

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO CON VAINILLINA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ISONIACIDA EN TABLETAS

Validation of spectrophotometric method with vanillin for quantification of isoniazid in tablets

Pedro Alva Plasencia^{1*}, Olga Caballero Aquino², Robin Cruzado Lescano², Mayar Ganoza Yupanqui², David Ruidias Romero¹, Irving Bocanegra Vidal³.

Recibido 20 de Abril 2014; Aceptado 15 de Junio 2014

RESUMEN

Objetivo: El trabajo estuvo orientado a determinar los parámetros de validación del método espectrofotométrico con vainillina para la cuantificación de isoniacida en tabletas. **Material y Método:** Se utilizaron tabletas comerciales de isoniacida 100 mg. El método se validó mediante el estudio de linealidad, precisión, exactitud, especificidad y rango de cuantificación, de acuerdo a las guías para validación de métodos analíticos de la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (USP). **Resultados:** Los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, especificidad y rango de cuantificación determinados; cumplieron con los criterios establecidos para un rango de concentraciones de isoniacida de 4 ug/mL a 20 ug/mL. **Conclusiones:** Se concluye que este método cumple con los parámetros establecidos para validar métodos analíticos y es útil para cuantificar isoniacida en tabletas de 100 mg en un intervalo de 33,3% a 166,7%.

Palabras clave: Validación de métodos analíticos, isoniacida, vainillina, espectrofotometría.

ABSTRACT

Objective: The work was aimed at determining the parameters validation of spectrophotometric method with vanillin for quantification of isoniazid in tablets. **Material and Methods:** Commercial isoniazid tablets 100 mg were used. The method was validated by studying linearity, precision, accuracy, specificity and quantification range, according to the guidelines for validation of analytical methods of the Pharmacopoeia of the United States (USP). **Results:** The parameters linearity, precision, accuracy, specificity and quantification certain range; met the established criteria for a range of concentrations of isoniazid 4 ug / mL to 20 ug / mL. **Conclusions:** We conclude that this method meets the parameters set to validate analytical methods and is useful for quantifying isoniazid tablets 100 mg in a range of 33.3% to 166.7%.

Key words: Analytical methods for validation, isoniazid, vanillin, spectrophotometry.

INTRODUCCIÓN

En el marco de las exigencias normativas relacionadas con la calidad de medicamentos, la cuantificación de éstos en productos farmacéuticos es un aspecto

crítico, siendo necesario validar los métodos utilizados para dar la calidad necesaria a los resultados.^{1,2}

¹ Departamento de Farmacotecnia, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Trujillo- Perú

² Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Trujillo-Perú

³ Estudiante de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Trujillo-Perú

*Autor para correspondencia: e-mail: pmap2007@hotmail.com

Validación es el establecimiento de evidencia documentada que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos.^{1,3}

La validación implica que el comportamiento del método se conoce y que se puede evaluar la incertidumbre en el valor obtenido, de modo que el usuario puede estar seguro del grado de confianza que pueda tener el resultado. Esta debería aplicarse cuando se requiere incorporar una técnica nueva al trabajo de rutina del laboratorio, también cuando se comparan dos metodologías o bien cuando se está desarrollando un método o técnica nuevos.^{1,3,4}

Para realizar una validación efectiva se necesita tener en cuenta una serie de parámetros importantes para llegar a conclusiones significativas sobre el comportamiento del método. Según lo descritos por la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (USP 36)⁶, la Food and Drug Administration (FDA)² y la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de Métodos Analíticos (AEFI)⁵, tenemos: exactitud, precisión, especificidad, linealidad y rango.

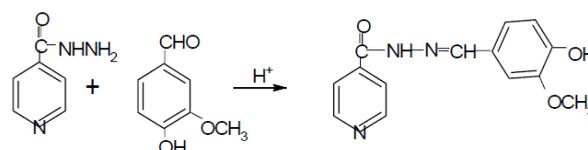
Los parámetros a considerar varían según las exigencias legales de diferentes organizaciones, fundamentalmente del método analítico seleccionado y el uso para el cual está previsto. Por tanto, los requisitos de validación necesarios se establecen dependiendo de la categoría del ensayo.^{6,7}

Por otro lado, el grupo principal de medicamentos que se consume en nuestro país, es el de antituberculosos entre ellos la isoniacida, medicamento de primera línea, altamente bactericida contra *Mycobacterium tuberculosis*, el cual existe en nuestro mercado en presentaciones de tabletas multifuente de 100 mg⁸, que requieren de controles de calidad en lo que respecta a la cantidad de éste ingrediente activo presente en ellas.

Un método espectrofotométrico para cuantificar isoniacida es el que utiliza Vainillina. Tiene la ventaja de no necesitar tecnología costosa, ideal para ser utilizado en

nuestro medio, tanto en el ámbito académico, legal, de investigación y de control de calidad.^{9,10}

La Vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) es un compuesto orgánico que contiene grupos, fenólico, aldehído y éter. Dentro de su uso se reporta la cuantificación espectrofotométrica de isoniacida, quien presenta un grupo hidracina, forma un complejo hidrazona de la isoniacina-vainillina, quien tiene máxima absorbancia cuantificable a 405 nm.⁹



Isoniacida Vainillina Complejo hidrazona amarillo

Teniendo en consideración que en el Perú en el año 2013 se diagnosticaron 12,690 casos de Tuberculosis (Tuberculosis en todas sus formas - TBC), la tasa de incidencia de TBC en todas sus formas por 100 habitantes al 2012 de 93,0; además en el departamento de la Libertad las tasas de morbilidad y de incidencia fueron 81,4 y 48,3 en el año 2011, respectivamente.¹¹ Es así que el objetivo de este trabajo es validar el método espectrofotométrico para la cuantificación de isoniacida en tabletas usando vainillina.

MATERIAL Y MÉTODO

Material:

El material de estudio estuvo conformado por isoniacida estándar USP, tabletas comerciales de isoniacida de 100 mg, etanol p.a., ácido clorhídrico p.a., vainillina p.a. y agua purificada. Equipos utilizados: Espectrofotómetro GÉNESIS 10UV, Espectrofotómetro UNICO® UV2100PU, Balanza analítica METTER TOLEDO ABS204-S y un equipo Ultrasonido. Marca: BRANSON 3510.

Método:

Cuantificación de isoniacida

Preparación de una solución patrón de isoniacida:

Se pesaron 100 mg de isoniacida estándar USP, y se disolvieron con agua purificada, agitando hasta completar el aforo de 100 mL, obteniéndose una concentración de 1 mg/mL. Esta solución fue protegida de la luz.

Preparación de soluciones de isoniacida a partir de tabletas:

Se pesaron y pulverizaron 20 tabletas de isoniacida 100 mg. Muestras de polvo conteniendo un equivalente a 100 mg de isoniacida se transfirieron a matraces Erlenmeyer. Se adicionaron 60 mL de agua purificada, se agitaron y sonicaron por 5 minutos. Porciones filtradas fueron transferidas a matraces aforados de 100 mL. Se aforaron para obtener concentraciones de 1 mg/mL. Esta solución fue protegida de la luz.

Procedimiento analítico de cuantificación:

Se transfirieron volúmenes establecidos de las soluciones conteniendo isoniacida en matraces aforados de 25 mL. Luego se añadieron 2 mL de una solución etanólica al 3% de vainillina. Seguidamente se aforaron con una solución de ácido clorhídrico en etanol al 0,5 M. Se dejó reposar 10 minutos y se realizó la lectura correspondiente en espectrofotómetro a 405 nm, corrigiendo con un blanco.⁹

Linealidad del sistema y del método:

Siguiendo el procedimiento analítico de cuantificación descrito, se trabajaron cinco concentraciones de isoniacida a partir de muestras estándar y polvo de tabletas, 4 ug/mL, 8 ug/mL, 12 ug/mL, 16 ug/mL y 20 ug/mL. Cada concentración fue sujeta de 3 análisis independientes.^{2,5,7}

Precisión del sistema y del método:

La precisión se evaluó analizando la repetibilidad y la precisión intermedia o reproducibilidad.^{2,5,7}

Repetibilidad:

A partir del estándar de isoniacida y del polvo de tabletas, se trabajaron independientemente nueve concentraciones iguales de 12 ug/mL. Durante éste proceso se

trabajó bajo las mismas condiciones: analista, equipo y día.

Reproducibilidad:

El proceso se ejecutó por dos analistas, utilizando dos equipos distintos de lectura (Espectrofotómetro GÉNESIS 10UV, Espectrofotómetro UNICO® UV2100PU) y en tres días diferentes; en cada día ambos analistas trabajaron en los dos equipos. El trabajo para las muestras, estándar y polvo de tabletas, fueron independientes. Cada análisis fue por triplicado. La concentración trabajada fue 12 ug/mL.

Exactitud del método:

Se trabajaron nueve muestras a partir del estándar y polvo de tabletas de isoniacida, tres concentraciones porcentuales según lo declarado por las tabletas (100 mg) correspondientes al 67,7%; 100,0% y 133,3%. Se ensayaron por triplicado y se evaluó el porcentaje de recuperación.⁶

Especificidad:

Considerando que, la aplicación del método es para cuantificar isoniacida en tabletas y la estabilidad del ingrediente farmacéutico activo (IFA), la especificidad se evaluó en base a los parámetros de linealidad, precisión y exactitud.^{1,4}

Rango:

Se evaluaron los datos obtenidos para linealidad, precisión y exactitud, tanto del sistema como del método.⁶

Análisis estadístico de datos:

Los datos obtenidos fueron sujetos de ensayos estadísticos propuestos por la AEFI⁵ y Guía de la FDA², en el marco descrito en la USP⁶.

Para evaluar Linealidad, se determinaron los parámetros de Regresión: pendiente, intercepto, coeficiente de regresión (r). Coeficiente de determinación (r^2), ecuación de la recta de regresión. Se realizaron ensayos t de Student para r, pendiente e intercepto. Se determinó la desviación estándar

relativa (RSD) de la pendiente, los límites de confianza de la pendiente y del intercepto. Además se determinó la suma de cuadrados residuales y se calculó la (RSD) del factor respuesta (f), ésta última para evaluar la sensibilidad del calibrado. Los ensayos estadísticos se trabajaron con un nivel de significancia del 95% ($\alpha = 0,05$).

Para predecir precisión (repetibilidad y reproducibilidad), a los datos individuales de porcentajes de isoniacida muestrales, se les determinó su promedio y su RSD.

RESULTADOS

Tabla 1: Parámetros de linealidad del sistema: método espectrofotométrico para la cuantificación de isoniacida en tabletas usando vainillina

| Parámetro | Valores | Criterios de aceptación |
|---|---------|---|
| Pendiente de la recta | 0,0451 | - Diferente de cero - Valor $t = 215,88$ ($\alpha = 0,05$; g.l.:13) $P < 0,05$ - $RSD^a = 0,4632 < 2\%$ - $LCS^b = 0,0455$; $LCI^c = 0,0446$. No incluyen a cero (conforme). |
| | | - Igual a cero. - $LCS = 0,0194$; $LCI = 0,0075$. No incluyen a cero (no conforme). - Valor $t = 4,86$ ($\alpha = 0,05$; g.l.:13) $P < 0,05$ |
| Intercepto de la recta | 0,0135 | - $r > 0,99$. Valor $t = 215,88$ ($\alpha = 0,05$; g.l.:13) $P < 0,05$ |
| Coefficiente de correlación (r) | 0,9999 | - $r > 0,98$ |
| Coefficiente de determinación (r^2) | 0,9997 | - $RSD < 2\%$ |
| RSD del factor respuesta | 1,8295 | - Valor cercano a cero |
| Suma de cuadrados residuales | 0,0003 | |

a: desviación estándar relativa; b: límite de confianza superior; c: límite de confianza inferior.

Tabla 2: Parámetros de precisión, exactitud especificidad y rango del sistema: método espectrofotométrico para la cuantificación de isoniacida en tabletas usando vainillina

| Parámetro | Valores | Criterio de aceptación |
|---|----------------|------------------------------------|
| Precisión | | |
| Repetibilidad RSD | 0,4847 | $RSD^a < 2,74\%$ $RSD < 2,00\%$ |
| Reproducibilidad RSD | 0,93 | |
| Exactitud | | |
| RSD | 0,59 | $RSD < 2,00\%$ |
| Linealidad de porcentajes | | |
| Pendiente | 0,9923 | Valor cercano a cero |
| I.C.S ^b 95% | 1,0045 | Intervalos alrededor de uno |
| I.C.I. ^c 95% | 0,9802 | |
| Especificidad | | |
| Los parámetros de linealidad, precisión y exactitud están dentro de los criterios de aceptación | | Específico |
| Rango | | |
| | 33,3% - 166,7% | 80,0% - 120,0% |

a: desviación estándar relativa; b: intervalo de confianza superior; c: intervalo de confianza inferior

Tabla 3: Parámetros de linealidad del método: método espectrofotométrico para la cuantificación de isoniacida en tabletas usando vainillina

| Parámetro | Valores | Criterios de aceptación |
|---|---------|---|
| Pendiente de la recta | 0,0452 | - Diferente de cero - Valor $t = 116,73$ ($\alpha = 0,05$; g.l.:13) $P < 0,05$ - $RSD^a = 0,8566 < 2\%$ - $LCS^b = 0,0461$; $LCI^c = 0,0444$. No incluyen a cero (conforme). |
| | | - Igual a cero. - $LCS = 0,0240$; $LCI = 0,0018$. No incluyen a cero (no conforme). - Valor $t = 2,51$ ($\alpha = 0,05$; g.l.:13) $P < 0,05$ |
| Intercepto de la recta | 0,0129 | - $r > 0,99$. Valor $t = 210,46$ ($\alpha = 0,05$; g.l.:13) $P < 0,05$ |
| Coefficiente de correlación (r) | 0,9999 | - $r > 0,98$ |
| Coefficiente de determinación (r^2) | 0,9997 | - $RSD < 2\%$ |
| RSD del factor respuesta | 1,9227 | - Valor cercano a cero |
| Suma de cuadrados residuales | 0,0003 | |

a: desviación estándar relativa; b: límite de confianza superior; c: límite de confianza inferior.

Tabla 4: Parámetros de precisión, exactitud especificidad y rango del método: método espectrofotométrico para la cuantificación de isoniacida en tabletas usando vainillina

| Parámetro | Valores | Criterio de aceptación |
|---------------------------|---|-----------------------------|
| Precisión | | |
| Repetibilidad RSD | 0,7341 | RSD ^a < 2,74% |
| | | RSD < 2,00% |
| Reproducibilidad RSD | 1,24 | |
| Exactitud | | |
| RSD | 0,91 | RSD < 2,00% |
| Linealidad de porcentajes | 0,9919 | Valor cercano a cero |
| Pendiente | 1,0205 | Intervalos alrededor de uno |
| I.C.S ^b . 95% | 0,9633 | |
| I.C.I. ^c 95% | | |
| Especificidad | | |
| | Los parámetros de linealidad, precisión y exactitud están dentro de los criterios de aceptación | Específico |
| Rango | | |
| | 33,3% - 166,7% | 80,0% - 120,0% |

a: desviación estándar relativa; b: límite de confianza superior; c: límite de confianza inferior.

DISCUSIÓN

La Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (USP 36)⁶, la Food and Drug Administration (FDA)² y la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI)⁵, recomiendan demostrar que los parámetros de validación aceptables se demuestran trabajando con el analito estándar (validación del sistema) y con el analito presente en la formulación farmacéutica (validación del método).

La linealidad es una característica que expresa la capacidad del método analítico para brindar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un rango establecido, esto se logra asegurando una correspondencia directa entre concentraciones y sus señales en el equipo (absorbancias), comportamiento que para el sistema se ve caracterizados mediante los parámetros de la recta resultante, de pendiente 0,0451 y su intercepto 0,0135; valores analizados estadísticamente, y sus resultados

son presentados en la Tabla.^{14,5,9,12} El valor de la pendiente, está relacionado con la sensibilidad del método espectrofotométrico, es decir cambios de absorbancia al cambiar las concentraciones del analito, para este caso es estadísticamente significativo ($P < 0,05$), además, la desviación estándar relativa (RSD) es menor del 2% y los límites de confianza no incluyen a cero (0,0455 – 0,0446). Para la situación del intercepto; 0,0135; relacionado con la variabilidad del método, su valor es diferente de cero ($P < 0,05$); y los límites de confianza no incluyen a cero, pero está muy cercano de él, por lo que es aceptable. Este comportamiento conduciría a errores cuando las concentraciones serían muy bajas, situación que para este caso no es considerable, ya que el trabajo se realiza a absorbancias mayores de 0,1. El coeficiente de correlación (r) encontrado es de 0,9999 ($P < 0,05$), valor que según la AEFI⁵ debe ser mayor de 0,99. El porcentaje de variabilidad de absorbancia explicada por la concentración o viceversa es cuantificado por el coeficiente de determinación (r^2), es decir que para este caso 0,9997; el 99,97% de los valores de concentración son explicados por la absorbancia o viceversa, es decir valor aceptable.^{4-6,12}

La Farmacopea de los Estados Unidos de Norte América (USP)⁶ recomienda presentar los valores de la suma de cuadrados residuales, 0,0003, valor muy cercano a cero, que se sucede cuando r^2 es igual a uno.

El factor respuesta (f) expresa la relación entre la respuesta (absorbancia) y la concentración y puede tomarse como una expresión aproximada de la sensibilidad de calibrado. En una calibración lineal los factores de respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente. El valor encontrado para el sistema instrumental es 1,8295%, menor de lo recomendado, menos del 2%.⁵

La precisión refleja la medida en que los valores de una serie repetida de ensayos analíticos que se realizan sobre una muestra homogénea son semejantes entre sí, y es expresada, con la desviación estándar relativa (RSD)⁵. Según la FDA², se debe considerar a la precisión intra-ensayo llamada repetibilidad,

que es la capacidad de repetir el mismo procedimiento con el mismo analista, usando el mismo reactivo y el equipo en un corto intervalo de tiempo, por ejemplo dentro de un día; esperándose resultados similares. Además se debe evaluar la precisión inter-ensayo o reproducibilidad, que es la capacidad de repetir el mismo método bajo condiciones diferentes, por ejemplo cambio de analista, equipo o reactivos; para este estudio se consideró dos analistas, dos equipos y tres días diferentes. Los resultados para el sistema instrumental, son mostrados en la Tabla 2, donde se observa que para repetibilidad y reproducibilidad los valores de la RSD; 0,4847 y 0,93 son menores que el valor máximo aceptable 2,74 sugerido por la AEFI.^{5,12}

En lo que respecta a la exactitud, el RSD 0,59 es menor del máximo valor aceptable 2% y la pendiente de la recta obtenida de la relación entre las concentraciones estimadas y reales es 0,9923; valor cercano al deseado de 1. Además, los intervalos de confianza al 95%, 1,0045 y 0,9802 están alrededor de 1, cumpliéndose con los criterios de aceptación.⁶

Así mismo en la Tabla 2, se presentan los resultados de especificidad y rango, para el sistema instrumental. Considerando que la isoniacida en tabletas es estable y que los parámetros de validación: linealidad, precisión y exactitud para el método cumplen con los criterios de aceptación, se infiere que el método es específico; situación que es respaldada por la formación del complejo hidrazona al reaccionar la isoniacida con la vainillina en medio ácido, reacción que requiere de la presencia de un grupo hidracina, específico de la isoniaida.^{4,9}

El valor del rango de cuantificación establecido para este método fue de 33,3% - 166,7%; el cual enmarca al sugerido por este caso; 80% - 120%.^{2,5,7}

En las tablas 3 y 4 se presentan los resultados para los mismos parámetros de validación discutidos anteriormente, pero para la validación del método, donde los valores son semejantes a los del sistema instrumental, para linealidad, precisión, exactitud, especificidad y rango, los cuales cumplen con los criterios de aceptación propuestos por la

FDA para este tipo de estudios, confirmando la no influencia de los componentes de la formulación.^{2,5}

Después de evaluar los parámetros de validación del método espectrofotométrico para la cuantificación de isoniacida en tabletas usando vainillina, se concluye que los parámetros linealidad, precisión, exactitud, especificidad y rango de cuantificación; cumplen con los criterios establecidos para validar métodos analíticos, y por tanto es útil para cuantificar isoniacida en tabletas de 100 mg en el rango de 33,3% a 166,7%.

Conflicto de intereses: No declara.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ermer J. Validation in pharmaceutical analysis. Part. I: An integrated approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001; 24: 755-767.
2. Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation. Draft Guidance. Food and Drug Administration. July 2000. [en línea]. [Citado 2014 Marzo 19]. Disponible en URL: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/01424gl.pdf>.
3. Cámara C. Editora. Toma y tratamiento de muestras. Madrid. Editorial Síntesis S.A. 2004. p. 37-90.
4. Ermer J. Analytical Validation within the Pharmaceutical Environment. En: Ermer J, Miller J (editors). *Method Validation in Pharmaceutical Analysis* [libro electrónico]. Weinheim: Edit. Iley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005. p. 3-19 Pharmaceutical.
5. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de Métodos Analíticos [libro electrónico]. AEFI - Sección Catalana. Barcelona; 2001 [consultado: 04 de Diciembre de 2012]. p. 57-85. http://www.aefi.org/detalle-publicacion.asp?id_publicacion=78
6. Farmacopea de los Estados Unidos de América – USP 36 – NF 31. Vol. 1 [libro electrónico]. Rockville; The United States Pharmacopeial Convention; 2013. p. 1093-1099.

7. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. November 2005. [en línea]. [Citado 2014 Marzo 19]. Disponible en URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf
8. MINSA. Actualización del sub numeral 7. Tratamiento de la tuberculosis de la NTS N° 041-MINSA/DG SP-V. 01. “Norma Técnica de Salud para el Control de la Tuberculosis” aprobada por R.M. N° 383-2006/MINSA. Resolución Ministerial N° 579/MINSA del 16 de Julio de 2010. (16-07-2010).
9. Florence E. Spectrophotometric determination of Isoniazid in pure and pharmaceutical formulations using vainillin. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2010; 2 Sppl 2: S55-58.
10. Eidus L. and Harnanansingh A. A More Sensitive Spectrophotometric Method for determination of Isoniazid in Serum or Plasma. *Clin Chem.* 1971; 2 (6): 492-494.
11. Ministerio de Salud del Perú [Página principal en internet], Lima: Dirección General de Salud de las Personas; 2012 [actualizada en diciembre de 2012; acceso 04 diciembre 2012]. http://www.app.minsa.gob.pe/bsc/Detalle_IndBSC.asp?lcind=19&lcobj=4&lcper=1&lcfreq=1/10/2013
12. Chow Ch. Potency Method validation. En: Chow Ch, Lam H, Lee Y, Zhang X. (editors). *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification* [libro electrónico]. New Jersey: Edit. Jhon Wiley & Sons, Inc., 2004. p. 16-26.