

Determinación de Vitamina B₁₂ en una Formulación Multivitamínica por Espectrofotometría de Derivada de Primer Orden

Lisette Sordo MARTÍNEZ, Laritza SOTO MULET y Rolando GONZALEZ HERNANDEZ*

Centro de Química Farmacéutica, Laboratorio Análisis Químico y Control de la Calidad, Calle 200 esquina 21, Atabey, Playa, Apartado Postal 16042, Ciudad de la Habana, Cuba.

RESUMEN. Se desarrolló un método por espectrofotometría de derivadas de primer orden para la determinación de vitamina B₁₂ en una formulación multivitamínica compuesta por vitamina B₁, B₆ y B₁₂. La amplitud de la señal de la primera derivada se determinó a 378 nm. La validación prospectiva del método demostró que fue lineal ($r=0,999$), preciso (repetibilidad CV= 0 y 1,52%; reproducibilidad CV=2,7 y 1,67%), exacto y selectivo (se determinó B₁₂ en presencia de las vitaminas B₁, B₆ y en presencia de los productos de degradación de cada una de ellas).

SUMMARY. "Determination of vitamin B₁₂ in a multivitamin pharmaceutical by first order derivate spectrophotometry". A method by first derivative spectrophotometry for the determination of vitamin B₁₂ in a multivitamin pharmaceutical, composed by vitamins B₁, B₆ and B₁₂, was developed. The amplitude of the first derivative signal was measured at 378 nm. The prospective validation of the method showed that it was linear ($r=0,999$), precise (repeatability CV= 0 and 1,52%; reproducibility CV= 2,7 and 1,67 %), accurate and selective (vitamin B₁₂ could be determined in presence of vitamin B₁, B₆ and degradation products of each one of them).

INTRODUCCIÓN

De las vitaminas hidrosolubles del complejo B, cianocobalamina (B₁₂), tiamina (B₁) y piridoxina (B₆) generalmente forman parte en su conjunto de formulaciones farmacéuticas inyectables, debido a su utilización en el tratamiento y prevención de diversas enfermedades como la neuritis periférica, la anemia perniciosa y megaloblástica¹.

En la literatura se han reportado métodos cromatográficos^{2,3} para el análisis simultáneo de algunas vitaminas hidrosolubles, pero presentan como inconveniente que utilizan aditivos de apareamiento iónico como componentes de la fase móvil. Estos reactivos provocan el marcaje de las columnas, lo cual reduce su tiempo de vida y limita su campo de aplicación⁴. Recientemente se han reportado dos técnicas de HPLC que permiten la determinación de vitamina B₁₂^{5,6}. La primera técnica describe su determinación

en preparaciones multivitamínicas mediante un sistema de gradientes de la fase móvil compuesta por agua, metanol y acetonitrilo. La segunda técnica describe la determinación de vitamina B₁₂ en presencia de otras vitaminas hidrosolubles como vitamina C, nicotinamida, ácido nicotínico, ácido fólico, y vitamina B₂ en dos etapas. La primera etapa incluye una separación utilizando la extracción de fase sólida usando cartuchos de C18 para eliminar las vitaminas liposolubles. En la segunda etapa se realiza la separación cromatográfica mediante un sistema de gradientes de una fase móvil compuesta por metanol y una disolución amortiguadora (buffer) de acetato de amonio. Comercialmente se encuentra disponible una columna que asegura la separación de vitamina B₁₂ de otras vitaminas hidrosolubles, tales como B₁ y B₆⁷. La fase estacionaria recomendada está compuesta por fase reversa (C18) y la fase móvil por una mezcla de

PALABRAS CLAVE: Determinación de vitamina B₁₂, Espectrofotometría de derivadas, Vitamina B₁, Vitamina B₆, Validación.

KEY WORDS: Determination of vitamin B₁₂, Derivative Spectrophotometry, Vitamin B₁, Vitamin B₆, Validation.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: cqf@infomed.sld.cu. Fax: +53 - 7 -33 64 71

acetonitrilo y una disolución amortiguadora de acetato de amonio (0,05 mM). Estas técnicas emplean sistemas cromatográficos y reactivos muy específicos, por lo que su reproducibilidad puede verse seriamente afectada al cambiar ligeramente algunos de éstos, ya que no aparece reportado un estudio de robustez de los mismos.

La técnica de espectrofotometría ultravioleta de orden cero no puede llevarse a cabo de forma satisfactoria debido al gran solapamiento de los espectros de absorción (Figura 1). Recientemente, Morelli ⁸ ha desarrollado varios métodos basados en el uso de la espectrofotometría de derivadas de segundo y quinto orden con el objetivo de determinar varias vitaminas hidrosolubles presentes en mezclas ternarias y cuaternarias. Este método constituye uno de los más utilizados en el análisis de mezclas y consiste en medir la señal derivada del componente de interés a la longitud de onda en la que el espectro derivado del compuesto interferente corta al eje de las abscisas, es decir se anula ⁹. La espectrofotometría de derivadas es un método cuya practicabilidad se ve incrementada, ya que -a diferencia de la técnica de HPLC- no genera gran cantidad de reactivos residuales y además, al no requerirse separación previa, el tiempo de análisis se acorta.

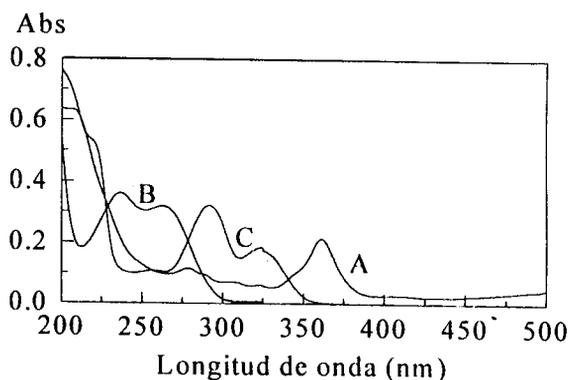


Figura 1. Espectros de las disoluciones de vitamina B₁ (B), B₆ (C) y B₁₂ (A) a 0,01 mg/mL cada una.

En el presente trabajo se desarrolló un método espectrofotométrico basado en la derivada de primer orden para la determinación de vitamina B₁₂ en una formulación inyectable compuesta además por vitaminas B₁, B₆ y B₁₂. Para comprobar la fiabilidad del mismo se analizaron los parámetros analíticos de linealidad, precisión, exactitud y selectividad, lo cual responde a las exigencias legales establecidas de acuerdo a la clasificación del método ¹⁰.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron como materiales de referencia para los análisis: cianocobalamina materia prima 96,05% de pureza (Medicuba), tiamina 99% de pureza (Merck) y piridoxina 99,5% de pureza (Merck). Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis BioChrom 4060 y para el análisis de los datos experimentales se empleó el paquete de programas BioChrom 4060 ¹¹. Se utilizaron formulaciones inyectables liofilizadas (Empresa Farmacéutica Carlos J. Finlay, Cuba) de composición: vitamina B₁ (100 mg), vitamina B₆ (100 mg) y vitamina B₁₂ (5 mg). El correcto funcionamiento del equipo se comprobó mediante un filtro de óxido de holmio y vapores de benceno (para el control de la longitud de onda) ¹² y con una disolución de dicromato de potasio (para el control de la absorbancia) ¹³. Se utilizó el paquete de programas estadístico Origin ¹⁴ para la determinación de la derivada de primer orden y para el ajuste de la recta de la curva de calibración.

Reactivos utilizados

Dicromato de potasio p.a., ácido sulfúrico p.a, tetraborato de sodio p.a, hidrógeno fosfato de potasio p.a., peróxido de hidrógeno al 30%, acetonitrilo para cromatografía y ácido fosfórico p.a fueron adquiridos a Merck.

Evaluación de los parámetros de validación

Linealidad

A partir de una disolución de B₁₂ (1 mg/mL) se prepararon 5 disoluciones en un rango de 33-166% sobre la base de una concentración teórica de 0,03 mg/mL. A cada una de estas disoluciones se le añadió una cantidad constante de la mezcla B₁-B₆ (correspondiente a 0,6 mg/mL). Este procedimiento se realizó por triplicado. A todas las disoluciones se le registró el espectro de absorción de 200 a 400 nm y se determinó la amplitud de la señal de la primera derivada a 378 nm. Con estos valores y los de concentración se construyó la curva de calibración y se determinaron los parámetros fundamentales de la ecuación de la recta obtenida.

Precisión

A partir de una disolución de vitamina B₁₂ (1 mg/mL), se preparó una disolución de concentración 0,02 mg/mL y una de 0,03 mg/mL. A ambas se les añadió una cantidad constante de la mezcla B₁-B₆ igual a 0,6 mg/ml. Este procedimiento se realizó por triplicado el mismo día

(ensayo de repetibilidad) y durante dos días por dos analistas diferentes para el estudio de reproducibilidad. A todas las disoluciones se le registró el espectro de absorción de 200 a 400 nm y se determinó la amplitud de la señal de la primera derivada a 378 nm. Con estos se calcularon las concentraciones mediante la ecuación de la recta obtenida en el ensayo de linealidad.

Exactitud

Se utilizaron los datos experimentales obtenidos en el ensayo de repetibilidad. Se determinó el porcentaje de recobrado y el intervalo de confianza del mismo.

Selectividad

La selectividad se evaluó mediante la comparación de la amplitud de la señal de la primera derivada a 378 nm de una disolución patrón de B₁₂ (0,03 mg/mL) y de varias disoluciones que tenían la misma cantidad de B₁₂ que la disolución anterior, pero que se encontraban contaminadas con: 1) sus propios productos de degradación obtenidos en medio básico (tampón pH 9) [II], 2) con los productos de degradación de la vitamina B₁ (degradada a reflujo en medio neutro) [III] y 3) con los productos de degradación de la vitamina B₆ obtenidos en medio oxidante (peróxido de hidrógeno) [III]. Los valores promedios de la amplitud de la señal de la primera derivada de las disoluciones II y III se compararon mediante una prueba t de Student con los de la disolución de vitamina B₁₂ (0,03 mg/mL).

Determinación del contenido de vitamina B₁₂ en la formulación comercial

Se tomó el contenido de 10 bulbos de liofilizado y se disolvió de forma independiente en 25 mL de agua destilada. Luego se tomaron alícuotas de 1,5 mL de cada uno por separado y se llevaron a matraces aforados de 10 mL. A cada disolución se le registró el espectro de absorción de 200 a 400 nm y se determinó la amplitud de la señal de la primera derivada a 378 nm. Con estos valores se procedió a determinar el contenido de vitamina B₁₂ en la formulación mediante la ecuación de la recta obtenida en el ensayo de linealidad.

RESULTADOS

Desarrollo del método analítico

Se registraron los espectros de 200 a 400 nm de las disoluciones acuosas de vitaminas B₁, B₆ y B₁₂ a 0,01 mg/mL cada una (Figura 1). También se registraron los espectros de una disolución acuosa de vitamina B₁₂ (0,03 mg/mL) y de

una disolución mezcla de vitaminas B₁-B₆ (0,6 mg/mL) cada una; estas concentraciones se refieren a las cantidades en que ellas están presentes en la mezcla (Figura 2). A estos últimos espectros le fueron determinadas las primeras derivadas. Las longitudes de onda a las cuales la primera derivada de la mezcla B₁-B₆ tomó valores cero fueron: 212, 218, 220, 230, 235, 236, 240, 242, 255, 260, 366, 373 y 378 nm (Figura 3). La primera derivada de la vitamina B₁₂ no tomó valores cero a ninguna de las longitudes de onda anteriores (Figura 4). A partir de estos resultados se seleccionó la longitud de onda de 378 nm para la determinación de vitamina B₁₂, ya que este valor se encontraba en el rango de menor ruido.

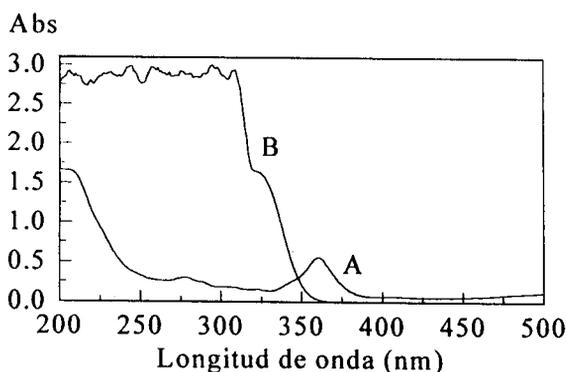


Figura 2. Espectros de las disoluciones acuosas de vitamina B₁₂ (A: 0,03 mg/mL) y mezcla B₁-B₆ (B: 0,6 mg/mL cada una). Concentraciones correspondientes a la cantidad en que las vitaminas están presentes en la formulación.

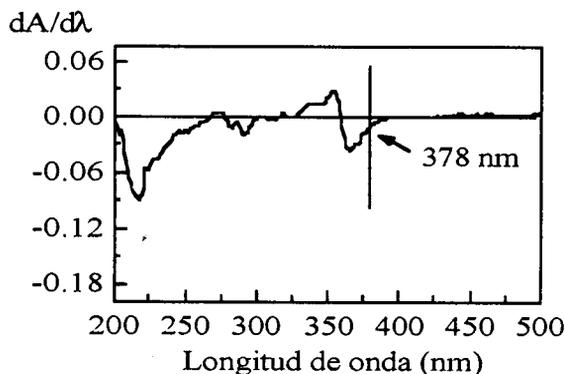


Figura 3. Derivada de primer orden del espectro de la disolución de vitamina B₁₂ (0,03 mg/mL).

Validación

En la Tabla 1 se muestran los parámetros estadísticos correspondientes a la curva de calibración de vitamina B₁₂.

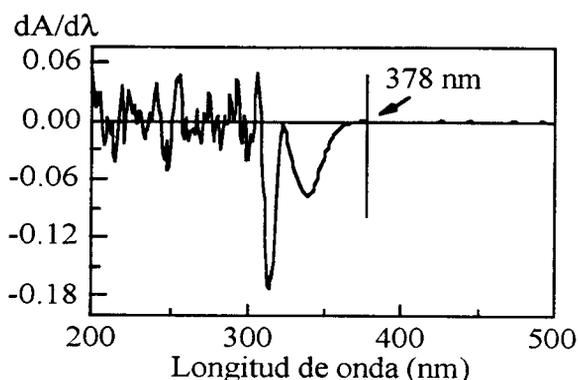


Figura 4. Derivada de primer orden del espectro de la disolución mezcla de las vitaminas B₁-B₆ (1,2 mg/mL de cada una).

Parámetro	Valor
Rango lineal (mg/mL)	0,01 - 0,05
Curva de calibración	Y = 0,525X
Pendiente, b	0,525
Desviación típica de b, Sb	0,0078
Coefficiente de variación de b, CVb	1,4857 %
Intercepto, a	-0,0003
Desviación típica de a, Sa	0,0002
Intervalo de confianza de a	[-0,00021;0,00091]
Coefficiente de correlación, r	0,9996
Tr	80,54

Tabla 1. Resultados del ajuste de la recta de la curva de calibración por el método de los mínimos cuadrados, donde: $t_{tab}=2,160$ ($\alpha=0,05$; $n=15$; $f=n-2=13$)- Valor de t_{tab} para el cálculo del intervalo de confianza y para evaluar la linealidad. tr : Valor experimental del estadístico t con $n-2$ grados de libertad para evaluar la linealidad.

En las Tablas 2, 3, 4 y 5 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de precisión, de exactitud, de selectividad y del contenido de vitamina B₁₂ en la formulación comercial, respectivamente.

	Repetibilidad		Reproducibilidad	
	Día 1 Analista 1		Día 2 Analista 2	
	Concentración 0,02 mg/mL	Concentración 0,03 mg/mL	Concentración 0,02 mg/mL	Concentración 0,03 mg/mL
Media	0,020	0,029	0,019	0,029
S	0	0,0004	0,0005	0,0005
CV	0%	1,52%	2,7%	1,67%

Tabla 2. Resultados del estudio de precisión (repetibilidad y reproducibilidad) en la determinación de la concentración de vitamina B₁₂. S: desviación típica. CV: coeficiente de variación

DISCUSIÓN

Los resultados del estudio de linealidad (Tabla 1) demostraron la existencia de una correlación linealmente positiva entre los valores de concentración estudiados y las respuestas obtenidas (t_r calculado $\gg t_{tab}$). El coeficiente de correlación fue cercano a la unidad. El coeficiente de variación de la pendiente fue menor del 2%, límite establecido¹⁵.

El intercepto fue no significativo y su intervalo de confianza incluyó al cero para un 95% de confiabilidad, lo que permite descartar la presencia de errores sistemáticos y confirmar el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer.

En el estudio de precisión (Tabla 2) los coeficientes de variación, tanto para repetibilidad como para reproducibilidad, fueron menores que los límites establecidos¹⁵ (2 y 3%, respectivamente) para las dos concentraciones estudiadas.

En el ensayo de exactitud (Tabla 3) el intervalo de confianza del porcentaje de recobrado incluyó al 100% para los dos niveles de concentración estudiados, por lo que el método se considera exacto.

En el ensayo de selectividad la amplitud de la señal de la primera derivada a 378 nm de la disolución I es menor que la de la disolución patrón de B₁₂ 0,03 mg/mL (Tabla 4). Esto demuestra que el método propuesto puede ser utilizado para el control de pureza del producto. Por otra parte, el método propuesto fue selectivo para la determinación de la vitamina B₁₂ en presencia de los productos de degradación de las vitaminas B₁ y B₆, ya que la amplitud de la señal de la primera derivada de las disoluciones II y III no difieren significativamente [t_{exp} (1,8345 para II) y (2,001 para III) $< t_{tab}$ (2,776)] de la disolución patrón de B₁₂ 0,03 mg/mL (Tabla 4).

El método desarrollado fue utilizado para determinar el contenido de B₁₂ en el inyectable, el

Cantidad añadida (mg/mL)	Cantidad media recuperada (mg/mL)	Porcentaje medio de recobrado	Cantidad añadida (mg/mL)	Cantidad media recuperada (mg/mL)	Porcentaje medio de recobrado
0,020	0,021	103	0,030	0,029	98
IC		97; 109	IC		95; 101

Tabla 3. Resultados del estudio de exactitud en la determinación de la concentración de vitamina B₁₂. IC: intervalo de confianza del recobrado.

	Amplitud de la señal de la primera derivada			
	B ₁₂	Disolución I	Disolución II	Disolución III
media	0,0175	0,0068	0,0165	0,0161
S	0,0003		0,0005	0,0008

Tabla 4. Resultados obtenidos en la determinación de la amplitud de la señal de la primera derivada de la vitamina B₁₂ en el ensayo de selectividad. S: desviación típica, $t_{tab}(0,05; 4) = 2,776$ - valor de la t de Student para la comparación de las medias.

Cantidad media (mg)	5,68
S	0,164
CV	2,88

Tabla 5. Resultados de la determinación de vitamina B₁₂ en la formulación comercial. S: desviación típica y CV: coeficiente de variación.

cual se encontró con una probabilidad de un 95% entre 5,30 y 6,06 mg. La cantidad expresada por el productor es de 5 mg, aproximadamente.

CONCLUSIONES

Se desarrolló un método rápido y sencillo para la determinación de vitamina B₁₂ en la formulación comercial en presencia de las vitaminas B₁ y B₆.

El método validado es lineal, preciso y exacto.

La espectrofotometría de derivadas es un método selectivo para la determinación de la vitamina B₁₂ en la formulación comercial en presencia de las vitaminas B₁ y B₆.

La espectrofotometría de derivadas es un método selectivo para la determinación de la vitamina B₁₂ en la formulación comercial en presencia de sus productos de degradación y los de las vitaminas B₁ y B₆.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Martindale (1996) "The Extra Pharmacopeia", (James EF Reynolds, ed.), London, Vol. 31, pág 1352

- Maeda, Y., K. Owada, J. Sato, T. Masui y H. Nakazawa (1989) *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **72**: 244-7
- Huan, X. y Z. Li (1991) *Zhongguo Yaoxue Zazhi* **26**: 34-6
- Quattrochi Oscar A., S.I. Abelaria y R.F. Laba (1992) "Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica", Artes Gráficas Farro SA, Argentina, pág. 76
- Stefova M., T. Stafilov, K. Stojanoski y B. CeregjanovaKrstic (1997) *Anal. Lett.* **30**: 2723-31
- Papadoyannis I.N., G.K. Tsioni, y V.F. Samanidou (1997) *J. of Liq. Chromatogr. and Rel. Techn.* **20**: 3203-31
- "Chromatography", Catalog 1997, Deerfield: Alltech Associates, Inc, p.534, e-mail: alltech@alltechmail.com, <http://www.alltechmail.com/>
- Morelli, B. (1996) *J. Anal. Chem.* **354**: 97-102
- Sánchez Rojas F., C. Boch Ojeda y J.M. Cano Pavón (1988) *Talanta* **35**: 753-61
- USP XXII/ NF XVII (1990) "Validation of compendials methods" pág. 1710
- Bunnage, L. "Biochrom 4060: Variable Wavelength Scanning Spectrophotometer, version 1." (1992) (Pharmacia LKB Biochrom Ltd.)
- "Beckman Instructions: 15-082 245-A" (1973) (Fullerton: Beckman Instrument Inc.) pág. 3
- "Appendix II B: Ultra-violet and Visible spectrophometry, A 74 y Appendix IA: General Reagents, Potassium Dichromate solution UV" (1988) (British Pharmacopoeia) pág A 44
- "Microcal Origin version 3.78" (1991-1995) Scientific and technical Graphics in Windows. Microcal Software, Inc.
- Rampazoo, P. (1990) *Il Farmaco* **45**: 807-15