron sus características organolépticas, el pH y se realizaron los estudios microbiológicos.

A partir de los resultados, se incorporó la técnica de la espectrofotometría ultravioleta de derivadas de primer orden para identificar la vitamina B₁₂.

Espectrofotometría: los equipos empleados fueron una bomba de gradiente en modo isocrático L-6000 Merck, Hitachi; un detector UV-Vis L-4250 Merck, Hitachi; un inyector Rheodyne 7125 con volumen de inyección de 20 µL y un espectrofotómetro UV-Vis Pharmacia LKB Biochrom 4060.

Soluciones: se empleó agua para inyección.

Registro: se registraron los espectros de absorción de la vitamina B₁₂ (sustancia de referencia 0,03 mg/mL) y de la mezcla de vitaminas B₁-B₆ sustancias de referencia de 0,6 mg/mL, respectivamente. Se seleccionó como longitud de onda de trabajo aquella para la cual la amplitud de la señal de la primera derivada para el espectro de la mezcla B₁-B₆ tomó valor cero y la del espectro de vitamina B₁₂ no.

Se validaron las técnicas analíticas seleccionadas,¹⁰ y se determinaron las especificaciones del producto terminado.

RESULTADOS

La variante seleccionada fue la No. 8. Se le denominó Compvit-B y está compuesta por 100 mg de vitamina B₁, 100 mg de vitamina B₆ y 5 000 µg de vitamina B₁₂ y sus especificaciones de calidad, según fabricante se observan en el cuadro 3.

Estabilidad y características organolépticas

Variantes 1, 3, 5 y 7 (producto líquido). Se obtuvieron bulbos con una solución acuosa de color rojo púrpura intenso, con olor característico y sin presencia de precipitado. A los 10 días los estudios de estabilidad acelerada mostraron ligeros cambios de color, especialmente en las variantes 1 y 5, por lo que fueron eliminadas.

Variantes 2, 4, 6 y 8 (producto liofilizado). Las variantes 2 y 6 mostraron un 80 % de tabletas deformadas, por lo que fueron eliminadas.

Análisis del pH. No se detectaron cambios significativos en los valores de pH en ninguna de las variantes estudiadas.

Cromatografía

Se analizaron las variantes 3, 4 y 8 de las cuales se obtuvieron cromatogramas, en los que se observaron los picos correspondientes a las vitaminas B₁ y B₆, detectadas aproximadamente a la longitud de onda de 245 y 290 nm y con tiempos de retención de 3 y 7 min respectivamente. La vitamina B₁₂ no eluyó en el sistema cromatográfico descrito, por lo que se recurrió a la espectrofotometría ultravioleta de derivada de primer orden.

En las variantes 3 y 4 se observaron picos correspondientes a productos de degradación del alcohol bencílico con tiempos de retención de 1 a 2,5 min.

Cuadro 3. Especificaciones de calidad del producto terminado con la variante 8, según fabricante

Ensayos	Límites
Características organolépticas	
Apariencia: liofilizado	Masa seca y porosa
Reconstituido	Solución transparente, libre de partículas
Color: liofilizado	Rosado
Reconstituido	Rojo intenso
Olor: liofilizado	Característico a vitaminas
Reconstituido	Característico a vitaminas
pH	De 3,0-5,0
Humedad	No mayor que 3,0 %
Identificación y cuantificación de las vitaminas B ₁ y B ₆ por CLAR	De 85,0-115,0 % De 85,0-115,0 mg/bbo
Identificación y cuantificación de la vitamina B ₁₂ por espectrofotometría UV	De 90-115 % De 4 500-5 750 µg
Esterilidad	Ausencia de microorganismos viables

Espectrofotometría

En la figura se observa el espectro de la vitamina B₁₂ (sustancia de referencia) a una concentración de 0,03 mg/mL, además de la derivada de primer orden del espectro de esta vitamina a la misma concentración. También se describe la derivada de primer orden del espectro de la mezcla de las vitaminas B₁-B₆ a una concentración de 1,2 mg/mL de cada una, en la que se muestra que las longitudes de onda a las cuales la primera derivada de la mezcla de vitaminas B₁-B₆ tomó valores cero (212, 218, 220, 230, 235, 236, 240, 242, 255, 260, 366, 373 y 378 nm), mientras que la derivada de primer orden de la vitamina B₁₂ no tomó valor cero a ninguna de estas longitudes de onda. Se seleccionó 378 nm para la determinación de vitamina B₁₂, ya que este valor se encontraba en la zona de menor ruido desde el punto de vista del espectro.

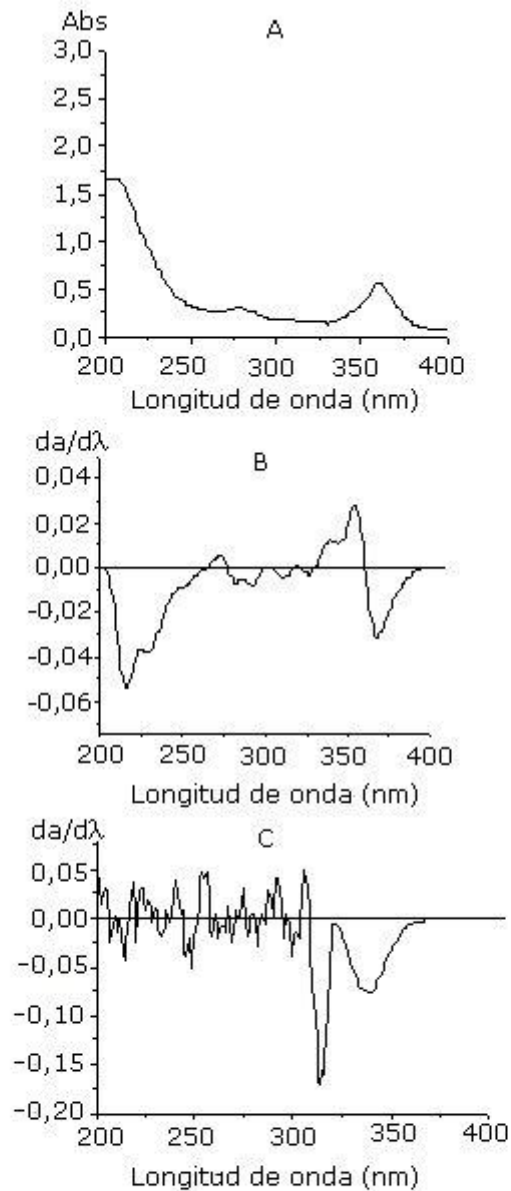


Fig. Espectro de la vitamina B₁₂ (sustancia de referencia) a una concentración de 0,03 mg/mL; B: Derivada de primer orden del espectro de la vitamina B₁₂ a una concentración de 0,03 mg/mL, y C: Derivada de primer orden del espectro de la mezcla de las vitaminas B1-B6, a una concentración de 1,2 mg/mL de cada una.

Estudios microbiológicos

Se realizaron los ensayos microbiológicos de acuerdo con lo descrito en la USP 30, en los que no se detectó la presencia de microorganismos.

DISCUSIÓN

La importancia de las vitaminas B₁, B₆ y B₁₂,¹¹⁻¹³ y su conexión metabólica se encuentra descrito por numerosos autores,^{2,5,7,14,15} así como sus efectos

terapéuticos ante muchos desórdenes neurológicos, entre los que se encuentran las polineuropatías de todo tipo,¹⁶⁻¹⁸ enfermedades neurodegenerativas como el alzhéimer,¹⁹⁻²¹ y otros trastornos del sistema nervioso^{22,23} lo que justifica la propuesta de una formulación con los componentes farmacéuticos descritos.²⁴ Es conocido que la preparación de formulaciones en las que se encuentren vitaminas del grupo B hay que tener presente las reacciones químicas que ocurren, especialmente en un medio acuoso, en las que el agua participa como un reactivo. En el caso de las vitaminas B₁, B₆ y B₁₂, la cianocobalamina es degradada lentamente por el clorhidrato de tiamina, especialmente en medio acuoso, lo cual se minimiza en las formas farmacéuticas sólidas como las tabletas y los productos liofilizados.²⁵ Esto explica el cambio de color experimentado en las variantes en forma líquida. También la cianocobalamina es afectada cuando se encuentra en medio líquido en presencia de otras vitaminas del grupo B y los valores de pH son mayores que 5.²⁵

A fin de minimizar estas interacciones químicas se emplean sustancias con función antioxidante, agentes quelantes como el EDTA o preservos como el alcohol bencílico, que reducen las reacciones de oxidación, interacción con metales pesados, o protegen el producto de la incidencia de la luz y otros factores.²⁶ Sin embargo, la inclusión del EDTA puede ocasionar cambios en el proceso de liofilización en alguna de sus etapas, lo que justifica la presencia de tabletas deformadas en las variantes liofilizadas que lo contenían. La vitamina B₆ es relativamente estable en formulaciones sólidas o tabletas. Los tiempos de elución obtenidos en los casos de las vitaminas B₁ y B₆ se corresponden con los reportados por algunos autores que emplean sistemas cromatográficos similares.^{27,28} Las mejores opciones para la producción de poli fármacos inyectables de diferentes tipos de vitaminas es el uso de las jeringas de doble canal o el uso de la liofilización, que permite obtener un producto seco y estable, con la composición de sus principios activos íntegros y que es capaz de extender el tiempo de vida útil del medicamento.²⁵ De las variantes probadas la No. 8 resultó ser la de mayor estabilidad química con la ventaja adicional de una menor complejidad para el análisis de las vitaminas mediante las técnicas analíticas descritas por no tener aditivos.

En la actualidad la detección simultánea de vitaminas en un polifármaco se realiza por diferentes técnicas, a partir de la complejidad que representa el gran tamaño de las moléculas de cianocobalamina y el posible solapamiento de los espectros de absorción de estas tres vitaminas en un rango común de valores de longitud de onda.^{28,29} La inclusión de la espectrofotometría de derivadas de primer orden responde a que en el sistema cromatográfico descrito las cantidades de cianocobalamina contenidas en la formulación no se identificaban adecuadamente, ya que en este caso las concentraciones de las vitaminas B₁ y B₆ son muy elevadas y se produce una zona de mucho ruido que coincide con la zona de longitud de onda empleada por *Morelli*.³⁰

La formulación desarrollada al cumplir con las especificaciones de producto terminado, establecidas por el productor y el CECMED, se encuentra en producción y comercialización por la Industria Farmacéutica cubana en cantidades crecientes de acuerdo con la demanda de la población y su nombre comercial es Compvit-B®.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Macías MC, Monterrey GP, Lanyau GY, Pita RG, Sordo QX. Uso de suplementos vitamínicos por la población cubana. Rev Cubana Salud Pública. 2003; 29(3):215-9.

2. Fernstrom J. Can nutrient supplements modify brain function? *Am J Clin Nutr.* 2000; Suppl 71:1669-73.
3. González-Gross M, Pietrzik K. Nutrition and cognitive impairment in the elderly. *Br J Nutr.* 2001;86(3):313-21.
4. Roman GC. An epidemic in Cuba of optic neuropathy, sensorineural deafness, peripheral sensory neuropathy and dorsolateral myeloneuropathy. *Neurol Sci.* 1994;127:11-28.
5. Zulueta D, Macías C, Gay J, Rodríguez-Ojea A, Jiménez STB. Estudio de deficiencias nutricionales específicas mediante sitios centinela. *Rev Esp Nutr Comunitaria.* 1997;3(3/4):122-6.
6. Rodríguez-Ojea A, Macías C, Jiménez S, Cabrera A, Bacallao J, Alonso E. Estudio nutricional en pacientes de neuropatía epidémica al año de evolución. Indicadores bioquímicos. *Rev Cubana Med Trop* 1998;50(Suppl):254-8.
7. Pita G, Macías C, Pérez A, Reboso J, Serrano G. Evaluación nutricional de ancianos en un consultorio del médico de la familia. *Rev Cub Aliment Nutr.* 1999;13(2):91-1999;13(2):91-7.
8. British Pharmacopeia. Thiamine Chlorhydrate and Pyridoxine. Chlorhydrate London: Printed in the United Kinston by The Stationary Office; Vol. III. 2007.
9. The Unites Satated Pharmacopeial, USP 30. The National Formulary, NF 25. Rockville: Staff Liaison; 2007.
10. González GO, Canal RJ, Francis TL, Vázquez BE. Estabilidad del producto farmacéutico Compvit-B. *Rev Cubana Far [Internet].* 2011 [citado 10 Oct 2011];45(4):505-14. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152011000400005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
11. WHO. Expert Consultation. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva: WHO; 2003. Report No. 916.
12. Ropper AH, Brown RH. Normal development and deviations in development of the Nervous System. *Principles of Neurology.* 8th ed. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2005. p. 492-518.
13. Valdés MS, Gómez VA. Crecimiento y Desarrollo. En: *Temas de Pediatría.* La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2006. p. 17-28.
14. Rosenfield J, Ellis A. Nutrition and dietary supplements in motor neuron disease. *Phys Med Rehab Clin USA.* 2008;19(3):573-6.
15. Sun Y, Lu CJ, Chien KL, Chen ST, Chen RC. Efficacy of multivitamin supplementation containing vitamins B₆ and B₁₂ and folic acid as adjunctive treatment with a cholinesterase inhibitor in Alzheimer's disease: a 26-week,

randomized, double-blind, placebo-controlled study in Taiwanese patients. *Clin Ther.* 2007;29(10):2204-12.

16. Mckenna MC, Rolf G, Sonnewald U, Waagepetersen HS. *Molecular, Cellular and Medical Aspects, Energy Metabolism Brain. Basic Neurochemistry.* 7th ed. New York: Elsevier Academic Press; 2006. p. 537-51.

17. Shy ME. *Peripheral neuropathies.* In: Goldman L, Ausiello D, editors. *Cecil textbook of Medicine.* 22rd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. p. 445.

18. Nigthingale LM, Paviour CD. *Nutritional optic and peripheral neuropathy. Cases.* 2009;2:7762.

19. Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Sutton L, Ueland PM. Folate, vitamin B₁₂, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 1998;55:1449-55

20. Nourashémi F, Gillette-Guyonnet S, Andreu S, Ghisplfi A. Alzheimer disease: protective factors. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(Suppl):643-9.

21. Molina JA. Cerebrospinal fluid levels of thiamine in patients with Alzheimer disease. *Neural Transm.* 2002;109(8):1035-44.

22. Benton D, Fordy J, Haller J. The impact of long-term vitamin supplementation on cognitive functioning. *Psychopharmacology (Berl).* 1995;117(3):298-305.

23. Bourre JM. The role of nutritional factors on the structure and function of the brain: an update on dietary requirements. *Rev Neurol (Paris).* 2004;160(8):767-92.

24. Christen WG, Glynn RJ, Chew EY. Folic acid, pyridoxine, and cyanocobalamin combination treatment and age-related macular degeneration in women. *Arch Intern Med.* 2009;169:335-41.

25. Buhler V. *Vademecum for Vitamin Formulations.* 2nd ed. Stuttgart: BASF; 2001.

26. Heudi O, Kilinc T, Fontanaz P. Separation of water-soluble vitamins by reversed-phase high performance liquid chromatography with ultra-violet detection: application to polyvitaminated premixes. *J Chromatogr.* 2005;1070(1-2):49-56.

27. Elzanfaly ES, Nebesen M, Ramadan NK. Development and validation of PCR, PLS, and TLC densitometric methods for the simultaneous determination of vitamins B₁, B₆, and B₁₂ in pharmaceutical formulations. *Pharm Sci.* 2010;23(4):409-15.

28. Marszall ML, Lebiedzinska A, Czamowski W, Szefer P. High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and cyanocobalamin in pharmaceutical formulations using coulometric electrochemical and ultraviolet detection. *J Chromatogr A.* 2005;1094(1-2):91-8.

29. Gentili A, Caretti F, D'Ascenzo G, Marchese S, Perret D, Di Corcia D. Simultaneous determination of water-soluble vitamins in selected food matrices by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2008;13:2029-43.

30. Morelli B. High-resolution/higher-order derivative spectrophotometry for determination of ternary mixtures of B-complex vitamins in pharmaceuticals. *J Anal Chem.* 1996;354(1):97-102.

Recibido: 9 de abril de 2012.

Aprobado: 4 de junio de 2012.

Olivia Teresa González Gay. Empresa de Producción de Biológicos "Carlos J. Finlay". Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, municipio Playa, Apartado Postal 16017. La Habana, Cuba. Correo electrónico: tereggay@infomed.sld.cu