

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LOS MÉTODOS DE
ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA Y CROMATOGRFÍA LÍQUIDA
DE ALTA RESOLUCIÓN PARA CUANTIFICACIÓN DE TIAMINA,
PIRIDOXINA Y CIANOCOBALAMINA EN SOLUCIONES
INYECTABLES

MARIO ÁYAX POLINICES SANTISTEBAN PAZ

Químico Farmacéutico

Guatemala, Noviembre de 2003

JUNTA DIRECTIVA

M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán	Decano
Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona	Secretaria
Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo	Vocal I
Lic. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Dr. Federico Adolfo Richter Martínez	Vocal III
Br. Carlos Enrique Serrano	Vocal IV
Br. Claudia Lucía Roca Berreondo	Vocal IV

DEDICATORIA

A esa constante presencia, razón de nuestro ser y existir

A mis Padres

Gladis Argelia Paz Solórzano y Mario Augusto Santisteban Véliz, por su amor, paciencia y esfuerzo al haberme dado todo cuanto estuvo a su alcance y más.

A mis Hermanas

Bagda y Briseida por su cariño, apoyo, ayuda y presencia a lo largo de mi vida.

A mi Abuela y Tío

Ernestina Véliz quien me brindo amor y confianza; además, con la sabiduría que dan los años fue fuente de aprendizaje.

Jorge Pinzón, quien fue ejemplo de esfuerzo, lucha, amor y superación.

AGRADECIMIENTOS

- A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por darme los conocimientos necesarios para mi formación profesional.
- A mi asesora, Licda. Paulina Castellanos de Monroy y familia, por su cariño, amistad y apoyo en la realización de esta tesis.
- A mi coasesor Lic. Élfego Rolando López, guía valiosa en la realización de la tesis.
A él y a mis demás profesores, los llevaré en mi recuerdo.
- Al Laboratorio Nacional de Salud, por haberme brindado la oportunidad de realizar esta tesis. Asimismo, a aquellas personas que me brindaron su amistad y apoyo, en especial a mi “asesora técnica”, Licda. Millie Cruz.

ÍNDICE

1. Resumen	01
2. Introducción	02
3. Antecedentes	03
4. Justificación	05
5. Objetivos	06
6. Hipótesis	07
7. Materiales y métodos	08
8. Resultados	14
9. Discusión de resultados	23
10. Conclusiones	26
11. Recomendaciones	27
12. Referencias	28
13. Anexos	31

1. Resumen

Mediante el presente trabajo de investigación, se evaluó la eficiencia de los métodos de espectrofotometría infrarroja y cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de Tiamina, Piridoxina y Cianocobalamina en soluciones inyectables; mediante la comparación de la concordancia, reproducibilidad, costo y tiempo para la cuantificación de las sustancias en estudio.

Se analizaron 12 muestras, seleccionadas al azar, las que fueron recibidas en el Laboratorio Nacional de Salud durante un año. Las muestras fueron analizadas por el método de cromatografía líquida de alta resolución y por el método de espectrofotometría infrarroja propio del Laboratorio Nacional de Salud.

Los resultados obtenidos fueron sometidos al siguiente análisis estadístico: t de Student y coeficiente de correlación de concordancia, para determinar la equivalencia de ambos métodos y reproducibilidad de datos. Posteriormente se evaluó el costo y tiempo requerido para el desarrollo del análisis.

Los resultados obtenidos demuestran que el análisis de Tiamina y Piridoxina pueden efectuarse indistintamente por cualesquiera de los métodos. La cuantificación de Cianocobalamina, por no ser el método de espectrofotometría infrarroja equivalente, debe llevarse a cabo por cromatografía líquida de alta resolución. En cuanto al costo, el método de espectrofotometría infrarroja es una opción para obtener un análisis de menor costo y menor tiempo de análisis.

2. INTRODUCCIÓN

Los medicamentos son sustancias simples o compuestas, naturales o sintéticas o asociación de ellas, destinadas a prevenir, tratar, aliviar o curar enfermedades o síntomas asociados a las mismas. Las vitaminas son sustancias medicamentosas, que contribuyen al correcto funcionamiento del organismo. Sin embargo, tanto la deficiencia de éstas como el exceso son perjudiciales a la salud del ser humano. Por ello, el tratamiento con vitaminas debe ser administrado con sumo cuidado y vigilancia para evitar efectos no deseados. Es importante mencionar de igual forma que el control de estos medicamentos debe desarrollarse con seriedad, y exactitud.

El complejo B, el cual se compone principalmente por tiamina (vitamina B₁), piridoxina (vitamina B₆) y cianocobalamina (vitamina B₁₂), está indicado en casos de neuropatías periféricas, las cuales afectan a una buena parte de la población guatemalteca. Este tipo de productos se utiliza mayormente en forma inyectable por vía IM, debido a que presentan una mejor absorción y como consecuencia un efecto rápido, por lo tanto el análisis fisicoquímico debe garantizar que el medicamento es eficaz, confiable y de calidad.

Para el control de calidad, especialmente la cuantificación de este tipo de productos, el Laboratorio Nacional de Salud (LNS) utiliza la metodología de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), método que tiene como referencia la farmacopea estadounidense (USP XXIV). Sin embargo, el laboratorio cuenta con un método alternativo, Espectrofotometría Infrarroja, el cual a la fecha, no ha podido ser implementado por que se carece de datos analíticos comparativos que garanticen la obtención de resultados similares.

3. ANTECEDENTES

Entre la información disponible en cuanto a la comparación de métodos analíticos, pueden citarse los siguientes trabajos:

1. Tesis Ad Gradum de Héctor Rosito, titulada *Estudio comparativo de dos métodos para determinar partículas extrañas en inyectables de pequeño volumen envasados en recipientes plásticos de polipropileno*. El trabajo de investigación evaluó la efectividad de dos métodos especificados por la U.S.P. XXII., además se analizaron los costos y tiempo en llevar a cabo ambos métodos (19).

2. *Determinación del contenido y la potencia antibiótica de Penicilina G, Penicilina V y Ampicilina, mediante la comparación de los resultados obtenidos por los métodos microbiológico, yodomérico y cromatografía líquida de alta presión* elaborada por Ligia Orozco, se compara la sensibilidad y exactitud relativas de métodos yodométricos, cromatografía líquida de alta presión y microbiológico para la cuantificación de principios activos en muestras de ampicilina sódica inyectable, Penicilina G inyectable y Penicilina V en tabletas (13).

3. Tesis Ad Gradum de Mónica Vargas, titulada *Estudio comparativo de dos métodos (método por cromatografía de gas y método por electrodo selectivo de flúor) para determinar flúor en crema dental*. busca comparar dos métodos de análisis para determinar flúor en cremas dentales por CG (método propuesto por la Comisión Guatemalteca de Normas) y el método por electrodo selectivo de Flúor. Concluye que un método era más preciso que el otro, sin embargo los dos presentaban valores de exactitud aceptables. Además, calculó el costo de cada método en cuanto a tiempo y enceres (24).

4. *Comparación de dos métodos alternativos para la cuantificación de sodio y potasio en sales de rehidratación oral, fabricadas en el laboratorio de producción de medicamentos –LAPROMED- de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia*, tesis de licenciatura de Rossama Córdón, tuvo como objetivo la comparación de dos métodos de análisis, la fotometría de llama y la potenciometría de electrodo selectivo de iones, para la determinación de sodio y potasio en sales de rehidratación oral. Se encontró que para esa determinación la fotometría de llama y el electrodo selectivo de iones son técnicas equivalentes (4).

En cuanto a la evaluación de métodos de análisis, no se encontró más referencias bibliográficas.

4. JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo se propone evaluar la utilización de un método que contenga mayores ventajas que el que se utiliza ordinariamente en el Laboratorio Nacional de Salud (LNS): disminuir el tiempo de análisis, uso de menor cantidad de reactivos, disminución de costos y obtención de similares resultados.

Se analizará determinada cantidad de muestras, mediante el método de HPLC (método oficial) y por espectrofotometría infrarroja. Se calculará los costos de análisis y reactivos empleados en el transcurso de los análisis de cada uno de los métodos, al igual que el tiempo empleado para la determinación de resultados de cada uno de ellos.

5. OBJETIVOS

5.1 General:

- Comparar el método de cromatografía líquida de alta resolución y el método de espectrofotometría infrarroja en el análisis de Tiamina, Piridoxina y Cianocobalamina en soluciones inyectables, en cuanto a concordancia, tiempo y costo.

5.2 Específicos:

- Evaluar la eficiencia del método de espectrofotometría infrarroja respecto a la cromatografía líquida de alta resolución en la cuantificación de Tiamina, Piridoxina y Cianocobalamina en soluciones inyectables.
- Comparar la concordancia de los resultados obtenidos por el método de cromatografía líquida de alta resolución y el método de espectrofotometría infrarroja.
- Evaluar el tiempo de análisis de Tiamina, Piridoxina y Cianocobalamina en soluciones inyectables mediante el uso de dos métodos diferentes para su análisis.
- Determinar la cantidad de reactivos en el análisis de tiamina, piridoxina y cianocobalamina en soluciones inyectables en los métodos evaluados.
- Evaluar costos de análisis de tiamina, piridoxina y cianocobalamina en soluciones inyectables por los métodos evaluados.

6. HIPÓTESIS

El análisis de Tiamina, Piridoxina y Cianocobalamina en soluciones inyectables por **espectrofotometría infrarroja** reduce el tiempo empleado en el proceso, baja los costos de operación, disminuye la cantidad de reactivos que se utilizan en el análisis, y genera resultados similares que el método de **cromatografía líquida de alta resolución**.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Universo y Muestra

Muestras que ingresaron al Laboratorio Nacional de Salud durante el período del 1 de Enero de 2002 al 31 de Diciembre del mismo año. Muestras que ya fueron analizadas y se presentó el dictamen por parte del Laboratorio.

Método de análisis: Cuantificación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución y Espectrofotometría Infrarroja.

7.2 RECURSOS

7.2.1 RECURSOS HUMANOS:

- Autor: Br. Mario Santisteban.
- Asesora: Licda. Paulina Castellanos de Monroy.
- Coasesor: Lic. Elfego Rolando López.

7.2.2 RECURSOS INSTITUCIONALES:

- Biblioteca Central de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Biblioteca de la Universidad del Valle de Guatemala.
- Centro Guatemalteco de Información de Medicamentos (CEGIMED).
- Sección Físicoquímico de Medicamentos del Laboratorio Nacional de Salud.

7.3 Recursos Materiales

7.3.1. Equipo:

- Balanza analítica Metler Toledo.
- Unidad de filtración y bomba de vacío.
- Cromatógrafo Líquido de alta resolución Merck Hitachi con detector UV.
- Columna para vitaminas.
- Espectrofotómetro infrarrojo.
- Computadora Dell.
- Impresora Hewlett Packard.
- Ultrasonido.

7.3.2. Materiales:

- Filtros cartucho de 0.45 μm .
- Papel Parafinado.
- Espátula.
- Membranas hidrofílicas 0.45 μm .
- Jeringa.
- Papel Kleenex.

7.3.3. Cristalería:

- Balones acéricos aforados de 5, 10, 50, 100 y 1000ml
- Beaker de 100, 1000 ml
- Pipetas volumétricas de 2, 3 y 5 ml
- Probetas de 10, 50, 500 y 1000 ml
- Kitazato de 1000 ml

7.3.4 Reactivos:

- Agua HPLC.
- Metanol HPLC.
- Acetonitrilo HPLC.
- Ácido acético glacial.
- Sal sódica de ácido 1 hexanosulfónico.
- Acetona.
- Estándares de tiamina, piridoxina y cianocobalamina.

7.4. Procedimiento

7.4.1 Para la recolección de datos:

Se seleccionaron las muestras de Tiamina, Piridoxina y Cianocobalamina en soluciones inyectables que hayan ingresado durante un año, con valor reconocido, para el análisis con ambos métodos de estudio.

7.4.2. Para el análisis de Muestras:

7.4.2.1 Método USP para tiamina y piridoxina (HPLC).

Preparación de solución de disolución:

Preparar una mezcla de agua, acetonitrilo y ácido acético glacial (94:5:1).

Preparación de fase móvil:

Preparar una mezcla de agua, metanol y ácido acético glacial (73:27:1) que contiene 140 mg de sal sódica de ácido 1-hexanosulfónico, por cada 100 mililitros. Filtrar por membrana de nylon de 0.45µm y agitar 5 minutos en ultrasonido.

Preparación de la muestra de tiamina y Piridoxina:

Pipetear 2 mililitros de la muestra de complejo "B" y aforar a 100 mililitros con la solución de disolución. Agitar con magneto por 10 minutos y 5 minutos con ultrasonido. Antes de inyectar, filtrar por membrana de nylon(13mm) de 0.45um.

Preparación del estándar:

Pesar 20 mg de tiamina y 10 mg de piridoxina, todas bases anhidras. Luego aforar a 100 mililitros con la solución de disolución, agitar con magneto durante 10 minutos y luego 5 minutos con ultrasonido. Antes de inyectar, filtrar por membrana de nylon(13mm) de 0.45um.

La cuantificación se realiza a una longitud de onda de 360nm en el detector.

7.4.2.2. Método para cianocobalamina (HPLC).

Preparación de solución de disolución:

Preparar una mezcla de agua, acetonitrilo y ácido acético glacial (94:5:1).

Preparación de fase móvil:

Preparar una mezcla de agua, metanol y ácido acético glacial (73:27:1) que contiene 140 mg de sal sódica de ácido 1-hexanosulfónico, por cada 100 mililitros. Filtrar por membrana de nylon de 0.45um y agitar 5 minutos en ultrasonido.

Preparación de la muestra de Cianocobalamina:

Pipetear 2 mililitros de la muestra de complejo "B" y aforar a 100ml con la solución de disolución. Agitar con magneto por 10 minutos y

5 minutos con ultrasonido. Antes de inyectar, filtrar por membrana de nylon(13mm) de 0.45um.

Preparación del estándar:

Pesar 20 mg de cianocobalamina, base anhidra. Luego aforar a 100 mililitros con la solución de disolución, agitar con magneto durante 10 minutos y luego 5 minutos con ultrasonido. Antes de inyectar, filtrar por membrana de nylon(13mm) de 0.45um.

La cuantificación se realiza a una longitud de onda de 520nm en el detector.

7.4.2.3 Método LNS para Tiamina, Piridoxina y Cianocobalamina (IR).

Preparación de la curva de calibración:

Se requiere de un mínimo de 5 diferentes concentraciones en los cuales se mezclan los estándares de Tiamina, Piridoxina y cianocobalamina en forma conjunta y mezclan con agua, en balones de 25 mililitros.

Preparación de la muestra:

Las ampollas vienen por lo general de 2 o 3 mililitros, por lo que se procede a trasvasar una alícuota cuantitativamente a un balón de 25 mililitros para diluir y cambiar la concentración original a una entre las concentraciones preparadas para la curva de calibración que se preparo por el método propuesto:

El método Espectrofotométrico Infrarrojo, consta de 5 diferentes concentraciones de los estándares en cuestión. El infrarrojo calcula las diferentes concentraciones de los tres diferentes estándares al mismo tiempo, aplicándoles un método estadístico.

Cuantificación de la muestra

La muestra fue analizada inmediatamente por el método de espectrofotometría Infrarroja.

7.5 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

7.5.1 Muestreo:

Se analizó las muestras de complejo B ingresadas al Laboratorio Nacional de Salud durante el período comprendido entre el 1 de Enero al 31 de Diciembre de 2002. Es un tipo de muestreo por conveniencia debido al elevado costo que representa un análisis por HPLC, se analizarán un total de 10 muestras por los métodos enunciados (HPLC e IR).

7.5.2 Diseño:

El tipo de diseño es pareado, ya que a la misma muestra se le evaluarán por dos métodos distintos.

a) Análisis de datos en este caso, por ser el número de muestras menor a 20, el tipo de análisis es descriptivo, si se considera datos estadísticos como media, desviación estándar de cada método. Por ser un diseño de tipo pareado, se realizará la prueba de t de Student y el coeficiente de correlación de concordancia (Rc)

8. Resultados

8.1 **Tabla 1.1** *Tabla de resultados obtenidos del análisis de tiamina por HPLC.*

Código	A Mx	A Std	Vol Ampolla	[Conc] exp	[Conc] teórica	% encontrado
A	4396228	5762850	2	77.81	100	77.81
B	4064999	5762850	3	107.92	100	107.92
C	9513382	5762850	1	84.19	100	84.19
D	3776892	5762850	2	66.85	100	66.85
E	5520152	5654786	3	149.36	100	149.36
F	9197047	5654786	3	124.42	100	124.42
G	3841986	5654786	3	103.95	100	103.95
H	3821103	5654786	3	103.39	100	103.39
I	10713200	5852343	1	93.36	100	93.36
J	12757287	5852343	1	111.17	100	111.17
K	4742522	5813152	3	124.82	100	124.82
L	3918611	5813152	3	103.14	100	103.14

Tabla 1.2 *Tabla de resultados obtenidos del análisis de Piridoxina por HPLC.*

Código	A Mx	A Std	Vol Ampolla	[Conc] exp	[Conc] teórica	% encontrado
A	11712864	2609653	2	107.72	100	107.72
B	8474388	2609653	3	116.90	100	116.90
C	22022427	2609653	1	101.27	100	101.27
D	10458786	2609653	2	96.19	100	96.19
E	11434105	2567510	3	160.32	100	160.32
F	16483144	2567510	3	115.56	100	115.56
G	7653945	2567510	3	107.32	100	107.32
H	8277604	2567510	3	116.06	100	116.06
I	21995184	2666274	1	98.99	100	98.99
J	25463107	2666274	1	114.60	100	114.60
K	8695829	2556712	3	122.44	100	122.44
L	8615339	2556712	3	121.31	100	121.31

Tabla 1.3 *Tabla de resultados obtenidos del análisis de Cianocobalamina por HPLC.*

Código	A Mx	A Std	Vol Ampolla	[Conc] exp	[Conc] teórica	% encontrado
A	53950	141290	2	1.15	5	23.06
B	927105	141290	3	29.72	25	118.90
C	166399	141290	1	1.78	5	35.57
D	798023	141553	2	17.03	25	68.10
E	1238357	141553	3	39.63	25	158.52
F	815380	141553	3	26.09	15	173.96
G	142123	167081	3	3.85	5	77.07
H	579573	167081	3	15.71	25	62.85
I	417487	167081	1	3.77	5	75.46
J	617076	167081	1	5.58	5	111.54
K	508336	418066	3	5.51	10	55.08
L	272282	418066	3	2.95	10	29.50

8.2 Tabla 2.1 *Tabla de resultados obtenidos del análisis de Tiamina por IR.*

Código	[Mx Tiamina]	IR detectado	% detectado
A	0.6	0.42	70.0
B	0.399	0.43	107.8
C	0.6	0.51	85.0
D	0.6	0.41	68.3
E	0.399	0.59	147.9
F	0.399	0.48	120.3
G	0.399	0.42	105.3
H	0.399	0.41	102.8
I	0.6	0.56	93.3
J	0.6	0.67	111.7
K	0.399	0.5	125.3
L	0.399	0.41	102.8

Tabla 2.2 *Tabla de resultados obtenidos del análisis de Piridoxina por IR.*

Código	[Mx Piridoxina]	IR detectado	% detectado
A	0.6	0.65	108.3
B	0.399	0.45	112.8
C	0.6	0.61	101.7
D	0.6	0.58	96.7
E	0.399	0.64	160.4
F	0.399	0.46	115.3
G	0.399	0.43	107.8
H	0.399	0.47	117.8
I	0.6	0.59	98.3
J	0.6	0.69	115.0
K	0.399	0.49	122.8
L	0.399	0.49	122.8

Tabla 2.3 *Tabla de resultados obtenidos del análisis de Cianocobalamina por IR.*

Código	[Mx Cianocobalamina]	IR detectado	% detectado
A	0.03	0.009	30.0
B	0.099	0.13	131.3
C	0.03	0.012	40.0
D	0.15	0.109	72.7
E	0.099	0.156	157.6
F	0.06	0.102	170.0
G	0.0199	0.016	80.4
H	0.099	0.064	64.6
I	0.03	0.024	80.0
J	0.03	0.034	113.3
K	0.0399	0.022	55.1
L	0.0399	0.013	32.6

8.3 **Tabla 3.1** *Tabla de comparación y análisis estadístico para la cuantificación de Tiamina por HPLC e Ir.*

Código	mg/ml Tiamina	% HPLC	% Ir
A	50	77.81	70
B	33.3	107.92	107.8
C	100	84.19	85
D	50	66.85	68.3
E	33.3	149.36	147.9
F	33.3	124.42	120.3
G	33.3	103.95	105.3
H	33.3	103.39	102.8
I	100	93.36	93.3
J	100	111.17	111.7
K	33.3	124.82	125.3
L	33.3	103.14	102.8

Ho: $\mu_{Ir} = \mu_{HPLC}$

Tiamina

Prueba t para medias de dos muestras
emparejadas

	<i>% Ir</i>	<i>% HPLC</i>
Media	103.375	104.198333
Varianza	511.4711364	504.280015
Estadístico t	-1.074224612	
P(T<=t) dos colas	0.305721195	
Valor crítico de t (dos colas)	2.200986273	
Ho no se rechaza	No hay diferencia significativa	

Tabla 3.2 *Tabla de comparación y análisis estadístico para la cuantificación de Piridoxina por HPLC e Ir.*

Código	Pridoxina mg/ml	% HPLC	% Ir
A	50	107.72	108.3
B	33.3	116.90	112.8
C	100	101.27	101.7
D	50	96.19	96.7
E	33.3	160.32	160.4
F	33.3	115.56	115.3
G	33.3	107.32	107.8
H	33.3	116.06	117.8
I	100	98.99	98.3
J	100	114.60	115
K	33.3	122.44	122.8
L	33.3	121.31	122.8

Piridoxina

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	% Ir	% HPLC
Media	114.975	114.89
Varianza	280.2729545	278.614909
Estadístico t	0.200083937	
P(T<=t) dos colas	0.845065951	
Valor crítico de t (dos colas)	2.200986273	
Ho no se rechaza	No hay diferencia significativa	

Tabla 3.3 *Tabla de comparación y análisis estadístico para la cuantificación de Cianocobalamina por HPLC e Ir.*

Código	Cianocobalamina mg/ml	% HPLC	% Ir
A	2.5	23.06	30
B	8.33	118.90	131.3
C	5	35.57	40
D	12.5	68.10	72.7
E	8.33	158.52	157.6
F	8.33	173.96	170
G	8.33	77.07	80.4
H	8.33	62.85	64.6
I	5	75.46	80
J	5	111.54	113.3
K	3.33	55.08	55.14
L	3.33	29.50	32.6

Cianocobalamina

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	% Ir	% HPLC
Media	85.63666667	82.4675
Varianza	2248.769588	2389.196802
Estadístico t	2.668437453	
P(T<=t) dos colas	0.021854911	
Valor crítico de t (dos colas)	2.200986273	
Ho se rechaza	Si hay diferencia significativa	

8.4 Análisis estadístico de la cuantificación de los compuestos por ambos métodos.

Tabla 4.1

Tiamina

% HPLC	% Ir	Diferencia
77.81	70	7.81
107.92	107.8	0.12
84.19	85	-0.81
66.85	68.3	-1.45
149.36	147.9	1.46
124.42	120.3	4.12
103.95	105.3	-1.35
103.39	102.8	0.59
93.36	93.3	0.06
111.17	111.7	-0.53
124.82	125.3	-0.48
103.14	102.8	0.34

Varianza de las diferencias

<i>Diferencia</i>	
Media	0.82333333
Error típico	0.7664443
Desviación estándar	2.65504095
Varianza de la muestra	7.04924242

Tabla 4.2

Piridoxina

% HPLC	% Ir	Diferencia
107.72	108.3	-0.58
116.90	112.8	4.10
101.27	101.7	-0.43
96.19	96.7	-0.51
160.32	160.4	-0.08
115.56	115.3	0.26
107.32	107.8	-0.48
116.06	117.8	-1.74
98.99	98.3	0.69
114.60	115	-0.40
122.44	122.8	-0.36
121.31	122.8	-1.49

<i>Diferencia</i>	
Media	-0.085
Error típico	0.42482171
Desviación estándar	1.47162557
Varianza de la muestra	2.16568182

Tabla 4.3

Cianocobalamina

% HPLC	% Ir	Diferencia
23.06	30	-6.94
118.90	131.3	-12.40
35.57	40	-4.43
68.10	72.7	-4.60
158.52	157.6	0.92
173.96	170	3.96
77.07	80.4	-3.33
.85	64.6	-1.75
75.46	80	-4.54
111.54	113.3	-1.76
55.08	55.14	-0.06
29.50	32.6	-3.10

<i>Diferencia</i>	
Media	-3.16916667
Error típico	1.18764885
Desviación estándar	4.11413629
Varianza de la muestra	16.9261174

8.5 Tabla 5.1 Coeficiente de correlación de concordancia:

$$R_c = \frac{S_1^2 + S_2^2 - S_{(1-2)}^2}{S_1^2 + S_2^2 + (\bar{y}_1 - \bar{y}_2)^2}$$

S₁= Varianza del método HPLC

S₂= Varianza del método IR

S₍₁₋₂₎= Diferencia entre varianzas

Y₁= Media del método HPLC

Y₂= Media del método IR

Rc Tiamina 0.99990237

Rc Piridoxina 0.99996992

Rc Cianocobalamina 0.99997245

8.6 **Tabla 6.1** Costo de análisis de un lote de 5 muestras por HPLC

Reactivos y Materiales	Características técnicas	Cantidades	Costo
Agua	HPLC	2000 ml	Q. -----
Metanol	HPLC	400 ml	Q. 16.00
Acetonitrilo	HPLC	100 ml	Q. 8.00
Ácido Acético Glacial	GR	40 ml	Q. 4.80
Sal Sódica de ácido Hexanosulfónico	GR	1.4 g	Q. 109.20
Tiamina clorhidrato	Estándar USP	20 mg	Q. 84.40
Piridoxina	Estándar USP	10 mg	Q. 105.50
Cianocobalamina	Estándar USP	20 mg	Q. 28.20
Membrana hidrofílica		10 unidades	Q. 99.40
Filtro de cartucho .2um		10 unidades	Q. 198.00
Costo de Reactivos			Q. 653.50

Tiempo de análisis 16 horas

Tabla 6.2 Costo de análisis de un lote de 10 muestras por IR

Reactivos y Materiales	Características técnicas	Cantidades	Costo
Agua	Destilada	500 ml	Q. -----
Acetona	GR	200 ml	Q. 16.00
Tiamina clorhidrato	Estándar USP	20 mg	Q. 84.40
Piridoxina	Estándar USP	10 mg	Q. 105.50
Cianocobalamina	Estándar USP	20 mg	Q. 28.20
Membrana hidrofílica		10 unidades	Q. 99.40
Costo de Reactivos			Q. 333.50

Tiempo de análisis 8 horas

Tabla 6.3 Costos comparativos

Método	Costo reactivo	Otros costos*	Precio del lote	Precio Unitario
HPLC	Q. 653.50	Q. 2783.21	Q. 3437.41 (05)	Q. 687.48
IR	Q. 333.50	Q. 1420.71	Q. 1754.21 (10)	Q. 175.42

* Gastos propios del LNS.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El objetivo fundamental de esta investigación fue la comparación del método de cromatografía líquida de alta resolución y el método de espectrofotometría infrarroja en el análisis de Tiamina, Piridoxina y Cianocobalamina en soluciones inyectables, en cuanto a concordancia, tiempo y costo.

Para la determinación de la concordancia de los métodos se efectuó un análisis estadísticos. En el cual se buscaba obtener la reproducibilidad de los datos por medio del Coeficiente de correlación de concordancia y la equivalencia por medio de la t de Student mediante la comparación del método infrarrojo con el HPLC (método reconocido por la USP). El análisis de tiempo y costo fue determinado por el Laboratorio Nacional de Salud con base a tiempos y costos para ambos métodos.

La cuantificación de tiamina puede desarrollarse indistintamente por cualesquiera de los métodos, ya que el método de espectrofotometría infrarroja y de cromatografía líquida de alta resolución concuerdan, son equivalentes y no hay diferencia significativa, ya que el valor p de dos colas es de 0.305 y el valor estadístico t entra en los rangos establecidos por el valor crítico.

La cuantificación de la Piridoxina en soluciones inyectables fue evaluada y se llegó a obtener resultados para el valor p (0.845) y el valor de t dentro de los rangos permisibles por los valores críticos. Por lo anterior, al igual que la tiamina, la piridoxina puede ser cuantificada por cualesquiera de los dos métodos en estudio.

La cianocobalamina presenta sin embargo el siguiente inconveniente: el valor t (2.66) sale del valor crítico (± 2.20) a pesar que el dato de p es menor a los dos anteriores evaluados. Al obtener el anterior resultado se concluye que en

cuanto a la concordancia, el método de espectrofotometría infrarroja no es similar al método de HPLC, por lo que el método no es del todo adecuado para la cuantificación de la cianocobalamina. El valor t obtenido puede deberse a las pequeñas cantidades de cianocobalamina que viene en la mezcla de las vitaminas en estudio y la sensibilidad del equipo no es suficiente para su adecuada lectura. A pesar de lo anterior, el método de espectrofotometría infrarroja cuenta con una alta reproducibilidad (0.99997).

En cuanto a los reactivos empleados con los métodos objeto de estudio, se observó que en el método de HPLC se emplean diversos reactivos (sin contar los estándares y agua) y en cantidades considerables, mientras que con el método IR se emplea acetona, la cual es utilizada para la limpieza del porta muestras. No está de más mencionar que las cantidades de reactivo son menores en el análisis por el método infrarrojo.

Las cantidades de reactivos y la diversidad repercute en el costo del análisis, se determinó que para un lote de 5 muestras, su cuantificación por HPLC tiene un costo de Q. 653.60.

El costo de un lote de 10 muestras para su cuantificación por espectrofotometría infrarroja es de Q. 333.50. Lo anterior deja de relevancia lo siguiente: se analiza el doble de muestras por IR, a un costo dos veces menor que el método de cromatografía líquida de alta resolución.

El tiempo de análisis para cada uno de los métodos es diferente, esto se debe a la preparación del equipo, preparación de las muestras, lecturas que llevan varios minutos, la cuantificación por HPLC lleva un tiempo efectivo total para el análisis de las 3 vitaminas contenidas en 5 muestras de 16 horas. El método IR, por la simplicidad de la preparación de muestras y la rapidez en las lecturas permite analizar en un término de 8 horas 10 muestras.

El costo total de la cuantificación por ambos métodos se ve influida por varios factores, tales como reactivos, costo de mano de obra, gastos fabriles, gastos de administración y gastos tecnológicos. Se calculó que para la cuantificación de una muestra de Tiamina, Piridoxina y Cianocobalamina en soluciones inyectables, el costo por cromatografía líquida de alta resolución es de Q 687.48 y el costo por el método de espectrofotometría infrarroja es de Q 175.42. Por lo que es casi cuatro veces más barato realizar la cuantificación por IR que por HPLC.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 El método de espectrofotometría infrarroja es comparable al de cromatografía líquida de alta resolución en la cuantificación de Tiamina y Piridoxina; no así en la de Cianocobalamina, donde el método HPLC es el ideal para su cuantificación.
- 10.2 La concordancia entre el método de cromatografía líquida de alta resolución y el método de espectrofotometría infrarroja es satisfactoria.
- 10.3 El tiempo que se emplea para el análisis mediante el método infrarrojo es menor que el utilizado por el método HPLC.
- 10.4 Se emplea mayor cantidad y diversidad de reactivos con el método por HPLC que con los utilizados por el método infrarrojo, lo cual repercute en aspectos como costo y tiempo.
- 10.5 Los costos generados por el uso del método de espectrofotometría infrarroja son más bajos que los costos generados por el método de cromatografía líquida de alta resolución.

11. Recomendaciones

- 11.1 A los laboratorios de control de calidad instaurar y utilizar métodos de análisis alternos que reduzcan el tiempo de análisis y costos, respaldados con estudios comparativos, para establecer la validez, reproducibilidad y confiabilidad de los resultados obtenidos.

- 11.2 Análisis de otras sustancias activas, mediante métodos alternos, para optimizar el uso de equipos disponibles en el Laboratorio Nacional de Salud, en virtud que muchas veces la falta de metodología analítica válida y confiable, imposibilita efectuar el control de calidad o el costo de análisis resulta sumamente elevado.

12. REFERENCIAS

1. Ayres, G. Análisis clínico cuantitativo. University of Texas. Editorial Harla S.A. México. 1970. Pag. 287, 522.
2. Bernard O. Técnicas de estadística moderna, cuando y donde aplicarlas. Editorial Limusa-Wiley, S.A. México. 1973.
3. Coates J. The analysis of aqueous solutions by infrared spectroscopy. Reprinted from European Spectroscopy News. England. 1998.
4. Cordón R. 1995. Comparación de dos métodos alternativos para la cuantificación de sodio y potasio en sales de rehidratación oral, fabricadas en el laboratorio de producción de medicamentos (LAPROMED) de la facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
5. Daniels, W. Bioestadística, base para el análisis de la ciencia de la salud. 3^{ra}. Edición. Editorial Limusa. México. 1990. Pag. 189-196 y 221-239.
6. European Pharmacopoeia. 2001. Pp. 690-694, 1448
7. Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 9^a.Ed. Editorial Panamericana. Buenos Aires Argentina.
8. Grant, E. Richard, S. Control estadístico de calidad. Compañía editorial continental, S.A. México, 1979. Pag. 5-14.
9. Martindale, 33th Ed. 2002. Pp. 1386-1389

10. McNair H. Cromatografía líquida de alta Presión. 2^a Edición. Editorial secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. USA. 1980.
11. Monografías Farmacéuticas. 1998. Pp. 959-961.
12. Nickerson, C. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. Biometrics. 1997 pag. 1503-1507.
13. Orozco L. 1994. Determinación del contenido y la potencia antibiótica de Penicilina G, Penicilina V y Ampicilina, mediante la comparación de los resultados obtenidos por los métodos microbiológico, yodométrico y cromatografía líquida de alta presión. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
14. Page. Curtis. Sutter. Walker. Hoffman. Farmacología Integrada. Ediciones Harcourt España S.A. España. 1999. Pp 200-202, 489.
15. Pattacini S. Infrared Spectroscopy and Computer Separation of Drug Mixtures. Perkin-Elmer Bulletin. Perkin-Elmer Corporation. England. 1997.
16. Perkin-Elmer. Infrared Applications Study. USA. 1998.
17. Quant+ User's Guide. Perkin-Elmer Ltd. England. 1994.
18. Quant+. Reference Manual. Perkin-Elmer Ltd. England. 1994.
19. Rosito H. 1990. Estudio comparativo de dos métodos Para determinar partículas extrañas en inyectables de pequeño volumen envasados en recipientes plásticos de polipropileno. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

- 20.Skoog/Leary. Análisis Instrumental. 4^a. Edición. Editorial McGraw-Hill. España 1994.
- 21.Spragg R. Program for quantitative multicomponent analysis of complex materials. Perkin Elmer Infrared bulletin. 1990.
- 22.USP 24 NF 19. Pp. 1639-1641
- 23.USP DI. 22nd Ed. 2002. Pp. 2746-2748.
- 24.Vargas M. 1994. Estudio comparativo de dos métodos (método por cromatografía de gas y método por electrodo selectivo de fluor) para determinar fluor en crema dental. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- 25.Zeller M. The Infrared Grating Spectra of Polymers. Perkin-Elmer Bulletin. Perkin-Elmer Corporation. England. 1993.



Resumen

La eficiencia de los métodos de espectrofotometría infrarroja y cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de Tiamina, Piridoxina y Cianocobalamina en soluciones inyectables; fue evaluada en cuanto a concordancia, reproducibilidad, costo y tiempo.

Se seleccionaron 12 muestras al azar, recibidas en el Laboratorio Nacional de Salud. Las muestras fueron analizadas por el método de cromatografía líquida de alta resolución y por el método de espectrofotometría infrarroja propio del Laboratorio Nacional de Salud.

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente para determinar la equivalencia de ambos métodos y reproducibilidad de datos. Posteriormente se evaluó el costo y tiempo requerido para el desarrollo del análisis.

Los resultados demuestran que el análisis de Tiamina y Piridoxina pueden efectuarse indistintamente por cualesquiera de los métodos. La cuantificación de Cianocobalamina, por no ser el método de espectrofotometría infrarroja equivalente, debe llevarse a cabo por cromatografía líquida de alta resolución. En cuanto al costo, el método de espectrofotometría infrarroja es una opción para obtener un análisis de menor costo y menor tiempo de análisis.

INTRODUCCIÓN

El complejo B, compuesto principalmente por tiamina, piridoxina y cianocobalamina, está indicado en casos de neuropatías periféricas. Este tipo de productos se utiliza mayormente en forma inyectable por vía

IM, debido a que presentan una mejor absorción y como consecuencia un efecto rápido, por lo tanto el análisis fisicoquímico debe garantizar que el medicamento es eficaz, confiable y de calidad.

Para el control de calidad, el Laboratorio Nacional de Salud (LNS) utiliza la metodología de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), método que tiene como referencia la farmacopea Estadounidense (USP XXIV). Sin embargo, el laboratorio cuenta con un método alternativo, espectrofotometría Infrarroja, el cual a la fecha, no ha podido ser implementado porque se carece de datos analíticos comparativos que garanticen la obtención de resultados similares. Por lo que el estudio de la eficiencia del método infrarrojo debe realizarse con el parámetro de referencia del método apoyado por la USP.

En cuanto a la evaluación de métodos de análisis, no se encontró referencias bibliográficas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Universo y Muestra

Muestras que ingresaron al Laboratorio Nacional de Salud durante el período del 1 de Enero de 2002 al 31 de Diciembre del mismo año. Muestras que ya fueron analizadas y se presentó el dictamen por parte del Laboratorio.

Método de análisis: Cuantificación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución y Espectrofotometría Infrarroja.

Recursos Materiales

Equipo:

- Balanza analítica Mettler Toledo.
- Unidad de filtración y bomba de vacío.
- Cromatógrafo Líquido de alta resolución Merck Hitachi

Merck Hitachi

- Columna para vitaminas.
- Espectrofotómetro infrarrojo Perkin

Elmer.

- Computadora Dell.
- Impresora Hewlett Packard.
- Ultrasonido.

Reactivos:

- Agua HPLC.
- Metanol HPLC.
- Acetonitrilo HPLC.
- Ácido acético glacial.
- Sal sódica de ácido 1 hexanosulfónico.
- Acetona.
- Estándares U.S.P. de tiamina, piridoxina y cianocobalamina.

Procedimiento

Para el análisis de Muestras:

Método USP para tiamina y piridoxina (HPLC).

Preparación de solución de disolución:

Preparar una mezcla de agua, acetonitrilo y ácido acético glacial (94:5:1).

Preparación de fase móvil:

Preparar una mezcla de agua, metanol y ácido acético glacial (73:27:1) que contiene 140 mg de sal sódica de ácido 1-hexanosulfónico, por cada 100 mililitros. Filtrar por membrana de nylon de 0.45um y agitar 5 minutos en ultrasonido.

Preparación de la muestra de tiamina y Piridoxina:

Pipetear 2 mililitros de la muestra de complejo "B" y aforar a 100 mililitros con la solución de disolución. Agitar con magneto por 10 minutos y 5 minutos con ultrasonido. Antes de inyectar, filtrar por membrana de nylon(13mm) de 0.4um.

Preparación del estándar:

Pesar 20 mg de tiamina y 10 mg de piridoxina, todas bases anhidras. Luego aforar a 100 mililitros con la solución de disolución, agitar con magneto durante 10 minutos y luego 5 minutos con ultrasonido. Antes de inyectar, filtrar por membrana de nylon(13mm) de 0.4um.

La cuantificación se realiza a una longitud de onda de 360nm en el detector.

Método para cianocobalamina (HPLC).

Preparación de solución de disolución:

Preparar una mezcla de agua, acetonitrilo y ácido acético glacial (94:5:1).

Preparación de fase móvil :

Preparar una mezcla de agua, metanol y ácido acético glacial (73:27:1) que contiene 140 mg de sal sódica de ácido 1- hexanosulfónico, por cada 100 mililitros. Filtrar por membrana de nylon de 0.45um y agitar 5 minutos en ultrasonido.

Preparación de la muestra de Cianocobalamina:

Pipetear 2 mililitros de la muestra de complejo "B" y aforar a 100ml con la solución de disolución. Agitar con magneto por 10 minutos y

5 minutos con ultrasonido. Antes de inyectar, filtrar por membrana de nylon(13mm) de 0.4um.

Preparación del estándar:

Pesar 20 mg de cianocobalamina, base anhidra. Luego aforar a 100 mililitros con la solución de disolución, agitar con magneto durante 10 minutos y luego 5 minutos con ultrasonido. Antes de inyectar, filtrar por membrana de nylon(13mm) de 0.4um.

La cuantificación se realiza a una longitud de onda de 520nm en el detector.

Método LNS para Tiamina, Piridoxina y Cianocobalamina (IR).

Preparación de la curva de calibración:

Se requiere de un mínimo de 5 diferentes concentraciones en los cuales se mezclan los estándares de Tiamina, Piridoxina y cianocobalamina en forma conjunta y mezclan con agua, en balones de 25 mililitros.

Preparación de la muestra:

Las ampollas vienen por lo general de 2 o 3 mililitros, por lo que se procede a trasvasar una alícuota cuantitativamente a un balón de 25 mililitros para diluir y cambiar la concentración original a una entre las concentraciones preparadas para la curva de calibración que se preparó por el método propuesto:

El método Espectrofotométrico Infrarrojo, consta de 5 diferentes concentraciones de los estándares en cuestión. El infrarrojo calcula las diferentes concentraciones de los tres diferentes estándares al mismo tiempo, aplicándoles un método estadístico.

Cuantificación de la muestra

La muestra fue analizada inmediatamente por el método de espectrofotometría Infrarroja.

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Diseño:

El tipo de diseño es pareado, ya que a la misma muestra se le evaluarán por dos métodos distintos.

a) Análisis de datos

en este caso, por ser el número de muestras menor a 20, el tipo de análisis es descriptivo, si se considera datos estadísticos como media, desviación estándar de cada método. Por ser un diseño de tipo pareado, se realizará la prueba de t de Student y el coeficiente de correlación de concordancia (Rc)

Resultados

Resultados y análisis estadístico para la cuantificación de Tiamina.

Código	mg/ml Tiamina	% HPLC	% Ir
A	50	77.81	70
B	33.3	107.92	107.8
C	100	84.19	85
D	50	66.85	68.3
E	33.3	149.36	147.9
F	33.3	124.42	120.3
G	33.3	103.95	105.3
H	33.3	103.39	102.8
I	100	93.36	93.3
J	100	111.17	111.7
K	33.3	124.82	125.3
L	33.3	103.14	102.8

Estadístico t

P(T<=t) dos colas
 Valor crítico de t (2 colas)
 Desviación estándar
 Varianza de la muestra

Ho (*) no se rechaza
 significativa

Rc ()**Tiamina

-1.074224612

0.305721195

2.200986273

2.65504095

7.04924242

No hay diferencia

0.99990237

Resultados y análisis estadístico para la cuantificación de Piridoxina

Código	Piridoxina mg/ml	% HPLC	% Ir
A	50	107.72	108.3
B	33.3	116.90	112.8
C	100	101.27	101.7
D	50	96.19	96.7
E	33.3	160.32	160.4
F	33.3	115.56	115.3
G	33.3	107.32	107.8
H	33.3	116.06	117.8
I	100	98.99	98.3
J	100	114.60	115
K	33.3	122.44	122.8
L	33.3	121.31	122.8

Estadístico t

P(T<=t) dos colas
 Valor crítico de t (2 colas)
 Desviación estándar
 Varianza de la muestra

Ho (*) no se rechaza
 significativa

Rc ()**Piridoxina

0.200083937

0.845065951

2.200986273

1.47162557

2.16568182

No hay diferencia

0.99996992

*Ho= Comparación entre el método IR con el HPLC

**Rc= Coeficiente de correlación de concordancia

Resultados y análisis estadístico para la cuantificación de Cianocobalamina

Código	Cianocobalamina mg/ml	% HPLC	% Ir
A	2.5	23.06	30
B	8.33	118.90	131.3
C	5	35.57	40
D	12.5	68.10	72.7
E	8.33	158.52	157.6
F	8.33	173.96	170
G	8.33	77.07	80.4
H	8.33	62.85	64.6
I	5	75.46	80
J	5	111.54	113.3
K	3.33	55.08	55.14
L	3.33	29.50	32.6

Estadístico t	2.668437453
P(T<=t) dos colas	0.021854911
Valor crítico de t (2 colas)	2.200986273
Desviación estándar	4.11413629
Varianza de la muestra	16.9261174
Ho se rechaza	Si hay
diferencia significativa	
Rc Cianocobalamina	0.99997245

Costo de análisis de un lote de 5 muestras por HPLC

Reactivos y Materiales	Características técnicas	Cantidades	Costo
Agua	HPLC	2000 ml	Q. -----
Metanol	HPLC	400 ml	Q. 16.00
Acetonitrilo	HPLC	100 ml	Q. 8.00
Ácido Acético	GR	40 ml	Q. 4.80
Sal Sódica de ácido Hexanosulfónico	GR	1.4 g	Q.109.20
Tiamina clorhidrato	Estándar USP	20 mg	Q. 84.40
Piridoxina	Estándar USP	10 mg	Q.105.50
Cianocobalamina	Estándar USP	20 mg	Q. 28.20
Membrana hidrofílica		10 unidades	Q. 99.40
Filtro cartucho .2um		10 unidades	Q.198.00
Costo de Reactivos			Q653.50

Tiempo de análisis 16 horas

Costo de análisis de un lote de 10 muestras por IR

Reactivos y Materiales	Características técnicas	Cantidades	Costo
Agua	Destilada	500 ml	Q. -----
Acetona	GR	200 ml	Q. 16.00
Tiamina clorhidrato	Estándar USP	20 mg	Q. 84.40
Piridoxina	Estándar USP	10 mg	Q. 105.50
Cianocobalamina	Estándar USP	20 mg	Q. 28.20
Membrana hidrofílica		10 unidades	Q. 99.40
Costo de Reactivos			Q. 333.50

Tiempo de análisis 8 horas

Costos comparativos

Método	Costo reactivo	Otros costos*	Precio del lote	Precio Unitario
HPLC	Q. 653.50	Q. 2783.21	Q. 3437.41 (05)	Q. 687.48
IR	Q. 333.50	Q. 1420.71	Q. 1754.21 (10)	Q. 175.42

* Gastos propios del LNS.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La cuantificación de tiamina puede desarrollarse indistintamente por cualesquiera de los métodos, ya que el método de espectrofotometría infrarroja y de cromatografía líquida de alta resolución concuerdan, son equivalentes y no hay diferencia significativa, ya que el valor p de dos colas es de 0.305 y el valor estadístico t entra en los rangos establecidos por el valor crítico.

La cuantificación de la Piridoxina en soluciones inyectables fue evaluada y se llegó a obtener resultados para el valor p (0.845) y el valor de t dentro de los rangos permisibles por los valores críticos. Por lo que la piridoxina puede ser también cuantificada por cualesquiera de los dos métodos en estudio.

La cianocobalamina presenta sin embargo el siguiente inconveniente: el valor t (2.66) sale del valor crítico (± 2.20) a pesar que el dato de p es menor a los dos anteriores evaluados. Al obtener el anterior resultado se concluye que en cuanto a la concordancia, el método de espectrofotometría infrarroja no es similar al método de HPLC, por lo que el método no es del todo adecuado para la cuantificación de la cianocobalamina. El valor t obtenido puede deberse a las pequeñas cantidades de cianocobalamina que viene en la mezcla de las vitaminas en estudio y la sensibilidad del equipo no es suficiente para su adecuada lectura.

En cuanto a los reactivos empleados con los métodos objeto de estudio, se observó que en el método de HPLC se emplean diversos reactivos y en cantidades considerables, no así con el método IR.

Las cantidades de reactivos y la diversidad repercute en el costo del análisis. Se determinó que para un lote de 5 muestras, su cuantificación por HPLC tiene un costo de Q. 653.60.

El costo de un lote de 10 muestras para su cuantificación por espectrofotometría infrarroja es de Q. 333.50. Lo anterior deja de relevancia lo siguiente: se analiza el doble de muestras por IR, a un costo dos veces menor que el método de cromatografía líquida de alta resolución.

El tiempo de análisis para cada uno de los métodos es diferente, esto se debe a la preparación del equipo, preparación de las muestras, lecturas que llevan varios minutos, la cuantificación por HPLC lleva un tiempo efectivo total para el análisis de las 3 vitaminas contenidas en 5 muestras de 16 horas. El método IR, por la simplicidad de la preparación de muestras y la rapidez en las lecturas permite analizar en un término de 8 horas, 10 muestras.

El costo total de la cuantificación por ambos métodos se ve influida por varios factores, tales como reactivos, costo de mano de obra, gastos fabriles, gastos de administración y gastos tecnológicos. Se calculó que para la cuantificación de una muestra de Tiamina, Piridoxina y Cianocobalamina en soluciones inyectables, el costo por cromatografía líquida de alta resolución es de Q 687.48 y el costo por el método de espectrofotometría infrarroja es de Q 175.42.

Por lo anterior enunciado, el método de espectrofotometría infrarroja es comparable al de cromatografía líquida de alta resolución en la cuantificación de Tiamina y Piridoxina; no así en

la de Cianocobalamina, donde el método HPLC es el ideal para su cuantificación.

La concordancia entre el método de cromatografía líquida de alta resolución y el método de espectrofotometría infrarroja es satisfactoria.

El tiempo que se emplea para el análisis mediante el método infrarrojo es menor que el utilizado por el método HPLC.

Los costos generados por el uso del método de espectrofotometría infrarroja son más bajos que los costos generados por el método de cromatografía líquida de alta resolución.

La inquietud puesta de relevancia es la búsqueda de métodos de análisis alternos que reduzcan el tiempo de análisis y costos, respaldados con estudios comparativos, para establecer la validez, reproducibilidad y confiabilidad de los resultados obtenidos.

AGRADECIMIENTO

Al Laboratorio Nacional de Salud (LNS) por permitirme realizar este trabajo, ya que aportó el equipo necesario, además de financiarlo y un agradecimiento muy especial por su asesoría técnica a la Licda. Millie Cruz.

REFERENCIAS

1. Daniels, W. Bioestadística, base para el análisis de la ciencia de la salud. 3^{ra}. Edición. Editorial Limusa. México. 1990. Pag. 189-196 y 221-239.
2. Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 9^a.Ed. Editorial Panamericana. Buenos Aires Argentina.
3. Grant, E. Richard, S. Control estadístico de calidad. Compañía editorial continental, S.A. México, 1979. Pag. 5-14.
4. McNair H. Cromatografía líquida de alta Presión. 2^a. Edición. Editorial secretaria General de la Organización de los Estados Americanos. USA. 1980.
5. Nickerson, C. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. Biometrics. 1997 pag. 1503-1507.
6. Page. Curtis. Sutter. Walker. Hoffman. Farmacología Integrada. Ediciones Harcourt España S.A. España. 1999. Pp 200-202, 489.
7. Pattacini S. Infrared Spectroscopy and Computer Separation of Drug Mixtures. Perkin-Elmer Bulletin. Perkin-Elmer Corporation. England. 1997.
8. Perkin-Elmer. Infrared Applications Study. USA. 1998.
9. USP 24 NF 19. Pp. 1639-1641
10. USP DI. 22nd Ed. 2002. Pp. 2746-2748.