

# TRABAJOS DE COLABORACION

LABORATORIOS LANDERLAND, S. A. E.

DEPARTAMENTO DE CONTROL

DIRECTOR: D. CARRIAZO

## SEPARACION Y DETERMINACION DE "VITAMINA B<sub>1</sub>" SIN EMPLEO DE FLUOROMETRO

por

D. CARRIAZO y A. RUIZ-PERMUY

Ars Pharm. IX, 343 (1968)

Son muy numerosos los métodos descritos para la valoración de la vitamina B<sub>1</sub>, y normalmente no presenta dificultad seleccionar el más idóneo para el problema que nos ocupa, en la amplia bibliografía que existe al respecto. En ella se describen métodos biológicos, microbiológicos, polarográficos, cromatográficos, colorimétricos, espectrofotométricos, gravimétricos, volumétricos en medio acuoso o anhidro y, en especial, uno sumamente específico conocido como método del tiocromo, que en esencia consiste en oxidar la vitamina en medio alcalino y medir la fluorescencia del tiocromo producido.

En el caso de la vitamina B<sub>1</sub> pura, la Farmacopea Española indica el uso de NaOH 0,1 N en presencia de azul de bromotímol. Métodos volumétricos indican, también las farmacopeas Inglesa y Francesa, junto con una gravimetría con ácido sílico-túngstico. La Farmacopea de los Estados Unidos, en sus dos últimas ediciones, describe el método fluorométrico.

Estos métodos son también aplicables a los preparados farmacéuticos en cuya composición interviene la vitamina B<sub>1</sub>, bien sola o asociada a otros principios, que por su naturaleza no interfieren en el método elegido.

Si la complejidad de la fórmula aumenta o disminuye la concentración de la vitamina B<sub>1</sub> frente a otros fármacos, la reacción

del tiocromo es insustituible y a ella hay que acudir para poder resolver el problema.

El procedimiento es cómodo, fácil y bastante rápido, presentando, quizás como único inconveniente, la necesidad de disponer, para la lectura, de un fluorómetro, aditado al espectrofotómetro, algo costoso, y cuya utilidad, en muchos casos, puede quedar limitada únicamente a esta valoración, ya que la vitamina B<sub>2</sub>, cuya determinación fluorométrica es también corriente es más fácil de resolver por presentar una marcada absorción en la región visible del espectro, o bien por el método de la lumiflavina.

Por esta razón encontramos en la bibliografía (6) medidas espectrofotométricas del tiocromo a 367-369 m $\mu$ ., utilizando soluciones problemas con una concentración de 20 a 150  $\mu$ g., por ml., con lo que se suple la posible falta de fluorómetro.

La vitamina B<sub>1</sub> puede ir acompañada (como sucede en el caso de comprimidos polivitamínicos) de principios activos que interfieren esta sencilla determinación, siendo entonces necesario proceder a su aislamiento en columnas de resina de cambio iónico. Tal sucede con los productos que presentan fluorescencia propia o inducida por la solución oxidante, o con aquéllos de carácter reductor que consumen el ferricianuro destinado a oxidar la tiamina.

Ambas interferencias se nos presentan en el caso de unos comprimidos polivitamíni-



cos, por lo que hubimos de proceder al aislamiento de la vitamina B<sub>1</sub> con Permutita T. En las condiciones descritas en la bibliografía (1-6), se obtiene un eluido con 1-2  $\mu\text{g./ml.}$ , de vitamina B<sub>1</sub>, concentración suficiente para proceder a la medida de la fluorescencia del tiocromo, pero demasiado bajo para su lectura espectrofotométrica, en la que, como indicábamos, se necesitaba una concentración mínima de 20  $\mu\text{g./ml.}$

Fue necesario estudiar las condiciones de la valoración hasta llegar a una solución de compromiso que nos permitiera aislar la vitamina, y proceder a la lectura de la misma en el espectrofotómetro.

Dos vías de trabajo se ofrecían: una, aumentar la concentración del eluido; otra, variar las condiciones especificadas en la lectura del tiocromo a 367-369  $m\mu$ .

La primera no resultó viable en ninguno de los casos planteados: disminución del volumen de elución, aumento de la muestra que se lleva a la columna, o variación de las medidas de la misma.

La segunda sí resultó factible, tomando como muestra la totalidad del eluido de la columna: 25 ml. con 10-50  $\mu\text{g.}$  de vitamina B<sub>1</sub> y aumentando a 5 ml. la cantidad de solución oxidante, se encontraron las mejores condiciones de sensibilidad del método.

A continuación detallamos el método, tal como se aplica actualmente a un gran número de nuestros preparados, y exponemos los resultados obtenidos. En I, las lecturas efectuadas con una solución patrón directamente y después de aislar en la columna de resina. En II, la aplicación a unos comprimidos polivitamínicos.

## METODO

### Reactivos:

- 1) Ferricianuro potásico 1 g/100 ml. de agua.
- 2) HaOH 20 por ciento en agua.
- 3) Solución oxidante: 1 ml. del reactivo número 1, más 9 ml. del reactivo número 2.
- 4) Isobutanol.
- 5) Sulfato sódico anhidro.
- 6) Permutita T de Decalso.

7) Solución de CIK ácida. Solución al 25 por ciento, que contiene 8,5 ml. de ClH de 37 por ciento por litro.

8) Acido acético al 3 por ciento en agua.

### Activación de la resina

Colocar la resina en un vaso de precipitados y cubrir con solución caliente de ácido acético al 3 por ciento, manteniendo la temperatura a 100° durante diez minutos con agitación frecuente. Dejar reposar y decantar el líquido sobrenadante. Lavar tres veces con solución de CIK caliente y finalmente lavar con agua caliente, hasta que los lavados no den reacción de cloruros. Desecar en estufa a 100° C.

### Solución problema

Diluir el problema en agua a una concentración aproximada de 2  $\mu\text{g./ml.}$ , ajustando el pH entre 3 y 4.

### Aislamiento

Llevar a una columna de 1 cm de diámetro (con unos 5 g de resina) 25 c.c. del problema y, a continuación, lavar con 3 x 10 ml. de agua caliente. Eluir la vitamina con 2 x 10 ml., mas 1 x 5 ml. de solución de CIK ácido en caliente, y completar a 25 c.c. en un matraz aforado.

### Lectura

Agitar durante 1 minuto los 25 ml. recogidos con 5 ml. de la solución oxidante. Agitar 2 minutos con 15 ml. de isobutanol. Dejar separarse las capas, despreciar la fracción inferior acuosa, y filtrar la capa alcohólica a través de sulfato sódico anhidro.

Este filtrado se lee a 367  $m\mu$ . frente a Isobutanol.

### Construcción de la gráfica

Preparar una solución con un patrón de vitamina B<sub>1</sub>, tal que quede a una concentración de 2  $\mu\text{g./ml.}$  y verificar las lecturas, tal como se acaba de indicar, con muestras de 20, 25 y 30 ml., después de tratar con la solución oxidante y extraer con isobutanol.

### Cálculos

Llevar las lecturas de los patrones a una gráfica: en la curva obtenida encontraremos



la cantidad correspondiente a la lectura efectuada en el problema.

### Resultados

I.—Con tiamina clorhidrato, se preparó una solución a concentración de 2  $\mu\text{g./ml.}$

Solución en ml.	Vitamina en $\mu\text{g.}$	Lect. Direc.	Pase Col.	Lect. Direc.	Pase Col.	Lect. Direc.	Pase Col.
25	50	0,085	0,085	0,112	0,115	0,093	0,095
20	40	0,060	0,062	0,090	0,088	0,076	0,080
15	30	0,046	0,044	0,067	0,064	0,058	0,052

La solución patrón fue la misma en las tres determinaciones. Las soluciones reactivas se prepararon en el día para cada una de ellas.

Las lecturas se efectuaron en un Beckman-DB. (Figura I).

II.—Los comprimidos citados anteriormente responden a la composición siguiente:

Desoxiofedrina clorhidrato	5 mg.
Pentobarbital	20 "
Acido Ascórbico	100 "
Vitamina B <sub>1</sub>	0,5 "
Vitamina B <sub>2</sub>	1 "
Acido Nicotínico	5 "
Metilcelulosa	162,5 "
Excipiente adecuado c.s.	

De una muestra de diez comprimidos pulverizados, tomar el peso correspondiente a un comprimido y llevar a 250 ml. con agua destilada, después de ajustar el pH entre 3 y 4 con ClH 0,1 N. De aquí tomar una muestra de 25 ml., que se lleva a la columna. Los 25 ml. que se recogen, se leen en las condiciones especificadas.

Preparar una solución patrón, como se indicada en "I" y representar gráficamente las lecturas correspondientes a muestras de 20, 25 y 30 ml. En esta gráfica encontramos la concentración del problema a partir de la DO obtenida. Indicamos resultados en varias experiencias.

y en pH de 4. De aquí se tomaron muestras duplicadas de 15, 20 y 25 ml., que se leyeron directamente. Otra serie de muestras análogas se llevó a la columna de resina antes de su lectura. Los resultados indicados corresponden a la media de cada par de determinaciones.

Experiencia	Lectura Problema	Lectura Patrón de 25 ml.
1	0,116	0,116
2	0,087	0,091
3	0,097	0,091
4	0,086	0,082
5	0,068	0,062
6	0,097	0,094
7	0,078	0,087
8	0,089	0,084

La diferencia más significativa se produjo en la experiencia número 7. Si se representa la gráfica de la solución patrón y se lleva a ella la lectura del problema encontramos una cantidad total de 45,5  $\mu\text{g.}$ , es decir, un 91 por ciento del valor teórico. En los restantes casos los resultados son casi análogos y en general superiores al patrón, lo que es lógico, dado que en el Departamento de Fabricación, se pesa un ligero exceso de producto al preparar la fórmula.

### RESUMEN

En el caso de soluciones de tiamina de una concentración de unos 1-2  $\mu\text{g./ml.}$ , procedentes de aislamiento en columnas de resina de cambio iónico, se propone una marcha de trabajo que permite proceder a la lectura espectrofotométrica del tiocromo producido al oxidar con una solución alcalina de ferricianuro. La exactitud se estima suficiente para las necesidades habituales de un Departamento de Control en la Industria Farmacéutica.



## SUMMARY

For the assay of Thiamine solution of 1-2  $\mu\text{g./ml.}$  concentration, obtained from isolation in ionic exchange resin columns, we propose a process which allows spectrophotometric reading of thiochrome produced by oxidation with an alkaline solution of ferricyanide. The results are sufficient for the usual needs of the Chemical Control in the pharmaceutical industrie.

## BIBLIOGRAFIA

1. Farmacopea Española, Tomo II, Edición IX, 1954, pág. 1.219.
2. Farmacopea Francesa, Edición VIII, 1965, pág. 1.215.
3. Farmacopea Estados Unidos, Edición XVI, pág. 751 y 909.
4. Farmacopea Estados Unidos, Edición XVII, 1965, pág. 713 y 888.

5. Farmacopea Inglesa, Edición 1963, página 50.
6. ROLF STROHECKER, Vitamin Essay, 1965, pág. 65.
7. E. KNOBLOCH, Vitaminbestimmungs Methoden, Akademie Verlag, Berlin, 1963, pág. 149.
8. Vitamins, E. Merck, pág. 36.
9. Higuehi. Pharmaceutical Analysis, 1961, pág. 656.
10. D. C. GARRAT, The Quantitative Analysis of Drugs, Chapman, Londón, Edición III, 1964, pág. 45 y 444.
11. The Merck Index, Seventh Edition, 1960, pág. 1.032.
12. Rhône Poubue, Produits Chimiques Pharmaceutiques, Tome IV, Edition II, 717.
13. CARL STEINIER, Analyse des Medicaments, Les Presses Universitaires, Liège, Edition III, 1964, pág. 561.