

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Química Farmacéutica



Validación de un método analítico para la cuantificación de
riboflavina en cápsulas.

Trabajo de graduación presentado por

Valeria Andrea Salguero Recinos para optar al grado académico de Licenciada en
Química farmacéutica.

Guatemala,

2024

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Química Farmacéutica



Validación de un método analítico para la cuantificación de
riboflavina en cápsulas.

Trabajo de graduación presentado por

Valeria Andrea Salguero Recinos para optar al grado académico de Licenciada en
Química farmacéutica.

Guatemala,

2024

Vo. Bo.

(f)



Lic. Sergio Alejandro Sánchez Ramos

Asesor

Tribunal examinador:

(f)



Licda. Ana Luisa Mendizábal Solé de Montenegro

Asesor

(f)



Dr. Élfego Rolando López García

Director de departamento de Química farmacéutica

(f)



Lic. Sergio Alejandro Sánchez Ramos

Asesor

Guatemala, 26 de enero de 2024.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por ser mi guía y fortaleza a lo largo de este viaje académico. Su gracia y sabiduría han sido fundamentales para superar los desafíos y alcanzar este logro.

A mi amada familia, mis padres, mis hermanos, mis tías y mi abuela, quienes han sido mi mayor apoyo y fuente de inspiración. Gracias por su amor incondicional, comprensión y por ser la base sólida que ha sustentado mis esfuerzos académicos.

A Carlos José, tu apoyo constante, paciencia y amor han sido mi ancla en momentos difíciles. Compartir este logro contigo ha hecho que sea aún más especial.

Quiero agradecer a mis compañeras de estudio, quienes han sido más que colegas; han sido amigas y cómplices en este viaje. Juntas hemos enfrentado desafíos, celebrado éxitos y creados recuerdos que atesoraré siempre.

Mi más sincero agradecimiento a mi asesor de tesis, Lic, Sergio Sánchez. Su experiencia, orientación y dedicación han sido invaluable. Gracias por ayudarme a alcanzar mis metas académicas. Así también a todo el equipo del laboratorio, Global Quality en especial a German, por su valiosa ayuda y su disposición siempre.

A mi director de Carrera el Dr. Élfego López y a mi revisora Lic. Ana Luisa Mendizábal, por contribuir significativamente a mi crecimiento como estudiante y futura profesional.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	v
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE GRÁFICAS.....	xvi
RESUMEN.....	xvii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO CONCEPTUAL	3
A. Antecedentes.....	3
B. Justificación.....	5
C. Planteamiento del problema	6
D. Alcance y límites de problemas.....	6
III. MARCO TEÓRICO.....	7
A. Vitaminas.....	7
B. Riboflavina	7
C. Deficiencia de la riboflavina.....	8
D. Implicaciones de la deficiencia de la riboflavina	9
1. Migraña	9
2. Neuropatía en niños	10
3. Anemia	10
4. Cataratas	10
E. Farmacocinética de la riboflavina	13
F. Farmacotecnia de la riboflavina	13
G. Métodos para la determinación de la riboflavina	14
1. Cromatografía líquida alta resolución	14

2. Clasificación de la cromatografía líquida alta resolución.....	15
3. Partes del equipo de cromatografía líquida alta resolución:	16
H. Fluorescencia	21
1. Teoría de la fluorescencia molecular:	22
I. Validación de un método analítico	24
1. Categorías de validación	24
2. Parámetros:.....	25
IV. MARCO METODOLÓGICO	27
A. Objetivos	27
1. General.....	27
2. Específicos:	27
B. Población y muestra	28
C. Procedimiento.....	28
D. Diseño de investigación	35
V. MARCO OPERATIVO.....	36
A. Tratamiento y recolección de datos.....	36
B. Recursos Humanos.....	36
C. Recursos materiales.....	36
1. Equipo.....	36
2. Cristalería y materiales	36
3. Reactivos	37
4. Estándares y muestra de trabajo	37
D. Recursos económicos:.....	37
VI. CRONOGRAMA.....	38
VII. RESULTADOS.....	39

A. Adecuación del sistema	39
B. Especificidad.....	40
C. Linealidad, intervalo y rango del sistema.....	41
D. Linealidad del método y exactitud.....	44
E. Repetibilidad	48
F. Precisión intermedia.....	49
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	51
IX. CONCLUSIONES	55
X. RECOMENDACIONES	57
XI. BIBLIOGRAFÍA	58
XII. ANEXOS.....	63
A. Glosario	63
B. Matriz de riesgos: Validación riboflavina	66
C. Base legal del proceso de validación de métodos analíticos	67
D. Características del equipo de cromatografía de alta resolución “Agilent 1260 Infinity II”.....	71
E. Certificado de verificación de desempeño del equipo.....	73
F. Certificado del estándar de riboflavina	77
G. Adecuación del sistema	78
H. Especificidad	81
I. Linealidad del sistema	83
J. Linealidad del método	91
K. Precisión intermedia.....	95

LISTA DE TABLAS

Tabla No. 1 Preparación de estándares para la curva de linealidad del sistema de valoración de riboflavina.	32
Tabla No. 2 Preparación de estándares para la curva de linealidad del método de valoración de riboflavina	33
Tabla No. 3 Cronograma de elaboración de tesis	38
Tabla No. 4 Resultados de adecuación del sistema para el método de valoración de riboflavina.	39
Tabla No. 5 Resultados de especificidad para valoración de riboflavina	40
Tabla No. 6 Resultados de linealidad de sistema para la valoración de riboflavina.....	41
Tabla No. 7 Resumen resultados estadísticos de linealidad del sistema para valoración de riboflavina.	42
Tabla No. 8 Reporte estadístico de la prueba de linealidad y rango del sistema para la valoración de riboflavina.	43
Tabla No. 9 Resultados de prueba de exactitud para valoración de riboflavina.....	44
Tabla No.10 Resumen resultados estadísticos de la exactitud para valoración de riboflavina.	45
Tabla No.11 Resultados de linealidad del método para valoración de riboflavina.....	45
Tabla No. 12 Resumen resultados estadísticos de linealidad del método para valoración de riboflavina	46
Tabla No. 13 Reporte estadístico de la prueba de linealidad del método para la valoración de riboflavina.	47
Tabla No. 14 Resumen de resultados estadísticos de repetibilidad para valoración de riboflavina	48
Tabla No. 15 Resultados de repetibilidad para valoración de riboflavina	48

Tabla No 16. Resumen resultados estadísticos de precisión intermedia para valoración de riboflavina	49
Tabla No 17. Resultados de precisión intermedia para valoración de riboflavina día 1.	49
Tabla No 18. Resultados de precisión intermedia para valoración de riboflavina día 2.	50
Tabla No 19. Matriz de riesgos para la validación de cápsulas orales de riboflavina. ..	66
Tabla No 19. Matriz de riesgos para la validación de cápsulas orales de riboflavina. ..	67

LISTA DE FIGURAS

Figura No. 1 Estructura química de la riboflavina.....	8
Figura No. 2 Esquema de un HPLC.....	16
Figura No. 3 Columna cromatográfica.....	19
Figura No. 4 Diagrama de energía para la fluorescencia	22
Figura No. 5 Cromatograma de la primera inyección del estándar de riboflavina para la adecuación del sistema	78
Figura No. 6 Cromatograma de la segunda inyección del estándar de riboflavina para la adecuación del sistema	78
Figura No. 7 Cromatograma de la tercera inyección del estándar de riboflavina para la adecuación del sistema	79
Figura No. 8 Cromatograma de la cuarta inyección del estándar de riboflavina para la adecuación del sistema	79
Figura No. 9 Cromatograma de la quinta inyección del estándar de riboflavina para la adecuación del sistema	80
Figura No. 10 Cromatograma de la quinta inyección del estándar de riboflavina para la adecuación del sistema	80
Figura No. 11 Cromatograma del estándar de riboflavina para la especificidad.....	81
Figura No. 12 Cromatograma de la muestra de riboflavina para la especificidad	81
Figura No. 13 Cromatograma del placebo de la muestra de riboflavina para la especificidad.....	82
Figura No. 14 Cromatograma de la fase móvil en el sistema de validación de riboflavina para la especificidad	82
Figura No. 15 Cromatograma del diluyente en el sistema de validación de riboflavina para la especificidad	83

Figura No. 16 Cromatograma de la primera inyección del estándar de riboflavina al 50% para la linealidad del sistema	83
Figura No. 17 Cromatograma de la segunda inyección del estándar de riboflavina al 50% para la linealidad del sistema	84
Figura No. 18 Cromatograma de la tercera inyección del estándar de riboflavina al 50% para la linealidad del sistema	84
Figura No. 19 Cromatograma de la primera inyección del estándar de riboflavina al 75% para la linealidad del sistema	85
Figura No. 20 Cromatograma de la segunda inyección del estándar de riboflavina al 75% para la linealidad del sistema	85
Figura No. 21 Cromatograma de la tercera inyección del estándar de riboflavina al 75% para la linealidad del sistema	86
Figura No. 22 Cromatograma de la primera inyección del estándar de riboflavina al 100% para la linealidad del sistema	86
Figura No. 23 Cromatograma de la segunda inyección del estándar de riboflavina al 100% para la linealidad del sistema	87
Figura No. 24 Cromatograma de la tercera inyección del estándar de riboflavina al 100% para la linealidad del sistema	87
Figura No. 25 Cromatograma de la primera inyección del estándar de riboflavina al 125% para la linealidad del sistema	88
Figura No. 26 Cromatograma de la segunda inyección del estándar de riboflavina al 125% para la linealidad del sistema	88
Figura No. 27 Cromatograma de la tercera inyección del estándar de riboflavina al 125% para la linealidad del sistema	89
Figura No. 28 Cromatograma de la primera inyección del estándar de riboflavina al 150% para la linealidad del sistema	89
Figura No. 29 Cromatograma de la segunda inyección del estándar de riboflavina al 150% para la linealidad del sistema	90

Figura No. 30 Cromatograma de la tercera inyección del estándar de riboflavina al 150% para la linealidad del sistema	90
Figura No. 31 Cromatograma de la primera inyección de la solución de riboflavina al 80% para la linealidad del método	91
Figura No. 32 Cromatograma de la segunda inyección de la solución de riboflavina al 80% para la linealidad del método	91
Figura No. 33 Cromatograma de la tercera inyección de la solución de riboflavina al 80% para la linealidad del método	92
Figura No. 34 Cromatograma de la primera inyección de la solución de riboflavina al 100% para la linealidad del método	92
Figura No. 35 Cromatograma de la segunda inyección de la solución de riboflavina al 100% para la linealidad del método	93
Figura No. 36 Cromatograma de la tercera inyección de la solución de riboflavina al 100% para la linealidad del método	93
Figura No. 37 Cromatograma de la primera inyección de la solución de riboflavina al 120% para la linealidad del método	94
Figura No. 38 Cromatograma de la segunda inyección de la solución de riboflavina al 120% para la linealidad del método	94
Figura No. 39 Cromatograma de la tercera inyección de la solución de riboflavina al 120% para la linealidad del método	95
J. Precisión intermedia	95
Figura No. 40 Cromatograma de la primera inyección del estándar de riboflavina para la precisión intermedia del día 1	95
Figura No. 41 Cromatograma de la segunda inyección del estándar de riboflavina para la precisión intermedia del día 1	96
Figura No. 42 Cromatograma de la tercera inyección del estándar de riboflavina para la precisión intermedia del día 1	96

Figura No. 43 Cromatograma de la cuarta inyección del estándar de riboflavina para la precisión intermedia del día 1	97
Figura No. 44 Cromatograma de la quinta inyección del estándar de riboflavina para la precisión intermedia del día 1	97
Figura No. 45 Cromatograma de la sexta inyección del estándar de riboflavina para la precisión intermedia del día 1	98
Figura No. 46 Cromatograma de la primera inyección de la muestra de riboflavina para la precisión intermedia del día 1	98
Figura No. 47 Cromatograma de la segunda inyección de la muestra de riboflavina para la precisión intermedia del día 1	99
Figura No. 48 Cromatograma de la tercera inyección de la muestra de riboflavina para la precisión intermedia del día 1	99
Figura No. 49 Cromatograma de la cuarta inyección de la muestra de riboflavina para la precisión intermedia del día 1	100
Figura No. 50 Cromatograma de la quinta inyección de la muestra de riboflavina para la precisión intermedia del día 1	100
Figura No. 51 Cromatograma de la sexta inyección de la muestra de riboflavina para la precisión intermedia del día 1	101
Figura No. 52 Cromatograma de la primera inyección del estándar de riboflavina para la precisión intermedia del día 2	101
Figura No. 53 Cromatograma de la segunda inyección del estándar de riboflavina para la precisión intermedia del día 2	102
Figura No. 54 Cromatograma de la tercera inyección del estándar de riboflavina para la precisión intermedia del día 2	102
Figura No. 55 Cromatograma de la cuarta inyección del estándar de riboflavina para la precisión intermedia del día 2	103
Figura No. 56 Cromatograma de la quinta inyección del estándar de riboflavina para la precisión intermedia del día 2	103

Figura No. 57 Cromatograma de la sexta inyección del estándar de riboflavina para la precisión intermedia del día 2	104
Figura No. 58 Cromatograma de la primera inyección de la muestra de riboflavina para la precisión intermedia del día 2	104
Figura No. 59 Cromatograma de la segunda inyección de la muestra de riboflavina para la precisión intermedia del día 2	105
Figura No. 60 Cromatograma de la tercera inyección de la muestra de riboflavina para la precisión intermedia del día 2	105
Figura No. 61 Cromatograma de la cuarta inyección de la muestra de riboflavina para la precisión intermedia del día 2	106
Figura No. 62 Cromatograma de la quinta inyección de la muestra de riboflavina para la precisión intermedia del día 2	106
Figura No. 63 Cromatograma de la sexta inyección de la muestra de riboflavina para la precisión intermedia del día 2	107

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica No 1. Linealidad del sistema de la valoración de riboflavina.....	42
Gráfica No 2. Linealidad del método para la valoración de riboflavina.....	46

RESUMEN

La riboflavina es una vitamina hidrosoluble del complejo B, es un nutriente esencial para la salud humana y debe ser aportado por la dieta. La Junta de Alimentos y Nutrición (FNB) ha recomendado una ingesta de 1.4 mg de riboflavina, algunos alimentos ricos en riboflavina son los huevos, la carne magra, la leche y las verduras de hoja (NIH,2022). La deficiencia de riboflavina es más común en poblaciones subdesarrolladas que tienen un consumo mínimo de productos lácteos y carne. Las personas con algunos tipos de cáncer, cardiopatías congénitas y consumo excesivo de alcohol tienen un mayor riesgo de deficiencia de riboflavina. La deficiencia de riboflavina puede causar distintas anormalidades clínicas, incluyendo retraso en el crecimiento, anemia, lesiones, daño renal y cambios degenerativos en el sistema nervioso.

Debido a la importancia de la riboflavina, se desarrolló, estandarizó y validó un método analítico para la cuantificación de esta en cápsulas multivitamínicas. La metodología se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia con una excitación de 450 nm y una emisión de 528 nm. El método desarrollado cumplió con las características de desempeño establecidas por organismos internacionales para los parámetros de validación de categoría I, los cuales son: adecuación del sistema, exactitud, precisión, especificidad, linealidad, intervalo y repetibilidad. Por lo tanto, se comprobó que el método puede utilizarse para la cuantificación de riboflavina en cápsulas multivitamínicas.

I. INTRODUCCIÓN

La riboflavina (B2) es una vitamina hidrosoluble del complejo B, es de color amarillo anaranjado y en solución acuosa, tienen una fluorescencia amarillo-verdosa muy intensa. Cada vitamina del grupo B actúa en conjunto para lograr el correcto funcionamiento del cuerpo, estas vitaminas son esenciales en los procesos metabólicos tales como producción de energía y formación de glóbulos rojos. La riboflavina es esencial para el organismo ya que actúa como cofactor; en numerosas reacciones enzimáticas y ejecuta funciones metabólicas clave al mediar la transferencia de electrones en la reacción biológica de oxidación reducción (Alam et al., 2015).

Así también participa en el metabolismo del folato, por lo que ayuda a mantener la integridad de mucosas, piel, ojos y sistema nervioso, cuando existen períodos de privación dietética o estrés fisiológico y patológico, las personas pueden desarrollar deficiencia de riboflavina y esto puede conducir a una variedad de anomalías clínicas, incluyendo retraso en el crecimiento, anemia, lesiones, daño renal y cambios degenerativos en el sistema (Alam et al., 2015).

Por lo que su demanda en la industria farmacéutica es cada vez mayor. Las formas más comunes de riboflavina disponible en preparados farmacéuticos se encuentran en sueros, cápsulas y tabletas multivitamínicas y de vitaminas del complejo B, así también en suplementos como riboflavina y riboflavina 5'-monofosfato (Rodríguez, 2015).

Existen diversos métodos y técnicas que permiten determinar la concentración de vitaminas, como la riboflavina, estos métodos incluyen ensayos microbiológicos, técnicas de espectrofotometría, quimioluminiscencia, la espectrometría de absorción atómica, electroforesis capilar y finalmente la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (Skoog, et al., 2001; Li & Chen, 2001).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) , con detector de fluorescencia, es el equipo que se utiliza en esta investigación ya que tiene la capacidad de separar compuestos orgánicos, para luego realizar una identificación y cuantificación inequívoca del compuesto en la muestra (Skoog, et al., 2001; Li & Chen, 2001).

La HPLC con detector de fluorescencia se ha aplicado con éxito para el análisis de la vitamina B2 en diferentes tipos de muestras de productos farmacéuticos y alimenticios este método proporciona sensibilidad, selectividad y certeza (Tang, Cronin, & Brunton, 2006). Ya que se puede obtener una cuantificación rápida, un alto grado de resolución y reproducibilidad en cuanto a vitaminas aplicando diferentes métodos de detección y preparación (Chatzimichalakis, et al., 2004).

La fluorescencia es un fenómeno electrónico de emisión molecular que se presenta inmediatamente después de aplicarle al analito una fuente luminosa como energía de excitación. La vitamina B2 presenta gran fluorescencia inherente y puede detectarse muy específicamente con alta sensibilidad a un pH neutro-básico (Ovalles, et al., 2002).

En el presente trabajo se tiene como objetivo desarrollar una validación de un método analítico para cuantificar la riboflavina en cápsulas. La validación de un método analítico es el proceso que permite demostrar que los resultados obtenidos son fiables y repetibles, además que el método es adecuado para su respectiva aplicación en el laboratorio (Crubellati & Di Risio, 2009). El resultado de la validación permite probar la aptitud de los métodos y documentar su validez, mediante la determinación de parámetros analíticos de calidad. Además, la validación determina con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos (Duffau, et al., 2010).

La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América (FDA), la Farmacopea de los Estados Unidos, (USP), y El Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA), establecen que todo laboratorio debe cumplir con la validación de los métodos analíticos que se utilizan esto para garantizar que los resultados obtenidos presentan exactitud, precisión y selectividad y que dicho método es reproducible (Ozkan, 2018).

Los parámetros que se evaluarán para esta validación ya que pertenece a la categoría I, debido a que se trata de un procedimiento analítico para la cuantificación del ingrediente activo en un producto farmacéutico terminado son: Exactitud, incertidumbre de medición de los resultados o precisión, selectividad del método o especificidad, linealidad, repetibilidad o reproducibilidad y la robustez del método (Comisión Guatemalteca de Normas, 2017).

II. MARCO CONCEPTUAL

A. Antecedentes

Entre los estudios que se han efectuado para identificar y cuantificar la riboflavina y otras vitaminas hidrosolubles se encuentran:

Dávila Medina, C. O., & Santillan Montero, R. A. (2021). *Validación de un método analítico para la determinación de vitaminas hidrosolubles en una forma farmacéutica líquida (jarabe) por HPLC en la empresa Neofarmaco Cia. Ltda.*

En esta investigación se presenta una optimización y validación de un método analítico empleando la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa acoplado con un detector ultravioleta visible (UV/VIS) mediante la técnica de par iónico conjugado (PIC), para la cuantificación de ácido ascórbico, tiamina, riboflavina, nicotinamida y piridoxina en estándar combinado y placebo cargado. Se utilizó una columna LiChrospher® 100 RP-18 endcapped (125 x 4,6 mm, 5 µm). La fase móvil consistió en un buffer PIC 7 pH 2,0, metanol y acetonitrilo usando el gradiente: 0-16 min (80:17,5:2,5), 16-21 min (17,5:80:2,5), y 21-24 min (80:17,5:2,5). El flujo fue de 1 ml / min a 35 °C. El volumen de inyección de la muestra fue de 10 µl. Después del desarrollo y optimización del método se procedió a validarlo, de acuerdo a la categoría I de procedimientos analíticos en productos farmacéuticos terminados, descrita en la USP para la validación, demostrando ser selectivo con un porcentaje de recuperación del 99,8853% para Riboflavina, se demostró que el método analítico desarrollado, optimizado y validado es apropiado para la identificación y cuantificación de vitaminas hidrosolubles en una forma farmacéutica líquida y puede ser aplicado para el control de rutina en el laboratorio.

James, RN & Boneschans, B. (1992). *Un método de HPLC de fase reversa para la determinación de niacinamida y riboflavina en muestras de disolución de cápsulas de combinación de multivitaminas y minerales. Desarrollo de fármacos y farmacia industrial, 18 (18), 1989-2000.*

En el presente estudio de James y Boneschans se describe un método de HPLC mediante el cual se cuantifican niacinamida y riboflavina en 900 ml de HCl 0,1N como medio de disolución, en presencia de ácido ascórbico, calcio pantotenato, piridoxina, tiamina y minerales, se utilizó un sistema de cromatografía líquida que consta de una bomba

alternativa de doble pistón, un inyector 7010 con un bucle de 60uL, un filtro de precolumna de 2uL y un detector de longitud de onda variable UV/Visible, se usó el detector de absorbancia sintonizable modelo 484. La columna utilizada modelo NOVA-PAK C8 8mm X 100 mm, 4 micrones. Obteniéndose resultados satisfactorios se concluyó que el método desarrollado, utilizando la forma de dosificación cápsulas, es sencillo, directo y se puede adoptar para su uso en la rutina de análisis de control de calidad.

Zhou, T., Li, H., Shang, M., Sun, D., Liu, C., & Che, G. (2021). *Recent analytical methodologies and analytical trends for riboflavin (vitamin B2) analysis in food, biological and pharmaceutical samples. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 143, 116412.*

En la investigación de Zhou, et al., se presenta un artículo sobre la importancia de la riboflavina en los campos alimentario, biológico y farmacéutico, por lo que es importante detectar su contenido con precisión para orientar el diagnóstico/tratamiento nutricional-saludable de enfermedades relacionadas a ella, así como investigación farmacológica de riboflavina y supervisión de calidad de alimentos/medicamentos. En esta revisión, los métodos de detección recientes establecidos para la riboflavina fueron resumidos incluyendo espectrometría de masas, detección fluorescente, detección electroquímica, inmunoensayo, etc, involucra un ingenioso pretratamiento de muestras, materiales avanzados, nuevos métodos, sensores y plataformas establecidos, así como ventajas y desventajas de cada uno de estos, la precisión y exactitud para el análisis de riboflavina fueron logrados, Finalmente, se presentan las tendencias actuales y las perspectivas futuras del análisis de riboflavina.

Semanate Bautista, M. F. (2016). *Determinación y validación de vitamina B2 (Riboflavina) por Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en el Laboratorio ECUACHEMLAB Cía. Ltda (Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica).*

Semanate validó el método para la determinación de Vitamina B2 (Riboflavina) por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), la detección fue por fluorometría se empleó el (Espectrofluorómetro Perkin Helmer series, 2000, USA), la metodología AOAC 970.65 modificada y la norma ISO/IEC 17025 que describe las directrices y parámetros para la validación del método asegurando la validez de los resultados. Los parámetros analíticos

que se determinaron son: linealidad, rango de trabajo, límites de detección y cuantificación, precisión, exactitud e incertidumbre. Los resultados obtenidos muestran para la linealidad un coeficiente de correlación superior a $r=0,999$ para cada curva de calibración.

Los estudios presentados evalúan la riboflavina en distintos tipos de muestras, mediante cromatografía líquida de alta resolución, en los diversos estudios se obtuvieron diferentes resultados, lo cual muestra la diversidad de muestras con las cuales se puede realizar este análisis.

B. Justificación

En el presente trabajo de graduación se desarrolló una estandarización y validación de un método analítico para la cuantificación de riboflavina en cápsulas comerciales, esto se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia, empleando una excitación de 450 nm y una emisión de 528 nm, evaluando los parámetros necesarios para una validación de categoría I, los cuales son: exactitud, precisión, especificidad, linealidad e intervalo.

Un laboratorio de control de calidad tiene como objetivo proporcionar resultados de certeros y precisos, para ello se necesita garantizar la calidad de sus resultados a través del uso de métodos analíticos que sean confiables y adecuados para su propósito.

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas, un método de ensayo al ser validado proporciona resultados fiables y exactos para su propósito perseguido, determinará la incertidumbre del método y responderá a la confianza de los clientes que hayan solicitado un trabajo analítico (USP, 2019).

El desarrollo de esta metodología presentará un beneficio para el laboratorio de control de calidad, ya que este procedimiento permitirá garantizar que el equipo adquirido de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de fluorescencia brinda resultados confiables y precisos, por lo que se creará la posibilidad de ofrecer análisis químicos validados en distintos tipos de medicamentos.

Esto se debe a que la industria farmacéutica guatemalteca debe asegurar que la calidad de los productos terminados cumpla con los estándares de calidad más altos y así también que los métodos utilizados sean certeros y confiables, para garantizar la invariabilidad de los resultados.

C. Planteamiento del problema

¿Es posible diseñar un método analítico que permita obtener resultados validados con un correcto margen de incertidumbre en cuanto a la cuantificación de riboflavina en muestras farmacéuticas con cromatografía líquida de alta resolución mediante detector de fluorescencia?

D. Alcance y límites de problemas

El alcance del estudio es el desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de la riboflavina (vitamina B2) en cápsulas orales, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de fluorescencia.

Entre los límites del estudio están que el método se llevará a cabo bajo condiciones del cromatógrafo líquido de alta resolución con detector de fluorescencia del laboratorio, con reactivos y estándares proporcionados por ellos.

Así mismo, se trabajará bajo las condiciones ambientales controladas en las que se encuentra el laboratorio, es decir, la temperatura, humedad, ventilación, iluminación y ruido. Así también los límites consisten en cuanto a la forma farmacéutica ya que estos resultados son únicamente reproducibles para cápsulas orales.

III. MARCO TEÓRICO

A. Vitaminas

Las vitaminas son sustancias orgánicas que son necesarias para los seres humanos debido a que tienen un rol importante en el metabolismo, funcionamiento, crecimiento y desarrollo, se dividen principalmente en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas de solubilidad que pueden ser en agua y en grasas, debido a esto se clasifican en vitaminas hidrosolubles y liposolubles, en cuanto a las vitaminas hidrosolubles, se encuentran las vitaminas del llamado complejo B y la vitamina C, estas vitaminas tienen como papel principal actuar como cofactores enzimáticos (Thakur, et al., 2017).

Por otro lado, se encuentran las vitaminas liposolubles estas se disuelven en grasas como las vitaminas A, D, E, K, las cuales se almacenan en los tejidos adiposos y en el hígado, el exceso de consumo puede ser muy perjudicial para la salud, ya que el organismo es capaz de almacenar su exceso (Thakur, et al., 2017).

B. Riboflavina

La riboflavina (vitamina B2) es de carácter hidrosoluble pertenece a las vitaminas del complejo B, su fórmula molecular es: $C_{17}H_{20}N_4O_6$ y su peso molecular es de 376.36 g/mol, se encuentra constituida por un anillo de isoaloxazina dimetilado unido al ribitol, un alcohol derivado de la ribosa es la cadena de 5 carbonos en la parte superior (NIH,2022).

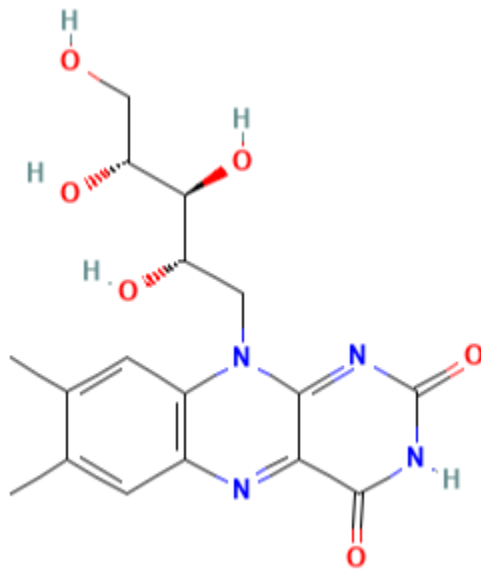
La riboflavina fue descubierta en 1872 por el científico Blyth, como un pigmento amarillo fluorescente en la leche, sin embargo, la propiedad vitamínica de este pigmento no se estableció hasta principios de la década de 1930, ya que se descubrió que es esencial para el metabolismo de los nutrientes y también para la protección antioxidante, las plantas y algunos microorganismos pueden sintetizar riboflavina; sin embargo, es un nutriente esencial para la salud humana y debe ser aportado por la dieta. La Junta de Alimentos y Nutrición (FNB) ha recomendado una ingesta de 1.4 mg de riboflavina, algunos alimentos ricos en riboflavina son los huevos, la carne magra, la leche y las verduras de hoja (NIH,2022).

La riboflavina activa se encuentra como parte de dos coenzimas: la mononucleótido de flavina (FMN) y el dinucleótido de adenina y flavina (FAD). Estas coenzimas son

transportadoras de electrones en reacciones de oxidorreducción del metabolismo intermediario. Participan, entre otras, en las vías metabólicas de la oxidación de ácidos grasos, aminoácidos y en algunas reacciones del ciclo del ácido cítrico (Thakur, et al., 2017).

La riboflavina se puede sintetizar químicamente a partir de diversas sustancias. Una de las rutas más comunes es a través de la síntesis de Riboflavina-5'-fosfato, que es una forma activa de la vitamina. En la síntesis de Riboflavina-5'-fosfato, la riboflavina se convierte en su forma fosforilada mediante la adición de una molécula de ácido fosfórico en la posición 5'. Este proceso se puede lograr por medio de diferentes métodos químicos utilizando reactantes tales como ácido clorhídrico, fosfato de potasio, ortofosfato de sodio y otros reactivos, cabe señalar que la riboflavina también se puede obtener de fuentes naturales, tales como alimentos como la leche, los huevos, los vegetales verdes y los cereales fortificados, entre otros, Además de la alimentación, la riboflavina también se encuentra disponible en forma de suplementos vitamínicos en cápsulas, comprimidos y líquidos (Thakur, et al., 2017).

Figura No. 1 Estructura química de la riboflavina



Fuente: Pubchem (2023).

C. Deficiencia de la riboflavina

La deficiencia de riboflavina es más común en poblaciones subdesarrolladas que tienen un consumo mínimo de productos lácteos y carne. Las personas con algunos tipos de

cáncer, cardiopatías congénitas y consumo excesivo de alcohol tienen un mayor riesgo de deficiencia de riboflavina. Como la riboflavina se destruye con la exposición a la luz ultravioleta, la terapia con luz ultravioleta en bebés con hiperbilirrubinemia podría causar deficiencia de riboflavina. Cuando se necesita un suplemento de riboflavina, es adecuada una cantidad que sea de cinco a diez veces la cantidad diaria recomendada. Hasta el momento no se han informado efectos tóxicos o adversos de la ingesta de altas dosis de riboflavina en humanos. Sin embargo, se puede sugerir que una dosis alta de riboflavina podría causar un desequilibrio en el estado antioxidante del cuerpo humano (Pinto & Zempleni, 2016).

La deficiencia de riboflavina puede causar distintas anormalidades clínicas, incluyendo retraso en el crecimiento, anemia, lesiones, daño renal y cambios degenerativos en el sistema nervioso. Los modelos de ratas con deficiencia de riboflavina se han utilizado durante muchos años para evaluar los efectos biológicos de la riboflavina estos modelos han indicado que la riboflavina es importante en el desarrollo posnatal temprano del cerebro y tracto gastrointestinal. Es capaz de modular una gran cantidad de actividades metabólicas, como el daño del ADN inducido por carcinógenos, así como la absorción y utilización de hierro. Estos modelos también permiten la extrapolación de datos obtenidos en un modelo animal a datos clínicos humanos (Thakur, et al., 2017).

D. Implicaciones de la deficiencia de la riboflavina

1. Migraña

Con la efectividad limitada de las terapias preventivas actuales, el uso de la medicina complementaria y alternativa ha ido aumentando en el manejo del dolor de cabeza, uno de los mecanismos más frecuentemente citados de acción sugiere que una disfunción mitocondrial que resulta en un metabolismo de oxígeno deteriorado puede desempeñar un papel en la migraña patogénesis, y la riboflavina puede revertir esto y por lo tanto puede ser eficaz en la prevención de la migraña. A pesar de ser seguro, bien tolerado y económico parece haber diferencias de género y edad en respuesta a la riboflavina (Sherwood et al., 2014).

2. Neuropatía en niños

En un estudio, de un nuevo gen responsable del síndrome del Brown-Vialetto-Van Laere SLC52A2 que codifica al transportador de riboflavina (RFVT2), se demostró la reducción en la absorción de riboflavina y la disminución en la expresión de la proteína transportadora de riboflavina debido a las mutaciones SLC52A2 y la respuesta a la terapia con riboflavina oral en dosis altas en pacientes con estas mutaciones condujeron mejoras clínicas y bioquímicas sostenidas. Por eso, este estudio favoreció la suplementación con riboflavina para combatir la progresión de esta condición neurodegenerativa (Fairweather-Tair et al., 1992).

3. Anemia

La riboflavina desempeña un papel en la eritropoyesis, mejorando la absorción de hierro y ayuda en la movilización de la ferritina de los tejidos. En estudios con animales, la riboflavina ha demostrado que mejora la absorción de hierro, y la deficiencia de riboflavina puede aumentar significativamente la tasa de pérdida de hierro gastrointestinal, así como disminuir la movilización de hierro de las reservas. Los datos recientes del Jiangsu estudio de nutrición de China muestra que la inadecuada ingesta de riboflavina se ve asociada con un mayor riesgo de anemia persistente. Hubo una asociación positiva entre la ingesta de riboflavina y anemia entre las mujeres, particularmente en aquellas menores de 50 años. Además, los estudios en animales correlacionan la deficiencia de riboflavina con una disminución de la absorción de hierro y aumento de la pérdida de hierro, Por lo tanto, corregir la deficiencia de riboflavina puede ser uno de los componentes en la prevención de la anemia (Powers et al., 2011).

4. Cataratas

La riboflavina parece jugar un papel esencial en la prevención de formación de cataratas. La riboflavina actúa como cofactor del glutatión reductasa (GR), que está vinculada a la formación de cataratas por disminución de los niveles de glutatión en el cristalino la cual actúa protegiendo al tejido del daño oxidativo. En un estudio que examinó el estado de la vitamina B de los pacientes con cataratas, se reveló que el 80% de los pacientes con cataratas tenían deficiencia de riboflavina. Un gran ensayo controlado, aleatorizado, doble ciego en China estudiaron los efectos de los nutrientes en la formación de cataratas dando

un multivitamínico/mineral o placebo durante 5 a 6 años. El efecto más protector se observó en el grupo de edad de 65 a 74 años que tomaba riboflavina (3 mg)/niacina (940 mg) diariamente (Sperduto et al., 1993). Los autores concluyeron que la deficiencia de riboflavina no parece ser cataratogénico, aunque sí se encuentra una asociación entre la deficiencia de riboflavina y la formación de cataratas en los ancianos (Li et al., 2015).

5. Estrés oxidativo

La riboflavina es una de las vitaminas que puede tener función antioxidante de forma independiente mediante la conversión de riboflavina reducida a forma oxidada o como componente del glutatión (Ashoori & Saedisomeolia, 2014). Hay estudios, que confirman los dos aspectos de la naturaleza antioxidante de riboflavina a través de la cual esta vitamina puede proteger el cuerpo contra el estrés oxidativo, especialmente por la peroxidación lipídica y el daño oxidativo por repurificación. Los informes sugieren que la riboflavina puede aliviar las lesiones oxidativas al eliminar los radicales. La riboflavina es importante para el estado antioxidante dentro de los sistemas celulares. Sin embargo, la mayoría de las investigaciones en esta área se limitan a estudios en animales, por lo que se requirieron estudios de intervención en población humana, para poder obtener una conclusión certera (Iwanaga et al., 2007).

6. Diabetes Mellitus

Los estudios clínicos sugieren que el estrés oxidativo juega un papel importante en la patogenia de la diabetes mellitus tipo 2. Estudios realizados han sugerido que la suplementación con riboflavina dietética podría ayudar en la reducción de las complicaciones diabéticas. En las pruebas de función renal y de función hepática sugirieron que el tratamiento con riboflavina reduce el riesgo de diabetes, reduciendo complicaciones al disminuir la inflamación causada por estrés oxidativo. En este estudio, el hígado y el riñón de ratones diabéticos no tratados mostraron un daño extenso en la microestructura hepática, incluido el contorno alterado de los hepatocitos, el túbulo renal y los glomérulos también se vieron gravemente afectados, Estos cambios se redujeron en gran medida mediante la administración de riboflavina a los animales. Además, los autores concluyeron que la peroxidación lipídica alterada, carboxilación de proteínas antioxidantes, los niveles y el daño tisular en la condición diabética mejoraron mediante el tratamiento con

riboflavina a través de la reducción de la inflamación inducida por especies reactivas de oxígeno (Suez et al., 2014).

7. Hipertensión

La hipertensión es el principal factor de riesgo de mortalidad en todo el mundo (López et al., 2006), y es responsable de unas 8 millones muertes prematuras por año. La fisiopatología exacta de la hipertensión sigue sin estar clara y se han identificado múltiples factores de riesgo genéticos y de estilo de vida. Este estudio ha sugerido el papel para la riboflavina en la modulación de la presión arterial, específicamente en individuos con el genotipo MTHFR 677TT, la suplementación con riboflavina puede disminuir la presión arterial en individuos hipertensos con el genotipo TT pero no en aquellos con el CC o Genotipo CT (Horigan et al., 2010). Al estabilizar la variante enzimática MTHFR, es posible que la suplementación con riboflavina podría restaurar las concentraciones de 5-MTHFR en las células vasculares, y mejorar la disponibilidad de óxido nítrico, que, a su vez, mejoraría función endotelial y provocaría una disminución de la presión arterial (Lawes et al., 2008).

8. Cáncer

Se han realizado varios estudios, que relacionan la deficiencia de la riboflavina con la inhibición en el crecimiento del tumor en estudios experimentales en animales y posiblemente en el hombre, pero los mecanismos precisos involucrados no han sido revelados. Algunos estudios indican que la deficiencia de riboflavina aumenta el riesgo de cáncer en ciertos sitios, mientras que otros sugieren un posible efecto atenuante de la riboflavina en presencia de algunos carcinógenos. La riboflavina, como FAD, es un cofactor de MTHFR que proporciona algunas interacciones entre la riboflavina folato y el genotipo para determinar la homocisteína plasmática, un marcador funcional del estado del folato. El polimorfismo MTHFR C677T parece interactuar con el folato y la riboflavina modulando el riesgo de cáncer y esta interacción varía según el sitio del cáncer. La mayoría de las evidencias apuntan a un efecto protector de este polimorfismo para el riesgo de cáncer colorrectal, pero el efecto sobre el riesgo de cáncer de cuello uterino no está claro (Powers, 2005).

Los estudios en animales han demostrado que la deficiencia de riboflavina puede conducir a la ruptura de la integridad del epitelio del esófago y algunos estudios epidemiológicos han reconocido una relación entre el cáncer de esófago y las dietas bajo en riboflavina. El estado deficiente de riboflavina también se ha implicado como un factor de riesgo para la displasia cervical, una condición precursora del cáncer cervical invasivo. En un estudio para examinar el estrés oxidativo y el estado de las vitaminas del grupo B en pacientes con cáncer de pulmón de células en diferentes etapas. Los niveles reducidos de vitamina B2 y B6 en los glóbulos rojos, aparecen en todos los pacientes con cáncer de pulmón (Tsao et al., 2007), por lo que la deficiencia de riboflavina se ha relacionado con una mayor susceptibilidad a cáncer (Bareford et al., 2005).

E. Farmacocinética de la riboflavina

La riboflavina se absorbe principalmente en el intestino delgado y se distribuye en los tejidos corporales. Una vez absorbida, la riboflavina es fosforilada por la enzima riboflavina quinasa para formar flavina mononucleótido (FMN) y posteriormente flavina adenina dinucleótido (FAD), que son las formas activas de la vitamina. La absorción de la riboflavina es un proceso dependiente de energía que se lleva a cabo a través de un sistema de transporte activo en el intestino delgado. La absorción se ve influenciada por varios factores, como la cantidad de riboflavina consumida, la presencia de otras vitaminas del complejo B y la acidez del estómago (Thakur, et al, 2017).

Una vez en la sangre, la riboflavina se distribuye a los tejidos corporales, donde se convierte en sus formas activas (FMN y FAD) y se utiliza en una serie de reacciones enzimáticas importantes. La riboflavina es metabolizada principalmente en el hígado y excretada en la orina (Thakur, et al, 2017).

F. Farmacotecnia de la riboflavina

La riboflavina se encuentra en distintos suplementos multivitamínicos y multiminerales, así como en los suplementos dietéticos del complejo vitamínico B y en los que solo contienen riboflavina y riboflavina-5'-monofosfato. Las formas farmacéuticas más comunes de riboflavina disponible en preparados farmacéuticos se encuentran en los sueros, cápsulas y tabletas, así también en suplementos como riboflavina y riboflavina-5'-monofosfato. Algunos suplementos contienen riboflavina en cantidades mayores a las

recomendadas, pero el cuerpo no puede absorber más de unos 27 mg a la vez (Rodríguez, 2015).

G. Métodos para la determinación de la Riboflavina

Existen diversos métodos y técnicas que permiten determinar la concentración de vitaminas, estos métodos incluyen ensayos microbiológicos, técnicas de espectrofotometría, fluorimetría, quimioluminiscencia, la espectrometría de absorción atómica, electroforesis capilar y finalmente la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (Skoog, et al, 2001). La HPLC se ha aplicado con éxito para el análisis de la vitamina B2 en diferentes tipos de matrices. Este método proporciona sensibilidad y selectividad y supera algunos de los problemas asociados con los métodos químicos. Los métodos de HPLC proporcionan una separación rápida, un alto grado de resolución, reproducibilidad, y cuantificación de vitaminas aplicando diferentes métodos de detección y preparación (Chatzimichalakis, y otros, 2004).

1. Cromatografía líquida alta resolución

La Cromatografía Líquida de Alta resolución (HPLC) es una técnica de carácter analítico que tiene como objetivo principal separar mezclas complejas de diferentes tipos de sustancias, con el propósito de identificarlas, cuantificarlas y purificarlas. La HPLC se considera una de las técnicas de cuantificación más versátiles y certeras ya que permite aplicarse a diversos ámbitos entre ellos: la investigación química, bioquímica, farmacéutica y clínica, entre otras, para la determinación de la pureza de sustancias, la detección de metabolitos de interés farmacológico de plantas, la detección de metabolitos de drogas en fluidos biológicos, el aseguramiento de la calidad de productos farmacéuticos, etc (Semanate, 2016).

La cromatografía líquida de alta eficacia trabaja por elución, en la cual se requiere una fase móvil, que es un líquido que circula a través del equipo y entra en contacto con un sólido u otro líquido inmiscible que se denomina fase estacionaria; al introducir la mezcla de sustancias (analitos) en la corriente de fase móvil, cada analito recorrerá el sistema con una velocidad diferente ya que esto dependerá de su afinidad por cada una de las fases, por lo que después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada una de las

substancias introducidas en el sistema eluirá con un tiempo diferente, es decir, estarán separadas (Semanate, 2016).

Cada componente eluye en una ubicación específica, medida por el tiempo transcurrido entre el momento de la inyección [tiempo cero] y el momento en que el pico máximo eluye. Al comparar el tiempo de retención [tR] de cada pico con el de los patrones de referencia inyectados en el mismo sistema cromatográfico [misma fase móvil y estacionaria], es posible identificar cada compuesto (Dong, 2013).

Una vez establecida la identidad, el siguiente dato importante es la cantidad de cada compuesto presente en la muestra. El cromatograma y los datos relacionados del detector permiten calcular la concentración de cada compuesto. Básicamente, el detector responde a la concentración de la banda de compuestos a medida que atraviesa la celda de flujo. Cuanto más concentrado esté, más fuerte será la señal; esto se considera una mayor altura del pico por encima de la línea base (Dong, 2013).

2. Clasificación de la cromatografía líquida alta resolución

Los diferentes tipos de cromatografía líquida se pueden clasificar de diferentes maneras, pero la forma más común es según la naturaleza de la fase estacionaria, ya que es ésta la que impone fundamentalmente el mecanismo de separación; de este modo, se pueden enumerar cuatro tipos de técnicas:

- a. Cromatografía de adsorción (líquido-sólido): En ese caso se usa como fase estacionaria un adsorbente y la separación se realiza en repetidas etapas de adsorción-desorción (Suarez & Morales, 2018).
- b. Cromatografía de reparto/adsorción (fases ligadas químicamente): La separación se realiza con un reparto del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria (Suarez & Morales, 2018).
- c. Cromatografía de intercambio iónico: En este caso la fase estacionaria contiene grupos ionizados con la capacidad de retener selectivamente a iones de signo contrario que circulan en la fase móvil (Suarez & Morales, 2018).
- d. Cromatografía de exclusión molecular: Como fase estacionaria, se emplea un material poroso de tamaño controlado, que permite la entrada de ciertas moléculas de manera selectiva, dejando fuera otras de mayor tamaño (Suarez & Morales, 2018).

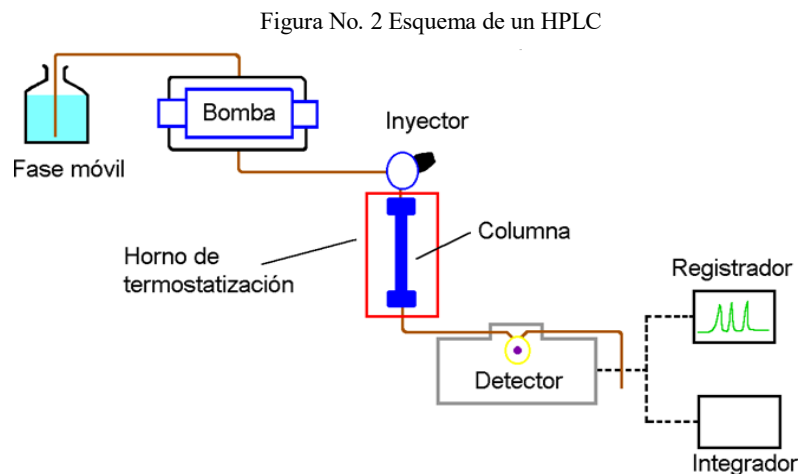
El mecanismo de retención para las dos primeras clasificaciones es muy similar, se diferencian únicamente por el tipo de interacciones que se producen; por esta razón, usualmente se aplicó otra clasificación de los dos primeros tipos de cromatografía en cuanto a polaridad de la fase estacionaria (Suarez & Morales, 2018).

- a. Cromatografía de fase normal: Para este caso la fase estacionaria tiene puntos de alta polaridad, que provoca interacciones que se producen con el soluto son específicas del grupo activo. La fase estacionaria puede ser un sólido adsorbente (sílice o alúmina), o bien, un soporte al que se unen químicamente moléculas orgánicas que presentan grupos funcionales de alta polaridad (ciano, amino, etc) (Suarez & Morales, 2018).
- b. Cromatografía de fase reversa (inversa): La fase estacionaria tiene una naturaleza apolar cadenas hidrocarbonadas, grupos fenilo) y las interacciones que se producen son inespecíficas (efecto solvóforo) (Suarez & Morales, 2018).

3. Partes del equipo de cromatografía líquida alta resolución:

Los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos son:

- a. Dispositivo de suministro de eluyentes (bomba y dispositivo de mezclado de eluyentes).
- b. Dispositivo de inyección.
- c. Conducciones y conexiones.
- d. Detector y registrador.
- e. Columna.



Fuente: Semanate (2016).

Además de los dispositivos anteriormente mencionados también se pueden agregar al equipo otros que pueden simplificar o agilizar el análisis, como pueden ser:

- f. Inyectores automáticos
- g. Colectores de fracciones
- h. Hornos termostatizados para las columnas
- i. Sistemas de tratamiento de datos (Semanate, 2016).

1) Bomba

La misión de la bomba es la de suministrar un caudal constante y libre de pulsos de la fase móvil a través de la columna, sin que el flujo sea influido por la presión en cabeza de columna, ya que ésta puede variar por obstrucción de las líneas de conducción, del filtro de la cabeza de la columna, etc (Semanate, 2016).

Un correcto sistema de bombeo debe:

- a) Estar construido con materiales químicamente inertes frente a la fase móvil.
- b) Ser capaz de trabajar a presiones elevadas.
- c) Proporcionar un flujo libre de pulsaciones o llevar asociado un amortiguador de éstas, debido a que existen factores como las pulsaciones que pueden afectar el ruido de fondo del detector y por lo tanto disminuir la sensibilidad.
- d) Suministrar flujos adecuados para los diferentes tipos de columnas. El rango de caudales para las columnas que se utilizan habitualmente varía desde los 10:l/min hasta los 10 ml/min (columnas microbore, analíticas y semipreparativas).
- e) El caudal que suministran debe ser constante a lo largo del tiempo, ya que de él depende la reproducibilidad de los tiempos de retención (Semanate, 2016).

2) Sistemas de mezcla de fase móvil

En cromatografía de líquidos, es posible trabajar en dos modalidades; isocrático, cuando la fase móvil mantiene la misma composición durante la elución, y en gradiente, cuando la composición de la fase móvil cambia según una función dependiente del tiempo (Semanate, 2016).

Para trabajar en la modalidad de gradiente, es necesario que el equipo cromatográfico tenga un dispositivo capaz de realizar mezclas de disolventes con un control preciso y reproducible. Los dos principales métodos de mezclado de los componentes de la fase móvil se conocen como mezclado a alta presión y mezclado a baja presión (Semanate, 2016).

3) Sistemas de inyección

Este sistema es sumamente importante debido a que si existe un mal sistema de inyección puede dar lugar a ensanchamientos de la banda cromatográfica que deterioren la eficacia del sistema cromatográfico (Semanate, 2016). Un inyector ideal debe tener las siguientes características:

- a) Introducir la muestra en la columna como una banda lo más estrecha posible.
- b) Ser de fácil manejo.
- c) Dar lugar a resultados reproducibles, tanto en la cantidad de muestra inyectada como en el ensanchamiento que origina en la banda cromatográfica.
- d) Ser capaz de trabajar a presiones elevadas (Semanate, 2016).

4) La columna

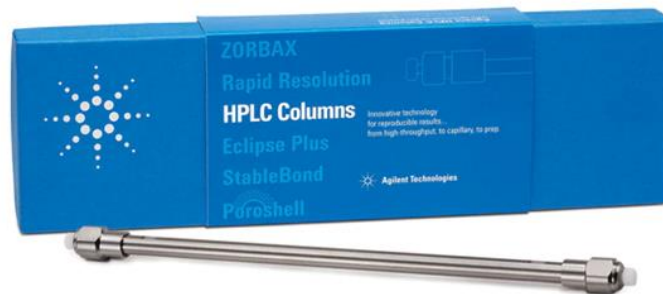
La columna es el elemento fundamental de un cromatógrafo de líquidos, puesto que es en ella donde tiene lugar la separación; por lo tanto, resulta fundamental una correcta elección de la columna adecuada para cada separación, ya que con una columna inadecuada o de mala calidad se nunca se obtendrán buenos resultados, aunque se disponga del mejor instrumental (Martha, 2020).

Las partes de que se compone una columna de cromatografía líquida se muestran en la figura. Las columnas más utilizadas en cromatografía de líquidos son las de relleno; estas columnas consisten en un tubo, generalmente de acero, relleno de una fase estacionaria adecuada al tipo separación que se pretende llevar a cabo. El diámetro interno varía entre 2 y 60 mm dependiendo su utilización, a escala analítica o semipreparativa, y su longitud varía entre 5 y 30 cm (Martha, 2020).

También se encuentran hoy en día en el mercado columnas de pequeño diámetro (microbore), con diámetros comprendidos entre 2 y 0,5 mm y longitudes entre 25 y 100

cm. Este tipo de columnas permite reducir el consumo de disolventes y, por lo tanto, facilitan la posibilidad de acoplar la cromatografía líquida a otras técnicas analíticas (fundamentalmente espectrometría de masas). Por otro lado, se empieza a introducir la denominada cromatografía de líquidos capilar, en la que se utilizan como columnas tubos (de sílice fundida generalmente) de un diámetro interno muy pequeño (entre 200 y 500 μ m) y de gran longitud (varios metros); en este tipo de columnas, la característica más importante es que la fase estacionaria se encuentra ligada químicamente a las paredes del tubo, por lo que se hace innecesaria la utilización de partículas de fase estacionaria como en los dos casos anteriores (Martha, 2020).

Figura No. 3 Columna cromatográfica



Fuente: Agilent (2020).

Las características de la columna que influyen sobre su capacidad de separación son:

- a) Diámetro interno
- b) Longitud
- c) Conexiones (reducciones)
- d) Relleno
- e) Tamaño de partícula del relleno

5) Detectores

Este es un dispositivo que es capaz de medir la salida del analito de la columna. La detección en cromatografía se ejecuta casi siempre, en continuo, aunque también se pueden utilizar colectores de fracciones para la identificación y cuantificación de pequeñas fracciones del eluyente (Giri, 2015). Existen características importantes en cuanto al detector las principales son las características que no afectan a la eficacia de la separación:

- Respuesta: Esta es la señal que emite el detector cuando existe variación de la propiedad física del eluyente que se está midiendo. Esta propiedad debe ser proporcional a la variación de masa del soluto que sale de la columna o a su concentración. Esta señal se ejemplifica de forma lineal, (en un rango más o menos ancho según el tipo de detector), lo que implica que la señal generada por el detector varía linealmente con la concentración o la masa de soluto que, por unidad de tiempo, sale de la columna (Giri, 2015).
- Ruido: Se refiere a las perturbaciones de la respuesta del detector y que no es originada por la salida de un soluto de la columna (Giri, 2015).

El ruido de fondo del detector está compuesto con dos tipos de ruido: ruido de corto alcance que son las perturbaciones de una frecuencia mayor que la inversa del ancho del pico de soluto y ruido de largo alcance que son las perturbaciones con una frecuencia del mismo orden que la inversa del ancho del pico del soluto (Giri, 2015).

- Deriva: Es la variación de la señal de base a lo largo del tiempo, que origina una variación lenta y progresiva de la línea de base (Giri, 2015).
- Sensibilidad: La sensibilidad se define como la mínima concentración o cantidad de soluto que debe pasar por el detector para que la señal a que éste da lugar sea dos veces mayor que la del ruido de fondo. Este parámetro indica la cantidad mínima de soluto que es posible detectar, y es dependiente del ruido del detector (Giri, 2015).
- Rango dinámico: Es el rango de concentraciones de soluto entre las cuales el detector produce una respuesta dependiente de la concentración de soluto a la salida de la columna. El valor mínimo, se corresponde con la sensibilidad del detector, y el máximo, con la concentración de soluto a partir de la cual la respuesta del detector es constante (saturación). El rango dinámico lineal, es la zona del anterior en el que la respuesta del detector es lineal frente a la concentración de soluto (Giri, 2015).

Características que afectan a la eficacia de la separación:

- Volumen de la cubeta: El volumen de la cubeta puede provocar una pérdida considerable de la eficacia del sistema, ya que volúmenes grandes de célula originan un efecto de dilución exponencial del soluto que sale de la columna, deformándose el pico y pudiéndose mezclar dos solutos que salen separados de la columna (Giri, 2015).
- Constante de tiempo: La constante de tiempo del detector indica el tiempo que necesita la electrónica del detector para asumir la señal instantánea originada por el soluto. Constantes de tiempo elevadas, dan origen a que picos que salen rápidamente de la columna se vean ensanchados, y por lo tanto, dan origen a una pérdida de la eficacia del sistema. Para análisis convencionales, son apropiadas constantes de tiempo inferiores a 100 ms (Giri, 2015).

Los detectores que no aportan información estructural han sido hasta el momento los de uso más extendido; entre ellos deben mencionarse:

- a) Detector índice de refracción.
- b) Detector de ultravioleta y/o visible.
- c) Detector de fluorescencia.
- d) Detector de conductividad eléctrica.
- e) Detector electroquímico.

(Giri, 2015).

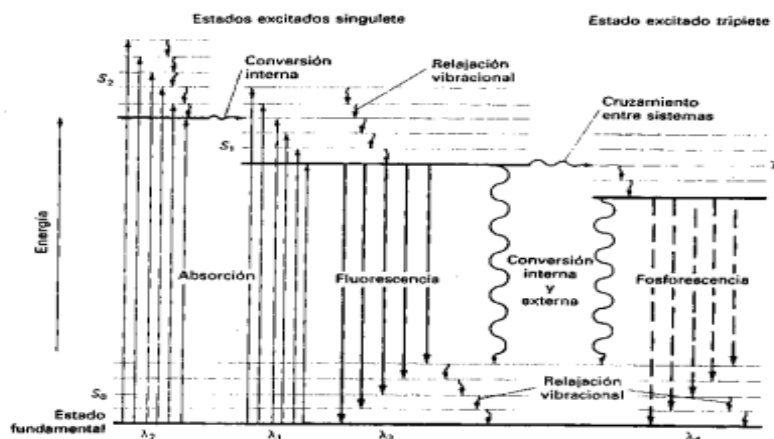
H. Fluorescencia

La fluorescencia es un proceso de fotoluminiscencia en el que los átomos y moléculas se excitan con la absorción de la radiación electromagnética. Después la especie excitada se relaja al estado fundamental y emite su exceso de energía como fotones. La característica más atractiva de la fluorescencia es su sensibilidad inherente, habitualmente de uno a tres órdenes de magnitud mayor que con la espectroscopia de absorción. De hecho, con este método se ha detectado una sola molécula de especies seleccionadas y en condiciones controladas. Otra ventaja de los métodos de fluorescencia es su amplio intervalo de concentración lineal, significativamente mayor que en la espectroscopia de absorción. Sin embargo, los métodos de fluorescencia tienen menos aplicaciones que los métodos de

absorción, dado el número relativamente limitado de sistemas químicos que presentan fluorescencia apreciable. Además, esta última se ve sujeta a muchos más efectos de interferencia ambiental que los métodos de absorción. El análisis por fluorescencia es un método analítico relacionado con la espectrofotometría. Muchas moléculas son capaces de emitir esta energía como radiación, con lo cual vuelven al estado fundamental, la radiación emitida se conoce como fluorescencia (Skoog, et al, 2005).

1. Teoría de la fluorescencia molecular:

Figura No. 4 Diagrama de energía para la fluorescencia



Fuente: Harris (2007).

Normalmente, el tiempo de vida media de una especie excitada es breve porque hay diversas formas en las cuales un átomo o una molécula excitada liberan su exceso de energía y se relajan a su estado fundamental. Dos de las más importantes de estos mecanismos son la relajación (desactivación) no radiante y la relajación fluorescente (Harris, 2007).

En la figura se ilustra el otro proceso de relajación: la fluorescencia. Se puede observar que las bandas de radiación son producidas cuando las moléculas fluorescen debido a que las moléculas electrónicamente excitadas se pueden relajar a cualquiera de los estados vibracionales del estado electrónico fundamental. De igual forma que las bandas de absorción molecular, las bandas de fluorescencia molecular están formadas por una multitud de líneas espaciadas tan estrechamente que son muy difíciles de resolver (Harris, 2007).

El camino más probable hacia el estado fundamental es aquel que minimiza el tiempo de vida media del estado excitado. Por tanto, si la desactivación por fluorescencia es rápida con respecto a los procesos sin radiación, se observa tal emisión. Por otro lado, si un camino sin radiación tiene una constante de velocidad favorable, la fluorescencia no tiene lugar o es menos intensa (Harris, 2007).

VARIABLES QUE AFECTAN LA FLUORESCENCIA:

- a. Rendimiento cuántico: El rendimiento o la eficacia cuánticos de la fluorescencia es simplemente la relación entre el número de moléculas que emiten fluorescencia respecto al número total de moléculas excitadas. Las moléculas altamente fluorescentes, por ejemplo, la fluoresceína, tienen eficiencias cuánticas que, en ciertas condiciones, se aproximan a la unidad. Las especies no fluorescentes tienen eficiencias que son prácticamente cero (González & Hernández, 2002).
- b. Estructura: La fluorescencia más intensa y la más útil es la que presentan los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos. Los compuestos que contienen estructuras alifáticas y alicíclicas de carbonilo o estructuras con dobles enlaces muy conjugados pueden presentar también fluorescencia. La mayoría de los hidrocarburos aromáticos no sustituidos son fluorescentes en disolución, la eficacia cuántica aumenta con el número de anillos y con su grado de conjugación (González & Hernández, 2002).
- c. Rigidez estructural: Empíricamente se encuentra que la fluorescencia está particularmente favorecida en moléculas que poseen estructuras rígidas. La influencia de la rigidez también tiene importancia en el aumento de la fluorescencia de ciertos quelatantes orgánicos cuando están formando un complejo con un ion metálico (González & Hernández, 2002).
- d. Temperatura y disolvente: La eficacia cuántica de la fluorescencia disminuye en muchas moléculas con el aumento de la temperatura, ya que el aumento de la frecuencia de las colisiones a temperatura elevada hace aumentar la probabilidad de desactivación no radiante (conversión externa). Una disminución en la viscosidad del disolvente

también aumenta la probabilidad de conversión externa y produce el mismo resultado (González & Hernández, 2002).

- e. Efecto del pH: La fluorescencia de un compuesto aromático con sustituyentes ácidos o básicos en el anillo depende normalmente del pH. Tanto la longitud de onda como la intensidad de emisión son probablemente diferentes para la forma ionizada y no ionizada del compuesto. Por lo tanto, será muy frecuente en los métodos fluorimétricos el control estricto del pH (González & Hernández, 2002).
- f. Efecto de la concentración: La potencia de la radiación fluorescente F es proporcional a la potencia radiante del haz de excitación que es absorbido por el sistema (González & Hernández, 2002).

I. Validación de un método analítico

En la norma ISO 9001:2015, se define la validación como la aprobación de que un método analítico ha alcanzado los requisitos para utilizarse en la determinación de un analito de interés. Esto se establece mediante estudios de laboratorio, determinando ciertos parámetros (Organización Internacional para la Estandarización, 2017). Las características que se desempeñan son las siguientes: rango de medición, exactitud, incertidumbre de medición de los resultados o precisión, límite de detección, límite de cuantificación, selectividad del método o especificidad, linealidad, repetibilidad o reproducibilidad y la robustez del método (Comisión Guatemalteca de Normas, 2017).

El resultado de la validación es probar la aptitud de los métodos y documentar su validez, mediante la determinación de parámetros analíticos de calidad. Además, la validación determina con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos (Duffau, y otros, 2010).

1. Categorías de validación

Los requisitos de las pruebas farmacopeicas varían desde determinaciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones subjetivas de atributos. Para lo cual se ha dividido en las categorías descritas a continuación (USP, 2017).

- a. Categoría I: Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.
- b. Categoría II: Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados.
- c. Categoría III: Procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño como por ejemplo perfiles de disolución, desintegración, entre otros.
- d. Categoría IV: Pruebas de identificación.

(USP, 2017).

2. Parámetros:

Al ser una validación de categoría I, los parámetros que aplican son:

- a. Rango de medición: Este parámetro indica el intervalo que existe entre la concentración superior e inferior de analito en una muestra para las cuales el método analítico cumple con brindar resultados precisos, exactos y que cumplen con linealidad. El intervalo se reporta en las mismas unidades que la cantidad de analito reportado (RTCA, 2006).
- b. Exactitud: Es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante el método analítico y el valor verdadero o de referencia (RTCA, 2006).
- c. Precisión: Expresa el grado de concordancia entre una serie de mediciones individuales, para ello se mide la dispersión de una serie de medidas obtenidas a partir de múltiples lecturas de una muestra homogénea con las mismas condiciones (RTCA, 2006).
- d. Especificidad; selectividad: Capacidad de evaluar, medir e identificar simultánea o separadamente, los analitos de interés de forma inequívoca sin interferencias de impurezas o productos de degradación (Bridwell et al., 2011).
- e. Linealidad: La linealidad es el parámetro que asegura que la concentración de un analito de interés es directamente proporcional a la medida de lectura del equipo, tal

como la absorbancia o área cromatográfica (Farmacopea de Estados Unidos, 2021) (RTCA, 2006).

- f. Repetibilidad: Indica la precisión de un método utilizado bajo las mismas condiciones, tales como el mismo equipo y analista durante un período corto de tiempo (RTCA, 2006).

IV. MARCO METODOLÓGICO

A. Objetivos

1. General

- a. Estandarizar un método para la cuantificación de riboflavina en cápsulas por medio de cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia.
- b. Validar un método analítico para la cuantificación de riboflavina en una muestra de cápsulas, por medio del equipo de cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia en el laboratorio de análisis fisicoquímicos de un laboratorio de control de calidad.
- c. Documentar un nuevo método de cuantificación de riboflavina para el laboratorio de control de calidad por medio del equipo de cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia.

2. Específicos:

- a. Evaluar los parámetros de especificidad, linealidad del método y del sistema, rango, repetibilidad y exactitud para determinar la validez del método analítico.
- b. Establecer una metodología confiable para la cuantificación de Riboflavina en cápsulas orales.
- c. Elaborar el protocolo e informe de validación del método de cuantificación de riboflavina, que se utilizará en el desarrollo de pruebas de control de calidad en el laboratorio comercial.
- d. Recibir la autorización del director técnico del laboratorio del control de calidad para la utilización de este método en dicho laboratorio.

B. Población y muestra

1. Población: La población a estudiar es el contenido riboflavina (vitamina b2) en cápsulas comercializadas en Guatemala.

2. Muestra: Cantidad requerida de riboflavina (vitamina B2) en cápsulas comercializadas en Guatemala.

C. Procedimiento

1. Revisión bibliográfica

En cuanto a la revisión bibliografía esto se llevó a cabo consultando principalmente la biblioteca virtual de la Universidad del Valle de Guatemala, el repositorio institucional, el reglamento técnico centroamericano, así como las normas ICH (International conference on Harmonization) y la farmacopea de los estados unidos.

2. Elaboración de plan de investigación

Inicialmente se realizó la presentación del título, los objetivos, la introducción y el marco metodológico de la investigación para optar al grado de Licenciado en Química Farmacéutica.

Una vez autorizado, se procedió a realizar el protocolo de investigación que incluye el título, introducción, marco conceptual (antecedentes, justificación, planteamiento de problema, alcances y límites) marco teórico, marco metodológico, operativo, programa, bibliografía y anexos.

Se envió el protocolo para revisión por el director de carrera del Departamento de Química Farmacéutica, el asesor principal y el revisor.

3. Muestreo

Para la selección de la molécula a analizar, se realizó una extensa investigación de las distintas moléculas que presentan la característica de fluorescencia, seleccionando la riboflavina, por ser fácil de obtener y presentar una buena estabilidad, se identificó a los posibles proveedores de riboflavina en el mercado y se escogió el producto más confiable.

4. Análisis de muestras

a. Preparación de fase móvil:

Pesar 13,61 g de acetato de sodio, transferir a un balón aforado de 1000 mL y aforar con agua destilada grado HPLC, realizar una agitación constante y llevar a un pH de 5.4 con ácido acético glacial, hacer una mezcla 30:70 de metanol y la preparación del acetato de sodio y mezclar. para por último filtrar a través de membrana de 0,45 μm ,

b. Preparación de solución estándar madre de riboflavina:

En una balanza analítica pesar 20.11 mg del estándar de riboflavina y esto se debe transferir a un balón aforado con capacidad de 100 mL, agregar 30 mL de hidróxido de sodio 0.1 N, y llevar a ultrasonido por 5 minutos, aforar con hidróxido de sodio 0.10 N y mezclar.

Debido a que la solución estándar de riboflavina es sensible a la luz, y puede degradarse fácilmente, la solución se debe envolver con papel aluminio, además se debe mantener refrigerada.

Transferir 5mL de la solución estándar a un balón aforado de 50 mL y llevar a aforo con una mezcla de (5:1:94) de acetonitrilo, ácido acético glacial y agua y mezclar. Finalmente se debe micro filtrar con membranas de 0.45 micras de nylon, transferir a los viales.

El hidróxido de sodio se preparó pesando 2 gramos de hidróxido de sodio y se disolvió en 500 mL de agua.

c. Preparación de la muestra:

Homogenizar la muestra moliendo en caso de ser necesario se debe de pasar por tamiz malla 20, luego pesar y anotar el peso exacto de 289.73 mg, en un balón aforado de 25 mL con cuello esmerilado, mezclar la muestra con 10mL de hidróxido de sodio 0.10 N y aforar con el mismo hidróxido de sodio. Mezclar bien a fin de obtener una suspensión homogénea, k0y filtrar con embudo y papel filtro, tomar una alícuota de 5mL, en un balón de 10 mL, aforar con una mezcla de (5:1:94) de acetonitrilo, ácido acético glacial y agua y mezclar.

Las condiciones cromatográficas:

- 1) Columna: C18 (5 μm) 125 x 4,6mm (Agilent ®)
- 2) Fase móvil: Inciso 2
- 3) Inyección: 20 μL
- 4) Flujo o caudal: 1.2 mL / min.

- 5) Detector: Fluorescencia (FLD) (Agilent ® 1260 Infinity II)
- 6) Excitación: 450 nm
- 7) Emisión: 528 nm.
- 8) Tiempo: 15 min.

Determinación de la concentración de riboflavina en la solución estándar:

$$STD_R \left(\frac{mg}{mL} \right) \frac{Peso STD_R (mg)}{100 mL} * \frac{5 mL}{50 mL} * \frac{Pureza}{100\%}$$

Determinación del contenido de riboflavina en la muestra:

$$R (\%) = STD_R \frac{mg}{mL} * \frac{A_{Mx}}{A_{STD}} * \frac{25 mL}{Peso Mx (mg)} * \frac{5 mL}{10mL} * 100$$

Concentración esperada de: 0.020 mg/mL

En donde:

- 1) R: Riboflavina
- 2) STDR: estándar de riboflavina
- 3) STDR (mg/mL): concentración riboflavina en la solución estándar
- 4) STDR(mg): peso del estándar de riboflavina
- 5) Mx: muestra de riboflavina
- 6) AMX: área del pico del analito identificado en el cromatograma de la muestra
- 7) ASTD: área del pico del analito identificado en el cromatograma del estándar

Criterio de aceptación: 90.0% - 110.0% de la cantidad declarada de riboflavina.

d. Adecuación del sistema:

Se realiza una medición en sextuplicado del estándar de Riboflavina, el cual es preparado como se indica en la sección anterior. Se analizan los parámetros de concentración del estándar, señal del estándar y coeficiente de variación de las seis inyecciones. También se analizan los factores cromatográficos de altura de picos, áreas de picos, factor de coileo USP, platos teóricos y factor de capacidad (k') de la columna.

Criterio de aceptación: La desviación estándar relativa (%CV) entre las 6 inyecciones debe ser menor o igual al 2%.

e. Especificidad:

La especificidad se obtiene a partir de la valoración por comparación del comportamiento de la Riboflavina a distintas condiciones. Para evaluar este parámetro, se preparan las siguientes soluciones:

1. Estándar al 100% de riboflavina
2. Muestra al 100% de concentración de riboflavina
3. Placebo al 100% de concentración de riboflavina
4. Fase móvil
5. Diluyente
6. Solución estándar: Realizar la preparación del estándar de trabajo, en concentración del 100% del analito respecto a la muestra.
7. Solución muestra: Realizar la preparación de la muestra, según lo indicado en el procedimiento de preparación de la muestra de este informe.
8. Solución placebo: Se determinó mediante un análisis de espectroscopia infrarroja (IR), comparando el contenido de las cápsulas con la base de datos, en el cual se determinó que la materia prima predominante es el almidón, empleándose 24 g de este, 42mg de tiamina, 66mg de piridoxina, 12mg de ácido fólico, 300mg de nicotinamida y 1 mg de cianocobalamina, esto se mezcló y se aplicó el mismo procedimiento para el análisis del analito.

Criterio de aceptación: El tiempo de retención de las soluciones placebo, diluyente y fase móvil no debe exhibir señales cuantificables en el mismo tiempo de retención de la solución estándar del analito, la solución muestra debe exhibir la misma respuesta en cuanto al tiempo de retención de la solución estándar. Con eso se demuestra que la matriz no interfiere.

f. Linealidad del sistema

Para evaluar la linealidad del sistema se preparan soluciones de estándar a 5 niveles de concentración de riboflavina: 50%, 75%, 100%, 125% y 150%. Este procedimiento se repite de forma independiente 3 veces y se evalúa estadísticamente la regresión lineal del sistema al graficar la concentración del analito vs el área cromatográfica para cada uno de los compuestos evaluados.

Preparación de la curva de linealidad del sistema para riboflavina: Preparar una solución madre de Riboflavina a una concentración de 0.02 mg/mL en un balón de 100 mL. Tomar de la solución madre las siguientes alícuotas y diluir con una mezcla de (5:1:94) de acetonitrilo, ácido acético glacial y agua a en balones aforados de 50 mL, mezclar, para alcanzar las concentraciones de cada nivel en la curva.

Tabla No. 1 Preparación de estándares para la curva de linealidad del sistema de valoración de riboflavina.

No.	Nivel (%)	Alícuota de solución madre de riboflavina (mL)	Concentración riboflavina (mg/mL)
1	50	2	0.010
2	75	3	0.015
3	100	4	0.020
4	125	5	0.025
5	150	6	0.030

Criterio de aceptación de linealidad del sistema:

1. Coeficiente de correlación (r): ≥ 0.99
2. Coeficiente de determinación (r^2): ≥ 0.98
3. %Desviación estándar relativa (RSD): $\leq 2.0 \%$
4. Coeficiente de variación de los factores de respuesta (CV): $\leq 2.0 \%$

g. Linealidad del método

La prueba de exactitud se lleva a cabo junto con el análisis de linealidad del método, el cual se obtiene trabajando a 3 niveles de concentración de riboflavina: 80%, 100%, y 120%. Este procedimiento se realiza tres veces de forma independiente para cada nivel y se evalúa estadísticamente la regresión lineal del sistema al graficar la concentración de analito añadida vs la recuperada para cada uno de los compuestos evaluados.

Preparación de soluciones para linealidad del método de riboflavina: Pesar las siguientes cantidades de riboflavina y placebo para alcanzar las concentraciones de cada nivel en la curva. Preparar cada una de las soluciones en balones de 50 mL, y aforar con hidróxido de

sodio 0.1 N. Tomar una alícuota de 2 mL del estándar y 2 mL del placebo y transferir a baulnes de 10 mL, diluir con una mezcla de (5:1:94) de acetonitrilo, ácido acético glacial y agua y mezclar.

Tabla No. 2 Preparación de estándares para la curva de linealidad del método de valoración de riboflavina

Nivel (%)	Peso de riboflavina (mg)	Peso de placebo (mg)	Concentración de riboflavina (mg/mL)
80	4	1444.64	0.016
100	5	1143.64	0.020
120	6	1142.64	0.024

Criterio de aceptación de linealidad del método

1. Coeficiente de correlación (r): ≥ 0.99
2. Coeficiente de determinación (r^2): ≥ 0.98
3. %Desviación estándar relativa (RSD): $\leq 2.0 \%$
4. Coeficiente de variación de los factores de respuesta (CV): $\leq 2.0 \%$

h. Exactitud

Para evaluar la exactitud se calcula el porcentaje de recobro de la cantidad determinada con relación a la cantidad conocida de analito añadido a una muestra placebo.

1. Criterio de aceptación para la exactitud
2. Porcentaje de recuperación 98% a 100%
3. Coeficiente de variación: $\leq 2.0 \%$
4. G de Cochran tabulada ≤ 0.798

i. Repetibilidad

Aplicación del procedimiento analítico en un laboratorio durante un período corto por el mismo analista utilizando el mismo equipo. La determinación de la repetibilidad del método se realiza sobre una serie de 9 valoraciones llevadas a cabo por el mismo analista, bajo las mismas condiciones normales de operación.

Las muestras utilizadas en la determinación son las siguientes:

1. muestras de placebo más estándar que representen el 80% del analito.
2. muestras de placebo más estándar que representen el 100% del analito.
3. muestras de placebo más estándar que representen el 120% del analito.

Criterio de aceptación de repetibilidad: El coeficiente de variación CV, no debe ser mayor a 2% para cada nivel, ni para el grupo total de determinaciones.

j. Precisión intermedia

Este parámetro se analiza obteniendo resultados de 12 determinaciones, realizadas por dos analistas distintos. Con lo cual se determina la variación dentro del laboratorio.

Las 12 determinaciones se realizan de la siguiente manera:

1. Día 1: 6 determinaciones procedentes del analista 1 de una muestra homogénea que corresponde al 100% de Riboflavina
2. Día 2: 6 determinaciones procedentes del analista 2 de una muestra homogénea que corresponde al 100% de Riboflavina

Criterio de aceptación de precisión intermedia: El coeficiente de variación no debe ser mayor del 2%, entre las series ni en el grupo total de ellas.

k. Rango

Se mide la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el procedimiento según se describe en las secciones anteriores.

Criterio de aceptación de rango: El valor se debe encontrar entre 80% a 120% determinado respecto a la concentración del análisis.

5. Análisis y discusión de resultados

Mediante los datos obtenidos se procederá a la interpretación de los resultados, para verificar si la validación metodológica se ejecutó de forma correcta y se puede integrar a los métodos ordinarios que se utilizan en el laboratorio de control de calidad, interpretando cada uno de los parámetros por separado a partir de las gráficas y cuadros obtenidos.

6. Elaboración de informe de investigación

Por último, se realizó una presentación al director de carrera, asesor y revisor, para obtener la aprobación, y proceder a realizar el informe final agregando los resultados, la discusión, las conclusiones y recomendaciones.

D. Diseño de investigación

El estudio es de tipo observacional prospectivo, debido a que se realiza una comparación entre grupos, para validar un método analítico.

V. MARCO OPERATIVO

A. Tratamiento y recolección de datos

Los datos recolectados se deben ingresar manualmente a una base de datos de EXCEL, donde se ejecutarán mediante estadística descriptiva para presentar los resultados mediante gráficas y cuadros, para posteriormente realizar el análisis pertinente para desarrollar una discusión concisa y directa.

B. Recursos Humanos

1. Autora: Valeria Andrea Salguero Recinos
2. Asesor: Lic. Sergio Sánchez
3. Revisora: Licda. Ana Luisa Mendizábal Solé

C. Recursos materiales

1. Equipo

- a. Balanza analítica con sensibilidad 0.1 mg (Mettler Toledo)
- b. Cromatógrafo líquido de alta resolución con detector de fluorescencia (Agilent ® 1260 Infinity II)
- c. Baño termorregulado con agitación magnética
- d. Columna: C 18 (5 um), 125 x 4,6 mm (Agilent ®)

2. Cristalería y materiales

- a. Dispositivo de filtración con membrana Milipore
- b. Espátula
- c. Embudos
- d. Viales de inyección HPLC de 2mL
- e. Balón volumétricos de 1000, 100, 50 y 20 mL.
- f. Erlenmeyer de 25 mL
- g. Membranas de 0.45 micras, nylon.
- h. Beakers de 1000, 100 y 50 mL
- i. Pipetas volumétricas de 2mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL y 6 mL
- j. Probetas de 1000, 100 y 50 mL
- k. Potenciómetro Mettler toledo

- l. Jeringas
 - m. Computadora
 - n. Equipo de protección personal: bata, guantes, lentes
 - o. Papel aluminio
 - p. Mortero y pistilo
 - q. Papel filtro
3. Reactivos
- a. Agua destilada grado HPLC
 - b. hidróxido de sodio 0.1N grado analítico
 - c. Acetato de sodio grado analítico
 - d. Ácido acético glacial grado analítico
 - e. Acetonitrilo grado HPLC
 - f. Metanol grado HPLC
4. Estándares y muestra de trabajo
- a. Estándar de riboflavina
 - b. Cápsulas de riboflavina
 - c. Placebo (almidón de maíz)
- D. Recursos económicos:

Este trabajo de graduación será financiado de forma completa por el laboratorio de control de calidad, tiene un costo aproximado de Q8,000.

VI. CRONOGRAMA

Tabla No. 3 Cronograma de elaboración de tesis

Tiempo Actividad	Semanas																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Revisión de bibliografía	x	x																		
Elaboración plan de investigación			x	x	x															
Muestreo y obtención de estas					x	x	x													
Análisis de muestras								x	x	x	x									
Discusión de resultados												x	x	x	x					
Elaboración de informe																x	x	x	x	x

VII. RESULTADOS

A. Adecuación del sistema

Tabla No. 4 Resultados de adecuación del sistema para el método de valoración de riboflavina.

Determinación	Platos teóricos	Factor de coleo	Área cromatográfica	Factor de capacidad ('k)	Tiempo de retención
1	3255.20	1.40	2568	1.50	6.10
2	3266.30	1.40	2537	1.50	6.11
3	3266.50	1.40	2529	1.50	6.11
4	3265.70	1.40	2526	1.50	6.10
5	3283.50	1.40	2509	1.50	6.11
6	3276.60	1.40	2491	1.50	6.10
Promedio	3269.97	1.40	2527	1.50	6.11
%CV	0.30	0.00	1.033	0.00	0.090

B. Especificidad

Tabla No. 5 Resultados de especificidad para valoración de riboflavina

Principio activo	Criterio	Resultado	Interpretación
Riboflavina	Las soluciones diluyente/fase móvil y placebo no deben de exhibir señales cuantificables. La solución muestra debe de exhibir una respuesta similar en el tiempo de retención de la solución estándar.	No hay interferencia de alguna señal proveniente de las soluciones diluyente/fase móvil o placebo. La solución muestra exhibe la misma respuesta en cuanto al tiempo de retención de la solución estándar.	Cumple
Especificidad	Área cromatográfica		
Estándar	3159.00		
Muestra	3786.00		
Placebo	0000.00		
Fase móvil	0000.00		
Diluyente	0000.00		

C. Linealidad, intervalo y rango del sistema

Tabla No. 6 Resultados de linealidad de sistema para la valoración de riboflavina

Nivel	No. Estándar	Concentración (mg/mL)	Área cromatográfica	Promedio	%CV
50%	1	0.010	1046	1047.00	0.17
	2	0.010	1046		
	3	0.010	1049		
75%	1	0.015	1665	1664.00	0.060
	2	0.015	1663		
	3	0.015	1664		
100%	1	0.020	2241	2243.66	0.10
	2	0.020	2245		
	3	0.020	2245		
125%	1	0.025	2888	2884.33	0.14
	2	0.025	2880		
	3	0.025	2885		
150%	1	0.030	3504	3506.66	0.072
	2	0.030	3509		
	3	0.030	3507		

Gráfica No 1. Linealidad del sistema de la valoración de riboflavina.

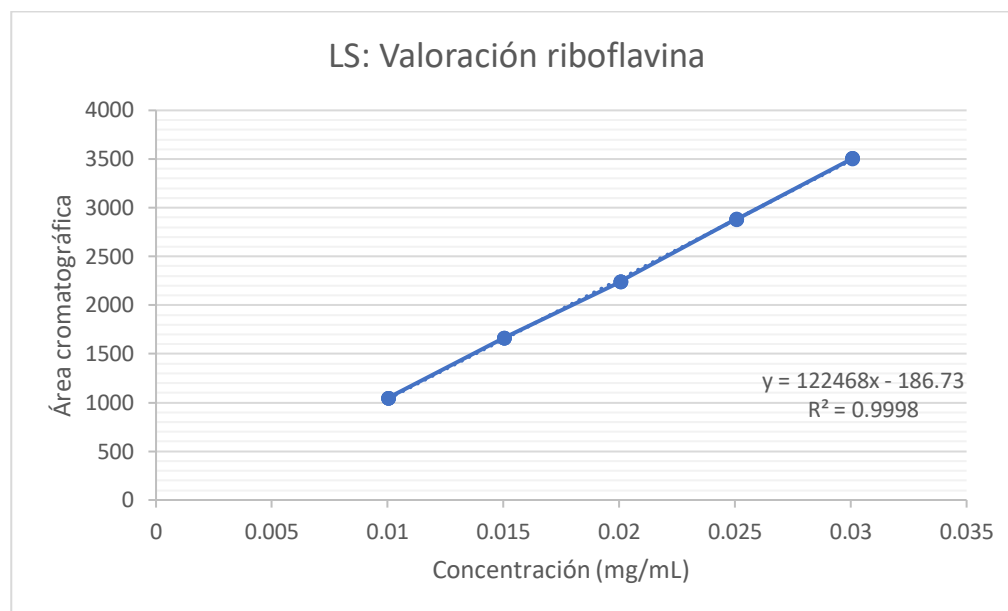


Tabla No. 7 Resumen resultados estadísticos de linealidad del sistema para valoración de riboflavina.

Criterio	Especificación	Resultado	Interpretación
Coeficiente de correlación R	≥ 0.99	1.00	Cumple
Coeficiente de determinación R^2	≥ 0.98	0.99	Cumple
% Desviación estándar relativa de b	≤ 2.00	0.42	Cumple
Coeficiente de variación de los factores de respuesta (%cv)	≤ 2.00	0.039	Cumple

Tabla No. 8 Reporte estadístico de la prueba de linealidad y rango del sistema para la valoración de riboflavina.

Descripción	Parámetros	Resultados
Resultados del análisis de regresión	Ecuación de la recta	$y=122468.32x-186.73$
	Coefficiente de correlación	1
	Coefficiente de determinación	0.99
Datos de la pendiente (b)	Coefficiente de regresión lineal b	122468.32
	Varianza	259922.63
	Desviación estándar	509.83
	Desviación estándar relativo	0.42
	Intervalo de confianza	123378.18
	Para $p=0.05$	121572.45
	La pendiente es distinta de 0 para $p=0.05$	
Datos del intercepto (a)	Valor del intercepto	-186.73
	Varianza	117.60
	Desviación estándar	10,84
	Desviación estándar relativo	5.80
	Intervalo de confianza	-167.78
	Para $p=0.05$	-206.19
	El intercepto es distinto de 0 para $p=0.05$	
Datos de los factores de respuesta (f)	Media	111711.58
	Desviación de factores	4384.95
	Coefficiente de variación	0.039

D. Linealidad del método y exactitud

Tabla No. 9 Resultados de prueba de exactitud para valoración de riboflavina

Nivel %	Área cromatográfica	Recuperado (mg)	Recuperado %	Promedio	Dev. Estándar	%CV
80	2027	80.46	100.58	101.18	0.54	0.54
	2037	81.062	101.33			
	2038	81.31	101.63			
100%	2537	99.62	99.62	100.58	0.88	0.88
	2571	101.35	101.35			
	2551	100.76	100.76			
120%	3046	121.12	100.93	100.99	0.46	0.45
	3052	121.76	101.47			
	3055	120.67	100.56			
Promedio				100.91	0.63	0.62
G Cochran Experimental				0.62		
G Cochran Tabulada				0.79		
Variabilidad para $p=0.05$				La variabilidad no depende la concentración para $p=0.05$.		

Tabla No.10 Resumen resultados estadísticos de la exactitud para valoración de riboflavina.

Criterio	Especificación	Resultado	Interpretación
Porcentaje de recuperación	(98.0 - 102.0%)	100.91	Cumple
Coefficiente de variación % (Cv)	≤ a 2%	0.62	Cumple
G de Cochran Experimental	0,798	0.62	Cumple

Tabla No.11 Resultados de linealidad del método para valoración de riboflavina

Nivel %	Área cromatográfica	mg agregados (%)	mg recuperado (%)	Concentración	% Recuperado
80%	2027	80.00	80.46	0.016	100.58
	2037	80.00	81.062	0.016	101.33
	2038	80.00	81.31	0.016	101.63
100%	2537	100.00	99.62	0.020	99.62
	2571	100.00	101.35	0.020	101.35
	2551	100.00	100.76	0.020	100.76
120%	3046	100.00	121.12	0.024	100.93
	3052	100.00	121.76	0.024	101.47
	3055	100.00	120.67	0.024	100.56

Grafica No 2. Linealidad del método para la valoración de riboflavina

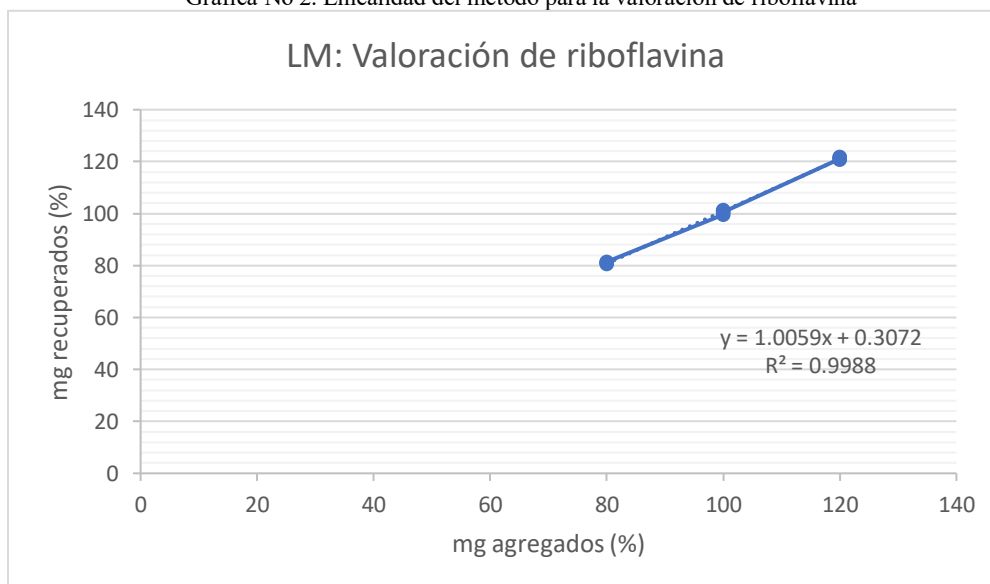


Tabla No. 12 Resumen resultados estadísticos de linealidad del método para valoración de riboflavina

Criterio	Especificación	Resultado	Interpretación
Coefficiente de correlación R	≥ 0.99	1.00	Cumple
Coefficiente de determinación R^2	≥ 0.98	0.99	Cumple
% Desviación estándar relativa de b	≤ 2.00	0.013	Cumple
Coefficiente de variación de los factores de respuesta (%Cv)	≤ 2.00	0.006	Cumple

Tabla No. 13 Reporte estadístico de la prueba de linealidad del método para la valoración de riboflavina.

Descripción	Parámetros	Resultados
Resultados del análisis de regresión	Ecuación de la recta	$y=1.0059x+ 0.3072$
	Coefficiente de correlación	1.00
	Coefficiente de determinación	0.99
Datos de la pendiente (b)	Coefficiente de Regresión lineal b	1.0059
	Varianza	0.00
	Desviación estándar	0.013
	Desviación estándar relativo	1.33
	Intervalo de confianza	1.031
	Para $p=0.05$	0.98
	La pendiente es distinta de 0 para $p=0.05$	
Datos del intercepto (a)	Valor del intercepto	0.3072
	Varianza	1.83
	Desviación estándar	1.35
	Desviación estándar relativo	441.23
	Intervalo de confianza	2.87
	Para $p=0.05$	-2.3
	El intercepto es distinto de 0 para $p=0.05$	
Datos de los factores de respuesta (f)	Media	1.01
	Desviación de factores	0.006
	Coefficiente de variación	0.006

E. Repetibilidad

Tabla No. 14 Resumen de resultados estadísticos de repetibilidad para valoración de riboflavina

Principio activo	Nivel %	Especificación	Resultado %CV	Interpretación
Riboflavina	80	≤ 2.00	0.53	Cumple
	100		0.88	Cumple
	120		0.45	Cumple

Tabla No. 15 Resultados de repetibilidad para valoración de riboflavina

Nivel%	Área cromatográfica	Recuperado %	Promedio %	Des. Estándar	%CV
80	2027	100.58	101.18	0.54	0.53
	2037	101.33			
	2038	101.63			
100	2537	99.62	100.58	0.88	0.88
	2571	101.35			
	2551	100.76			
120	3046	100.93	100.98	0.46	0.45
	3052	101.47			
	3055	100.56			
Promedio			100.91	0.63	0.62

F. Precisión intermedia

Tabla No 16. Resumen resultados estadísticos de precisión intermedia para valoración de riboflavina

Criterio	Especificación	%CV	Interpretación
Coefficiente de variación analista 1	≤ 2.00	0.92	Cumple
Coefficiente de variación analista 2	≤ 2.00	0.79	Cumple
Coefficiente de variación general	≤ 2.00	0.86	Cumple

Tabla No 17. Resultados de precisión intermedia para valoración de riboflavina día 1.

Determinación	Agregado (mg)mx	Área cromatográfica	% Recuperado
1	289.70	3467	113.74
2	289.45	3448	113.21
3	289.46	3499	114.88
4	289.56	3431	112.61
5	289.96	3430	112.43
6	289.73	3413	111.96
Promedio % Recuperado	113.14		
Desv. Estándar	1.058		
CV%	0.92		

Tabla No 18. Resultados de precisión intermedia para valoración de riboflavina día 2.

Determinación	Agregado (mg)mx	Área cromatográfica	% Recuperado
1	290.06	290.06	110.47
2	289.61	289.61	108.57
3	289.72	289.72	110.66
4	289.77	289.77	109.88
5	289.71	289.71	110.41
6	290.09	290.09	109.00
Promedio % Recuperado	109.83		
Desv. Estándar	0.86		
CV%	0.79		

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A. Adecuación del sistema

Este es un parámetro específico para comprobar si existe una adecuada distribución de la señal en el espectro durante el proceso de detección. Como se observa en la tabla 4, se tiene un coeficiente de variación (CV) de 1.033% para las áreas cromatográficas por lo que no existe variabilidad significativa entre las lecturas realizadas en un mismo vial, así también se obtuvo un 0% de CV en factor de coleo, esto quiere decir que la simetría del pico cromatográfico es adecuada, igualmente se obtuvo un 0% de CV en el factor de capacidad, esto significa que se obtuvo el mismo grado de retención de la muestra en la columna en todas las inyecciones, en el caso de los platos teóricos se obtuvo un CV de 0.30% por lo que se pudo comprobar la eficiencia de la columna, por último un CV de 0.090% en cuanto al tiempo de retención por lo que se concluye que el tiempo que tarda un analito en salir de la columna es muy similar en las 6 inyecciones.

B. Especificidad

En este parámetro se analizó la solución estándar al 100% de Riboflavina, la muestra al 100% de Riboflavina, el placebo, el diluyente y la fase móvil.

Se evaluó la especificidad para determinar la posible interacción o si existe interferencia de los excipientes, así como el sistema cromatográfico y los estándares y la muestra trabajada, esta evaluación se realiza para determinar si existe algún componente de la formula del producto o del sistema cromatográfico que pudiera emitir señal en la misma longitud de onda que el principio activo.

Los resultados se pueden observar en el área de anexos, apartado G. Las soluciones diluyentes, fase móvil y placebo no emitieron señales cuantificables en el mismo tiempo de retención de la solución estándar del analito, sin embargo para la solución muestra si se exhibió una respuesta similar en cuanto al tiempo de retención de la solución estándar. Con eso se demuestra que la matriz no interfiere. A partir de esto, se concluye que el método analítico utilizado para la valoración de Riboflavina cumple con los parámetros de especificidad.

C. Linealidad del sistema

En este parámetro se evaluaron 5 niveles de concentración (50%,75%,100%,125%,150%), por lo que se obtuvo un rango desde 0.010 mg/mL hasta 0.030 mg/mL, respecto a la concentración en la preparación de la muestra. Este parámetro es importante ya que permite determinar que el sistema brinda resultados confiables dentro y fuera del rango de aceptación del producto, obteniéndose información para poder detectar producto que se encuentren fuera de los límites de la especificación y poder cuantificarlos con la misma precisión y exactitud.

En los resultados, en la gráfica 1, se pudo observar una relación lineal directamente proporcional entre la concentración de Riboflavina y el área determinada por el equipo. Se evaluaron los parámetros coeficiente de correlación (R) y coeficiente de determinación (R²) 1.000 y 1.00 respectivamente, cumpliendo con la especificación de ser mayores a 0.99 y 0.98 como se muestra en la Tabla 7. La correlación entre los datos y la desviación estándar para la pendiente es de 0.42 % (menor o igual a 2%). Tomando en cuenta estos datos, se puede afirmar que la pendiente de riboflavina no tiene variabilidad y por lo tanto no existe variabilidad en las valoraciones para las concentraciones en el rango lineal evaluado.

El coeficiente de determinación para riboflavina, indica que los resultados presentados en el presente informe se apegan en al menos un 98.0% al modelo de regresión lineal y la concentración y el área están relacionados entre sí. El sistema cumple con los parámetros de linealidad y se asegura que la capacidad del método de análisis da una respuesta proporcional a la cantidad del analito analizado.

D. Linealidad del método

Se realizó el análisis de valoración a tres niveles diferentes de concentración de riboflavina (80%, 100% y 120 %), que equivalen a un rango de 0.016mg/mL a 0.024 mg/mL para evaluar la correlación entre la concentración y el porcentaje de recobro al analizar una matriz con el principio activo. En este rango se demostró que existe una correlación lineal entre la cantidad de riboflavina agregada y la cantidad recuperada, como se observa en la gráfica 2, obteniendo un coeficiente de correlación de 1.00 y un coeficiente de determinación de 1.00, lo que demuestra que los datos del área de Riboflavina cumplen con el modelo lineal en un 100% de los casos, y un coeficiente de

variación de la regresión menor al 2%, por lo que se cumple con los parámetros establecidos por la ICH de validación, al demostrar que la variabilidad no depende de la concentración, se obtiene que la relación de principio activo agregado y recuperado es directamente proporcional por lo que el método es lineal y adecuado para el análisis de riboflavina.

E. Repetibilidad

Este parámetro se evalúa en tres niveles de concentración distintos (80%, 100% y 120%), cada uno realizado en triplicado, dentro del rango de linealidad de cada analito como se puede observar en la Tabla 15 en la sección de resultados, se puede notar que para las tres diferentes concentraciones se mantienen los valores de desviación estándar y coeficiente de variación debajo del 2%, además se puede obtener un porcentaje de recuperación adecuado de 100.98%. Esto indica que para la riboflavina se puede asegurar que hay una buena repetibilidad en tanto a una concentración baja, mediana y alta.

F. Exactitud

Este parámetro fue determinado a partir del porcentaje de recobro a los mismos niveles de concentración obtenidos en la linealidad del método, con el objetivo de poder analizar con confiabilidad el producto que se encuentre conforme y no conforme. Como se observa en la Tabla 11, se obtuvo un porcentaje de recuperación promedio de 100.91% para la Riboflavina, por lo que la metodología analítica utilizada fue correctamente ejecutada para dar resultados que sean exactos y con una mínima variación (coeficiente de variación de 0.62%). Respecto al valor de G de Cochran, se determinó que entre los datos de cantidad agregada de riboflavina y el porcentaje recuperado existe poca variabilidad ya que se encontró un valor de 0.62 que es menor al valor tabulado (0.798), con lo que se demuestra que no existe influencia del factor de concentración en la variabilidad de los resultados, con lo que se comprueba la exactitud del método.

G. Precisión intermedia

El método analizado presentó un alto grado de repetibilidad ya que los resultados observados en las tablas 17 y 18 muestran que, analizando la misma concentración en muestras preparadas independientemente, los resultados obtenidos al aplicar el método

tienen poca variabilidad con la desviación estándar y el coeficiente de variación, siendo este menor a 2%.

El método cromatográfico desarrollado para la valoración de Riboflavina resultó ser preciso, lo cual se demuestra al evaluar la variabilidad entre el analista 1 en el cual se obtuvo un porcentaje de recuperación de 113.14%, con una desviación estándar de 1.036 y un coeficiente de variación de 0.92 y la preparación del analista 2 con un porcentaje de recuperación de 109.84%, una desviación estándar de 0.86% y un coeficiente de variación de 0.79%. A través del coeficiente de variación menor al 2%, se demuestra la poca variabilidad entre las preparaciones de ambos analistas.

IX. CONCLUSIONES

- Se estandarizó un método para la cuantificación de riboflavina mediante la evaluación a de parámetros clave como la especificidad, linealidad del método y del sistema, precisión, repetibilidad y exactitud. Los resultados obtenidos demostraron la validez del método analítico, lo que respalda su aplicabilidad en la determinación precisa de riboflavina en cápsulas orales.
- Se validó un método analítico para la cuantificación de riboflavina en una muestra de cápsulas orales, por medio del equipo de cromatografía líquida de alta resolución, los resultados y conclusiones obtenidos contribuyen significativamente al avance y excelencia en los procesos analíticos del laboratorio de control de calidad.
- Se implementó una metodología confiable para la cuantificación de riboflavina en cápsulas orales. Esto ha permitido establecer un proceso analítico consistente y eficaz, proporcionando una base sólida para la obtención de resultados precisos en el análisis de este tipo productos farmacéuticos.
- Se elaboró el protocolo e informe de validación del método de cuantificación de riboflavina, destinado a ser utilizado en el desarrollo de pruebas de control de calidad en el laboratorio comercial. Este documento no solo proporciona una guía detallada para la implementación del método, sino que también respalda la integridad y confiabilidad de los resultados obtenidos en el laboratorio de análisis fisicoquímicos.
- Se recibió la autorización del director técnico del laboratorio de control de calidad para la utilización de este método, esto confirma su confiabilidad y validez para aplicaciones prácticas. Esta aprobación respalda la utilidad y confiabilidad del

método en entornos profesionales, destacando su relevancia en la mejora continua de los estándares de calidad en la industria farmacéutica.

X. RECOMENDACIONES

Los resultados indican una buena repetibilidad y exactitud, sin embargo, se sugiere una revisión continua de estos parámetros a medida que se implementa el método en el laboratorio. Verificar la variabilidad del método cada 2 o 3 años garantizará la consistencia y confiabilidad del análisis, especialmente al enfrentar concentraciones variables y diferentes condiciones de muestreo. Dada la relevancia de la precisión intermedia, se recomienda realizar evaluaciones periódicas para garantizar que el método mantenga su alto grado de repetibilidad entre días independientes. Esto respaldará la confiabilidad del método a lo largo del tiempo.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Agilent Technologies, Inc. (2016). *Manual para y guía para el cromatógrafo 1260 Infinity II Quaternary System*. Alemania.
2. Alam, M. M., Iqbal, S. and Naseem, I. (2015). *Ameliorative effect of riboflavin on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in type-2 diabetic mice: mechanistic and therapeutic strategies*. *Archi. Biochem. Biophys.* 584:10–19.
3. Arosio, P., & Levi, S. (2010). *Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage*. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(4), 457-463. doi: 10.1016/S0891-5849(02)00932-
4. Ashoori, M. and Saedisomeolia, A. (2014). Riboflavin (vitamin B2) and oxidative stress: a review. *Br. J. Nutr.* 20:1–7.
5. Bareford, L. M., Phelps, M. A. and Foraker, A. B. (2005). *Intracellular processing of riboflavin in human breast cancer cells*. *Mol. Pharm.* 5:839– 848.
6. Benitez, M (2020). *Cromatografía Líquida De Alto Rendimiento (Hplc)*. Universidad Simón Bolívar.
7. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., Stryer, L. (2015). *Biochemistry. 8th edition*. *W. H. Freeman and Company*. Capítulo 14: "Metabolism."
8. Bridwell, H., Dhingra, V., Peckman, D., Roark, J., & Lehman, T. (2010). *Perspectives on method validation: importance of adequate method validation*. *The Quality Assurance Journal*, 13(3-4), 72-77
9. Chang, R. (2010). *Química. Décima edición*. *McGraw-Hill Interamericana*. Capítulo 2: "Propiedades y cambios de la materia".
10. Chatzimichalakis, P., Samanidou, V., Verpoorte, R., & Papadoyannis, I. (2004). *Development of a validated HPLC method for the determination of B-complex vitamins in pharmaceuticals and biological fluids after solid phase extraction*. *Journal of separation science*. 27(14).
11. Comisión Guatemalteca de Normas [COGUANOR]. (2017). *Norma COGUANOR NTG ISO/IEC 17025:2017*. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
12. Crubellati, R., & Di Risio, C. (2009). *Aspectos Prácticos de Validación e Incertidumbre en Medidas Químicas*. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (Primera ed.). CYTED, Buenos Aires.

13. Dong, M. (2013). *The essence of modern HPLC: advantages, limitations, fundamentals, and opportunities*. LCGC North America, 31(6), 472-479.
14. Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Roa, L., Rodríguez, L., Soto, M., & Aguilera, M. &. (2010). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos" (Primera ed.)*. Chile.
15. Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 40 NF 35. (2017). *Vol. 1*. Estados Unidos de América: The United States Pharmacopeial Convention.
16. Fairweather-Tair, S. J., Powers, H. J. and Minski, M. J. (1992). *Riboflavin deficiency and iron absorption in adult Gambian men*. *AMH. Nutr. Metab.* 36:34-40.
17. Figueroa, R. A. C. (2019). *Guía para la validación de métodos analíticos de jarabes por cromatografía líquida de alta resolución en un laboratorio farmacéutico*.
18. Giri, D. (2015). *High performance liquid chromatography (HPLC): principle, types, instrumentation and applications*. *LaboratoryInfo*. Recuperado de <https://laboratoryinfo.com/hplc/>
19. González C, & Hernández L.(2002). *Introducción al Análisis Instrumental*. España. Ariel.
20. Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press.
21. Harris, D. C. (2007). *Análisis químico cuantitativo*. 3ª ed. España. Reverté.
22. Hróbjartsson, A., & Gøtzsche, P. C. (2010). *Placebo interventions for all clinical conditions*. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2010(1), CD003974. doi: 10.1002/14651858.CD003974.pub3
23. International Committee for Harmonization, ICH. Guidance for Industry: Q2(R1). (1996). *Validation of Analytical Procedures: Methodology*. Fecha de consulta: 15 de Agosto de 2017. Disponible en: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>
24. International Organization for Standardization (ISO). (2021). *What are standards?* <https://www.iso.org/standards.html>
25. IRAM (2001). Norma 35050, "Estadística. Procedimientos para la evaluación de la incertidumbre de la medición.", Primera edición, 2001-06-15.

26. Iwanaga, K., Hasegawa, T. and Hultquist, D. E. (2007). *Riboflavin –mediated reduction of oxidant injury, rejection, vasculopathy after cardiac allotransplantation*. *Transplantation*. 83:747– 753.
27. Kaushansky, K., Lichtman, M. A., Prchal, J. T., Levi, M. M., Burns, L. J., Caligiuri, M. A. (2015). *Williams Hematology, 9th Edition*. McGraw-Hill Education. Capítulo 10: "Erythropoiesis and General Aspects of Anemia".
28. Kumar, S., & Kumar, A. (2017). *Riboflavin and health: A review of recent human research*. *Critical reviews in food science and nutrition*.
29. Lacueva, A., Mattivi, F., & Tonon, D. (1998). *Determination of riboflavin, flavin mononucleotide and flavin–adenine dinucleotide in wine and other beverages by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*. *Journal of Chromatography A.*, 823(1), 355- 363. Recuperado el 22 de Junio de 2016, de <http://www.sciencedirect.com.scihub.cc/science/article/pii/S0021967398005858>.
30. Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Seventh Edition. W. H. Freeman and Company. Capítulo 14: "Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation".
31. Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Seventh Edition. W. H. Freeman and Company. Capítulo 6: "Enzymes: The Catalysts of Life".
32. Lawes, C. M., Vander Hoorn, S. and Rodgers, A. (2008). *International Society of Hypertension. Global burden of blood-pressure-related disease*. *Lancet*. 371:1513– 1518
33. Li, H. B., & Chen, F. (2001). *Simultaneous determination of nine water-soluble vitamins in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography with diode array detection*. *Journal of separation science*, 24(4), 271-274. Recuperado el 24 de Mayo de 2016, de [http://onlinelibrary.wiley.com.sci-hub.cc/doi/10.1002/1615-9314\(20010401\)24:4%3C271::AID-JSSC271%3E3.0.CO;2-L/full?2-L/full](http://onlinelibrary.wiley.com.sci-hub.cc/doi/10.1002/1615-9314(20010401)24:4%3C271::AID-JSSC271%3E3.0.CO;2-L/full?2-L/full).
34. Melo, D. G. (2007). *El Detector de Fluorescencia del Observatorio Pierre Auger: Reconstrucción de lluvias de partículas, análisis de los primeros datos y extensión híbrida del detector de fluorescencia a energías*. (Doctoral dissertation, UNIVERSIDAD NACIONAL).

35. National Center for Biotechnology Information (2023). *PubChem Compound Summary for CID 493570, Riboflavin*. Retrieved May 7, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Riboflavin>.
36. National Institutes of Health, (2022). *Datos sobre la riboflavina*: <https://ods.od.nih.gov/pdf/factsheets/Riboflavin-DatosEnEspañol.pdf>
37. Ovalles, D., León, L., Calderón, L., & Buchheister, M. (2002). *Desarrollo de un método espectrofluorométrico*. Laboratorio de Análisis de Medicamentos. Universidad de los Andes. Mérida., República Bolivariana de Venezuela.
38. Ozkan, S. A. (2018). *Analytical method validation: the importance for pharmaceutical analysis*. *Pharm Sci*, 24(1), 1-2.
39. Pinto, J. T., & Zempleni, J. (2016). *Riboflavin*. *Advances in nutrition*, 7(5), 973-975.
40. Powers, H. J. (2005). *Interaction among folate, riboflavin, genotype, and cancer; with reference to colorectal and cervical cancer*. *International Conference on Diet, Nutrition, and Cancer*. 0022- 3166/05 American Society for Nutrition
41. Powers, H. J., Hill, M. H., Mushtaq, S., Dainty, J. R. and Majsak-Newman, G. (2011). *Correcting a marginal riboflavin deficiency improves hematologic status in young women in the United Kingdom (RIBOFEM)*. *Am. J. Clin. Nutr.* 93:1274–1284.
42. Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.03.39:06. *Productos Farmacéuticos. Validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos*. Anexo de la resolución no. 188-2006 (COMIECO-XL). Comités Técnicos de Normalización a través de los Entes de Normalización de los Estados Miembros que Integran la Región Centroamericana. Guatemala: Ministerio de Economía.
43. Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.03.59:18. *Productos Farmacéuticos Medicamentos De Uso Humano. Requisitos de registro sanitario*. Anexo de la resolución no. 446- 2021 (COMIECO-LXVII). Comités Técnicos de Normalización a través de los Entes de Normalización de los Estados Miembros que Integran la Región Centroamericana. Guatemala: Ministerio de Economía.
44. Rodríguez Carranza R. (2015). *Complejo b: vitaminas y minerales*. Vademécum Académico de Medicamentos. McGraw Hill. Vademécum Académico de Medicamentos. McGraw.

45. Sherwood, M. D., Ran, D. and Goldman, M. D. (2014). *Effectiveness of riboflavin in pediatric migraine prevention*. *Can. Fam. Physician* Mars. 60:157–159.
46. Sies, H. (2015). *Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine*. *Redox Biology*, 4, 180-183. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002
47. Skoog D, West D, Holler F & Crouch S. (2005). *Química Analítica*. 8ª ed.: México. Thomson.
48. Skoog, D., West, D., Holler, F., & Crouch, S. (2001). *Química Analítica*. (Séptima ed.). México: McGraw-Hill.
49. Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). *Principles of Instrumental Analysis*. *Cengage Learning*. Capítulo 27: "Principles of Quantitative Analysis".
50. Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). *Principles of Instrumental Analysis*. *Cengage Learning*. Capítulo 29: "Liquid Chromatography".
51. Suarez Ospina, D., & Morales Hernández, Y. (2018). *Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas*.
52. Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman-Schapira, G., Thaiss, C. A., Maza, O., Israeli, D., Zmora, N., Gilad, N. S., Weinberger, A., Kuperman, Y., Harmelin, A., Kolodkin-Gal, I., Shapiro, H., Halpern, Z., Segal, E. & Elinav, E. (2014). *Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota*. *Nature*. 514:181–186.
53. Tang, X., Cronin, D., & Brunton, N. (2006). *A simplified approach to the determination of thiamine and riboflavin in meats using reverse phase HPLC*. *Journal of food composition and analysis*, 19(8), 831-837. Recuperado el 20 de Mayo de 2016, de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157506000032>
54. Thakur, K., Tomar, S. K., Singh, A. K., Mandal, S., & Arora, S. (2017). *Riboflavin and health: A review of recent human research*. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(17), 36503660.
55. U. S. Food and Drug Administration (2015). *Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics Guidance for Industry*; Rockville.
56. United States Pharmacopoeial Convention; USP 41-NF 36, *chapter Validation of compendial procedures*. United States Pharmacopoeia: North Bethesda, 2018.
57. Wallace, D. C., & Fan, W. (2010). *Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics*. *Mitochondrion*, 10(1), 12-31. doi: 10.1016/j.mito.2009.09.006

XII. ANEXOS

A. Glosario

1. Analito: Es una sustancia química o componente específico que se busca identificar, cuantificar o analizar en una muestra (Skoog., Holler, & Crouch, 2017).
2. Antioxidante: Los antioxidantes son sustancias químicas que tienen la capacidad de proteger las células y los tejidos del daño causado por moléculas inestables llamadas radicales libres (Halliwell & Gutteridge, 2015).
3. Cofactor enzimático: Un cofactor enzimático es una molécula no proteica que colabora con una enzima para facilitar la catálisis de reacciones químicas específicas (Lehninger, Nelson, & Cox, 2017).
4. Cromatografía líquida de alta resolución: Es una técnica analítica utilizada para separar, identificar y cuantificar componentes individuales en una muestra líquida (Semanate, 2016).
5. Cromatograma: Registro gráfico producido por un método cromatográfico (Skoog, West, Holler, & Crouch, 2005).
6. Cuantificación: La cuantificación se refiere al proceso de determinar la cantidad o magnitud numérica de algo de manera precisa y medible (Giri, 2015).
7. Degradación térmica: Se refiere al proceso químico en el cual una sustancia se descompone y se modifica debido al aumento de temperatura (Lehninger, Nelson, & Cox, 2017).
8. Disfunción mitocondrial: Se refiere a alteraciones en el funcionamiento normal de las mitocondrias, las estructuras celulares encargadas de producir energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) a través del proceso de respiración celular (Wallace & Fan, 2010).
9. Elución: Se refiere al proceso de separación de componentes en una mezcla utilizando una fase móvil que pasa a través de una fase estacionaria (Skoog., Holler, & Crouch, 2017).
10. Emisión: Se refiere a la liberación o radiación de energía, generalmente en forma de luz o radiación electromagnética, por parte de un átomo, molécula o sistema que está en un estado excitado o energético superior (Skoog., Holler, & Crouch, 2017).
11. Eritropoyesis: Es el proceso de formación y desarrollo de los glóbulos rojos (eritrocitos) en la médula ósea, el tejido esponjoso que se encuentra en el interior de los huesos (Kaushansky, et al, 2015).

12. Estándar: Es una referencia o patrón ampliamente aceptado y reconocido que se utiliza como punto de comparación para evaluar, medir o calibrar otros objetos, sustancias o procesos (ISO, 2021).
13. Estrés oxidativo: Es un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad del sistema antioxidante del cuerpo para neutralizarlos y reparar el daño celular resultante (Sies, 2015).
14. Excitación: Se refiere al proceso en el cual un átomo, molécula o sistema absorbe energía en forma de radiación electromagnética (como luz) y sus electrones se elevan a niveles de energía más altos (Skoog., Holler, & Crouch, 2017).
15. Fase móvil: Es el solvente o gas que fluye a través de una columna o una superficie cromatográfica en el proceso de separación (Skoog., Holler, & Crouch, 2017).
16. Ferritina: Es una proteína presente en las células de mamíferos, incluyendo a los seres humanos, que juega un papel fundamental en el almacenamiento y liberación controlada del hierro en el organismo (Arosio & Levi, 2010).
17. Fluorescencia: Es un fenómeno físico en el cual ciertas sustancias, llamadas fluoróforos o fluorocromos, absorben la energía de la luz en una longitud de onda específica y luego emiten energía en forma de luz a una longitud de onda más larga, generalmente en el rango del espectro visible (Harris, 2007).
18. Hidrolisis alcalina: Es una reacción química en la que un compuesto se descompone en sus componentes más simples mediante la adición de agua en un entorno alcalino, es decir, con un pH elevado (básico) (Lehninger, Nelson, & Cox, 2017).
19. Margen de incertidumbre: Podría entenderse como el rango o la cantidad de error esperado en una medición o estimación (IRAM, 2001).
20. Metabolismo: El metabolismo se refiere al conjunto de procesos químicos y bioquímicos que ocurren dentro de un organismo vivo para mantener la vida (Berg,, Tymoczko, Gatto, & Stryer, 2015).
21. Oxidación: Es un proceso químico en el cual una sustancia pierde electrones, aumentando su estado de oxidación (Chang, 2010).
22. Parámetros analíticos: Los parámetros analíticos son medidas cuantitativas o cualitativas utilizadas para evaluar o caracterizar una muestra, sustancia o sistema en un contexto científico o técnico (Crubellati & Di Risio, 2009).

23. Placebo: Es una sustancia o tratamiento que no tiene propiedades farmacológicas activas y no tiene un efecto terapéutico real en el paciente, pero que se presenta como si fuera un medicamento o una intervención genuina (Hróbjartsson & Gøtzsche, 2010).
24. Propiedades fisicoquímicas: Las propiedades fisicoquímicas son características de una sustancia que están relacionadas tanto con sus propiedades físicas como con sus propiedades químicas. Estas propiedades abarcan aspectos que describen tanto la naturaleza física como la reactividad química de una sustancia (Chang, 2010).
25. Reacción oxido reducción: Es un tipo de reacción química en la cual uno o más electrones se transfieren entre los reactantes. En una reacción de oxidación, un compuesto o átomo pierde electrones, lo que resulta en un aumento en su estado de oxidación. En una reacción de reducción, un compuesto o átomo gana electrones, lo que resulta en una disminución en su estado de oxidación (Lehninger, Nelson, & Cox, 2017).
26. Sensibilidad: se refiere a la capacidad de un método analítico para detectar y cuantificar cantidades pequeñas o bajas de una sustancia (Skoog., Holler, & Crouch, 2017).
27. Tiempo de Retención: El tiempo de retención, en el contexto de la cromatografía, es el período de tiempo que transcurre desde que una muestra se introduce en el sistema cromatográfico hasta que un componente específico de la muestra alcanza el detector (Skoog., Holler, & Crouch, 2017).
28. Validación: La validación se refiere al proceso de evaluar y confirmar la precisión, la calidad y la integridad de algo (Crubellati & Di Risio, 2009).
29. Vitamina hidrosoluble: son un grupo de vitaminas que se disuelven en agua y son esenciales para el funcionamiento adecuado del organismo humano (Thakur, et al., 2017).
30. Vitaminas liposolubles: Las vitaminas liposolubles son un grupo de vitaminas que se disuelven en grasas y aceites, y se almacenan en los tejidos adiposos del cuerpo (Thakur, et al., 2017).

B. Matriz de riesgos: Validación riboflavina

Tabla No 19. Matriz de riesgos para la validación de cápsulas orales de riboflavina.

Operación unitaria analítica	Factor o variable analítica	Identificar riesgo potencial	Mapa de calor de riesgos		Estrategia de control analítico
			Exactitud	Precisión	
Preparación de reactivos y muestras	Humedad de laboratorio	Absorción de vapor por la muestra puede llevar a pesado incorrecto o degradación			Monitoreo diario de controles ambientales
	Habilidad analítica	Incorrecta preparación de la muestra, pesado o diluciones volumétricas			Verificación de los cálculos de preparación de las muestras
	Composición del disolvente usado en la preparación de la muestra	Falta de disolución completa de la muestra			Someter a ultrasonido hasta lograr disolución completa de la muestra
	Composición de la muestra	Falta de disolución completa de la muestra			Aumentar el tiempo de disolución en el baño de ultrasonido
Configuración de instrumento y sistema	Composición de la muestra	Interferencia en los cromatogramas en los tiempos de retención del analito			Pruebas preliminares de inyección de la muestra durante el desarrollo del método y/o validación
	Temperatura de la columna	Desempeño de la columna, forma de pico y tiempo de retención			Establecer operación dentro de límites durante la calificación del instrumento, pruebas de aptitud del sistema.
	Lote de material relleno de columna				Uso de columna C18 (5um) 125 x 4,6mm (Agilent ®)

Tabla No 19. Matriz de riesgos para la validación de cápsulas orales de riboflavina.

Calidad del disolvente	Deriva de línea base y ruido son dependiente de longitud de onda y puede afectar la forma del pico.			Deriva de línea base y ruido son dependiente de longitud de onda y puede afectar la forma del pico.
limpieza	Picos de inyecciones previas			Establecer protocolo de limpieza

C. Base legal del proceso de validación de métodos analíticos

La validación de métodos analíticos farmacéuticos es un proceso crítico para garantizar la calidad y seguridad de los productos farmacéuticos. Desde una perspectiva legal, hay varios aspectos específicos a considerar en relación con la validación de métodos analíticos en la industria farmacéutica:

1. Cumplimiento con regulaciones y pautas: En la industria farmacéutica, existen regulaciones y pautas específicas que establecen los requisitos para la validación de métodos analíticos. Por ejemplo, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) en los Estados Unidos y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) en la Unión Europea tienen normativas detalladas sobre la validación de métodos analíticos en el contexto de la fabricación y control de medicamentos. Cumplir con estas regulaciones es esencial para asegurar la aprobación y comercialización de productos farmacéuticos (Figueroa, 2019).
2. Documentación exhaustiva: La documentación completa y precisa de todo el proceso de validación es fundamental desde una perspectiva legal. Esto incluye la descripción detallada de los protocolos experimentales, los resultados obtenidos, los cálculos realizados y las conclusiones obtenidas. La documentación sólida respalda la integridad y validez de los datos en caso de inspecciones regulatorias o litigios (Figueroa, 2019).

3. Especificidad y selectividad: Los métodos analíticos en la industria farmacéutica deben ser específicos y selectivos para el compuesto en cuestión. Esto implica que el método debe ser capaz de diferenciar el compuesto de interés de otros componentes que podrían estar presentes en la muestra. La falta de especificidad puede tener implicaciones legales si los resultados no son confiables (Figuroa, 2019).
4. Precisión y exactitud: La precisión y la exactitud son aspectos cruciales en la validación de métodos farmacéuticos. La precisión se refiere a la capacidad de un método para proporcionar resultados consistentes y reproducibles, mientras que la exactitud se refiere a la proximidad de los resultados a un valor de referencia conocido: Cumplir con estos criterios es esencial para evitar problemas legales relacionados con la calidad y seguridad de los productos (Figuroa, 2019).
5. Calibración y estándares de referencia: El uso adecuado de estándares de referencia y la calibración adecuada del equipo son esenciales para la validez de los resultados analíticos. La trazabilidad de los estándares y la calibración regular son aspectos legales importantes para demostrar que los resultados son confiables y rastreables (Figuroa, 2019).
6. Robustez y límites de detección/cuantificación: La robustez se refiere a la capacidad de un método para producir resultados precisos y confiables incluso frente a pequeñas variaciones en las condiciones experimentales. Los límites de detección y cuantificación deben ser establecidos y validados para asegurar que el método sea capaz de detectar y cuantificar concentraciones bajas del compuesto de interés (Figuroa, 2019).
7. Validación continua: La validación de métodos no es un evento único, sino un proceso continuo. Los métodos deben ser monitoreados y revisados periódicamente para asegurar que sigan siendo válidos y apropiados para su propósito. Los cambios en el

método, el equipo o las condiciones pueden requerir una nueva validación (Figuroa, 2019).

Los requisitos legales para la validación de un método analítico pueden variar según la región, la industria y la aplicación específica. Sin embargo, a nivel general, existen algunas pautas y regulaciones ampliamente aceptadas que pueden aplicarse. Algunos requisitos legales y pautas comunes para la validación de métodos analíticos pueden incluir:

1. ICH (Conferencia Internacional de Armonización): El ICH es una organización que establece directrices internacionales para la industria farmacéutica. Sus directrices, como ICH Q2(R1), proporcionan orientación sobre la validación de métodos analíticos, incluyendo parámetros como especificidad, linealidad, exactitud, precisión, límites de detección y cuantificación, entre otros (ICH, 1996).
2. FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos) y EMA (Agencia Europea de Medicamentos): Estas agencias reguladoras tienen requisitos específicos para la validación de métodos analíticos en la industria farmacéutica y otros campos relacionados, un ejemplo es la: Guidance for Industry - Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics: Esta guía de la FDA proporciona información sobre la validación de métodos analíticos utilizados en la producción de medicamentos y productos biológicos. Ofrece orientación sobre varios aspectos de la validación, incluyendo la selección de métodos, la transferencia de métodos, la especificidad y otros parámetros, así también la guía: Guideline on Validation of Analytical Procedures: Aunque no es exclusivamente de la EMA, es desarrollada por el Grupo de Trabajo de Métodos Analíticos de la EMA y aborda los aspectos clave de la validación de métodos analíticos en el contexto de productos farmacéuticos (FDA, 2015)
3. USP (Farmacopea de los Estados Unidos) y EP (Farmacopea Europea): La USP proporciona orientación detallada sobre la validación de métodos analíticos en su capítulo general <1225> "Validation of compendial procedures" y en el <1226> "Verification of Compendial Procedures". Estos capítulos representan una fuente

importante de información sobre la validación de métodos analíticos en la industria farmacéutica y otras áreas relacionadas, la (EP) también proporciona orientación sobre la validación de métodos analíticos en su monografía general <2.2.40> "Validation of Analytical Procedures" (USP, 2018).

4. ISO (Organización Internacional de Normalización): Algunas normas ISO, como la ISO 17025 (Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración) y la ISO 15189 (Requisitos para la calidad y la competencia de los laboratorios médicos), pueden aplicarse a la validación de métodos analíticos (ISO, 2017).

En la industria farmacéutica, la validación de métodos analíticos es un requisito legal crucial para garantizar la calidad y la seguridad de los productos. Cumplir con las regulaciones y pautas, documentar adecuadamente el proceso de validación y asegurarse de la especificidad, precisión y exactitud son elementos clave para evitar problemas legales y garantizar la integridad de los datos analíticos (Figuroa, 2019).

Un aspecto importante para la parte legal, en los productos farmacéuticos es el requisito del registro sanitario, los documentos y requisitos básicos:

1. Solicitud de registro: Se debe completar y presentar una solicitud oficial de registro sanitario, proporcionando información detallada sobre el producto y el solicitante (RTCA, 2018).
2. Información sobre el solicitante: Se debe detallar las características principales sobre la empresa solicitante, incluyendo nombre, dirección, información de contacto y documentación legal (RTCA, 2018).
3. Información sobre el producto: Descripción completa del producto farmacéutico, incluyendo su nombre comercial, forma farmacéutica, dosificación, presentación, indicaciones, contraindicaciones, efectos secundarios, etc (RTCA, 2018).

4. Fabricante y Control de Calidad: Información sobre el fabricante del producto, incluyendo su nombre, dirección y pruebas de cumplimiento con buenas prácticas de fabricación (BPF) (RTCA, 2018).
5. Datos preclínicos y clínicos: Si es aplicable, se requerirá información sobre estudios preclínicos y clínicos que respalden la seguridad y eficacia del producto (RTCA, 2018).
6. Control de Calidad: Debes proporcionarse datos detallados sobre la calidad del producto, incluyendo especificaciones, métodos de análisis y resultados de pruebas de calidad (RTCA, 2018).
7. Etiquetado y Empaquetado: Se debe incluir el etiquetado completo del producto, incluyendo la información del producto, el empaque y el prospecto para el usuario (RTCA, 2018).

D. Características del equipo de cromatografía de alta resolución “Agilent 1260 Infinity II”.

1. Marca y modelo: Agilent 1260 Infinity II es una serie de cromatógrafos líquidos de alta resolución producidos por Agilent Technologies, una empresa líder en instrumentación analítica y científica.
2. Detector de fluorescencia: Este es muy usado debido a su alta sensibilidad y selectividad. Es ideal para la detección de compuestos que exhiben fluorescencia natural o que se marcan con etiquetas fluorescentes. El detector de fluorescencia de Agilent 1260 Infinity II está diseñado para detectar las señales fluorescentes emitidas por los analitos después de la excitación con una fuente de luz adecuada (Agilent Technologies, 2016).

3. Alta resolución: Este modelo cuenta con una alta resolución esto se refiere a la capacidad del sistema para separar con precisión y distinguir componentes cercanos en una mezcla compleja. Esto es especialmente útil cuando se trabaja con muestras que contienen múltiples compuestos con propiedades similares (Agilent Technologies, 2016).
4. Sistema de bombeo: Este incluye bombas de alta precisión y control que permiten la inyección precisa de muestras y la generación de gradientes de solventes para optimizar la separación cromatográfica (Agilent Technologies, 2016).
5. Columna cromatográfica: La columna es un componente clave en la separación de los compuestos en una muestra. Agilent ofrece una variedad de columnas cromatográficas diseñadas para diferentes aplicaciones y tipos de compuestos (Agilent Technologies, 2016).
6. Software de control y análisis: Agilent proporciona software dedicado para el control y análisis de los datos generados por el cromatógrafo. Este software permite configurar los parámetros de la corrida, adquirir datos, analizar resultados y generar informes (Agilent Technologies, 2016).
7. Interfaz de usuario intuitiva: Este equipo cuenta con una interfaz de usuario amigable que permite a los operadores configurar y controlar fácilmente el cromatógrafo, ajustar parámetros y monitorear el progreso de la corrida (Agilent Technologies, 2016).
8. Sistema de enfriamiento y control de temperatura: El sistema de enfriamiento y control de temperatura en el Agilent 1260 Infinity II contribuye a la estabilidad de la corrida, esto permite para asegurar resultados reproducibles (Agilent Technologies, 2016).

9. Conectividad y almacenamiento de datos: Este equipo ofrece opciones de conectividad para la transferencia de datos y la integración con sistemas de gestión de laboratorios (LIMS). También cuenta con opciones de almacenamiento de datos a largo plazo (Agilent Technologies, 2016).

E. Certificado de verificación de desempeño del equipo.



CERTIFICADO DE VERIFICACIÓN No. 0061

Página 1 de 3

Sistema No.: LQ 124	Modelo: 1260 INFINITY II	Fecha: 21/03/2023
Equipo: HPLC – VWD - FLD	Marca: AGILENT	Técnico de Servicio: César Cruz
Próxima fecha de Verificación		Marzo 2024

Cliente	Laboratorio Global Quality
Dirección	Km 17.5 San Jose Pinula Empresarial San Jose, Bodega 6
Teléfono	66459338
Departamento	Laboratorio Fisicoquímico
Responsable	Licenciado Marco Ramos

Modulo	Modelo	Número de Serie
Unidad de Bomba Cuaternaria	G7111A	DEAEZ04254
Automuestreador	G7129A	DEAEQ58937
Detector VWD	G7114A	DEACX33178
Detector FLD	G7121A	DEAE305605
ICC	G7130A	DEAEQ58937

BOMBA CUATERNARIA		Modelo: G7111A	No. Serie: DEAEZ04254	
No.	Parametro	Configuración	Especificaciones	Resultado
1	Función de Suministro	Purgar la bomba a 1 mL/min	El rango de flujo debe ser considerablemente lento, el motor de bomba gira lento.	Pasa
		Purgar la bomba a 5mL/min	Flujo considerablemente rápido, el motor de bomba gira rápido.	Pasa
2	Indicador de Presión Cero	Abrir válvula drenaje mientras la bomba esta suministrando flujo.	La presión es 0 ± 1 bar.	0 bar pasa
3	Límite de Presión Mínimo	Límite inferior 3 bar, cerrar válvula de drenaje, encender bomba, esperar hasta que la presión sea estable y encima de 5 bar, abrir válvula de drenaje.	La presión es de 0 bar, después de 10 segundos la bomba se apaga sola.	Pasa
4	Límite de Presión Máximo	Límite Superior 400 bar, flujo 0.2 mL/min, colocar tapón de presión en la salida de la bomba	Cuando la presión pase el límite máximo de presión, la bomba se apagará sola.	Pasa
5	Exactitud de Flujo	Flujo de 1mL/min por 1 min	1.0 ± 0.2 ml	1.00 mL pasa

CERTIFICADO DE VERIFICACIÓN No. 0061

Página 7 de 3

DETECTOR VWD		Modelo: G7114A	No. Serie: DEACX33178	
No.	Parámetro	Configuración	Especificaciones	Resultado
1	Función Auto Cero	Click botón auto cero.	mUA ± 1	0.00 mUA pasa

AUTOMUESTREADOR		Modelo: G7128A	No. Serie: DEAEQ58837	
No	Parámetro	Descripción	Especificación	Resultado
1	Precisión de inyección VWD	Ejecutar una serie de 6 inyecciones de 10µL de solución de cafeína 125 ppm como STD. Evaluar el RSD del tiempo de retención.	RSD Area ≤ 2%	0.14 % pasa
2	Precisión de inyección VWD	Ejecutar una serie de 6 inyecciones de 10µL de solución de cafeína 125 ppm como STD. Evaluar el RSD de las áreas de los picos obtenidos.	RSD Area ≤ 2%	0.13 % pasa
3	Acarreo de inyección VWD	Ejecutar una serie de 6 inyecciones de 10µL de solución de cafeína 125 ppm, seguidamente 2 inyección de 10µL diluyente para evaluar rastros de cafeína.	≤1%	0.00 % pasa
4	Linealidad VWD	Realizar inyecciones de 10µL de solución de cafeína de 25 ppm, 125ppm, 250ppm, 500ppm	R ² ≥ 0.99	1.000 pasa
5	Exactitud VWD	Realizar 6 inyecciones a de 10µL de solución de cafeína de 125ppm como muestra	± 2%	1.00 %

CERTIFICADO DE VERIFICACIÓN No. 0061

Página 3 de 3

DETECTOR FLD		Modelo: G7121A	No. Serie: DEAE305605	
No.	Parámetro	Configuración	Especificaciones	Resultado
1	Función Auto Cero	Click botón auto cero.	NA	ND

No	Parámetro	Descripción	Especificación	Resultado
1	Precisión de Inyección FLD	Ejecutar una serie de 6 inyecciones de 10µL de solución de glicerina 15 ppm como STD. Evaluar el RSD del tiempo de retención.	RSD Area ≤ 2%	ND
2	Precisión de Inyección FLD	Ejecutar una serie de 6 inyecciones de 6µL de solución de glicerina 15 ppm como STD. Evaluar el RSD de las áreas de los picos obtenidos.	RSD Area ≤ 2%	ND
3	Acarreo de Inyección FLD	Ejecutar una serie de 6 inyecciones de 10µL de solución de glicerina 15 ppm, seguidamente 2 inyección de 10µL de diluyente para evaluar rastros de la glicerina.	≤1%	ND
4	Linealidad FLD	Realizar inyecciones de 10µL, de solución de glicerina de 5 ppm, 10ppm, 15ppm, 25ppm, 50ppm	$R^2 \geq 0.99$	ND
5	Exactitud FLD	Realizar 6 inyecciones a de 10µL de solución de glicerina de 15ppm como muestra	≤ 2%	ND

Servicio Técnico	Firma y sello de Cliente
	

F. Certificado del estándar de riboflavina

CERTIFICATE OF ANALYSIS

PRODUCT NAME	RIBOFLAVIN(VITAMIN B ₂)		
MANUFACTURE DATE	MAY. 24, 2021	BATCH NO.	2105241
EXPIRY DATE	MAY. 24, 2024	QUANTITY	50 KG

TEST RESULT

ITEMS	SPECIFICATION	RESULT
Appearance	Yellow or orange-yellow crystalline powder	Complies
Identification	Positive	Complies
Assay	97.0% ~ 103.0%	100.0%
Specific optical rotation	-115° to -135°	-129°
Loss on drying	1.5% max	0.53%
Sulphated ash	0.1% max	0.06%
Absorbance	$\lambda 373\text{nm}/\lambda 267\text{nm}=0.31$ to 0.33 $\lambda 444\text{nm}/\lambda 267\text{nm}=0.36$ to 0.39	Complies
Related substances	Impurity A	0.025% max
	Impurity B	0.20% max
	Impurity C	0.20% max
	Impurity D	0.20% max
	Unspecified impurities	0.10% max

G. Adecuación del sistema

Figura No. 5 Cromatograma de la primera inyección del estándar de riboflavina para la adecuación del sistema

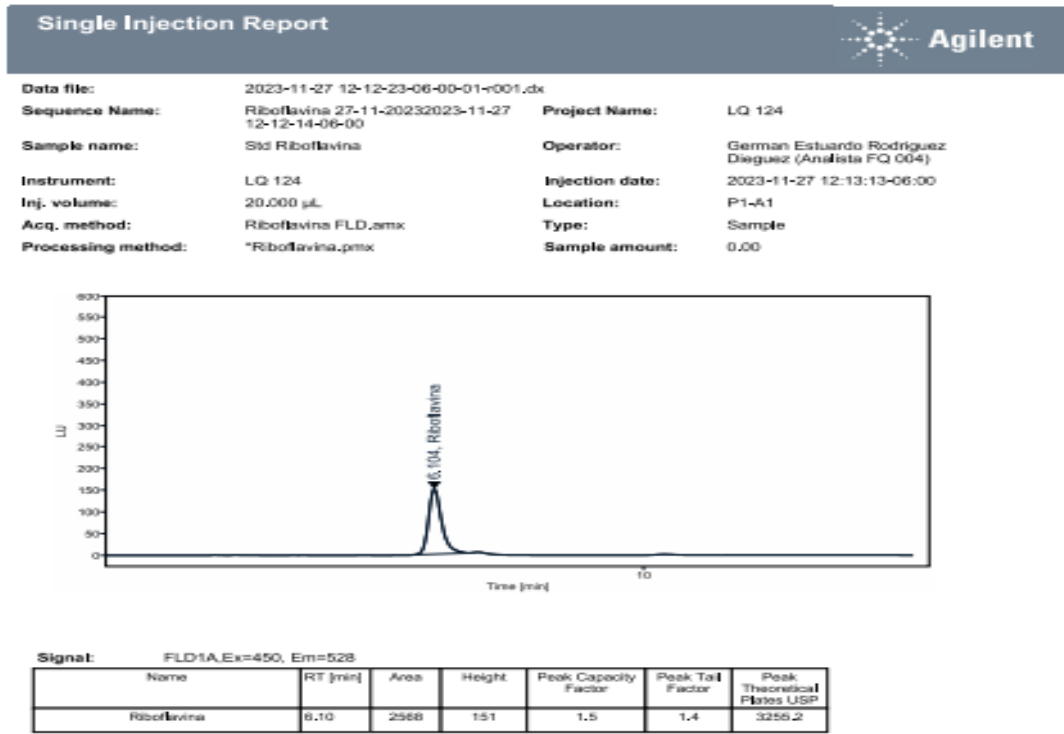


Figura No. 6 Cromatograma de la segunda inyección del estándar de riboflavina para la adecuación del sistema

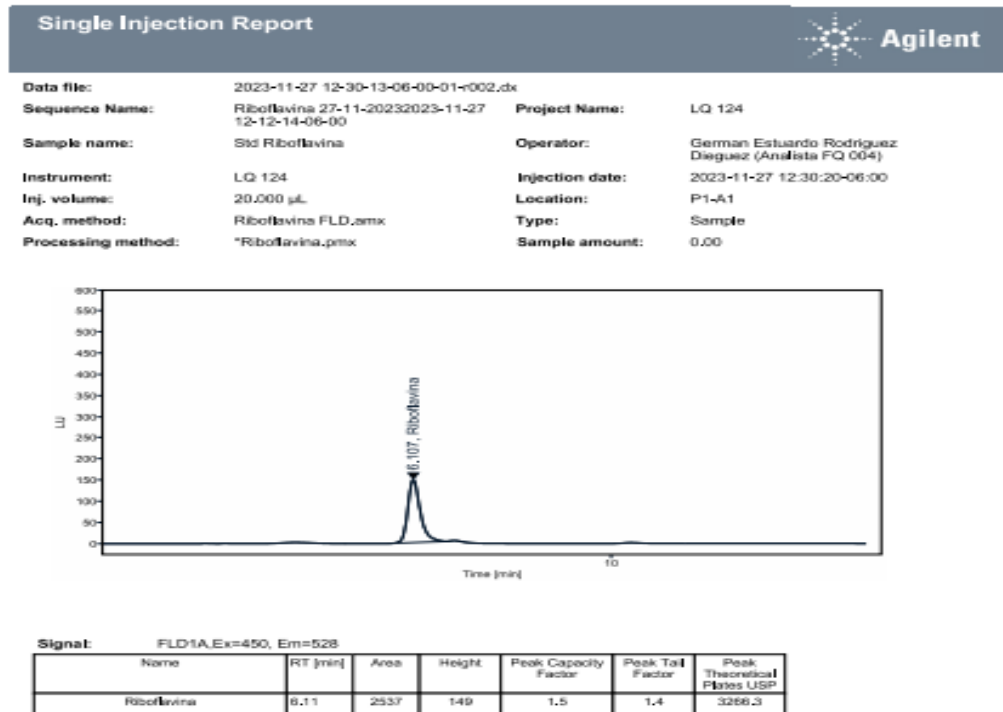


Figura No. 7 Cromatograma de la tercera inyección del estándar de riboflavina para la adecuación del sistema

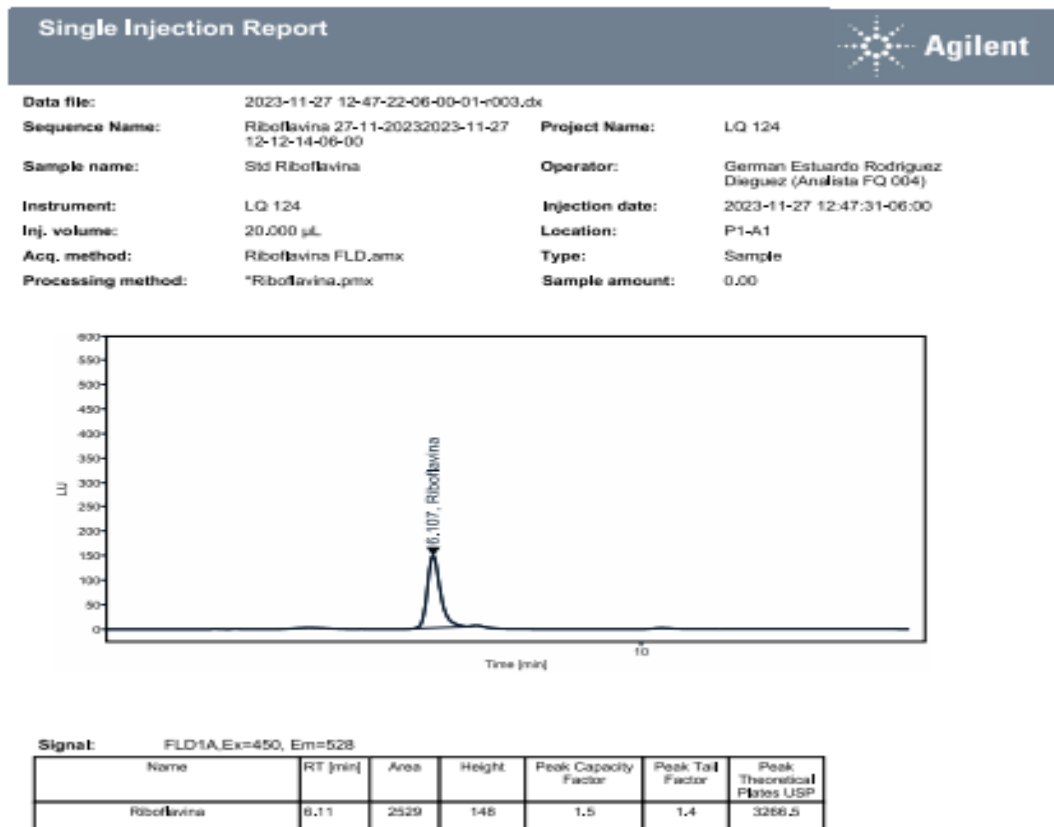


Figura No. 8 Cromatograma de la cuarta inyección del estándar de riboflavina para la adecuación del sistema

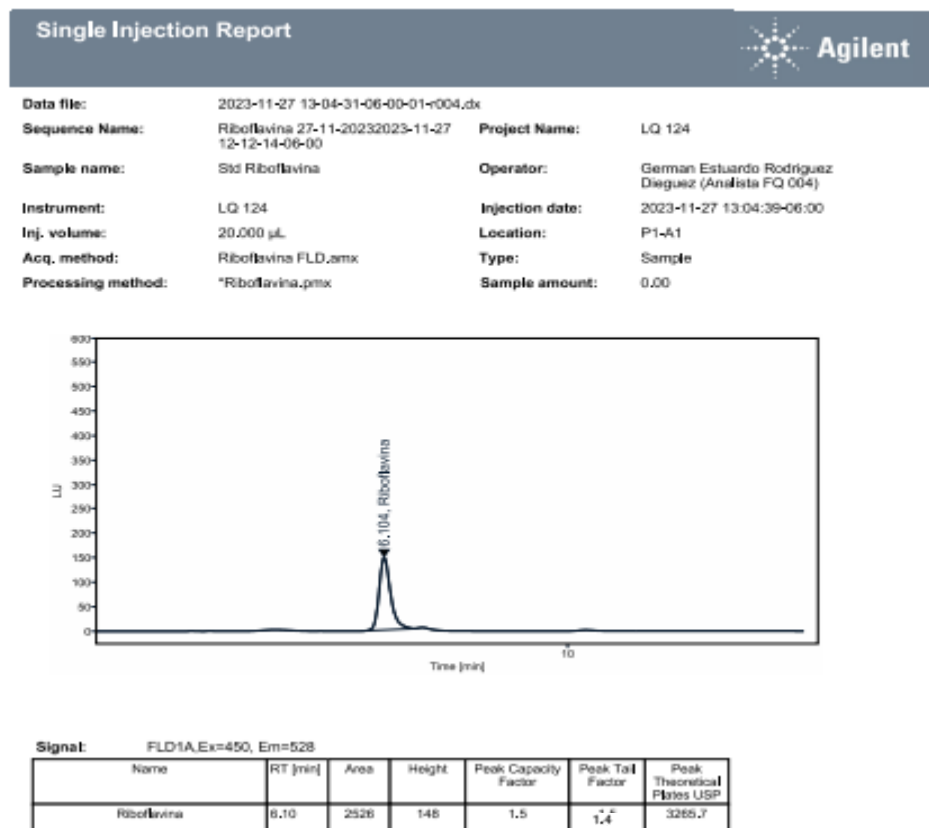


Figura No. 9 Cromatograma de la quinta inyección del estándar de riboflavina para la adecuación del sistema

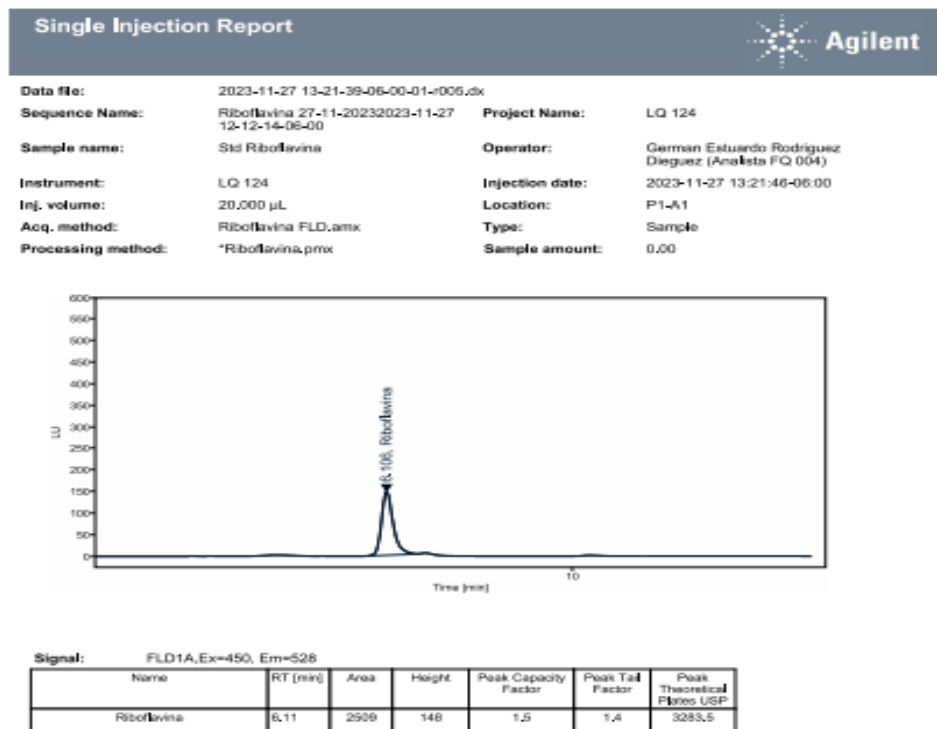
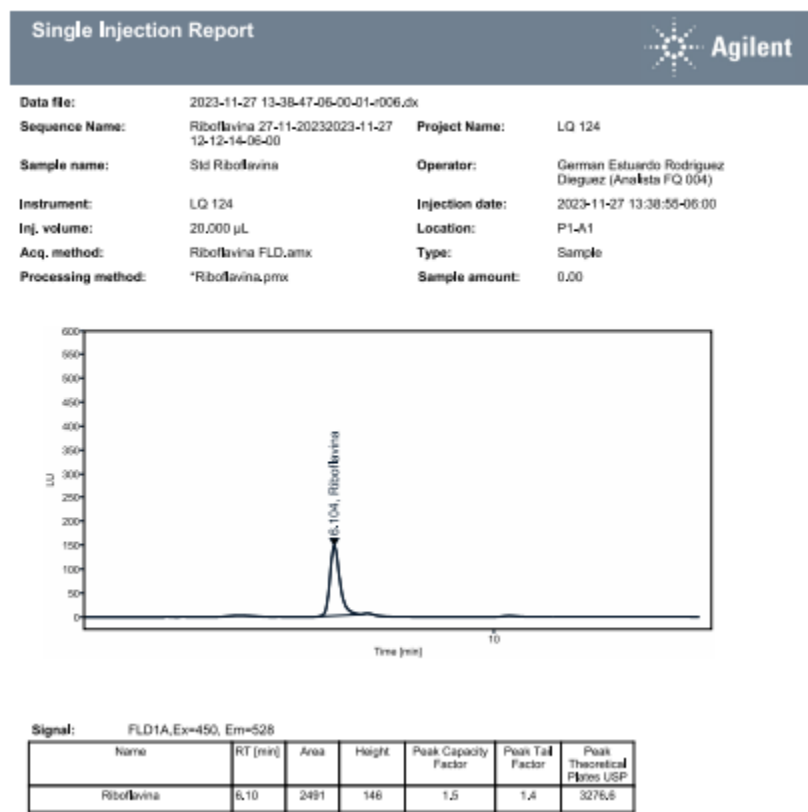


Figura No. 10 Cromatograma de la quinta inyección del estándar de riboflavina para la adecuación del sistema



H. Especificidad

Figura No. 11 Cromatograma del estándar de riboflavina para la especificidad

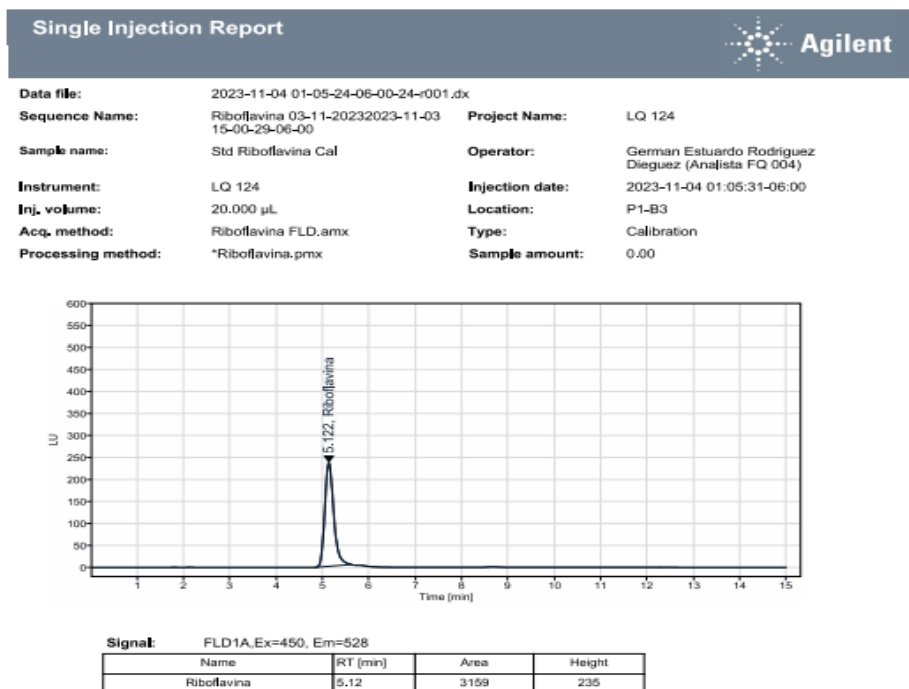


Figura No. 12 Cromatograma de la muestra de riboflavina para la especificidad

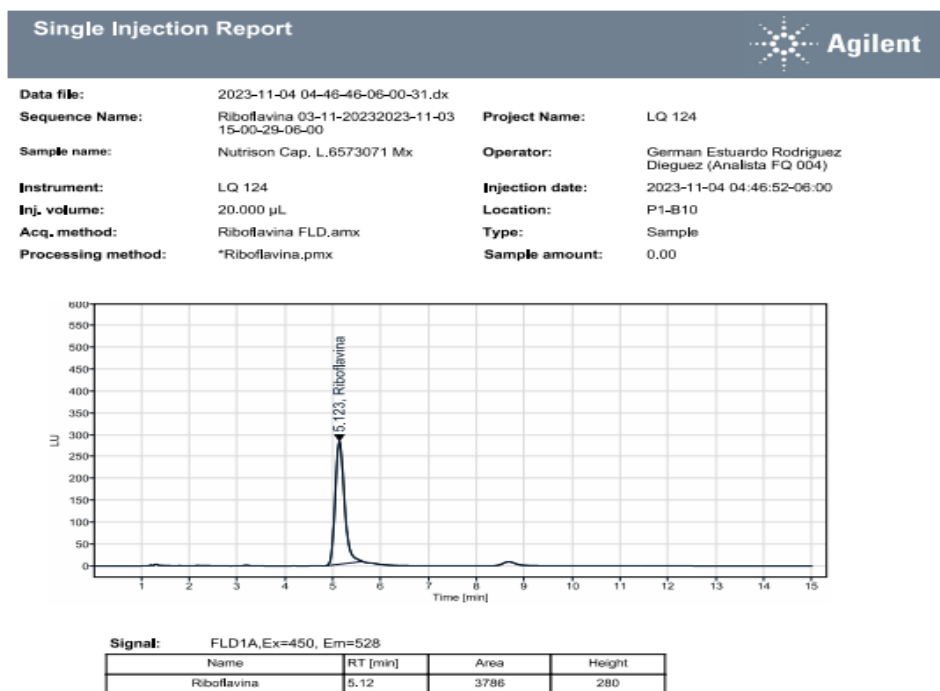


Figura No. 13 Cromatograma del placebo de la muestra de riboflavina para la especificidad

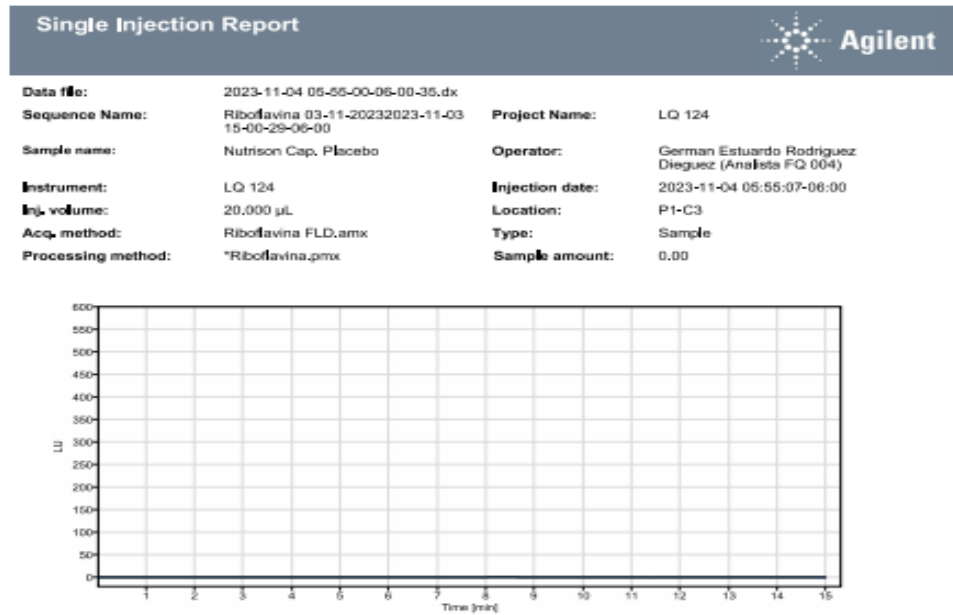


Figura No. 14 Cromatograma de la fase móvil en el sistema de validación de riboflavina para la especificidad

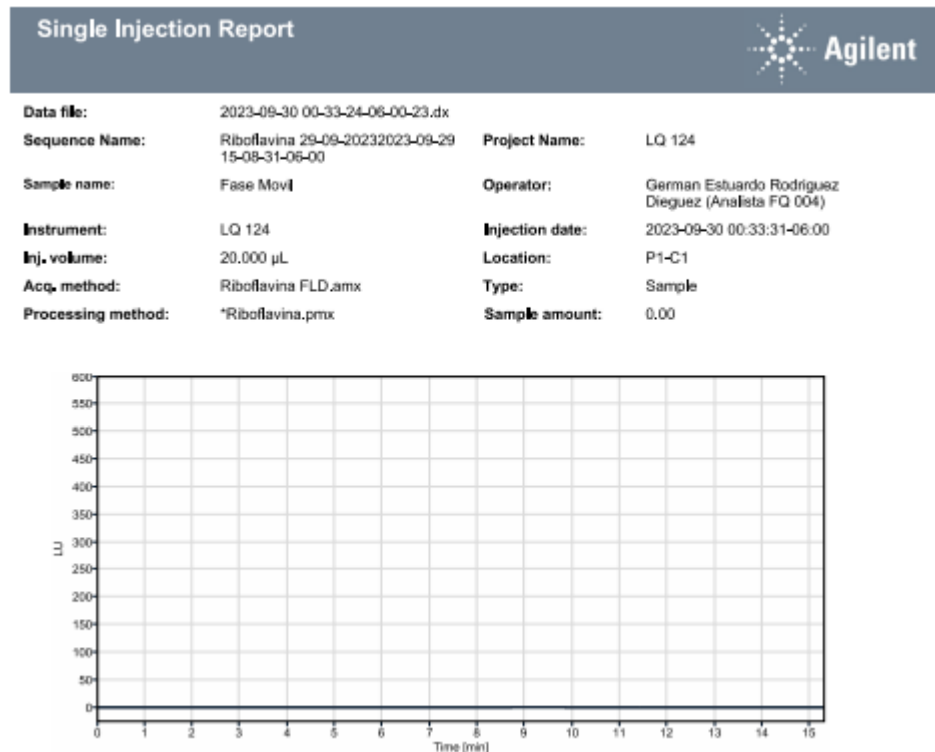
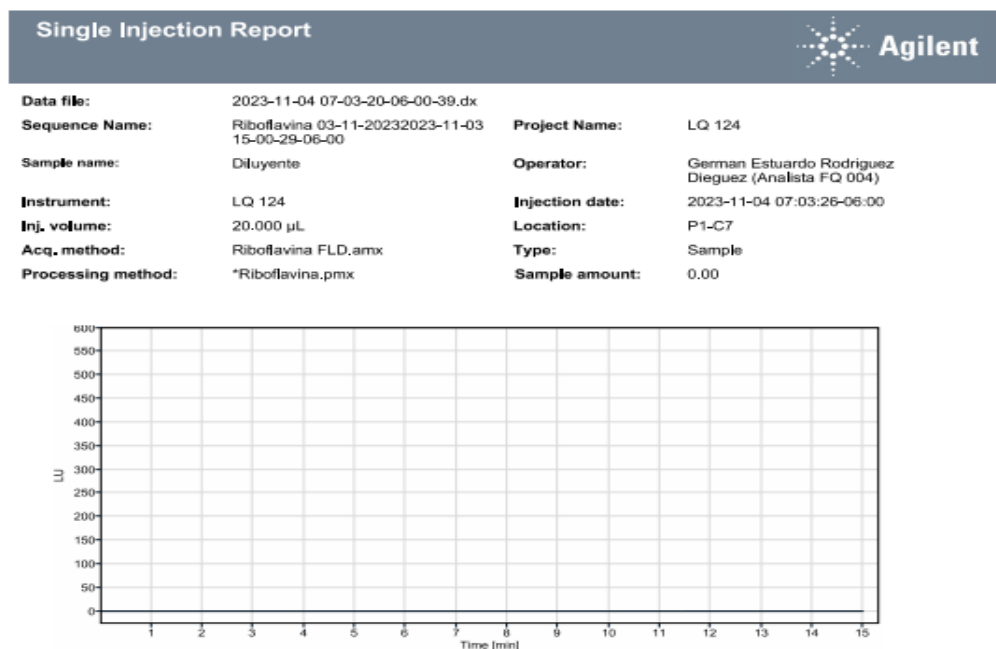


Figura No. 15 Cromatograma del diluyente en el sistema de validación de riboflavina para la especificidad



I. Linealidad del sistema

Figura No. 16 Cromatograma de la primera inyección del estándar de riboflavina al 50% para la linealidad del sistema

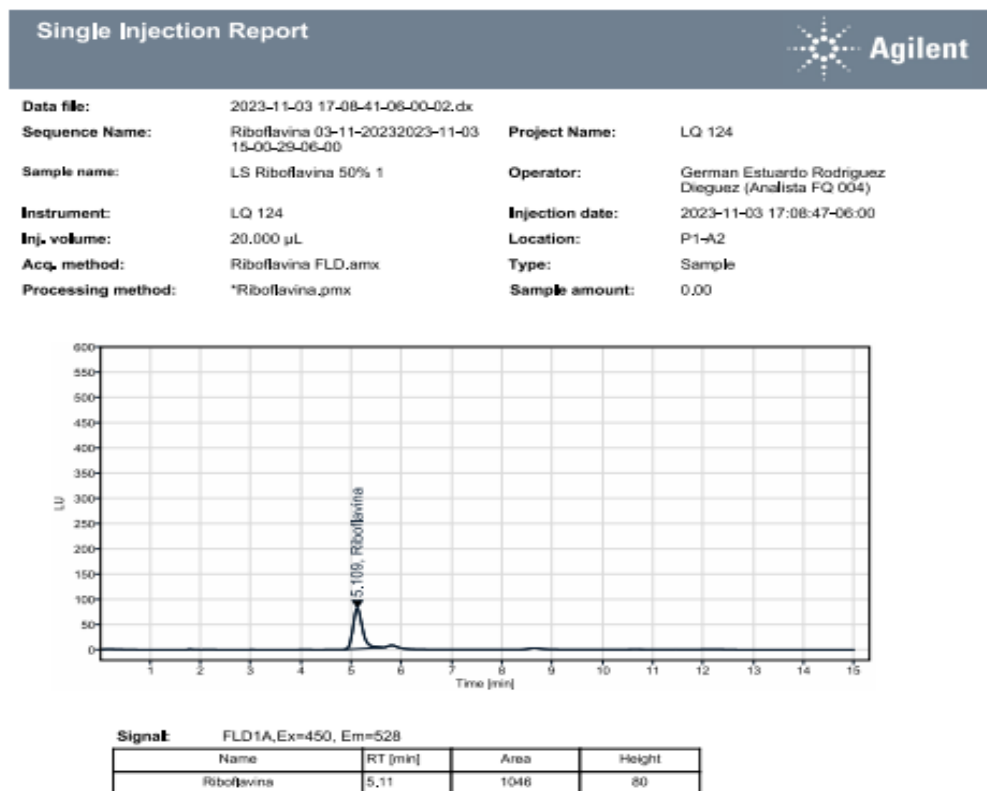


Figura No. 17 Cromatograma de la segunda inyección del estándar de riboflavina al 50% para la linealidad del sistema

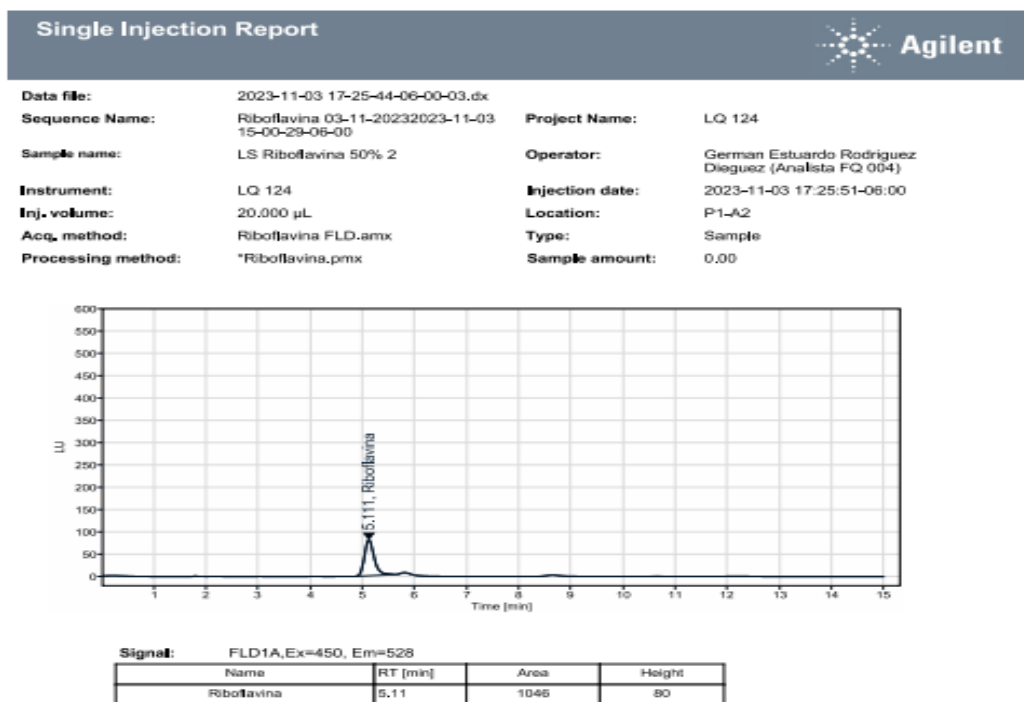


Figura No. 18 Cromatograma de la tercera inyección del estándar de riboflavina al 50% para la linealidad del sistema

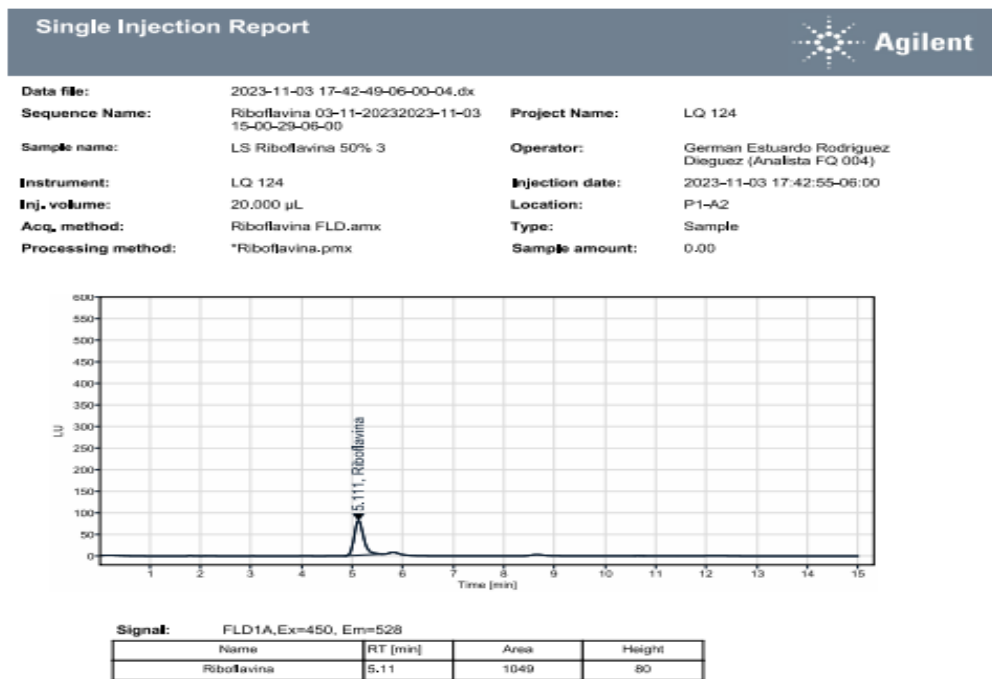


Figura No. 19 Cromatograma de la primera inyección del estándar de riboflavina al 75% para la linealidad del sistema

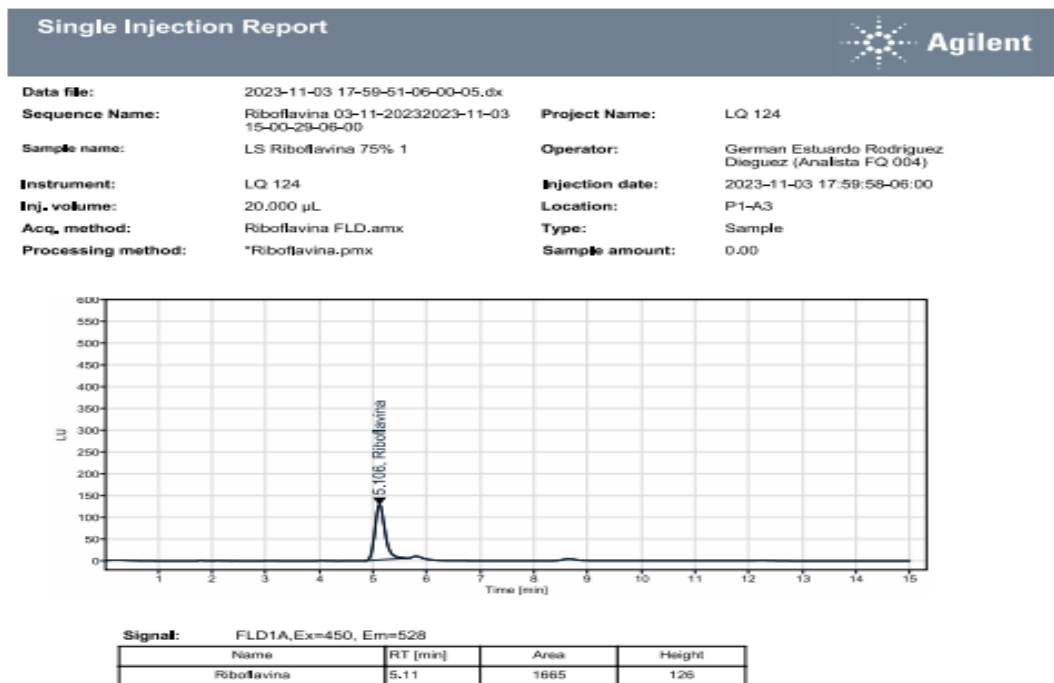


Figura No. 20 Cromatograma de la segunda inyección del estándar de riboflavina al 75% para la linealidad del sistema

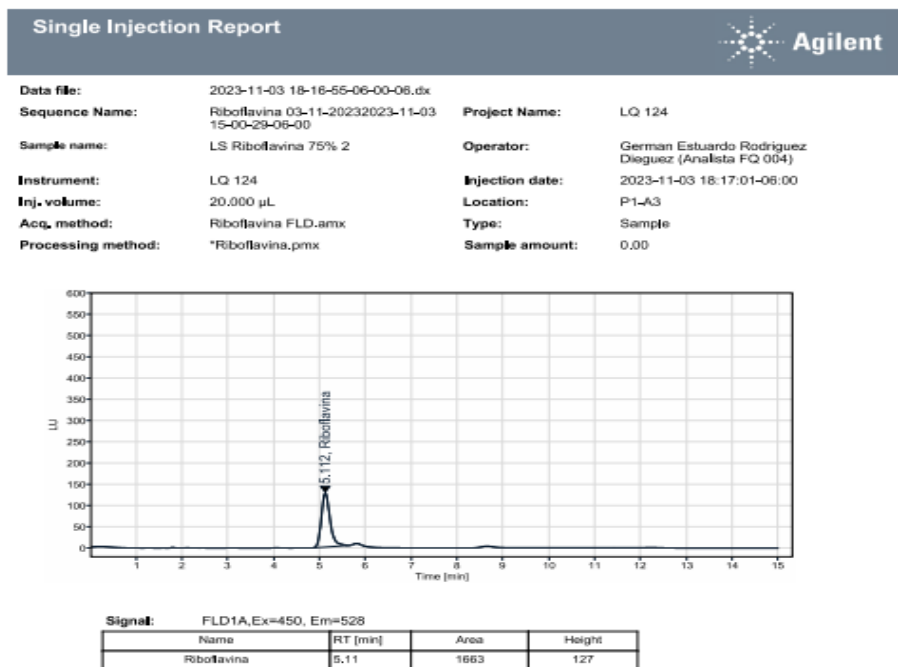
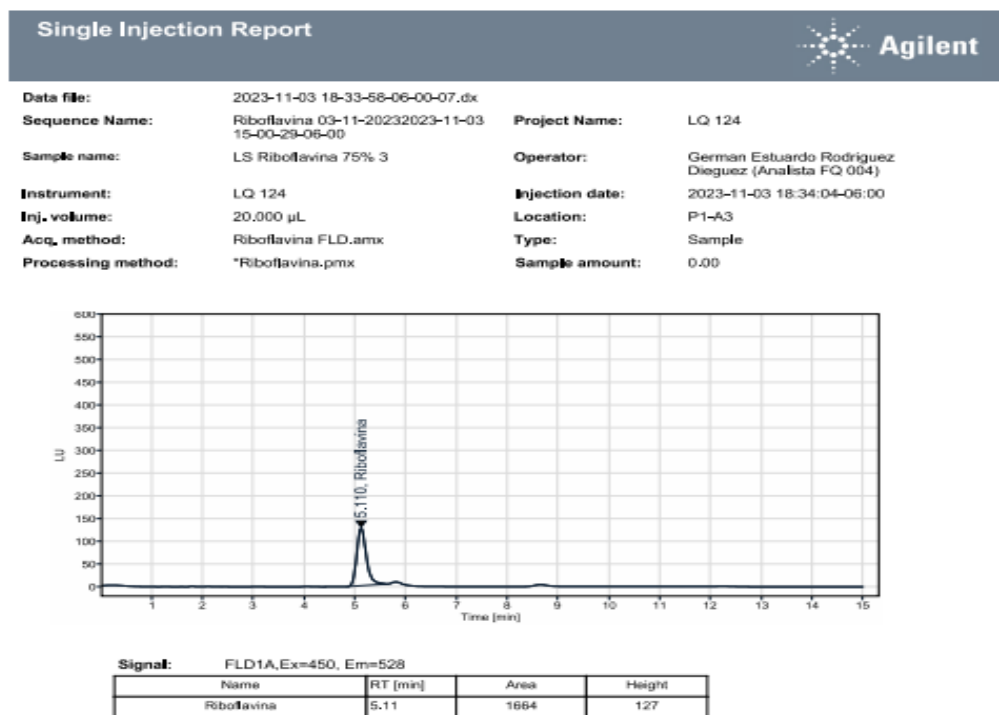


Figura No. 21 Cromatograma de la tercera inyección del estándar de riboflavina al 75% para la linealidad del



sistema

Figura No. 22 Cromatograma de la primera inyección del estándar de riboflavina al 100% para la linealidad del

sistema

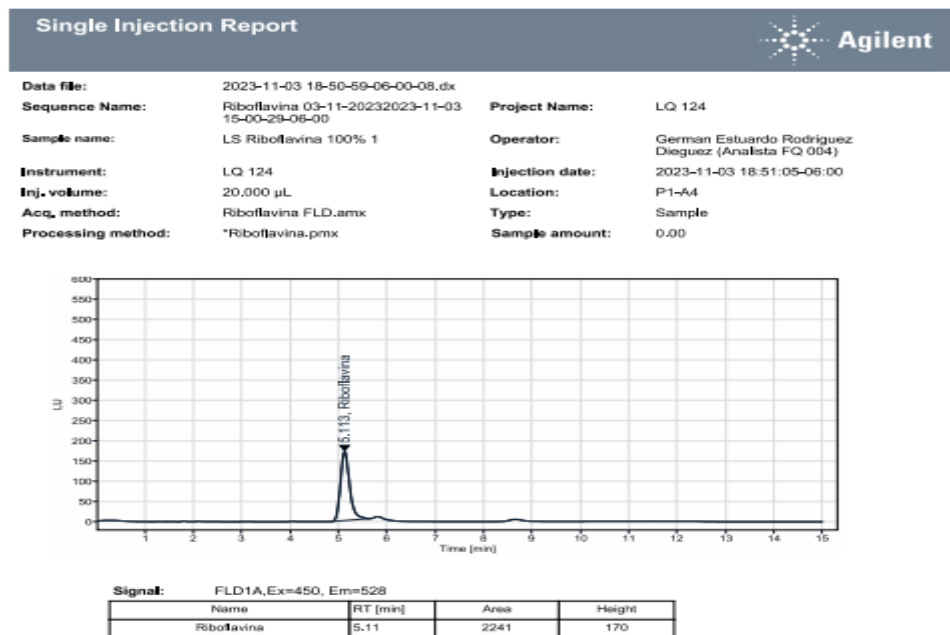


Figura No. 23 Cromatograma de la segunda inyección del estándar de riboflavina al 100% para la linealidad del sistema

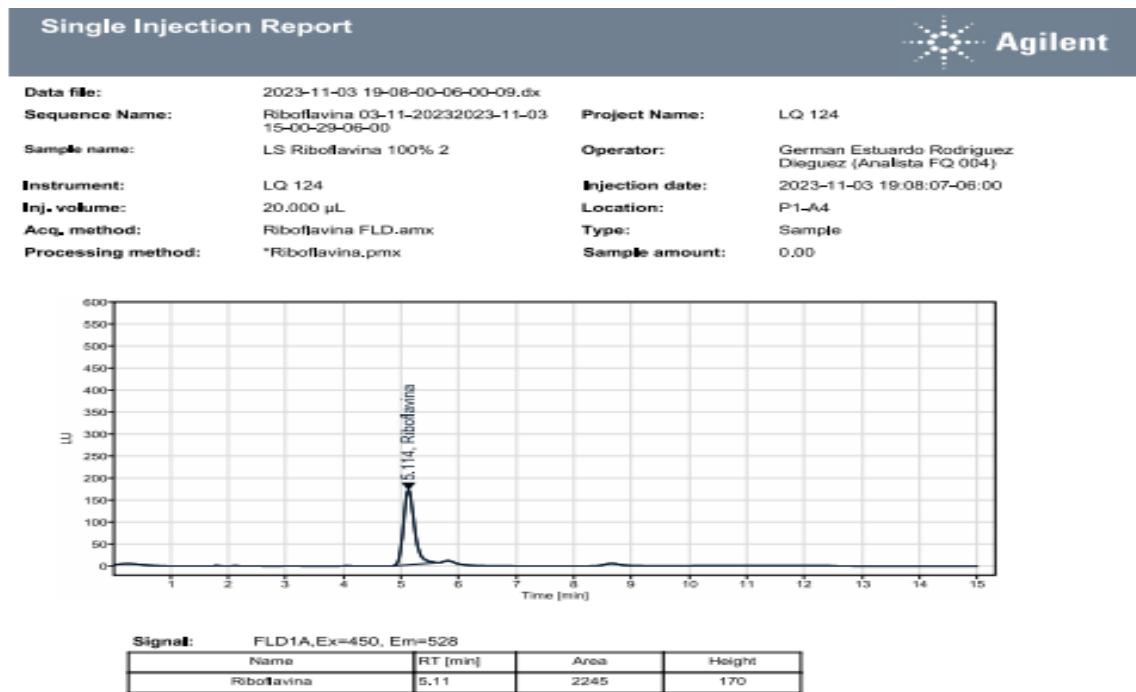


Figura No. 24 Cromatograma de la tercera inyección del estándar de riboflavina al 100% para la linealidad del sistema

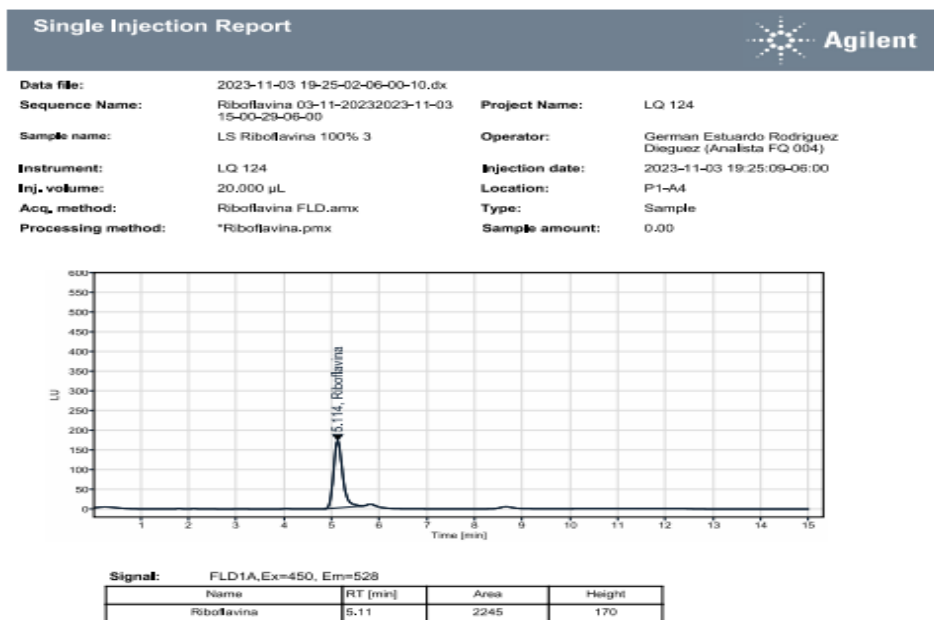


Figura No. 25 Cromatograma de la primera inyección del estándar de riboflavina al 125% para la linealidad del sistema

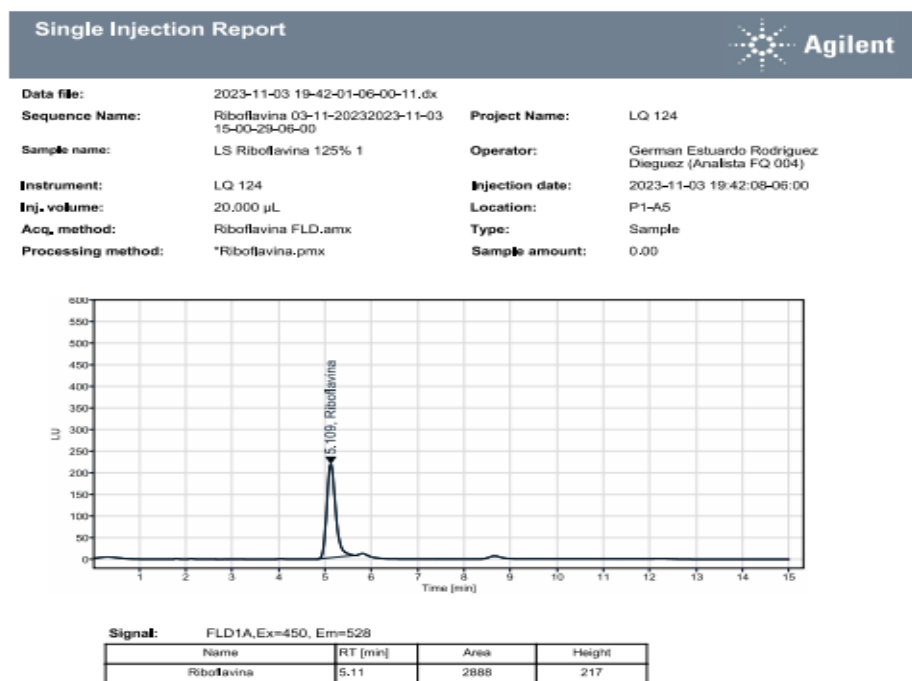


Figura No. 26 Cromatograma de la segunda inyección del estándar de riboflavina al 125% para la linealidad del sistema

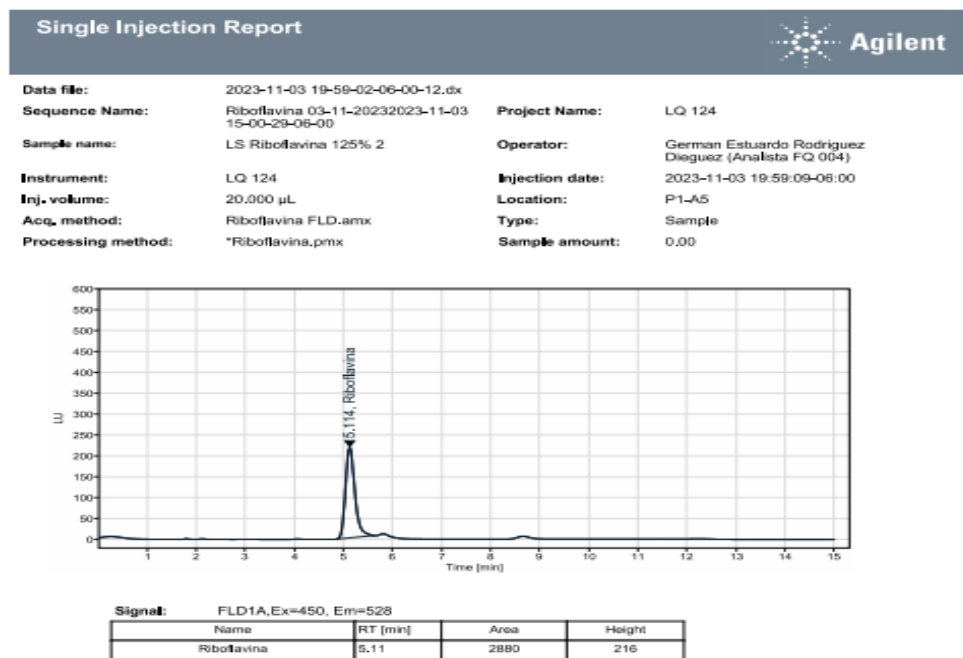


Figura No. 27 Cromatograma de la tercera inyección del estándar de riboflavina al 125% para la linealidad del sistema

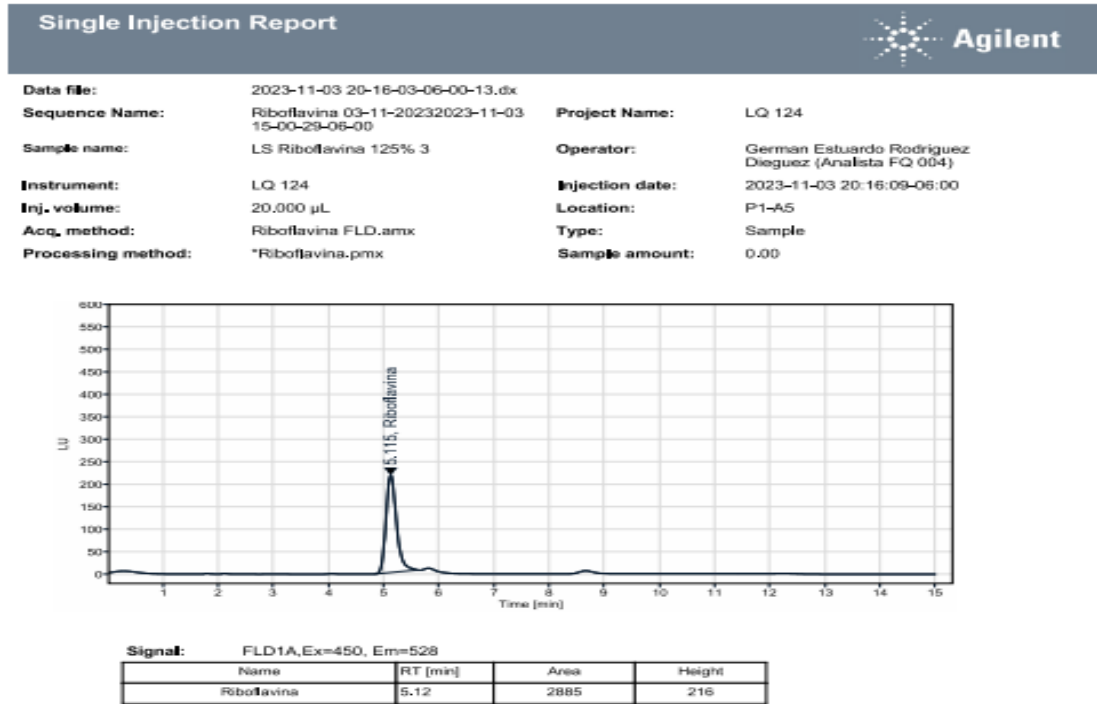


Figura No. 28 Cromatograma de la primera inyección del estándar de riboflavina al 150% para la linealidad del sistema

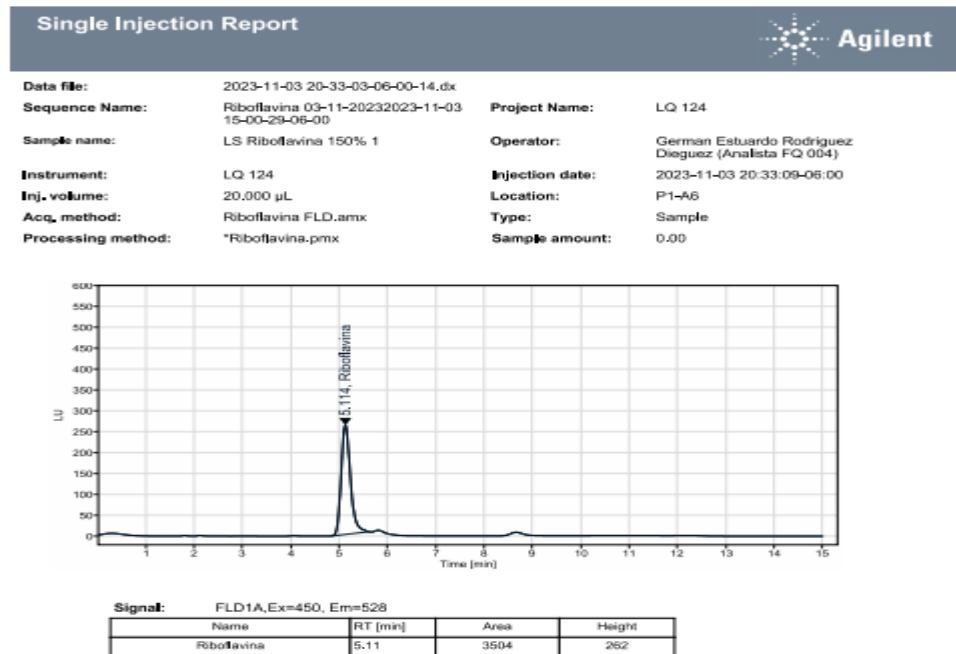


Figura No. 29 Cromatograma de la segunda inyección del estándar de riboflavina al 150% para la linealidad del sistema

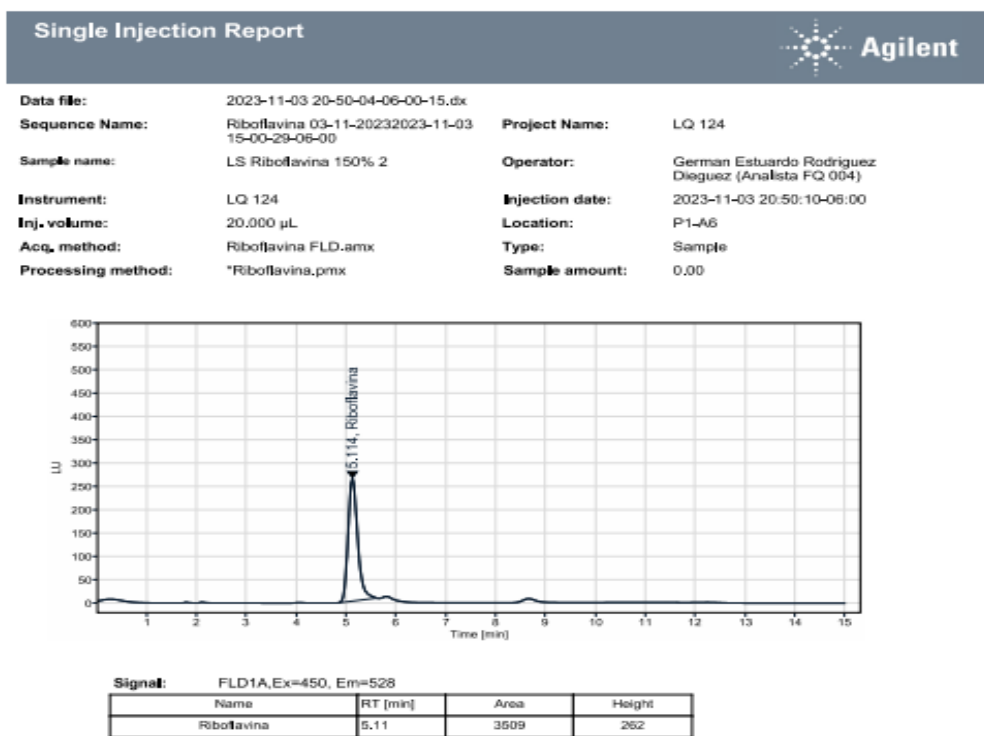
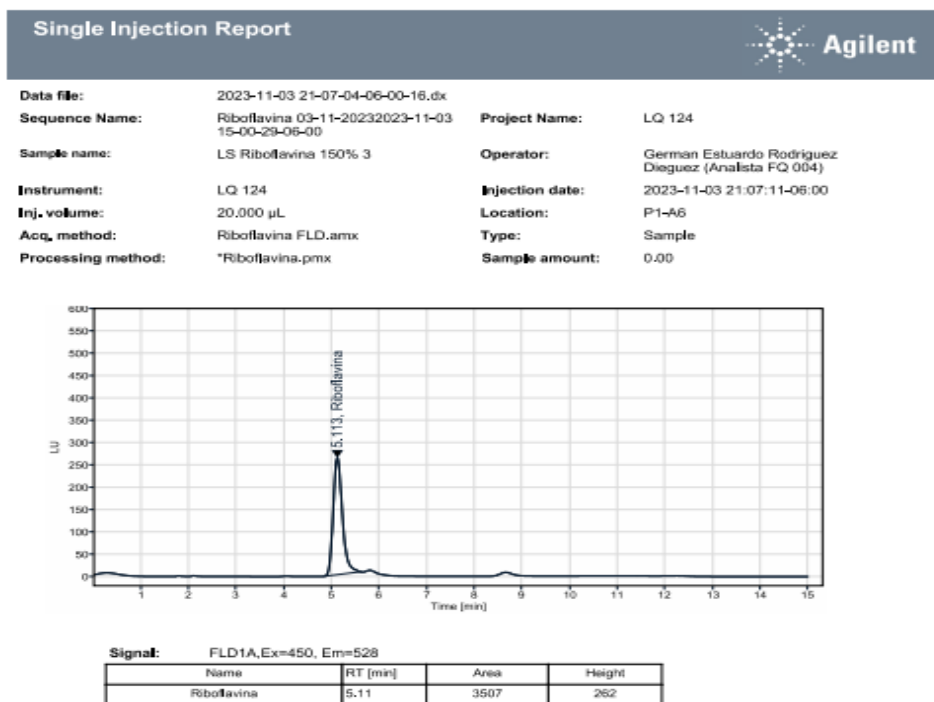


Figura No. 30 Cromatograma de la tercera inyección del estándar de riboflavina al 150% para la linealidad del sistema



J. Linealidad del método

Figura No. 31 Cromatograma de la primera inyección de la solución de riboflavina al 80% para la linealidad del método

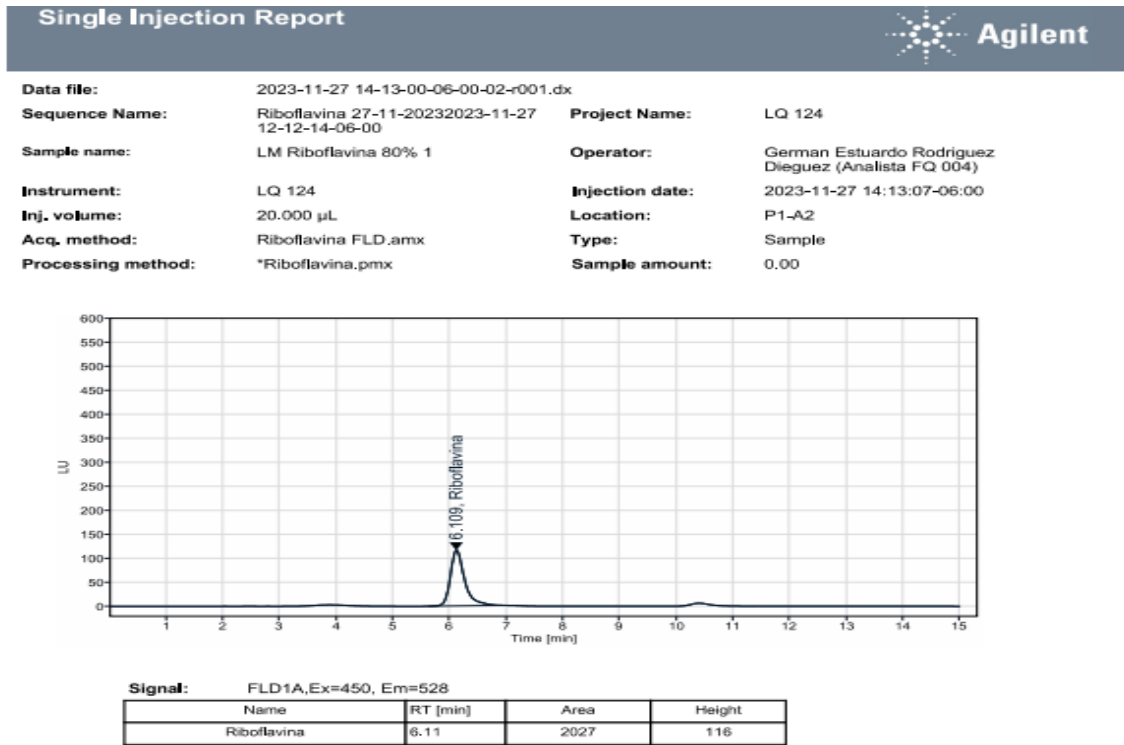


Figura No. 32 Cromatograma de la segunda inyección de la solución de riboflavina al 80% para la linealidad del método

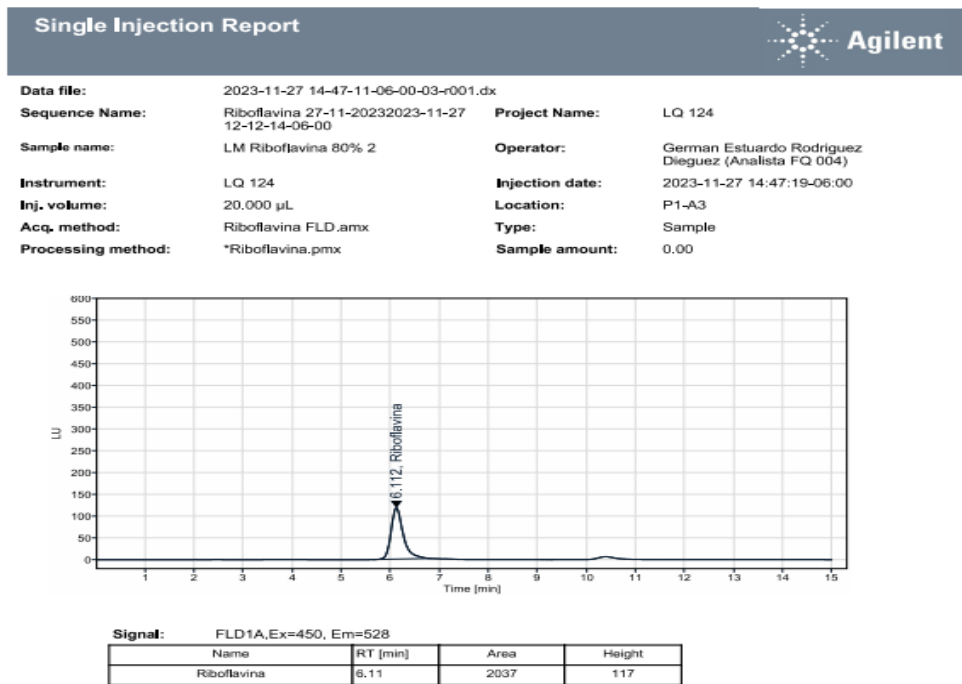


Figura No. 33 Cromatograma de la tercera inyección de la solución de riboflavina al 80% para la linealidad del método

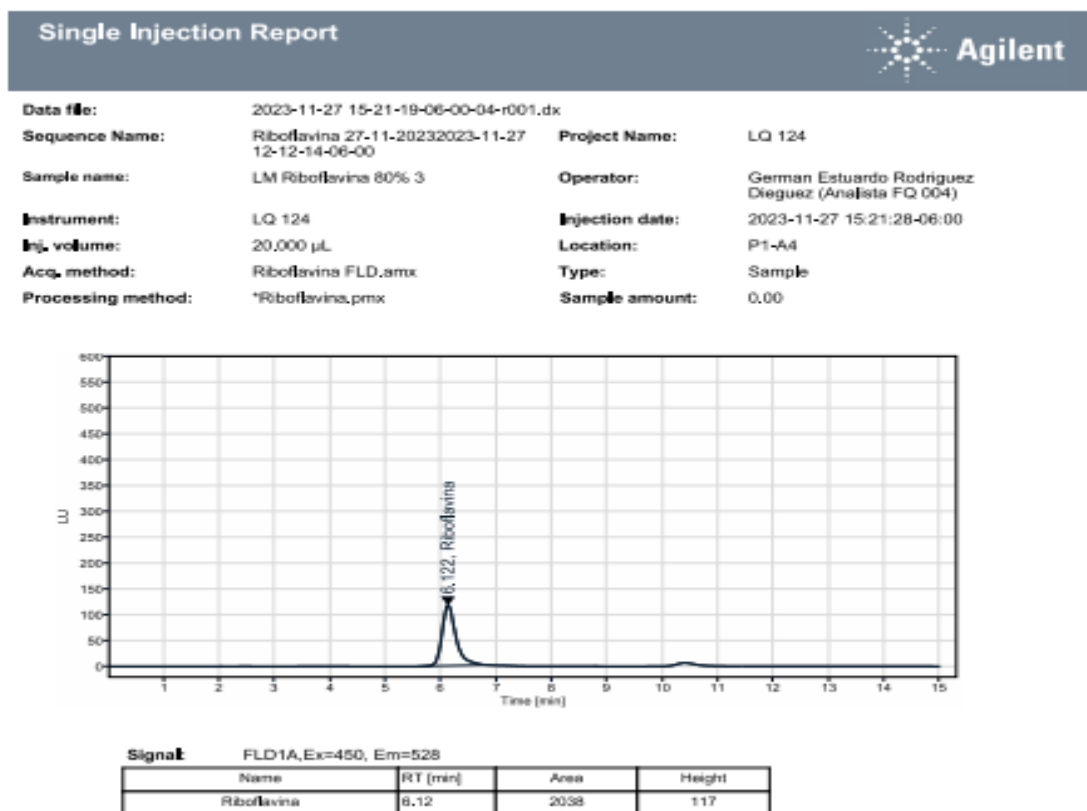


Figura No. 34 Cromatograma de la primera inyección de la solución de riboflavina al 100% para la linealidad del método

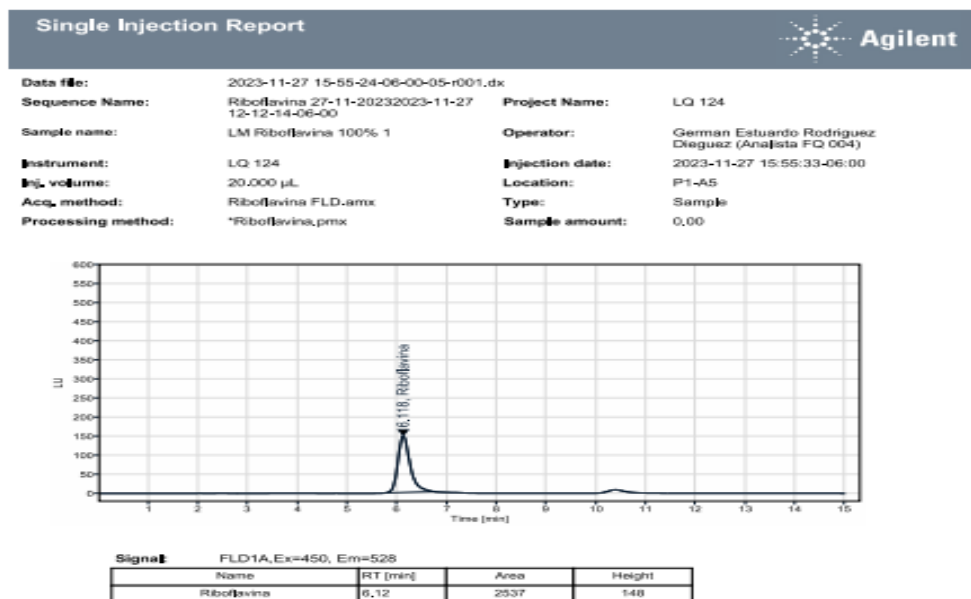


Figura No. 35 Cromatograma de la segunda inyección de la solución de riboflavina al 100% para la linealidad del método

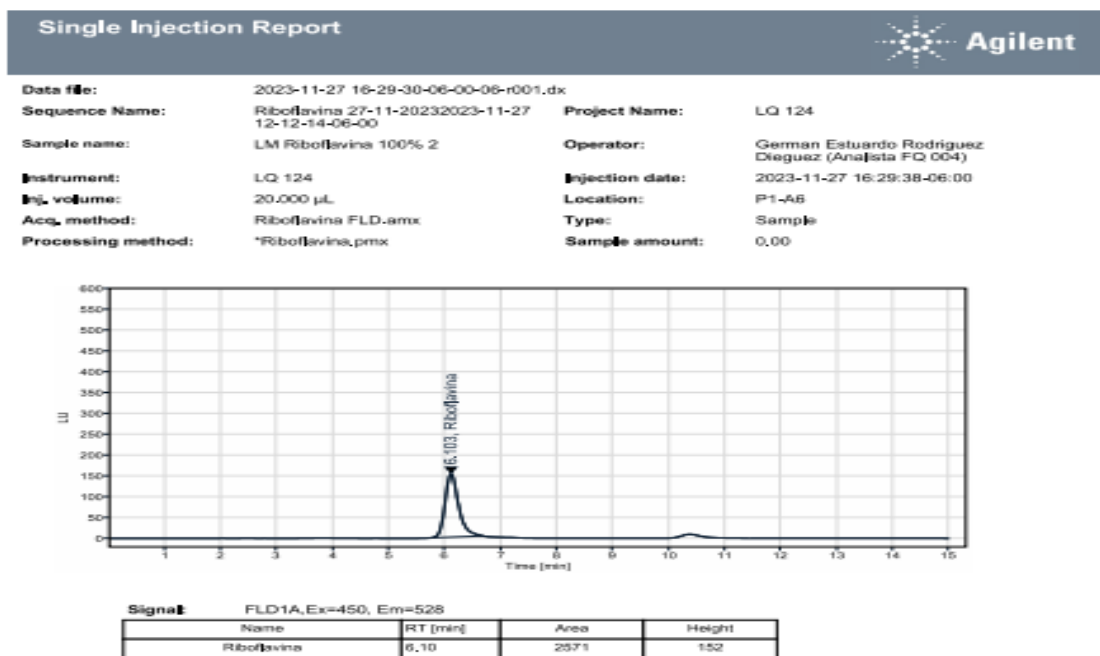


Figura No. 36 Cromatograma de la tercera inyección de la solución de riboflavina al 100% para la linealidad del método

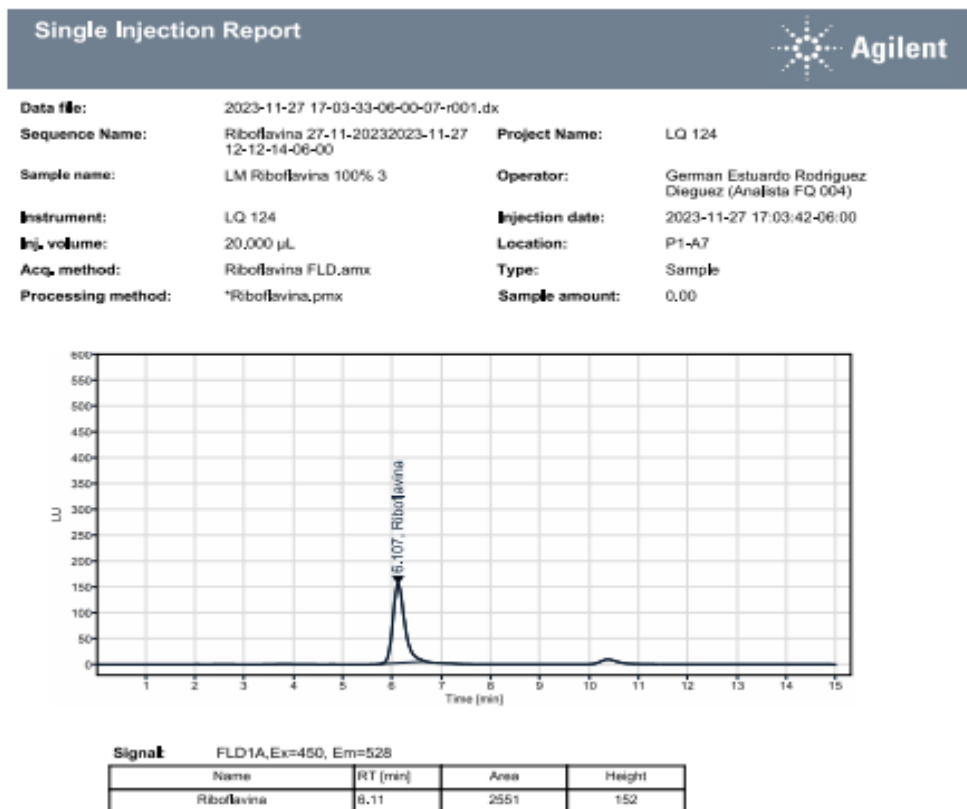


Figura No. 37 Cromatograma de la primera inyección de la solución de riboflavina al 120% para la linealidad del método

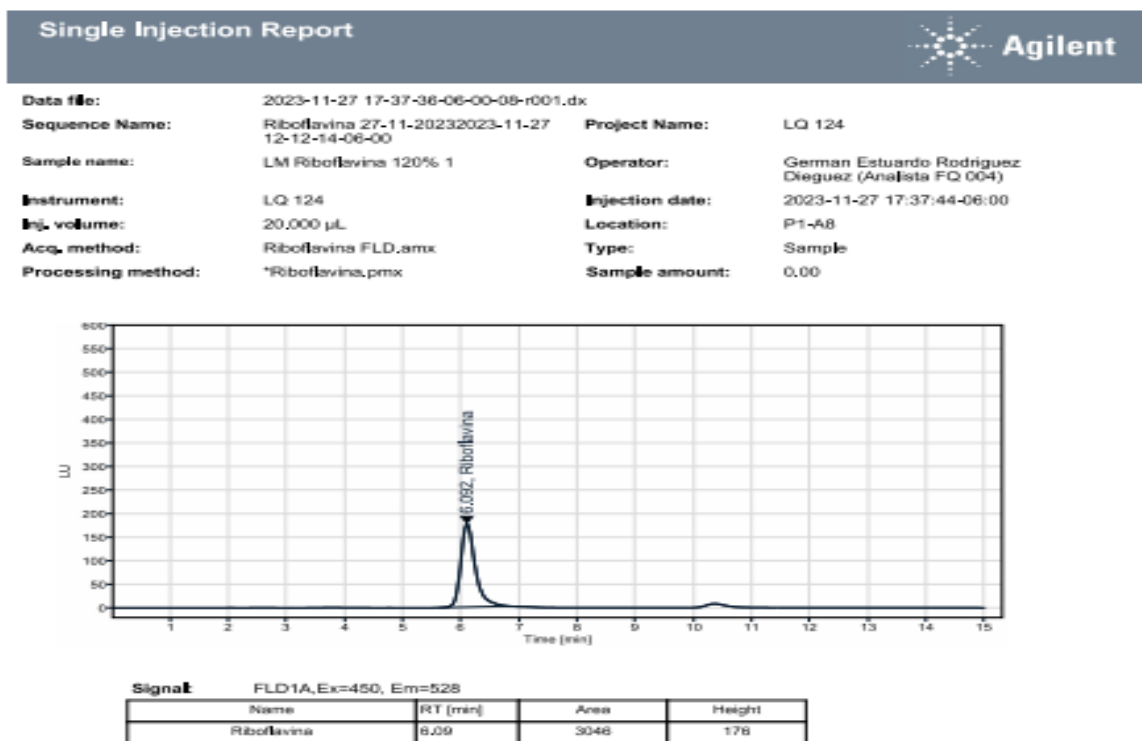


Figura No. 38 Cromatograma de la segunda inyección de la solución de riboflavina al 120% para la linealidad del método

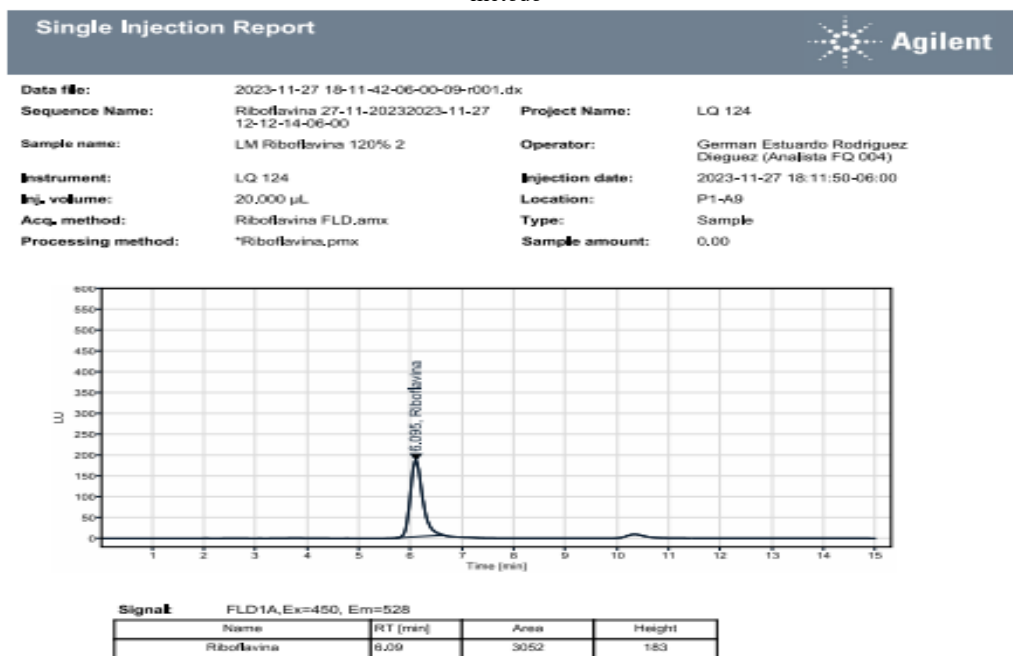
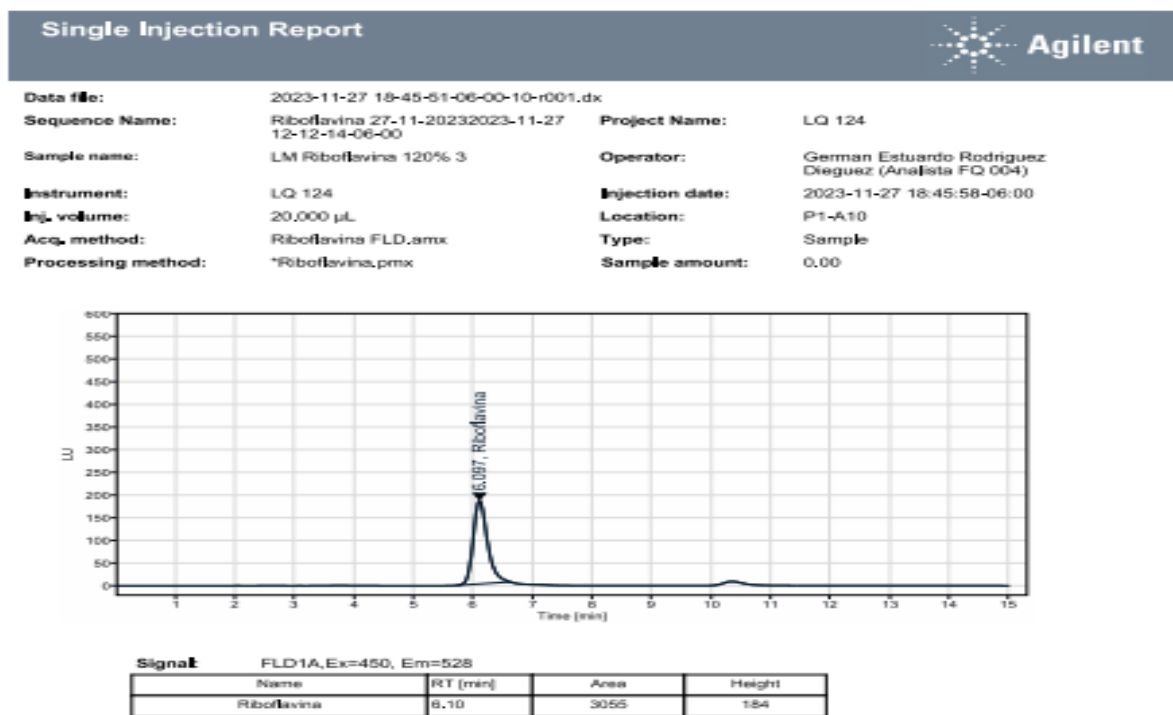


Figura No. 39 Cromatograma de la tercera inyección de la solución de riboflavina al 120% para la linealidad del método



K. Precisión intermedia

Figura No. 40 Cromatograma de la primera inyección del estándar de riboflavina para la precisión intermedia del día

1

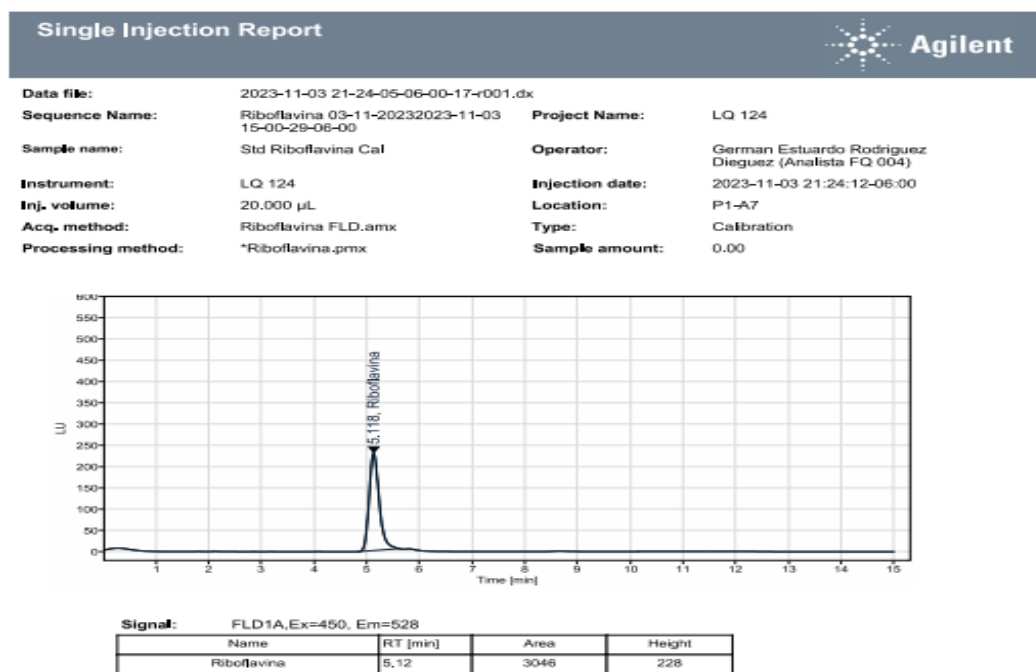


Figura No. 41 Cromatograma de la segunda inyección del estándar de riboflavina para la precisión intermedia del día 1

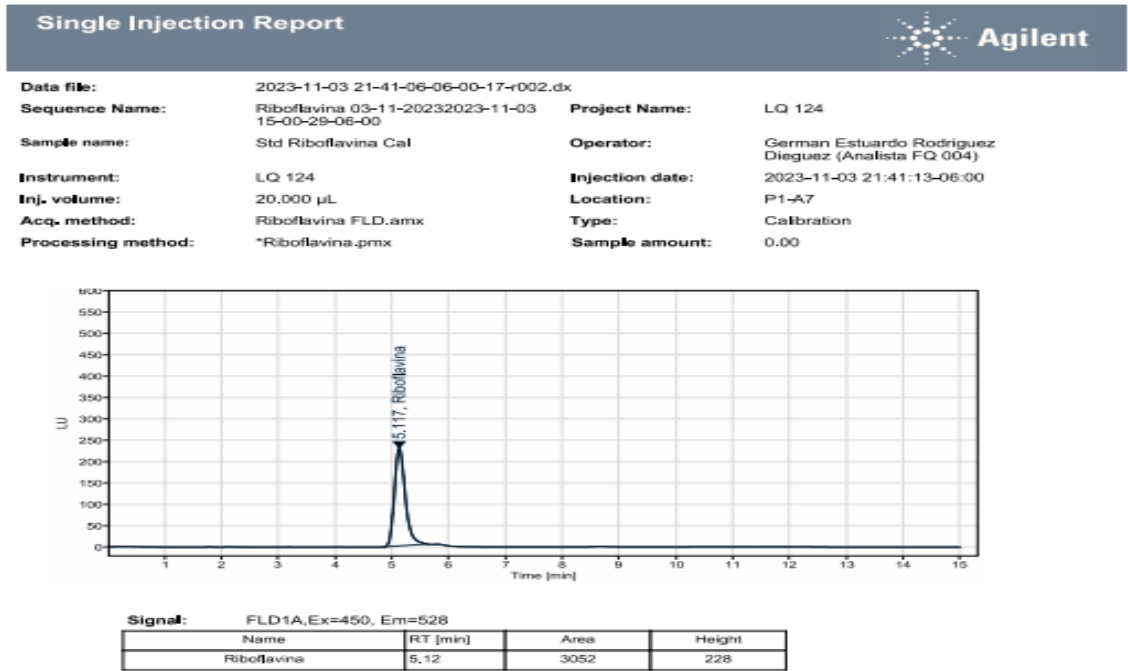


Figura No. 42 Cromatograma de la tercera inyección del estándar de riboflavina para la precisión intermedia del día 1

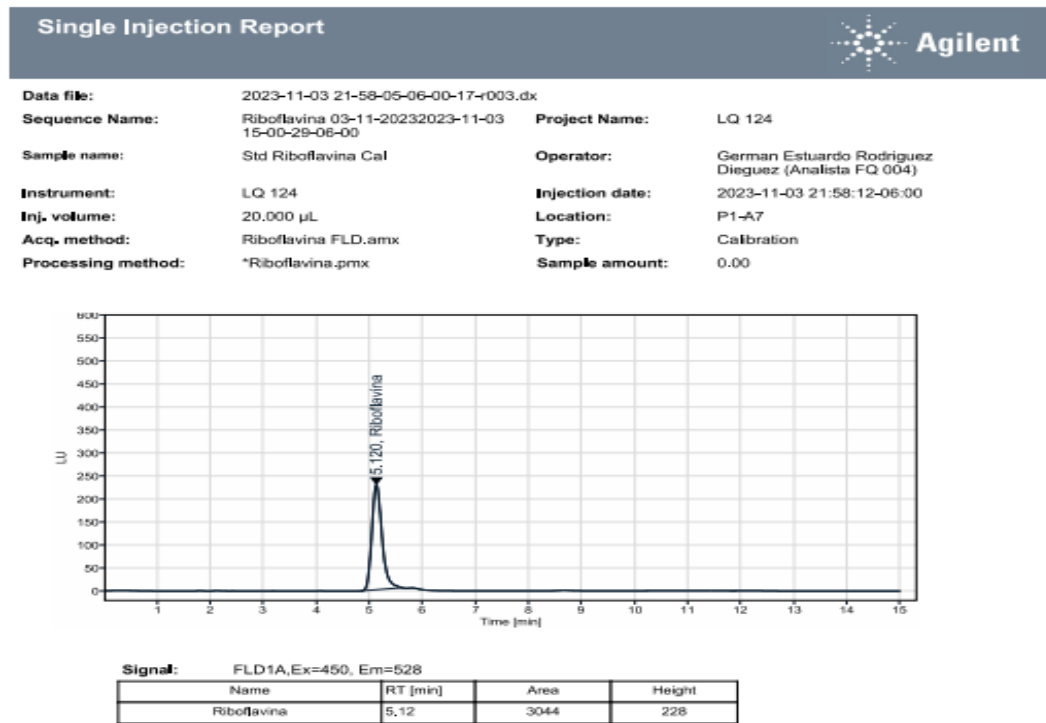


Figura No. 43 Cromatograma de la cuarta inyección del estándar de riboflavina para la precisión intermedia del día

1

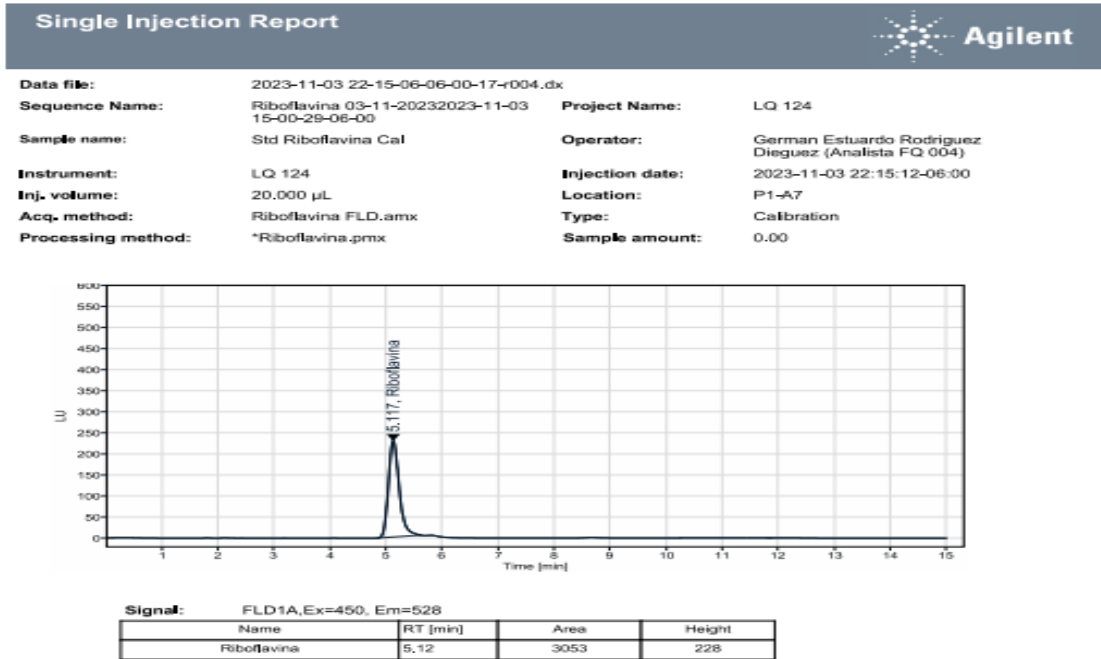


Figura No. 44 Cromatograma de la quinta inyección del estándar de riboflavina para la precisión intermedia del día

1

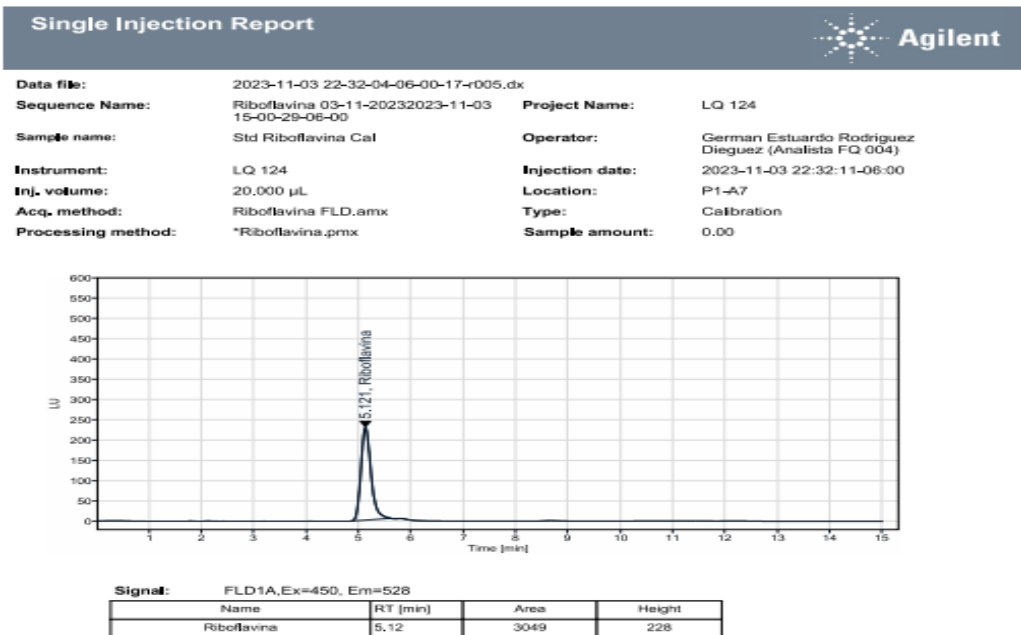


Figura No. 45 Cromatograma de la sexta inyección del estándar de riboflavina para la precisión intermedia del día 1

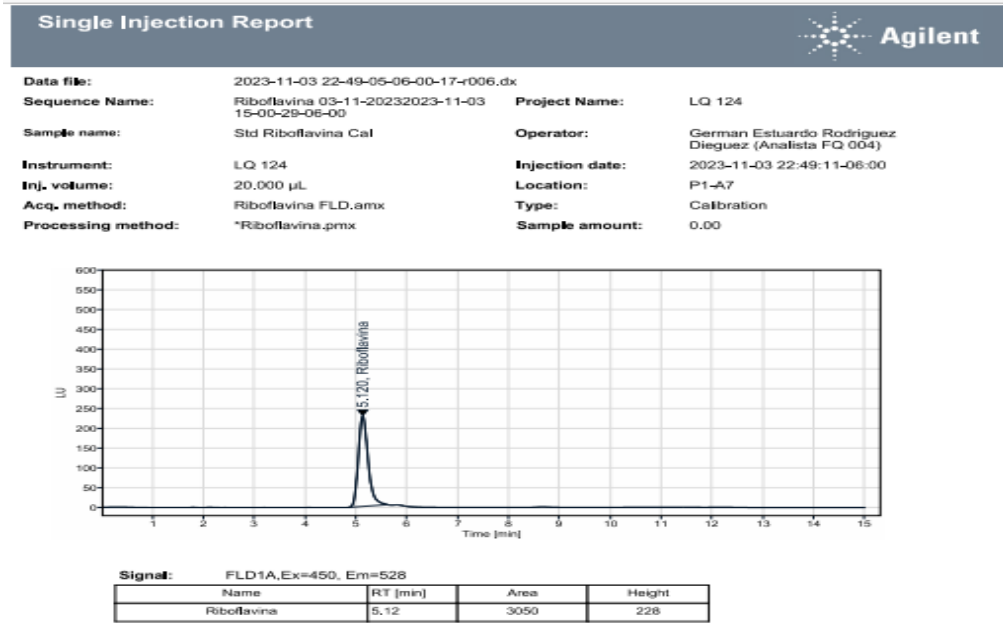


Figura No. 46 Cromatograma de la primera inyección de la muestra de riboflavina para la precisión intermedia del día 1

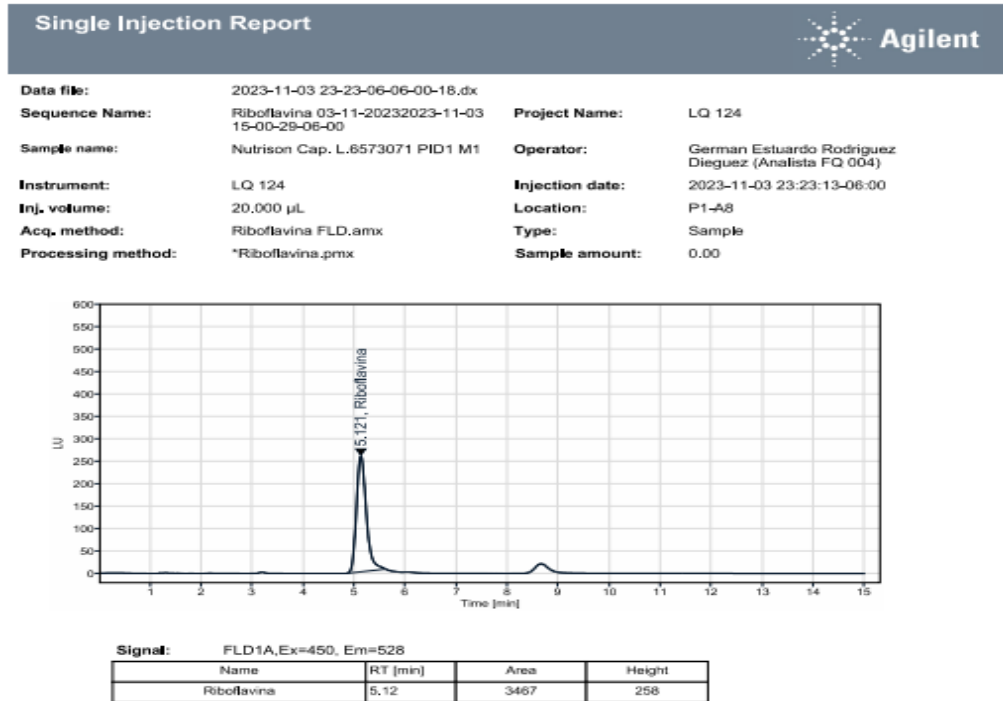


Figura No. 47 Cromatograma de la segunda inyección de la muestra de riboflavina para la precisión intermedia del día 1

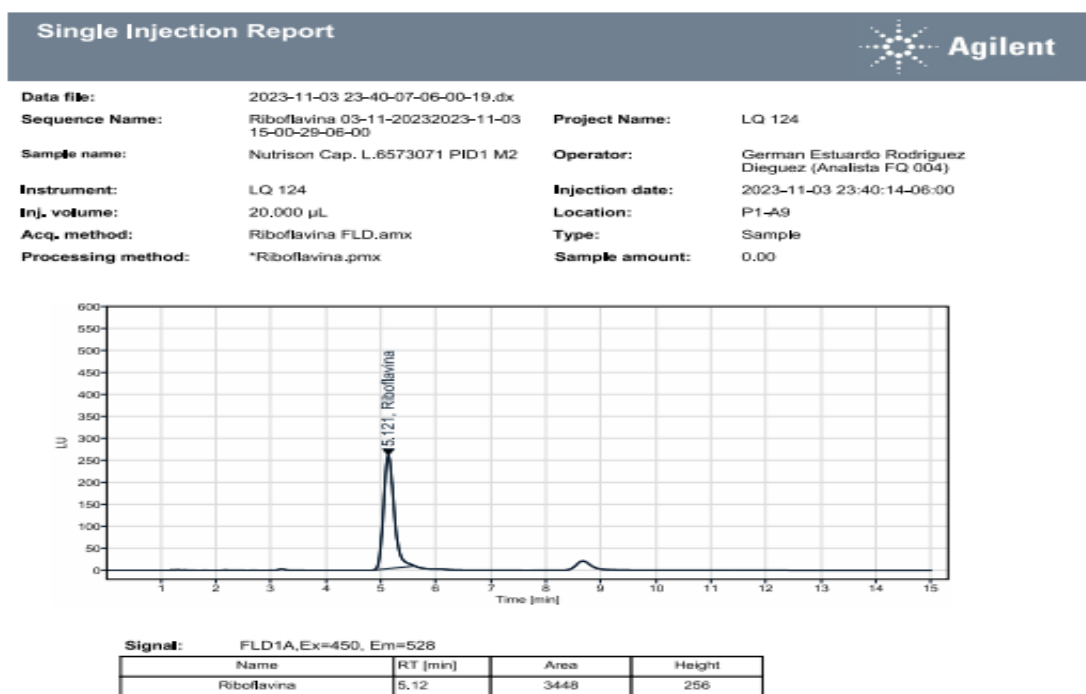


Figura No. 48 Cromatograma de la tercera inyección de la muestra de riboflavina para la precisión intermedia del día 1

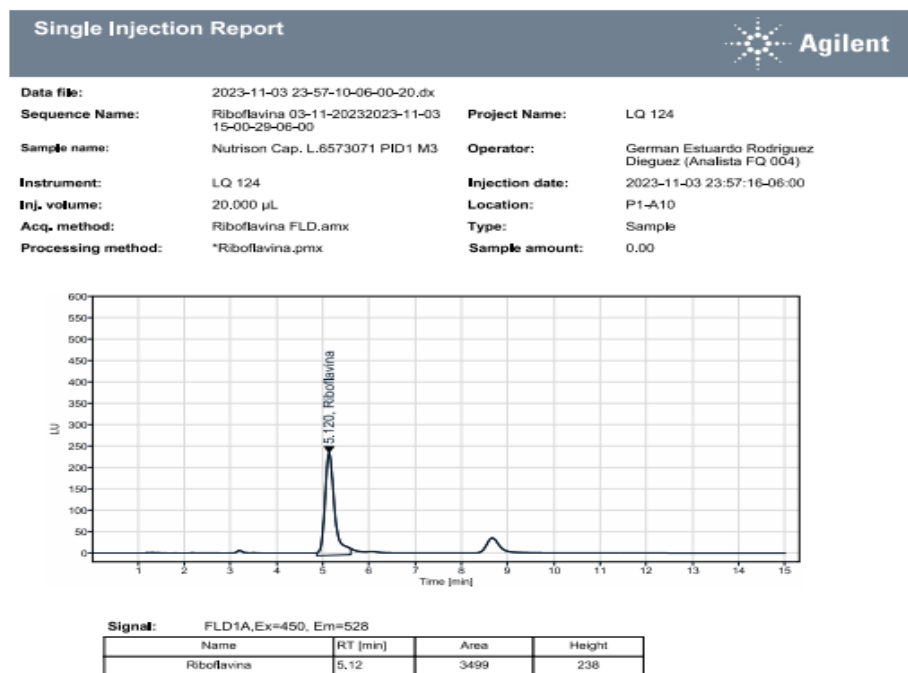


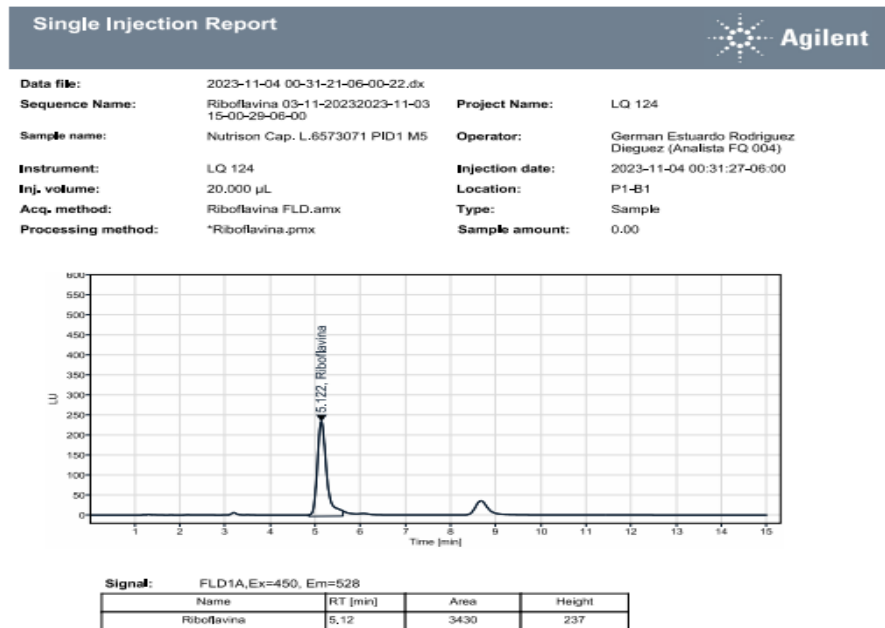
Figura No. 49 Cromatograma de la cuarta inyección de la muestra de riboflavina para la precisión intermedia del día

1



Figura No. 50 Cromatograma de la quinta inyección de la muestra de riboflavina para la precisión intermedia del día

1



.....

Figura No. 51 Cromatograma de la sexta inyección de la muestra de riboflavina para la precisión intermedia del día

1

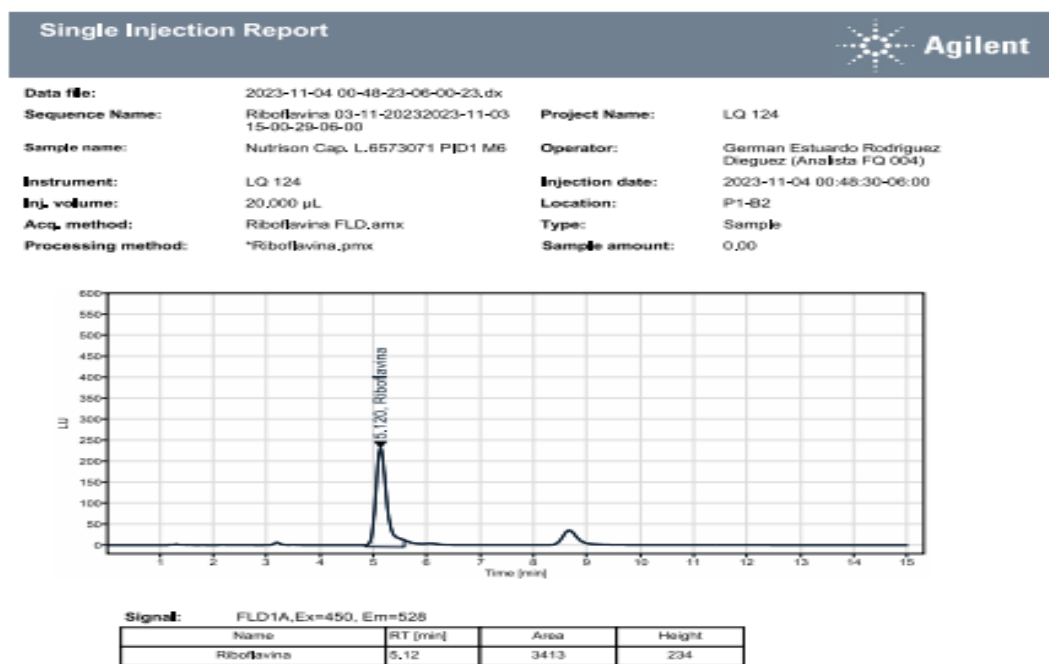
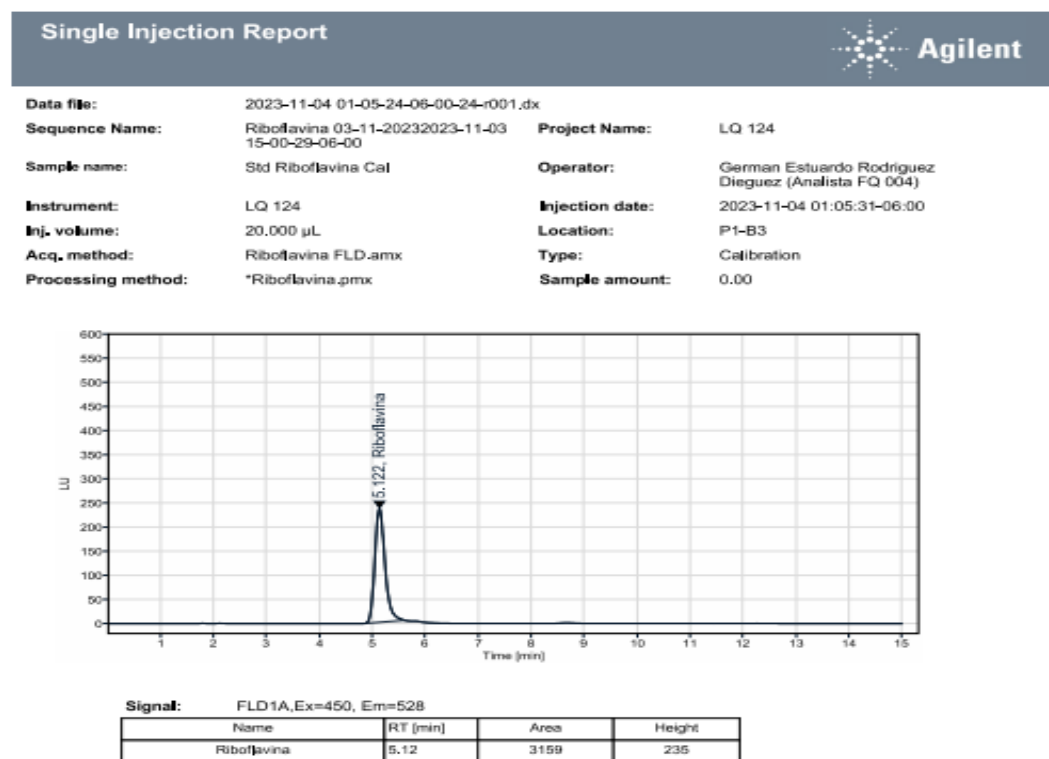


Figura No. 52 Cromatograma de la primera inyección del estándar de riboflavina para la precisión intermedia del día



2

Figura No. 53 Cromatograma de la segunda inyección del estándar de riboflavina para la precisión intermedia del día 2

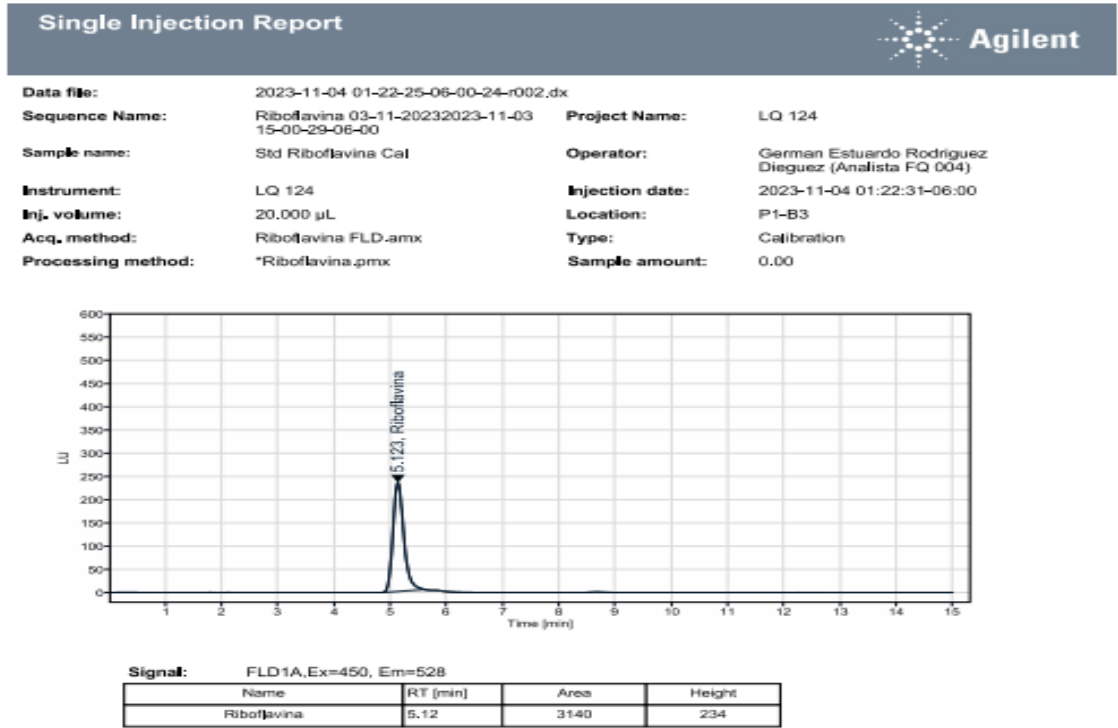


Figura No. 54 Cromatograma de la tercera inyección del estándar de riboflavina para la precisión intermedia del día 2

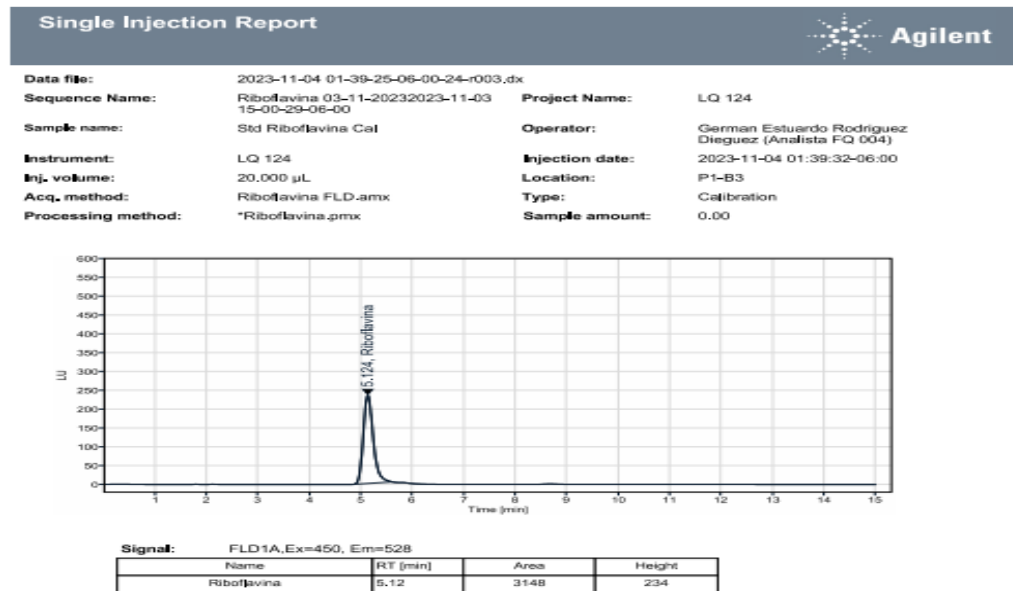


Figura No. 55 Cromatograma de la cuarta inyección del estándar de riboflavina para la precisión intermedia del día

2

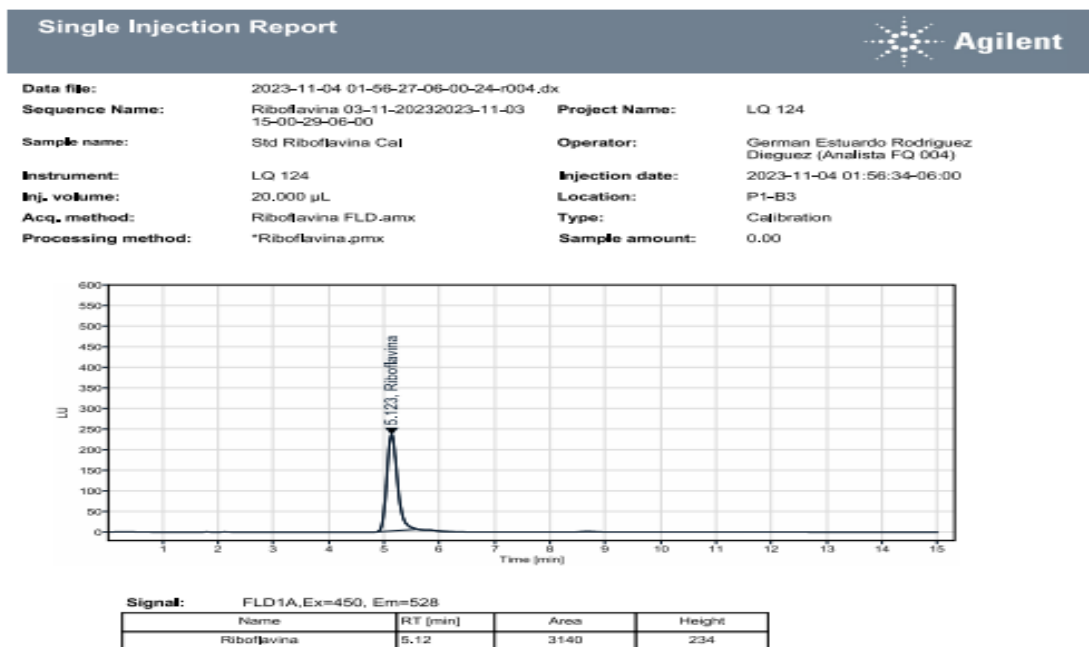


Figura No. 56 Cromatograma de la quinta inyección del estándar de riboflavina para la precisión intermedia del día

2

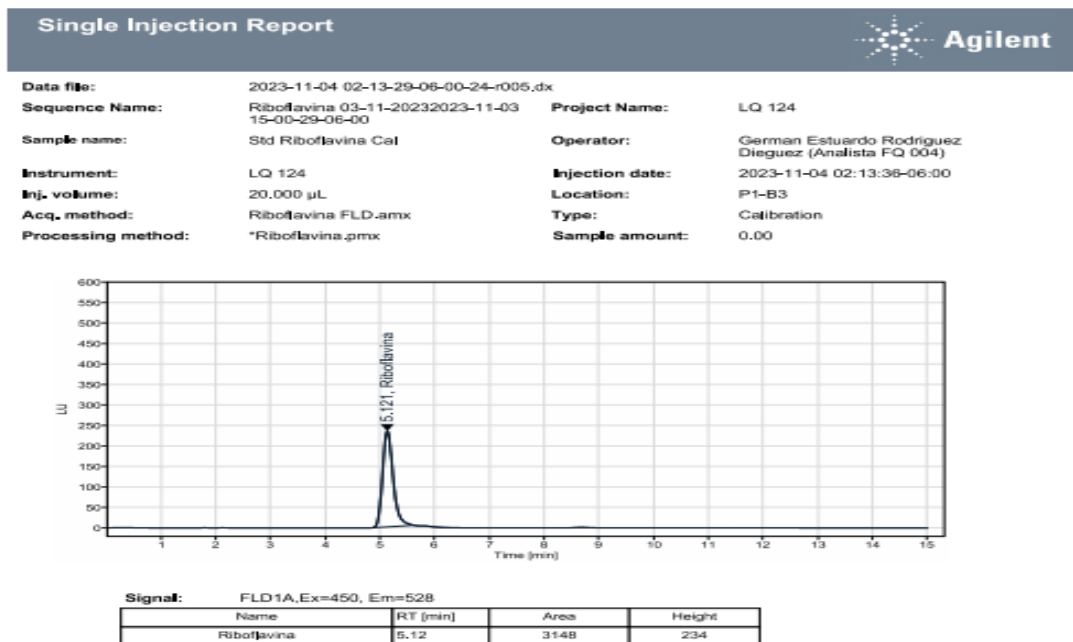


Figura No. 57 Cromatograma de la sexta inyección del estándar de riboflavina para la precisión intermedia del día 2

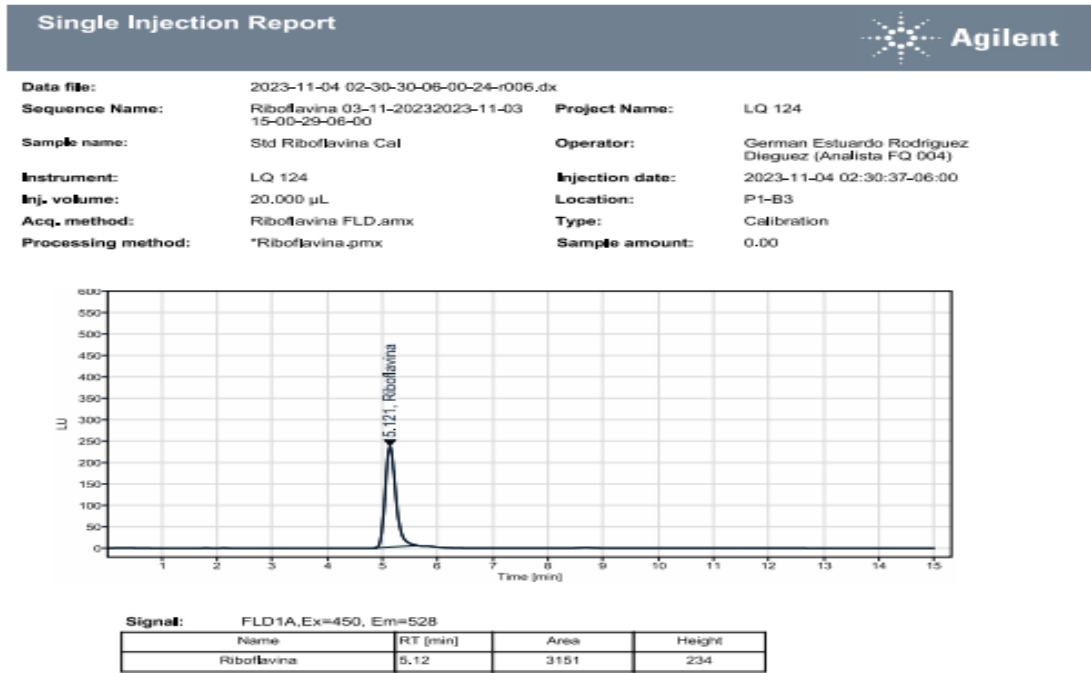


Figura No. 58 Cromatograma de la primera inyección de la muestra de riboflavina para la precisión intermedia del día 2

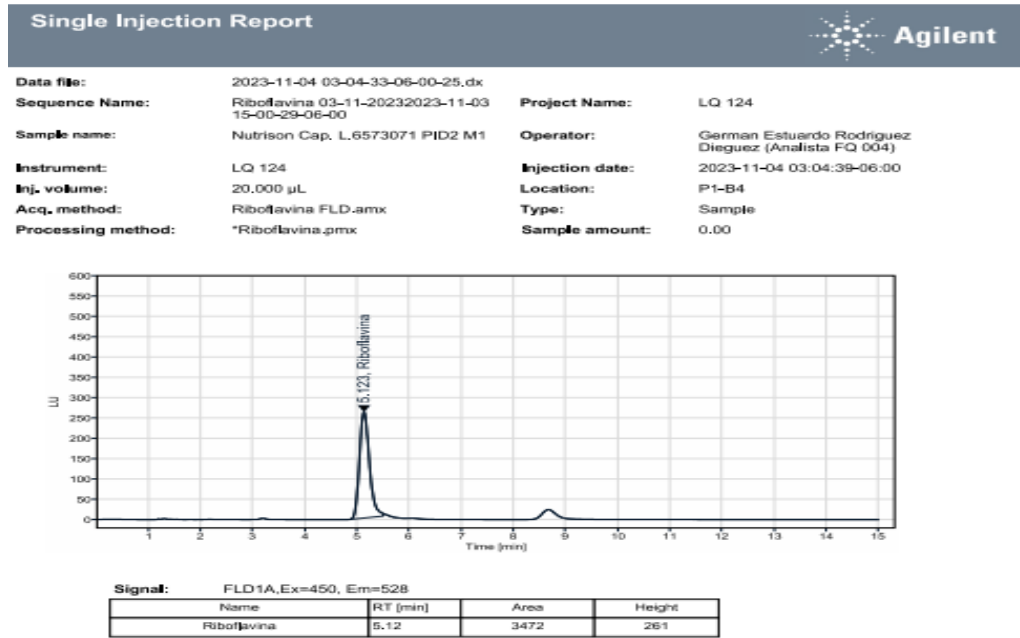


Figura No. 59 Cromatograma de la segunda inyección de la muestra de riboflavina para la precisión intermedia del día 2

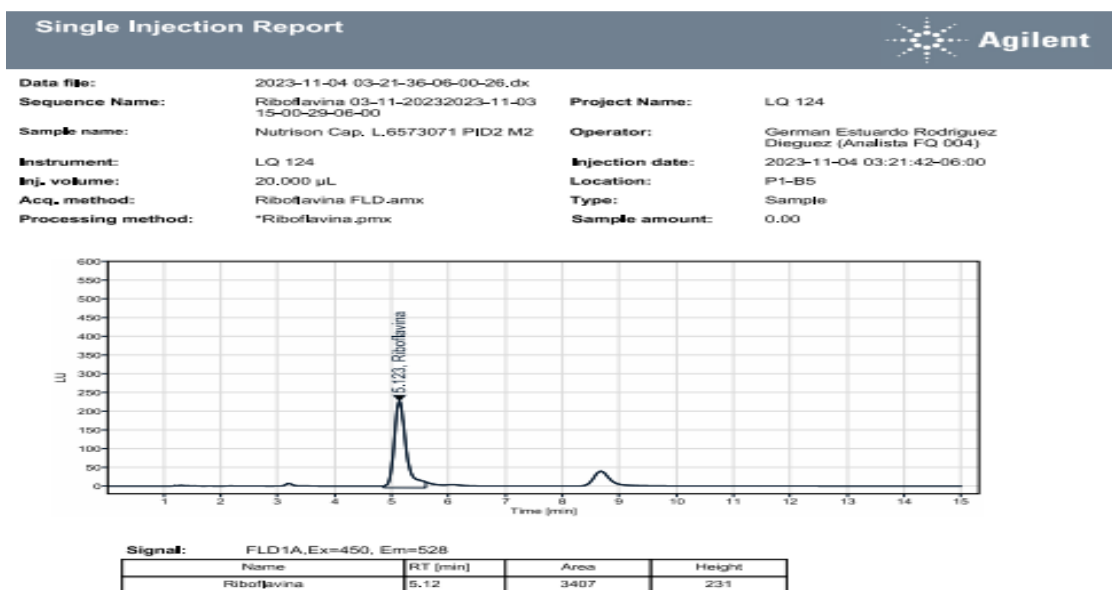


Figura No. 60 Cromatograma de la tercera inyección de la muestra de riboflavina para la precisión intermedia del día 2

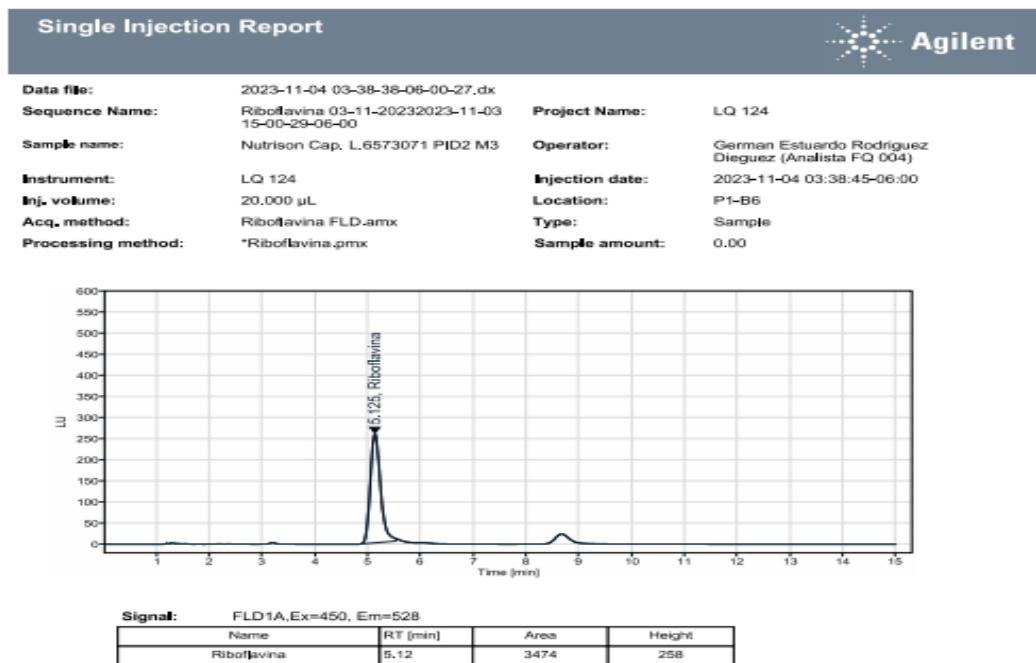


Figura No. 61 Cromatograma de la cuarta inyección de la muestra de riboflavina para la precisión intermedia del día

2

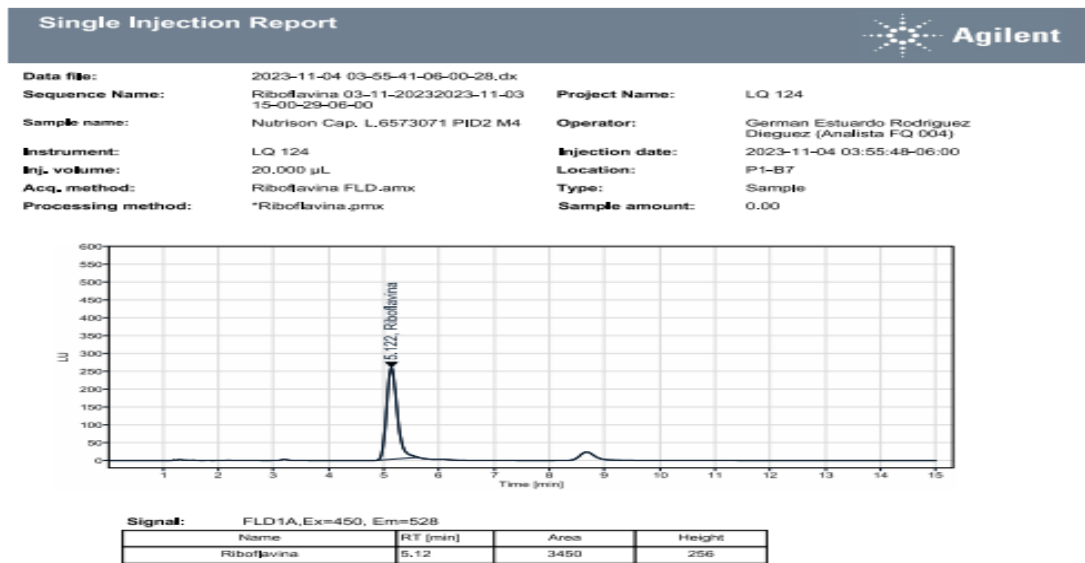


Figura No. 62 Cromatograma de la quinta inyección de la muestra de riboflavina para la precisión intermedia del día

2

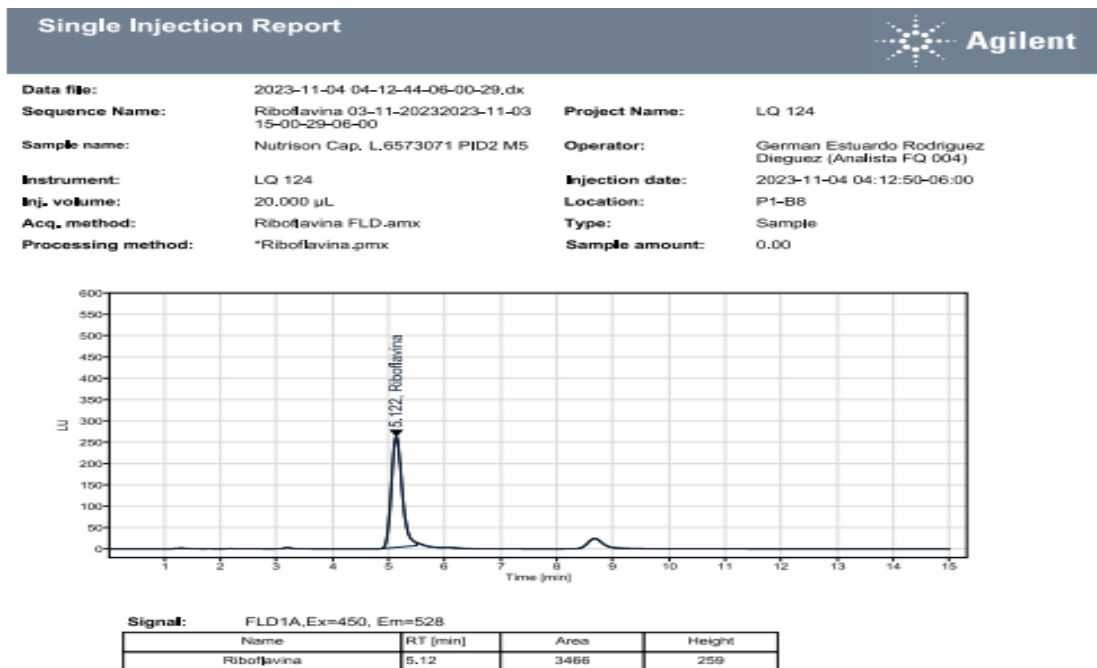


Figura No. 63 Cromatograma de la sexta inyección de la muestra de riboflavina para la precisión intermedia del día

2

