
Desarrollo y validación del método para control de calidad de clorhidrato de tiamina en tabletas

Maritza Coureaux Gonzalez¹, María de los Ángeles Arada

Pérez², Yania Suarez Pérez³, Jorge Marín Moran²

¹Laboratorio Farmacéutico Oriente, BioCubaFarma. Santiago de Cuba. Cuba. ²Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba. Cuba. ³Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. La Habana. Cuba.

Development and validation of methods for quality control of hydrochloride thiamine tablets

Desenvolupament i validació del mètode pel control de qualitat de clorhidrat de tiamina en comprimits

Recibido: 25 febrero de 2014; revisado: 9 de mayo de 2014; aceptado: 16 de mayo de 2014

RESUMEN

Se propone un método espectrofotométrico diferencial para la determinación de Clorhidrato de Tiamina en las tabletas de Vitamina B₁ 50 mg, el cual es una modificación del método fluorométrico establecido en la Farmacopea USP 32 para este producto. Consiste en la determinación espectrofotométrica a 369 nm del tiocromo producido por oxidación de la tiamina en solución alcalina. La medida de la absorción se realiza tanto en solución alcalina como en las muestras oxidadas. El método resultó válido, ya que los parámetros de linealidad, precisión, exactitud y especificidad cumplieron los criterios de aceptación propuestos en la literatura especializada para éstos fines. Se aplicó el mismo método espectrofotométrico para el ensayo de uniformidad de contenido, demostrando su adecuado desempeño en el rango de 70 a 130% de la cantidad teórica declarada en las tabletas.

Palabras clave: Clorhidrato de tiamina; tabletas; espectrofotometría; validación.

RESUM

Es proposa un mètode espectrofotomètric diferencial per la determinació de clorhidrat de tiamina en els comprimits de vitamina B₁ 50 mg, el qual és una modificació del mètode fluorimètric establert en la Farmacopea USP 32 per aquest producte. Consisteix en la determinació espectrofotomètrica a 369 nm del tiocrom produït per oxidació de la tiamina en solució alcalina. La mesura de l'absorció es realitza tant en solució alcalina com en les mostres oxidades. El mètode va resultar vàlid, perquè els paràmetres de linealitat, precisió, exactitud i especificitat van complir els criteris d'acceptació proposats en la literatura espe-

cialitzada per aquestes finalitats. Es va aplicar el mateix mètode espectrofotomètric per l'assaig d'uniformitat de contingut, i es va demostrar que en el interval entre el 70 i el 130% de la quantitat teòrica declarada en els comprimits el funcionament era el correcte.

Paraules clau: Clorhidrat de tiamina; comprimits; espectrofotometria; validació.

SUMMARY

A differential spectrophotometric method for the determination of thiamine hydrochloride in Vitamin B₁ tablets 50 mg, which is a modification of the fluorometric method specified in USP 32 Pharmacopoeia for this product is proposed. Consists of spectrophotometric determination to 369 nm of the thiochrome produced by oxidation of thiamine in alkaline solution. The absorption measurement is performed both in alkaline solution and in the oxidized samples. The method was valid, since the parameters of linearity, precision, accuracy and specificity met the acceptance criteria given in the literature for these purposes. The same spectrophotometric method for content uniformity test was applied, demonstrating adequate performance in the range of 70 to 130% of the theoretical amount stated in the tablets.

Keywords: Hydrochloride thiamine; tablets; spectrophotometric; validation.

INTRODUCCIÓN

En el establecimiento oficial de un método analítico se prevé la necesidad de demostrar que éste se pueda aplicar con resultados satisfactorios. Con el fin de crear confianza en los resultados analíticos reportados por un laboratorio, el método utilizado debe cumplir ciertos requisitos de calidad, los cuales se determinan mediante el proceso de validación /1/.

Se entiende por validación de un método analítico a las mediciones realizadas para comprobar y describir que el mismo opera en todo momento de acuerdo con las expectativas y los requisitos impuestos respecto a su exactitud, uso, implantación y fuentes de error /2/.

En la actualidad, las Buenas Prácticas de Laboratorio, así como un extenso trabajo que ha puesto en evidencia fallas en el desarrollo analítico, imponen un creciente control de los parámetros a evaluar y mayor rigor en lo referente al procesamiento estadístico de los resultados. De ahí la importancia que reviste la validación de los métodos analíticos en la evaluación del control de calidad de un medicamento. La exigencia en el cumplimiento de la validación de los procesos y de los métodos analíticos es de aplicación general por todos los productores de medicamentos. Para las tabletas Clorhidrato de Tiamina se reporta un método fluorométrico en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 32) /3/ que se basa en la oxidación de la Tiamina a tiocromo con el ferricianuro de potasio, que tiene lugar en medio alcalino, obteniéndose el tiocromo que tiene una intensa fluorescencia azul y en Farmacopea Británica (BP 2009) /4/, se propone uno por cromatografía líquida de alta resolución para el control de calidad.

El **objetivo** de este trabajo es validar el método utilizado en la determinación de Clorhidrato de Tiamina en tabletas de Vitamina B₁ 50 mg de producción nacional, según las exigencias establecidas para los métodos de la categoría I de la USP /3/.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos utilizados en esta investigación fueron de calidad puro para análisis (PA). Todas las soluciones utilizadas fueron de clasificación R según USP 32 /3/. La cristalería utilizada está certificada por el Comité Estatal de Normalización (CEN).

Muestras: Se preparó un placebo a nivel de laboratorio, siguiendo la formulación tecnológica establecida para las tabletas de Vitamina B₁ 50 mg /5/.

Soluciones utilizadas en la determinación de la concentración del ingrediente farmacéutico activo en las tabletas de Vitamina B₁.

- **Reactivo Oxidante:** Se añadieron 2,0 mL de ferricianuro de potasio 1% m/v en un matraz de 50 mL. Se añadió hidróxido de sodio 3,5 mol/L y se enrasó a volumen. La solución se puede usar solamente hasta 4 horas después de preparada.
- **Solución P** (Concentración = 100 µg/mL): Se pesaron con exactitud 50 mg de S.R de Clorhidrato de Tiamina y se transfirieron a un matraz aforado de 100 mL, se añadió solución de ácido clorhídrico 0,2 mol/L y se agitó hasta disolución. Se enrasó a volumen con la misma solución y se mezcló. Se midieron

cuantitativamente 10 mL de la solución anterior y se transfirieron a un matraz de 50 mL. Se adicionó ácido clorhídrico 0,2 mol/L, se enrasó con la solución de HCl 0,2 mol/L y se mezcló.

- **Solución madre de Clorhidrato de Tiamina:** Se transfirieron a un matraz aforado de 100 mL, 50 mg de Clorhidrato de Tiamina materia prima y 170 mg de placebo exactamente pesados, se añadieron 70 mL de ácido clorhídrico 0,2 mol/L, se agitó por 10 minutos, se llevó a volumen con la misma solución y se mezcló. Se centrifugó un volumen aproximado de 60 mL durante 10 minutos a una velocidad de 2000 r.p.m. Se transfirió la solución sobrenadante a un recipiente adecuado.

A partir de la solución madre se prepararon soluciones de Clorhidrato de Tiamina (M), añadiendo volúmenes medidos cuantitativamente a matraces de 50 mL, los cuales fueron enrasados con ácido clorhídrico 0,2 mol/L. Posteriormente se realizó la mezcla. Las soluciones M resultantes corresponden a 5 niveles de concentración en el rango de 70 a 130 µg/mL equivalentes al 70 -130% del Ingrediente farmacéutico Activo (IFA).

- **Solución Placebo de Clorhidrato de Tiamina (Solución Pb):** Se pesaron con exactitud 170 mg de Placebo y se transfirieron a un matraz de 100 mL. Luego se añadieron 70 mL de ácido clorhídrico 0,2 mol/L; se agitó por 10 minutos y se enrasó a volumen con la misma solución. Una vez realizada la mezcla, se centrifugó un volumen aproximado de 35 mL durante 10 minutos a una velocidad de 2000 r.p.m y se transfirió la solución sobrenadante a un recipiente adecuado.

Método analítico para la valoración del Clorhidrato de Tiamina.

Procedimiento: Se midieron cuantitativamente 2 alícuotas de 2 mL de cada una de las siguientes soluciones P, M1, M2, M3, M4, M5, Pb y se transfirieron separadamente a 2 tubos Nessler con tapa de 50 mL. Los tubos se rotularon con los subíndices "O" y "B" equivalentes a "oxidado" y "sin oxidar," respectivamente.

A cada tubo con el rotulado "B" (P_B, M1_B, M2_B, M3_B, M4_B, M5_B y Pb_B) se le añadió 2,0 mL de hidróxido de sodio 3,5 mol/L y se mezcló. Pasado un minuto se adicionaron cuantitativamente 15 mL de alcohol isobutílico desecado. Se mezcló vigorosamente durante 90 segundos agitando los tubos manualmente. Posteriormente se adicionó cuantitativamente a cada tubo 5 mL de alcohol etílico absoluto. Se invirtieron los tubos 2 veces suavemente para separar las fases, para decantar o extraer aproximadamente 10 mL de la solución sobrenadante clara.

Para los rotulados "O" (P_O, M1_O, M2_O, M3_O, M4_O, M5_O y Pb_O), se repitió el mismo procedimiento anterior, pero sustituyendo los 2,0 mL de hidróxido de sodio 3,5 mol/L por 2,0 mL de reactivo oxidante.

Se ajustó el espectrofotómetro como se establece en la instructiva operacional del equipo (Espectrofotómetro UV-visible, SPECORD 50). Posteriormente se determinaron las absorbancias de las soluciones sin oxidar (P_B, M1_B, M2_B, M3_B, M4_B, M5_B, Pb_B) y las de las soluciones oxidadas (P_O, M1_O, M2_O, M3_O, M4_O, M5_O, Pb_O) a una longitud de onda de 369 nm, utilizando celdas 1 cm de paso de luz y como blanco alcohol isobutílico. El valor de absorbancia a utilizar fue la diferencia de (O - B).

Cálculos: Se calculó la absorbancia corregida promedio de la solución de referencia de la siguiente forma:

$$A_p^R = \frac{A_p \cdot p_t \cdot V}{p_R \cdot 100} \quad (1)$$

Donde:

A_p^R - Absorbancia corregida de cada solución de referencia.

A_p - Absorbancia del patrón.

p_t - Pesada teórica del patrón.

p_R - Pesada real del patrón.

V - Valoración del patrón.

100 - Factor matemático para el cálculo.

Se determinó el promedio de la absorbancia de las soluciones de referencia A_p^R , siempre que la diferencia entre estos no fuera mayor de 0,010.

Posteriormente se calculó la concentración real de las soluciones modelo (M) a cada concentración aplicando la siguiente expresión:

$$C_m^R = \frac{(A_{mO} - A_{mB}) * pmt}{(A_{pO} - A_{pB}) * pmr} * 200 \mu g / ml \quad (2)$$

Donde:

A_{mO} - Absorbancia de la solución muestra oxidada.

A_{mB} - Absorbancia del blanco de la muestra.

A_{pO} - Absorbancia de la solución de referencia oxidada.

A_{pB} - Absorbancia del blanco de la sustancia de referencia.

pmt - Concentración teórica de la muestra.

pmr - Concentración real de la muestra.

200 - Concentración teórica de la solución de Vitamina B1 al 100 % expresada en $\mu g/ml$.

C_m^R - Concentración real de las soluciones modelo.

Validación del método analítico desarrollado para la valoración de las tabletas.

El procesamiento estadístico de los resultados se realizó con ayuda del programa STATGRAPHICS para Windows versión 5.1 del año 2001. El método para la valoración de las tabletas de Vitamina B₁ desarrollado en el laboratorio requirió validación exhaustiva considerando los parámetros de la Categoría I /3/:

- **Especificidad.**

Se determinó la especificidad con respecto a los excipientes. Se evaluaron por triplicado soluciones placebo cargadas con la materia prima de Clorhidrato de Tiamina correspondiente al 100% de concentración, utilizando la técnica propuesta. Se calculó el porcentaje de recuperación vs la materia prima certificada a través de la fórmula:

$$R = \frac{M}{P} * 100 \quad (3)$$

Donde: M: porcentaje de IFA recuperado en las muestras ensayadas.

P: porcentaje de IFA teórico de la materia prima de referencia.

Se utilizó el programa estadístico antes mencionado para realizar el cálculo de la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Se realizó la prueba de normalidad a través del test de Kolmogorov-Smirnov y una prueba de hipótesis de comparación de medias a través de la t de Student. Las desviaciones típicas se compararon a través de una prueba de contraste F.

Criterio: El método se consideró específico si la respuesta del placebo no difiere significativamente del blanco y si

los placebos cargados no difieren significativamente de la solución de referencia.

Linealidad del sistema. Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer.

Para evaluar el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer se construyó una curva de calibración de absorbancia vs concentración, utilizando las soluciones modelos correspondientes al 80, 90, 100, 110 y 120 $\mu g/mL$. Estas diluciones correspondieron a las concentraciones de 80, 90, 100, 110 y 120 % del IFA en relación con el contenido nominal en las tabletas. Los resultados se procesaron por regresión lineal y se aplicaron los criterios de aceptación siguientes: $r \geq 0,99$; $r^2 \geq 0,98$; prueba de proporcionalidad del método analítico (se empleó la prueba estadística t de Student para n-2 grados de libertad siendo n el número total de pares de valores; donde t experimental < t teórica); prueba de la hipótesis nula de la pendiente $b = 0$ (se determinó a partir de una prueba ANOVA de la regresión, o sea, la probabilidad (p) asociada con el valor de la pendiente: si la $p < 0,05$ el valor de "b" difiere significativamente de cero). Además se calcularon los factores respuesta para cada punto y el CV que debe ser menor que 5%.

Linealidad del método:

Para la evaluación de éste parámetro se utilizaron las muestras obtenidas de los placebos cargados con IFA en las mismas concentraciones descritas para la evaluación de la linealidad del sistema; de manera que se construyó la curva de calibración de concentración experimental (en porcentaje) vs concentración teórica (en porcentaje) y se aplicó el mismo procesamiento estadístico y los mismos criterios de aceptación descritos para la linealidad del sistema.

Exactitud:

Para la evaluación de éste parámetro se utilizaron las soluciones placebos cargados con IFA equivalentes al 80, 100 y 120% de Clorhidrato de Tiamina, realizando diez réplicas para cada concentración. Se construyó la curva de recuperación que incluyó los valores obtenidos para 3 niveles de concentración: bajo (80 %), medio (100 %) y alto (120 %). Además se calculó el porcentaje de recobrado (R), el recobrado medio (\bar{R}) y del coeficiente de variación total (CV).

Criterios de aceptación: \bar{R} : 97 – 103% y CV $\leq 3,0\%$

Además, se realizó la prueba G de Cochran, para determinar si el factor concentración tiene alguna influencia en la variabilidad de la concentración en todos los niveles de concentración.

Si $G_{exp} < G_{tab}$ las varianzas de las tres 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 t de Student para demostrar que no existen diferencias significativas entre el valor medio de recobrado obtenido y el 100%.

- **Precisión.** Se evaluó en función de la repetibilidad y la precisión intermedia.

- **Repetibilidad:** Se analizaron 10 réplicas de los 3 niveles de concentración utilizados para evaluar la exactitud. Se calculó para cada punto el coeficiente de variación (CV). Estas determinaciones se realiza-

ron por el mismo analista en las mismas condiciones de trabajo. $CV \leq 2,0 \%$.

- **Precisión intermedia.** Se prepararon nuevas soluciones modelo con las mismas materias primas e iguales concentraciones. Participaron 2 analistas en 2 días diferentes. Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante un análisis de varianza para la que se realizó la prueba de Tukey o de diferencias francamente significativas y se calculó el CV, el cual debe ser $\leq 2,0 \%$.
- **Rango.**
Se definió como el intervalo entre los niveles superiores e inferiores en que se cumplieron los requerimientos de precisión, exactitud y linealidad del método.

Evaluación de la linealidad del sistema para aplicación del método al ensayo de uniformidad de contenido.

Se utilizaron las soluciones modelos considerando el intervalo de concentraciones desde 70 - 130%. Se verificó el cumplimiento de la linealidad del sistema, teniendo en cuenta los mismos criterios de aceptación descritos con anterioridad.

Aplicación de los métodos analíticos al control de calidad de tabletas de Vitamina B₁ 50 mg.

Se evaluaron lotes producidos de tabletas de Vitamina B₁ 50 mg elaborados en la Empresa Laboratorio Farmacéutico Oriente, durante 12 meses. Se aplicaron los ensayos de valoración y uniformidad de contenido. Los criterios de aceptación fueron los establecidos en la Farmacopea USP 32 /3,6/.

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

En la Tabla 1 se resumen los valores promedios obtenidos en el ensayo de especificidad para el método espectrofotométrico. Como se puede observar ni el placebo ni el blanco dieron respuesta analítica cuantificable en el rango de interés analítico para el Clorhidrato de Tiamina. Al comparar los resultados del análisis del Clorhidrato de Tiamina al 100% de concentración, con el placebo cargado con el analito en esta misma concentración, los valores fueron concordantes. Al comparar las medias se obtuvo que el p-valor calculado es mayor que 0,05 lo cual indica que no hay diferencias entre las medias obtenidas para un nivel de confianza del 95,0%. Al comparar el radio de las desviaciones típicas de las poblaciones de las que proceden las dos muestras, el p-valor calculado no fue inferior a 0,05 por lo que no hay diferencias significativas entre las desviaciones típicas de las muestras para un nivel de confianza del 95,0%. Los placebos cargados no difieren significativamente de la solución de referencia por lo que el método se consideró suficientemente específico para control de calidad.

Tabla 1: Resultados del estudio de la especificidad.

Muestra a evaluar	Concentración Media (%)	Recobrado medio (%)
Clorhidrato de Tiamina MP	100,02	100,02
Clorhidrato de Tiamina MP + Placebo	100,04	100,04
Placebo	0,0020	0,00
Blanco de reactivo	0,0005	0,00
Prueba t	t = -0,239 p-valor = 0,817	
Prueba F	F = 0,9444 p-valor = 0,957	

MP: materia prima

La Fig. 1 muestra las curvas de calibración correspondientes a la determinación de la linealidad del sistema (Fig.1A) y del método (Fig. 1B). En la Tabla 2 se resumen los resultados del procesamiento estadístico aplicado, lo cual refleja el cumplimiento de todos los criterios establecidos, demostrando la proporcionalidad existente entre concentración de analito y la respuesta medida en cada caso. Tal es el caso de los valores de r y r^2 muy próximos a la unidad; los coeficientes de variación de los factores respuesta menores de 5 % y los intervalos que incluyeron el cero, cumpliendo con la condición de proporcionalidad.

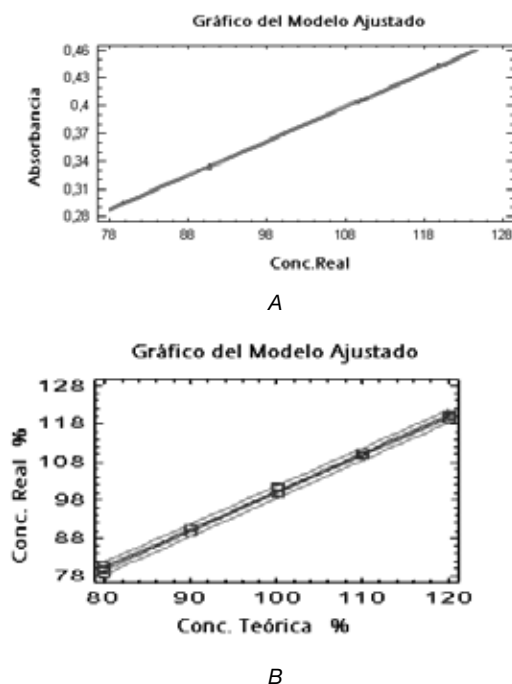


Fig 1: Curvas de calibración para la linealidad del sistema (A) y del método (B).

Tabla 2: Resumen estadístico de los resultados obtenidos en el ensayo de linealidad del sistema y del método.

Parámetro	Linealidad del sistema	Linealidad del método
Ecuación de la recta	Absorbancia = 0,001275 + 0,003702*Conc	Conc real = 0,680124 + 0,993913*Conc teórica
Coefficiente de correlación lineal (r)	0,9999	0,9988
Coefficiente de determinación (r^2)	0,9998	0,9976
Error absoluto de la media	0,0004	0,5288
Estadístico Durbin-Watson	2,0889 (P=0,3256)	2,5020 (P=0,0641)
Significación del intercepto para $\alpha = 0,05$	P valor Experimental=0,2653 $t_{exp} = -0,342 < t_{tab} = 2,07$	P valor experimental=0,5468 $t_{exp} = 0,61 < t_{tab} = 2,07$
Intervalo de confianza del intercepto	(-0,001; 0,004)	(-1,690; 2,980)
Coefficiente de variación de los factores respuesta (CV _f)	2,200 %	0,670 %

*Conc: concentración

*exp: experimental

*tab: tabulada

Igualmente para la exactitud los resultados fueron satisfactorios, ya que se observa que todos los por cientos de

Tabla 3: Resultados del ensayo de exactitud para las concentraciones estudiadas.

Concentración 80%				Concentración 100%				Concentración 120%			
Conc (%)	R (%)	Conc (%)	R (%)	Conc (%)	R (%)	Conc (%)	R (%)	Conc (%)	R (%)	Conc (%)	R (%)
80,2	100,2	80,8	101,0	100,1	101,1	100,0	100,0	119,0	100,0	119,2	99,33
79,9	99,88	79,4	99,25	99,7	99,7	101,6	101,6	120,1	100,2	119,0	100,0
80,2	100,2	80,2	100,2	99,7	99,7	99,7	99,7	120,3	100,5	120,1	100,2
78,6	98,25	80,2	100,2	101,6	101,6	101,1	101,1	120,6	99,33	120,3	100,5
80,8	101,0	79,9	99,88	100,0	100,0	99,7	99,7	100,0	100,0	100,0	100,0
R medio = 100,02%				R medio =100,3%				R medio = 99,69%			
C.V = 0,81%				C.V = 0,79%				C.V = 0,52%			
t= 0,10 Valor-P= 0,92				t= 1,61 Valor-P= 0,14				t= 0,25 Valor-P=0,82			
IC = 99,45-100,60				IC = 99,83-101,01				IC =99,65-100,43			
%R medio global = 100,03% Criterio = 97-103%											
Intervalo de Confianza= 99,74 -100,32%											
CV global = 0,70% Criterio ≤ 3,0%											
Resultados del ANOVA: Razón F = 0,89 ; Valor-P= 0,42 (entre e inter grupos)											
Contraste %rec 100 - % rec 120						Diferencia=0,38;			Límite=0,72		
Contraste %rec 100 - % rec 80						Diferencia=0,39;			Límite=0,72		
Contraste %rec 100 - % rec 80						Diferencia=0,38;			Límite=0,72		
G de Cochran						Prueba =0,445			Valor-P =0,632		
t de Students: H ₀ : media= 100 t exp = 0,242 H alternativa: media <> 100 P-Valor = 0,81 > 0,05 No se puede rechazar la hipótesis nula (H ₀)											

*Conc: concentración

*Abs: absorbancia

*R: Recobrado

*CV: Coeficiente de variación

*IC: Intervalo de confianza

Tabla 4: Resultados de la precisión del método.

Ensayo	Parámetro/ Prueba	80%	100%	120%
Repetibilidad	CV (%)	1,31	0,62	0,54
Precisión intermedia	ANOVA (Varianza)	Cociente F= 0,85 P-valor=0,50	Cociente F= 0,19 P-valor= 0,90	Cociente F= 2,64 P-valor= 0,12
	Contraste	G de Cochran= 0,50 p-valor =0,49	G de Cochran= 0,41 p-valor = 0,83	G de Cochran = 0,48 p-valor= 0,55

recobrados y los CV cumplieron con los criterios de aceptación establecidos (Tabla 3). Se comprobó que los datos de % de recuperación responden a una distribución normal con un nivel de confianza mayor o igual al 95%, calculada por el estadígrafo de Kolmogorov- Smirnov donde el p-valor más pequeño fue mayor de 0,10. Se aplicó el Test de Cochran para determinar si el factor concentración influyó en los resultados y se obtuvo un valor de G de 0,445 y el p-valor de 0,632 lo que demuestra que las varianzas de las tres concentraciones fueron equivalentes, o sea, que el factor concentración no influyó en la variabilidad de los resultados. Al realizar la prueba de significación de Student para los resultados obtenidos, t experimental fue de 0,242 y el p-valor de 0,811 por lo que no existieron diferencias significativas entre la recuperación media y el 100%, confirmando la buena exactitud del método.

El análisis de la repetibilidad se realizó siguiendo fielmente las condiciones exigidas en el desarrollo de la técnica analítica. En la Tabla 4 se resumen los resultados del análisis estadístico realizado, los cuáles muestran que el coeficiente de variación fue menor de 2% en cada nivel de concentración estudiado para la repetibilidad.

El procedimiento empleado demostró que las varianzas fueron homogéneas y se puede afirmar que no hay diferencias significativas entre las muestras evaluadas para cada nivel de concentración. Con la prueba de Cochran se comprobó que no hay diferencias significativas entre las desviaciones típicas dentro de cada una de las concentraciones estudiadas ya que el menor de los p-valores fue superior a 0,05.

Para la linealidad del sistema, las desviaciones estándares relativas fueron menores del 2% para cada una de las concentraciones evaluadas (70, 90, 100, 110 y 130%). Además se construyó la curva de calibración correspondiente y los resultados de los 50 puntos experimentales (5 concentraciones con 10 réplicas cada uno) fueron procesados estadísticamente por regresión lineal. El cumplimiento satisfactorio de todos los criterios avaló la linealidad del método en el rango deseado para su aplicación en el ensayo de uniformidad de contenido. Se obtuvo la siguiente ecuación de la recta:

$Y = 0,9917x + 0,7090$, siendo $r = 0,9975$ y $r^2 = 0,9949$, el intercepto no difiere significativamente de cero ya que t experimental = 0,6895 fue inferior a la tabulada (2,0107) para 48 grados de libertad. La pendiente es próxima a la

unidad, avalado por un valor de $p = 0,0000 < 0,05$ y el $CV_f = 0,60$ no superó el 5% establecido como límite.

En la Fig. 2 se presenta el comportamiento del parámetro concentración de analito, obtenido por el método desarrollado y validado para el control de calidad de las tabletas de Clorhidrato de Tiamina. Todos los lotes del producto terminado evaluados respondieron satisfactoriamente a las especificaciones de calidad establecidas / 6/.

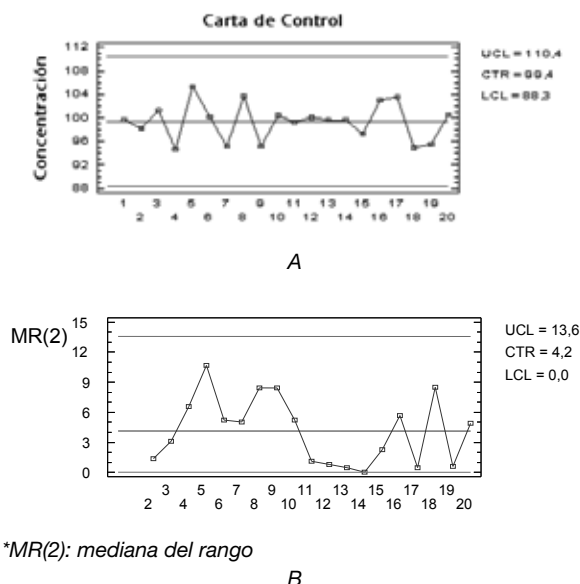


Fig 2: Gráfico de control de datos individuales para la concentración de Clorhidrato de Tiamina en las tabletas obtenida al aplicar el método desarrollado y validado para control de calidad a 20 lotes industriales. Gráfico de media (A) y gráfico de mediana del rango (B)

Además de encontrar todos los puntos dentro de los límites de control, tanto para la tendencia central (concentración) como para el gráfico de dispersión (Mediana del rango = $MR(2)$), no se detectan signos de falta de aleatoriedad. Estos resultados corroboran la consistencia del proceso estudiado.

La Tiamina presenta una marcada absorción en la región ultravioleta del espectro, que depende del pH de la solución. Esta propiedad puede aplicarse al análisis cuantitativo de Tiamina en soluciones puras /7/ ya que éste método de análisis no es selectivo, porque existen muchos compuestos que absorben en la misma región del ultravioleta. Como las tabletas de vitamina B₁ tienen en su composición un solo ingrediente farmacéutico activo (IFA). La medida de la absorción del tiocromo se puede realizar tanto en solución acuosa alcalina, como en extracto isobutanolico de la misma /8- 10/.

El método espectrofotométrico seleccionado aunque es mucho menos sensible que el fluorométrico reportado como método oficial /3,4/ tiene como ventaja que es una técnica diferencial, lo que le aporta una cierta especificidad frente a los excipientes y productos de degradación, fundamentalmente debido al producto formado por oxidación (tiocromo). Éste complejo formado absorbe en la región UV, lo que permite que se pueda determinar el contenido del principio activo con facilidad en las tabletas de Vitamina B₁ 50 mg.

A partir del análisis estadístico del ensayo de especificidad se confirmó que los excipientes no interfirieron en la

determinación del analito, lo cual concuerda con otros estudios realizados donde se plantean que la mayoría de los excipientes que se utilizan en producción de tabletas, no interfieren en la determinación de Tiamina por el método del tiocromo /10/.

El conjunto de resultados alcanzados para los ensayos de linealidad demuestran que los puntos experimentales se encontraban cercanos a la ecuación calculada al considerar el modelo de regresión lineal como el mejor ajuste a estos puntos. Este mismo comportamiento obtenido para la curva de recuperación del ensayo de exactitud avala la ausencia de errores sistemáticos.

El análisis de la precisión permite afirmar que los errores aleatorios no tienen un impacto directo en los resultados experimentales derivados de la aplicación del método desarrollado.

Las tabletas de Vitamina B₁ que se producen en el Laboratorio Farmacéutico Oriente tienen como masa promedio 220 mg y 50 mg de dosis por lo que se aplica para el ensayo de uniformidad de contenido el mismo método espectrofotométrico que se utiliza en el ensayo de valoración /11/.

La ausencia de síntomas de falta de aleatoriedad debidos a la incidencia de causas asignables, demuestra que el parámetro analizado muestra un patrón bajo control estadístico, debido solo a la variabilidad natural inherente al proceso.

CONCLUSIONES

El método espectrofotométrico desarrollado para la valoración de las tabletas de Vitamina B₁ 50 mg, resultó válido, ya que los parámetros de linealidad, precisión, exactitud y especificidad cumplieron los criterios de aceptación propuestos en la literatura especializada para éstos fines.

BIBLIOGRAFÍA

1. OMS. Guía de la Organización Mundial de la Salud sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF). Segunda parte. Validación. Ginebra. Suiza. 1998.
2. Guía para la validación de métodos de ensayos químicos para alimentos. NC- TS- 368: 2004. 1^{ra} Edición. Abril. 2004.
3. United States Pharmacopoeia. United States Pharmacopoeia Convention Edition 32. USA. 2009. USP32-NF27. p 3719.
4. British Pharmacopoeia (BP). Her Majesty Stationary Office. London; UK 2009. p10149 (Mark electronic).
5. Expediente Maestro de fabricación de tabletas de Vitamina B₁. EM 01. 009. Edición 01. Laboratorio Farmacéutico Oriente. 2010.
6. Especificaciones de Calidad, Tablet de Vitamina B₁ 50 mg. Esp. 11 .003T. Edición. 01. Laboratorio. Oriente. Junio, 2011.
7. Doherty, J.J.; Cane, N. F. "Thiamine Hydrochloride Injection". Workes Pharmacy Pharmacol. 1955,7, p1053.
8. Departamento de la Agricultura. Análisis de Vitamina en Alimentos - FAO [citado el 20 de octubre del 2010]. Disponible en: <http://www.fao.org>

-
9. Jansen B. "Determinación de Tiamina". Anal. Chim.1980, 52, p 2177-2184.
 10. Connors K. A.; Godon L. A. Chemical Stability of Pharmaceuticals. Text Book for pharmacists. New York: A Wiley –Intersciencie. Publication 1979, 318 p.
 11. Uniformidad de contenido de Clorhidrato de Tiamina para Tabletas de Vitamina B₁. INS 03.97T. Edición. 01. Laboratorio. Oriente. Julio, 2011.