

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO COMPARATIVO PARA CUANTIFICACION
DE VITAMINA B₂ POR FLUOROMETRIA,
COLORIMETRIA Y CROMATOGRAFIA

MARIA DE LOURDES GOMEZ SORIANO
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1 9 8 0

M-21675



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE :

PRESIDENTE	EVELVINA MEDRANO DE JAIMES
VOCAL:	ANDRES ZUÑIGA PADILLA
SECRETARIO:	FERNANDO ABADIA CLEMENTE
1er. Suplente:	JOSE LUIS IBARMEA AVILA
2o. Suplente:	HECTOR JARA FARJEAT

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA :

LABORATORIOS ENDO DE MEXICO, S.A.

SUSTENTANTE:



MA. DE LOURDES GOMEZ SORIANO

ASESOR:

ANDRES ZUÑIGA PADILLA



SUPERVISOR TECNICO :



FERNANDO ABADIA CLEMENTE

A MIS PADRES, con mi eterna
gratitud, respeto y cariño.

A TOÑO, por su ayuda y ejemplo.

A mis Hermanas y a LALO
con cariño.

A mi amor, AGUSTIN, por tu cariño
y compañía ahora que te tengo con
migo para siempre.

Agradezco al Q.F.B. Andres Zúñiga Padilla
su dirección en el presente trabajo.

Muchas gracias al Q.F.B. Fernando
Abadía Clemente por su supervisión
y atenciones para la realización de
este trabajo.

Agradezco a los Laboratorios Endo
de México, S. A., por la ayuda pres
tada para el desarrollo de este traa
bajo.

I N D I C E

	pág.
OBJETIVO	1
GENERALIDADES	2
Historia	
Propiedades químicas y físicas	
Propiedades espectroscópicas	
Mecanismo de acción	
Acción farmacológica	
Aplicaciones terapéuticas	
Requerimientos humanos	
Deficiencia de Riboflavina	
Compuestos relacionados	
Fuentes de obtención	
PARTE EXPERIMENTAL	16
Fórmula del multivitamínico	
Métodos de análisis utilizados	
Técnicas	
RESULTADOS.....	27
Valoración:	

Método fluorométrico	
Método cromatográfico	
Método colorimétrico	
Tiempos de análisis	
Costos	
DISCUSION.....	35
CONCLUSIONES.....	41
BIBLIOGRAFIA.....	42

O B J E T I V O

El tener la confianza de que una forma farmacéutica reúne todas las cualidades necesarias para que cumpla con su fin fundamental de prevenir o curar una enfermedad, nos conduce a la necesidad de contar con una metodología adecuada que nos permita asegurar la calidad óptima de dicha forma farmacéutica.

Actualmente se busca realizar lo anterior considerando como punto importante el reducir los costos de operación en el área del laboratorio analítico. Esta razón nos llevó a planear y realizar el presente trabajo con el fin fundamental de poder contar con una técnica analítica rutinaria para cuantificar la Vitamina B₂ en forma de Riboflavina-5-fosfato de sodio en un producto multivitamínico inyectable y que este método cumpliera además con los requisitos de: exactitud, precisión y rapidéz.

Para ello se seleccionaron tres métodos diferentes a probar: un método colorimétrico, un método empleando cromatografía en capa fina para la separación de la vitamina y su posterior --cuantificación espectrofotométrica y el método fluorométrico oficial descrito en la United States Pharmacopoeia en su XIX edición.

Asimismo se hicieron las pruebas necesarias para poder determinar si alguno de éstos métodos reunía además condiciones --necesarias suficientes para poder usarlo como método analítico --indicador de estabilidad.

GENERALIDADES

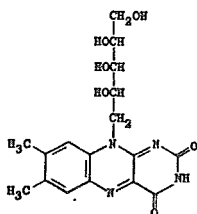
Historia.- La Riboflavina fue identificada primero en la leche por Blyth, en 1879. Se le dió el nombre de Lactocromo en razón de su intenso color amarillo. Posteriormente se aislaron compuestos amarillos de una gran variedad de sustancias y se les llamó flavinas, nombre al que se agregó la indicación del origen (lactoflavina, ovoflavina, hepatoflavina, etc.). Pronto se demostró que estas diferentes flavinas tenían la misma composición química.

Entretanto, se logró la separación de la vitamina B hidrosoluble en dos partes: el factor antiberiberi termolábil ó vitamina B₁ y el factor termoestable que favorece al crecimiento ó vitamina B₂. También se les denominó vitaminas F y G. Pronto se apreció que los concentrados de la llamada vitamina B₂ tenían color amarillo, cuya intensidad estaba relacionada con la actividad vitamínica. Se demostró también que la lactoflavina cristalizada tenía las mismas propiedades químicas que la sustancia pigmentada de los concentrados vitamínicos.

La vitamina fué designada con el nombre de Riboflavina por el Consejo de Farmacia y Química a causa de la presencia de ribosa en su estructura. Después el nombre se hizo oficial en la U.S.P.

Propiedades químicas y físicas. - El nombre químico de -

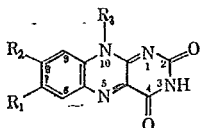
Ribloflavina¹⁶ es 7,8-dimetil-10-D-ribitil isoaloxazina ó 7,8-dimetil-10-(D-ribo-2,3,4,5-tetrahidroxipentil) isoaloxazina, su fórmula condensada $C_{17}H_{20}N_4O_6$. Tiene un peso molecular de 376.4 --- punto de fusión¹⁶ de 278-282°C con descomposición (se oscurece - a alrededor de 240°C). Su estructura química es la siguiente:



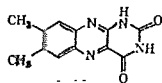
Se presenta como polvo cristalino amarillo o amarillo-naranja con ligero olor característico. Recristalizada de piridina, agua, alcohol o ácido acético 2N de agujas finas naranja-amarillas¹⁶. Rotación específica + 56.5° a +59.5° en una solución de 50 mg. por 10 ml. de HCl⁹ ó $[\alpha]_D^{25} - 112^\circ$ a -122° (50 mg. en 2 ml. de solución hidroalcohólica de hidróxido de sodio 0.1N diluído a 10 ml. con agua¹⁶. Su pH en solución saturada es de 5.5 a 7.2¹⁵. La solubilidad va de 1 en 3000 a 1 en 20000 en agua, dependiendo esta variación de su estructura cristalina interna que puede presentarse en tres formas¹⁵. Es más soluble en solución salina isotónica y en solución de urea al 10%; prácticamente insoluble en alcohol, benceno, acetona, cloroformo y éter ligeramente soluble en ciclohexanol, acetato de amilo y ---

Como se explicó anteriormente, la Riboflavina es muy susceptible a los agentes reductores, pero aún en ausencia de estos agentes externos la porción de isoaloxazina sufre una foto-reducción con ayuda de la cadena de ribosa que actúa como donador de electrones, pasando a la forma de leucoriboflavina.

Generalmente cuando esta forma de la molécula se oxida espontáneamente al exponerla al aire puede ocurrir una fragmentación para dar varios fotoproductos como indica la tabla siguiente:



COMPUESTO	R ₁ R ₂	R ₃
Riboflavina	-CH ₃	-CH ₂ (CH ₂ OH) ₃ -CH ₂ OH
Formilmetilflavina	-CH ₃	-CH ₂ CHO
Carboximetilflavina	-CH ₃	-CH ₂ COOH
Lumiflavina	-CH ₃	-CH ₃
Lumicromo		



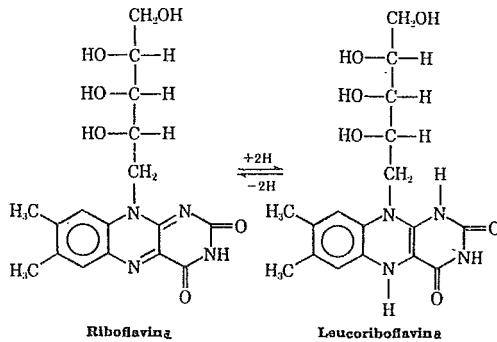
13

Propiedades espectroscópicas.- El espectro ultravioleta-visible de la Riboflavina en solución a pH 7 consiste en cuatro bandas principales centrales alrededor de 220, 266, 375 y 444 nm.

16
 fenol. Es muy soluble pero inestable en soluciones de álcalis -
 diluídos, se incrementa la solubilidad por compuestos aromáticos
 tales como la nicotinamida, probablemente porque existe la forma
 15
 ción de un complejo de solvatación intermolecular.

Es incompatible con álcalis y sales de metales pesados.
 Se debe conservar en envases resistentes a la luz, cuando se en-
 cuentra en forma de polvo seco no le afecta la luz difusa en --
 forma apreciable, pero en solución, especialmente en presencia -
 de álcalis, se deteriora rápidamente, siendo ésta deterioración
 15, 20
 acelerada por luz.

Presenta propiedades de óxido-reducción, se reduce en pre-
 sencia de ditionito de sodio, Zinc metálico en medio ácido y tri-
 cloruro de Titanio. 20

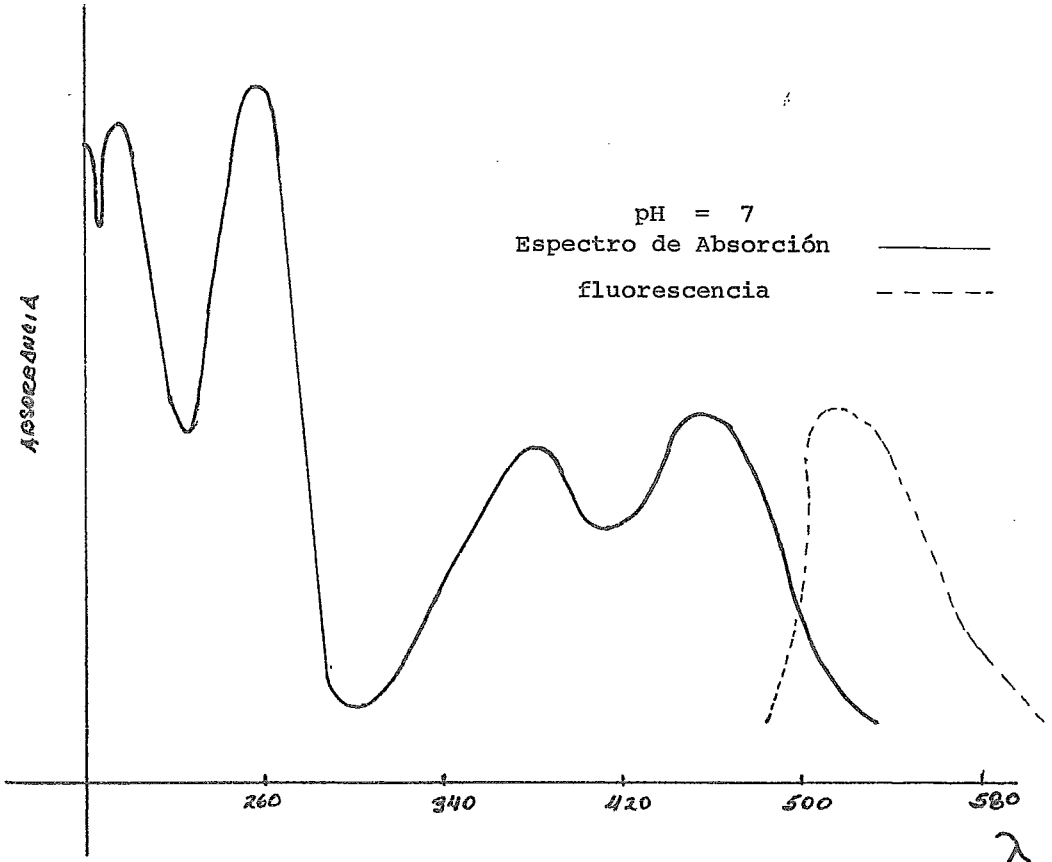


Respecto a esta propiedad de óxido-reducción la molécula
 de la Riboflavina sufre un fenómeno muy especial, una FOTOLISIS
 INTRAMOLECULAR o FOTORREDUCCION INTRAMOLECULAR. 13, III

La banda que da a 375 nm. se ve muy afectada por el disolvente que se use, generalmente cambiando a una longitud de onda mas corta a medida que se usen disolventes de menor polaridad.

La posición de la banda que se presenta en el visible a 444 nm. no se afecta apreciablemente.

Muestra una intensa fluorescencia con longitud de onda -- máxima de 530 nm. para emisión. Su espectro es el siguiente:



10,15

Absorción, destino y excreción.-

La absorción y excreción de la vitamina es esencialmente idéntica ya sea riboflavina ó su sal fosfato de sodio administrada oralmente. La absorción por vía parenteral es excelente en el sitio de aplicación.

La riboflavina formada de riboflavina-5-fosfato de sodio (flavinmononucleotido) o dada directamente como riboflavina base se convierte eventualmente a flavinmononucleótido en la mucosa intestinal fosforilandose enzimáticamente.

Absorbida la riboflavina, pasa a la sangre y se distribuye en todos los tejidos en donde se almacena en pequeñas cantidades. La concentración mas alta se encuentra en hígado, riñón y corazón, tal vez debido a su alto contenido de enzimas. En todas las células se transforma en mono y dinucleótido uniéndose a las proteínas del plasma quedando bien retenidas.

Cuando se administra por vía oral, cantidades por enzima de 50 mg, la concentración en el plasma se incrementa arriba de 300 ng/ml y del 20 al 40 % de la dosis de excreta en la orina.

Después de una inyección intravenosa de 84 mg., la concentración en el plasma se eleva a 1.8 mcg/ml y el 97 % de la dosis se excreta por la orina.

La eliminación de la riboflavina es resultado de excreción renal, excreción biliar, mínima secreción por otras vías (leche) e interconversiones a otras flavinas, coenzimas y flavoproteínas.

Puntualizando, la riboflavina se metaboliza parcialmente en el organismo y el exceso se excreta inalterada en la orina y en la leche.

En las heces siempre está presente la riboflavina debido a que probablemente se trate de riboflavina sintetizada por los microorganismos intestinales.

3, 10

Acción farmacológica.

La administración por vía oral o parenteral de la riboflavina no produce acción farmacodinámica manifiesta.

13

Mecanismo de acción

La riboflavina desempeña un papel importante en los sistemas enzimáticos relacionados con la respiración celular, u oxidaciones tisulares. Forma parte de las flavoproteínas flavinmononucleólido y flavinadenindinucleotido, enzimas que están constituidas por una proteína, la apoenzima y un grupo prostético - que es la riboflavina. Son necesarios para la oxidación de carbohidratos, aminoácidos, aldehídos y otros productos del metabolismo así como para conservar la integridad de los tejidos superficiales como piel y mucosas.

Gracias a la propiedad de la vitamina de oxidoreducción, la riboflavina presente en el sistema gana o pierde hidrógeno. Así el substrato, carbohidrato o aminoácido pueden oxidarse por

eliminación de hidrógeno.

El primer aceptor de hidrógeno en la cadena es nicotinade nindinucleotido. El sistema de riboflavina oxidada sirve entonces como aceptor de hidrógeno para el sistema de coenzimas y nuevamente es oxidada por el sistema de citocromos.

Finalmente el hidrógeno se pasa a un oxígeno para completar el ciclo oxidativo.

10

Aplicaciones terapéuticas.

La única aplicación terapéutica comprobada de la riboflavina es el tratamiento y la profilaxis de la arriboflavinosis o carencia de la vitamina.

La arriboflavinosis raramente ocurre como deficiencia aislada sin que acompañe a otras deficiencias nutricionales, especialmente la pelagra. Por tanto, el tratamiento de la arriboflavinosis debe incluir generalmente a los demás miembros del complejo B.

Siendo el papel que desempeña la riboflavina en los sistemas enzimáticos tan importante, es de llamar la atención como la carencia de la vitamina produce solamente fenómenos de naturaleza poco peligrosa. Problabmente se deba a la existencia de otras enzimas que suplen esa deficiencia.

10

Requerimientos humanos.

Los requerimientos de riboflavina están estrechamente re-

lacionados con el gasto energético. Los adultos normales requiereren alrededor de 1.3 a 1.8 mg diarios incrementandose durante la preñez y la lactación a 2.0 mg diarios.

Los niños necesitan 0.6 mg al día al nacer aumentando hasta los quince años en que llega a 2 mg diarios.

Dosis:

Profiláctica	1 a 4 mg diarios
Terapéutica	5 a 10 mg diarios
Rango usual U.S.P.	1 a 22 mg diarios

10

Deficiencia de Riboflavina: Arriboflavinosis

No en muchos lugares del mundo se tienen conocimiento de la existencia de arriboflavinosis.

En países como los Estados Unidos de Norteamérica, al Sur, India y China existen síntomas comunes de esta carencia que a su vez se favorece con la presencia de diarrea.

La carencia provoca trastornos principalmente:

- I. Bucales
- II. Cutáneos
- III. Oculares

I.- TRANSTORNOS BUCALES.- Queilosis que consiste en enrojecimiento, descamación y ulceración (fisura) de las comisuras de la boca.

II.- TRANSTORNOS CUTANEOS.- Dermatitis escamograsosa seborreica en la nariz, orejas y surco nasolabial.

III.- TRANSTORNOS OCULARES.- Queratitis, ardor en los ojos, lagrimeo, fotofobia, vascularización anormal en la unión esclerocorneana e invasión vascular de la córnea apareciendo opacidades que reducen la visión.

Como sucede en todos los casos de avitaminosis, la administración de la riboflavina en los casos de carencia de la misma hace desaparecer los transtornos correspondientes.

14

Fuentes de obtención.

La riboflavina se encuentra distribuída ampliamente en la naturaleza, en plantas, animales y sintetizada por microorganismos.

Los órganos que hacen una contribución importante de la riboflavina son principalmente el hígado, riñón y corazón de los animales.

Se tiene una pérdida moderada de la vitamina durante la cocción de los alimentos, carnes y verduras.

Algunos de los organismos que la sintetizan son:

Hongos : Ashbya gossypii, Eremothecium ashbyii,

Levaduras: Candida guillermondii, Candida spp :

Protozoarios: Chilemonas paramecium, Tetrahymena gleii,

Bacterias: Clostridium spp, Aerobacter spp, Azotobacter spp, Lactobacilus casei y algunas mas como las bacterias intestinales que la sintetizan en pequeñas cantidades.

Existen muchas evidencias que soportan la teoría de que una purina sirve como precursor obligatorio de la riboflavina en su biosíntesis.¹³

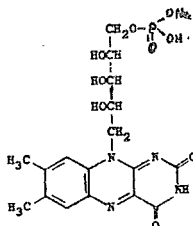
Esto se ha determinado con la incorporación de carbono 14 en bicarbonato y glicina utilizados por los microorganismos.

Compuestos relacionados

Flavoproteínas relacionadas

15,9,3

Riboflavina-5-fosfato de sodio



7,8-dimetil-10-(D-ribit-1-il)isaloaxazina 5-fosfato de sodio dihidratado.

C₁₇ H₂₀ N₄ Na O₉ P. 2 H₂O

P.M. 514.4

Descripción.- Polvo cristalino amarillo o amarillo naranja casi inodoro, higroscópico con ligero sabor característico.

Equivalencia.- 1.37 g de riboflavina 5-fosfato de sodio equivale aproximadamente a 1 g de riboflavina.

pH Una solución al 2 % en agua tiene de 4 a 6.3

Rotación específica.- 1.5 % en HCl 5N - 38° a - 42°

Solubilidad.- Soluble 1 en 20 de agua, muy ligeramente soluble en alcohol y dicloroetano, poco soluble en acetona y acetato de etilo, prácticamente insoluble es éter.

Salvo estas propiedades que difieren de la riboflavina base, todas las mencionadas anteriormente son las mismas que presenta la riboflavina 5-fosfato.

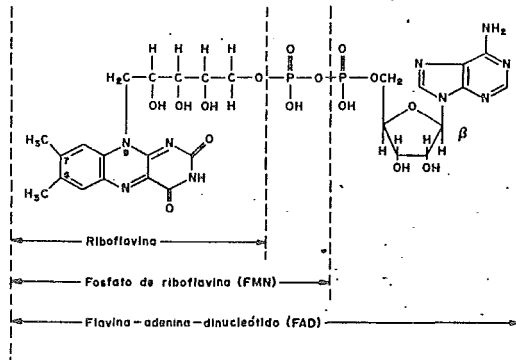
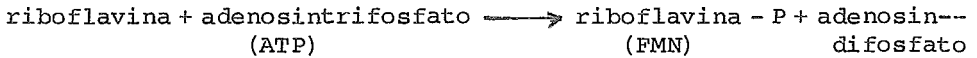
Algunas sustancias afines a la riboflavina también poseen actividad fisiológica, pero no se pueden hacer variar mucho la estructura de la vitamina sin provocar su inactividad.

De todas las cadenas laterales que han sido unidas al nitrógeno en la posición 10 solo las moléculas que contienen ribosa o arabinosa manifiestan actividad vitamínica.

La presencia del grupo metilo en 7 y 8 también es esencial. Si faltan ambos grupos metilo el compuesto se comporta como antagonista de la riboflavina.

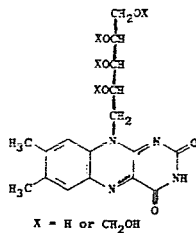
Las funciones de la riboflavina en el organismo se realizan en forma de sus coenzimas, el FLAVIN MONO NUCLEOTIDO (FMN) o riboflavina 5-fosfato y el FLAVIN ADENIN DINUCLEOTIDO (FAD).

La conversión de riboflavina en FMN y FAD se efectúan por las siguientes reacciones catalizadas por enzimas.



Metilolriboflavina¹⁶

(Hyflavina)



Mezcla de metilol (CH_2OH) derivados de riboflavina formados por la acción de formaldehído sobre la riboflavina en solución débilmente alcalina.

El número de grupos metilol en la cadena de ribosa varía de uno a tres.

Descripción.- Polvo naranja a amarillo, higroscópico. Puede tener un ligero olor a formaldehído.

Solubilidad.- Soluble en agua, prácticamente insoluble en alcohol, benceno, éter y cloroformo.

pH al 10 % en solución acuosa 6.7 a 7.9

Rotación específica.- Dextrorrotatorio

Estabilidad.- El polvo seco es inestable y pierde su actividad biológica, en el curso de varios meses con liberación de formaldehído y formación parcial de productos prácticamente insolubles en agua.

Dosis.- Se administra parenteralmente a infantes y adultos. Dosis recomendada 0.6 mg diarios a niños y se incrementa de 2 a 2.5 mg entre 13 y 20 años.

Aplicación terapéutica.- Se empleó como fuente de cofactor que utilizan algunas enzimas. Semejante a la Riboflavina.

FORMULA
DEL
MULTIVITAMINICO

A continuación se detallan los componentes de la formulación de la solución polivitáminica bajo estudio.

El hecho de que se trate de una solución facilita de manera notable la realización de la determinación analítica.

Cada ml contiene:

Riboflavina 5-fosfato de sodio.....	13.70 mg
equivalente a 10 mg de Riboflavina	
Clorhidrato de Tiamina.....	25.00 mg
Clorhidrato de Piridoxina.....	5.00 mg
Nicotinamida.....	50.00 mg
Pantenol.....	10.00 mg
Vehículo c.b.p.....	1.0 ml

PART E

EXPERIMENTAL

METODOS DE ANALISIS UTILIZADOS

1,2

GENERALIDADES

Para elegir cual de los métodos conocidos puede proporcionar mejores resultados con mayor rapidéz depende principalmente de la naturaleza de la muestra y el contenido previsto de riboflavina.

1,2

METODO FLUOROMETRICO

El método fluorométrico es más sensible que el colorimétrico por lo que se puede utilizar tanto en preparaciones farmacéuticas como en productos naturales.

Es un método reproducible unicamente cuando la solución problema se halla exenta de otras substancias fluorescentes. --

En la parte final del análisis se convierte la riboflavina a leucoriboflavina no fluorescente reduciéndola con ditionito de sodio, se determina la fluorescencia residual de la solución y el valor obtenido se resta de la lectura lograda antes de este tratamiento. En este paso debe emplearse en lo posible, la misma cantidad de ditionito para cada determinación y preferentemente no exceder los 20 mg. ya que una concentración salina demasiado alta puede afectar la fluorescencia.

1,2

METODO DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Posee las ventajas del método colorimétrico en cuanto a -

la determinación final de la vitamina. Aún mejor, al llevar a cabo una separación de la vitamina del resto de los componentes del multivitamínico eliminando las interferencias causadas por estos.

1,2

METODO COLORIMETRICO DIRECTO

Generalmente la medida directa del color intrínseco de la riboflavina suele ser suficiente para el análisis en preparaciones farmacéuticas. El color amarillo obedece a la ley de Beer a las concentraciones que se utilizan para la medición a 444 nm, - el intervalo óptimo es de 1 a 2 mg. de riboflavina por 100 ml.- por lo que el método se aplica solamente a concentrados de vitamina B₂ y medicamentos que la contengan en estas cantidades y - siempre y cuando no estén presentes en su formulación substancias coloreadas.

T E C N I C A S

18

METODO FLUOROMETRICO.

Preparación de reactivos y soluciones:

Solución del Estándar:

Pesar exactamente alrededor de 50 mg de Riboflavina Estándar de Referencia U.S.P., transferirlos en matraz volumétrico de 500 ml y disolverlos en aproximadamente 300 ml de ácido acético glacial 0.02 N con ayuda de calor. Enfriar y diluir al volumen con ácido acético glacial 0.02 N. De esta solución tomar una alícuota de 10 ml y transferirla a un matraz aforado de 100 ml. Llevar al volumen con ácido acético 0.02 N. Tomar una alícuota de 10 ml de la solución interior y llevarlos a un matraz volumétrico de 100 ml.; llevar al volumen con agua.

Solución del Problema:

Transferir una alícuota de la muestra que contenga aproximadamente el equivalente a 100 mg. de Riboflavina a un matraz volumétrico de 500 ml. y llevar al volumen con agua. De esta solución tomar una alícuota de 10 ml. y aforar a 1000 ml. con agua. De esta última dilución transferir una alícuota de 5 ml. y se aforan a 100 ml. con agua.

Solución de Permanganato de potasio.

Pesar 1 g de Permanganato de potasio y disolverlo en 25 ml de agua.

Solución de Peróxido de Hidrógeno.

Preparar una solución que contenga una parte de Peróxido de Hidrógeno al 30% por nueve partes de agua.

Procedimiento.

Pipetear en cada uno de cuatro tubos de ensayo una alícuota de 10 ml. de la solución problema e identificarlos como 1, 2, 3, y 4, respectivamente. A los tubos 1 y 3 se adiciona enseguida 1 ml. de la solución estándar y a los tubos 2 y 4 un ml. de agua. Enseguida agregar 1 ml. de ácido acético glacial a cada uno de los cuatro tubos. Finalmente ya para leer, adicionar 0.5 ml. de la solución de permanganato de potasio a cada tubo y se dejan reposar 2 minutos exactamente.

Transcurrido este tiempo agregar 0.5 ml. de la solución de peróxido y agitar los tubos vigorosamente hasta desaparecer el color rosa y las burbujas. Tan pronto desaparezcan éstas se procede a vaciar las soluciones en las cubetas del fluorómetro y se lee la fluorescencia que emiten empezando por los tubos 2 y 4.

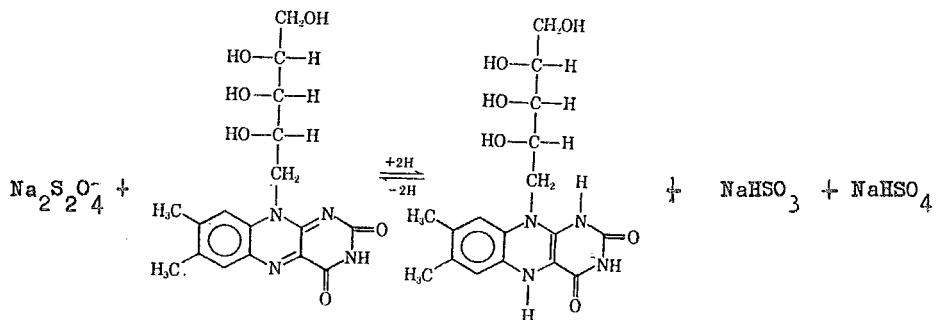
Se regresan las soluciones a los tubos originales respectivos. Enseguida leer nuevamente las soluciones después de adicionar 20 mg de ditionito de sodio (Hidrosulfito de sodio) $(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4)$ a cada tubo, uno a la vez. Debe agregarse rápidamente el ditionito, agitar fuertemente y leer en el curso de 5 a 10 segundos a partir de la adición.

Durante la preparación de las soluciones de riboflavina deben cubrirse con tela oscura ó una protección para evitar la incidencia de la luz.

Los filtros del fluorómetro son de alrededor de 365 nm en

MECANISMO DE REACCION

Método fluorométrico



la entrada y de 435 nm en la salida.

El fluorómetro se ajusta a cero con aire o sea sin cubeta en la parte que le corresponde.

Calculos.

$$\text{mg de Riboflavina/ml} = \frac{I_u - I_b}{I_s - I_u} \times \frac{\text{mg de estándar}}{5} \times \text{pureza est.}$$

I_u = promedio de lecturas de los tubos 2 y 4 sin Ditionito de sodio

I_s = promedio de lectura de los tubos 1 y 3 sin Ditionito de sodio

I_b = promedio de lectura de los tubos 1, 2, y 3 y 4 con Ditionito de sodio.

17

METODO CROMATOGRAFICO.

Material y reactivos:

Placas de vidrio para cromatografía en capa fina 20x20 cm.

Se cubre las placas con silica gel GF₂₅₄ con un espesor de 0.25 mm .

Microjeringas

Cámara para cromatografía

Acido fórmico

Dietanolamina

Fosfato dibásico de sodio M/15

Preparación de las Soluciones:

Solución del Estándar

- Pesar 500 mg de Riboflavina U.S.P. Estándar de Referencia y se pasan a un matraz aforado de 50 ml., disolver con aproximadamente 30 ml. de ácido acético 0.020 N y con ayuda de calor. Ya disuelto completamente, enfriar y llevar al aforo con el mismo ácido. De esta solución tomar una alícuota de 10 ml. y transferir a un matraz volumétrico de 25 ml. aforado con agua.

Solución del problema.

Transferir un volumen de la muestra que contenga aproximadamente el equivalente a 100 mg de Riboflavina y se llevan a un matraz aforado de 25 ml, llevar al volumen con agua.

Procedimiento:

En una placa de cromatografía previamente activada 30 min. a 105°C y dividida en cinco carriles se aplican por separado, -- 0.025 ml. de solución estándar y 0.025 ml. de la solución del -- problema, por duplicado, (hacer preferentemente dos estándares y dos problemas distintos) y el último carril se toma como blanco.

El ancho de la banda de aplicación no debe ser mayor de 0.5 cm.

Se introduce la placa en la cámara de cromatografía que previamente se ha dejado saturar una hora aproximadamente con un sistema de ácido fórmico: dietanolamina: fosfato dibásico de

sodio M/15 (3:1:5).

Cubrir la cámara con tela oscura y permitir que el sistema recorra la placa casi hasta el límite de la línea superior de la placa (el tiempo aproximado es de 60 minutos) y se saca de la cámara. Se evapora el disolvente con corriente de nitrógeno y protegiendo de la luz. Se observan las manchas bajo luz ultravioleta a una onda de 254 nm observandose una mancha amarilla de la riboflavina sobre un fondo verde y a una longitud de onda de 336 nm las manchas son fluorescentes. Inmediatamente se marcan los límites de las manchas en la silicagel y se raspan cuidadosamente transfiriendo cuantitativamente el polvo a matraces aforados de 10 ml llevar al aforo con agua destilada. Agitar perfectamente los matraces y centrifugar las soluciones a 3000 rpm durante 5 minutos.

Las soluciones perfectamente claras se leen en un espectrofotómetro adecuado a 444 nm y celdas de 1 cm usando como blanco la solución que se obtuvo del carril que se dejó libre para este fin.

Cálculos

$$\text{Mg de Riboflavina/ml} = \frac{\text{Abs. prob.}}{\text{Abs. est.}} \times \frac{\text{mg est.}}{50} \times \text{pureza est.}$$

11

METODO COLORIMETRICO DIRECTO

Preparación de reactivos y soluciones

Solución estándar

Pesar exactamente alrededor de 50 mg de Riboflavina Estándar

dar de Referencia U.S.P. y transferirlos a un matraz volúmetrico de 500 ml. disolverlos en aproximadamente 300 ml de ácido acético 0.02 N con ayuda de calor. Enfriar y diluir a 500 ml con el ácido acético 0.02 N. De esta solución transferir una alicuota de 10 ml a un matraz de 100 ml y aforar con agua.

Solución Problema

Transferir una alicuota de la muestra que contenga aproximadamente el equivalente a 100 mg de Riboflavina a un matraz aforado de 100 ml y llevar al volumen con agua. De esta solución transferir una alicuota de 1 ml a otro matraz aforado de 100 y se lleva al volumen con agua.

Solución de Hidróxido de sodio 1 N

Pesar 40 g de hidróxido de sodio R.A. y se lleva a un matraz aforado de 1000 ml. Se lleva al volumen con agua.

Solución de Acido Acético 5 N.

Llevar 290 ml de ácido acético glacial a un matraz volumétrico de 1000 ml y se afora con agua.

Procedimiento.

Al realizar la segunda dilución de las soluciones estándar y problema se adicionan 3 ml. de solución de hidróxido de sodio y 2 ml. de solución de ácido acético y se lleva al aforo con agua. Se leen las absorbancias de las soluciones en un espectro

fotómetro adecuado a una longitud de onda de 444 nm y celdas de 1 cm utilizando agua como blanco.

Durante todo el procedimiento de preparación de las soluciones de Riboflavina se les debe cubrir de la luz.

Cálculos.

$$\text{mg de Riboflavina/ml} = \frac{\text{Abs. Prob.}}{\text{Abs. Est.}} \times \frac{\text{mg Est.}}{5} \times \text{pureza del est.}$$

RESULTADOS

RESULTADOS DE LA VALORACION DE RIBOFLAVINA-5-FOSFATO DE SODIO
COMO RIBOFLAVINA POR EL METODO FLUOROMETRICO

Se llevaron a cabo 25 determinaciones de la vitamina sobre el multivitamínico dando los resultados siguientes en porcentaje basados en el contenido teórico de Riboflavina, que es de 11.50 mg/ml.

95.98	103.40
96.42	95.73
100.54	94.36
96.90.	98.27
95.23	96.69
100.86	96.69
103.04	95.03
101.45	95.41
97.82	92.98
100.00	97.51
96.86	101.78
100.79	100.63
97.10	

$$\bar{x} = 98.06 \%$$

límites de confianza al 95 %

$$\sigma = 2.8465$$

$$t = 2.06$$

$$\frac{\sigma}{\sqrt{N}} \times t = \frac{2.8465 \times 2.06}{\sqrt{25}} = 1.1727$$

$$98.06 \pm 1.1727 \%$$

RESULTADOS DE LA VALORACION DE RIBOFLAVINA 5 FOSFATO DE SODIO
 COMO RIBOFLAVINA POR EL METODO CROMATOGRAFICO

Se llevaron a cabo 25 determinaciones de la vitamina sobre el multivitamínico dando los resultados siguientes en porcentaje basados en el contenido teórico de Riboflavina que es de 11.50 -- mg/ml.

90.96	99.69
92.04	92.91
93.91	96.14
97.97	95.89
96.39	94.70
96.39	101.55
96.90	98.59
98.17	95.69
96.90	100.60
98.81	101.73
103.01	94.68
103.09	98.48
100.68	

$$\bar{x} = 97.38 \%$$

límites de confianza al 95 %

$$\sigma = 3.3484$$

$$t = 2.06$$

$$\frac{\sigma \times t}{\sqrt{N}} = \frac{3.3484 \times 2.06}{\sqrt{25}} = 1.3795$$

$$97.38 \pm 1.3795 \%$$

RESULTADOS DE LA VALORACION DE RIBOFLAVINA 5 FOSFATO DE SODIO
 COMO RIBOFLAVINA POR EL METODO COLORIMETRICO

Se llevaron a cabo 25 determinaciones de la vitamina sobre el multivitamínico dando los resultados siguientes en porcentaje basados en el contenido teórico de Riboflavina que es de 11.50 -- mg/ml.

99.99	99.62
98.29	98.38
99.73	99.87
99.47	99.37
100.25	99.62
99.38	99.37
99.39	98.38
102.08	101.90
97.17	102.65
98.91	101.65
99.87	101.40
97.63	100.90
99.37	

$$\bar{x} = 99.79 \%$$

$$\sigma = 1.3683$$

limites de confianza al 95 %

$$t = 2.06$$

$$\frac{\sigma \times t}{\sqrt{N}} = \frac{1.3683 \times 2.06}{\sqrt{25}} = 0.5637$$

$$99.79 \pm 0.5637 \%$$

RESULTADOS DE LA VALORACION DE RIBOFLAVINA 5 FOSFATO DE SODIO SOBRE UNA MUESTRA DEL MULTIVITAMINICO CON TRES AÑOS DE ELABORACION MANTENIDA A TEMPERATURA AMBIENTE.

Se realizaron cinco determinaciones de Riboflavina 5 fosfato de sodio como Riboflavina, los resultados se expresan en - mg/ml

METODO FLUOROMETRICO

13.05	mg/ml
12.24	"
12.24	"
12.16	"
13.74	"

METODO CROMATOGRAFICO

11.77	mg/ml
11.82	"
11.36	"
11.72	"
11.14	"

METODO COLORIMETRICO

11.84	mg/ml
11.84	"
11.84	"
11.65	"
11.79	"

TIEMPO DE ANALISIS REQUERIDO PARA REALIZAR LA
VALORACION DE LA RIBOFLAVINA POR CADA UNO DE
LOS TRES METODOS

METODO FLUOROMETRICO

DILUCIONES REALIZADAS	Estándar	50 mg	→	500 ml	(100 mcg/ml)
		10 ml	→	100 ml	(10 mcg/ml)
		10 ml	→	100 ml	(1 mcg/ml)
	Problema	10 ml	→	500 ml	(200 mcg/ml)
		10 ml	→	1000 ml	(2 mcg/ml)
		5 ml	→	100 ml	(0.1 mcg/ml)

PREPARACION DE MUESTRAS Preparar cuatro tubos por cada problema.
Adición de reactivos y reposo.

LECTURA DE SOLUCIONES Después de leer la absorbancia de cada
tubo se realiza una mas posterior a la -
adición del agente reductor.

TIEMPO ESTANDAR REQUERIDO: 80 minutos

METODO CROMATOGRAFICO

DILUCIONES REALIZADAS	Estándar	500 mg	→	50 ml	(10 mg/ml)
		10 ml	→	25 ml	(4 mg/ml)
		0.025 ml	→	10 ml	(10 mg/ml)
	Problema	10 ml	→	25 ml	(4 mg/ml)
		0.025 ml	→	10 ml	(10 mg/ml)

PREPARACION DE PLACAS
APLICACION DE SOLUCIONES
ELUCION DE LAS BANDAS DE RIBOFLAVINA
CENTRIFUGADO DE LAS SOLUCIONES

TIEMPO ESTANDAR REQUERIDO: 70 minutos

METODO COLORIMETRICO

DILUCIONES REALIZADAS

Estandar 50 mg \rightarrow 500 ml (100 mcg/ml)10 ml \rightarrow 100 ml (10 mcg/ml)Problema 10 ml \rightarrow 100 ml (10 mcg/ml)1 ml \rightarrow 100 ml (10 mcg/ml)TIEMPO ESTANDAR REQUERIDO: 30 minutos

NUMERO DE ANALISIS POSIBLES DE REALIZAR
EN SERIE UTILIZANDO CADA UNO DE LOS TRES
METODOS DE ANALISIS

Tomando en cuenta la susceptibilidad a la descomposición de la riboflavina en solución, se realizarían los siguientes análisis de tal manera que el tiempo que transcurre durante su elaboración no afecta seriamente a la vitamina.

<u>METODO DE ANALISIS</u>	<u>No. DE ANALISIS EN SERIE</u>
FLUOROMETRICO	2
CROMATOGRAFICO	2
COLORIMETRICO	5

COSTO DE CADA UNO DE LOS METODOS DEANALISIS

Tomando como base el costo hora-químico de \$ 78.00

METODO FLUOROMETRICO

Tiempo de análisis: 80 minutos

hora- químico	\$ 104.00
reactivos	\$ 4.00
total	<u>\$ 108.00</u>

METODO CROMATOGRAFICO

Tiempo de análisis: 70 minutos

hora-químico	\$ 90.00
reactivos	\$ 25.00
total	<u>\$ 115.50</u>

METODO COLORIMETRICO

Tiempo de análisis: 30 minutos

hora-químico	\$ 39.00
reactivos	\$ 5.00
total	<u>\$ 44.00</u>

D I S C U S I O N

D I S C U S I O N

Tomando en cuenta que el producto a valorar es la vitamina B₂ en forma de fosfato 5 de riboflavina que se encuentra formando parte de una solución inyectable polivitamínica y como en todo producto farmacéutico y más en aquellos que son de aplicación parenteral requieren de un estricto control de calidad muy especialmente en el renglón del control químico, es necesario -- contar con métodos de gran especificidad, así como de exactitud y precisión.

Los métodos usados para este estudio como ya se discutió con anterioridad son:

- METODO FLUOROMETRICO (USP)
- METODO CROMATOGRAFICO EN PLACA FINA
- METODO COLORIMETRICO

Cada uno de ellos tiene ventajas así como desventajas lo cual a continuación se expone.

METODO FLUOROMETRICO

Es el método mas sensible de los tres utilizados, alrededor de 0.1 mcg/ml de riboflavina.

En cuanto a especificidad, no se puede considerar que este método sea muy específico ya que existe en la formulación la tiamina que en su forma oxidada también emite fluorescencia e -- igualmente un producto de descomposición de ésta que es el tio--

cromo.

Por lo que respecta a la exactitud y precisión logrado con éste método se observa que no se tienen los mejores resultados -- con el.

Ventajas.

La sensibilidad tan alta del método (0.1 mcg/ml) pudiera - considerarse como una ventaja para la determinación, sin embargo, ya que en la preparación existe una concentración de riboflavina mas que suficiente para un análisis colorimétrico directo no re-- sulta tan ventajosa esta propiedad para esta preparación en particular.

Desventajas.

Se observó que por otra parte, debido a la concentración - tan pequeña necesaria para leer en el fluorómetro resulta un inconveniente ya que para disminuir la concentración de riboflavina de 10 mg/ml a 0.1 mcg/ml se requiere de una serie de diluciones para las que es necesario emplear mas tiempo que en cualquiera de los otros dos métodos.

Esta serie de maniobras hacen que la exposición de la vitamina a la luz sea inadecuada o la menos aconsejable para la riboflavina.

La presencia de un material fluorescente la vitamina B₁ --

(clorhidrato de Tiamina) presente en la formulación resulta una seria desventaja para la determinación debido a que se pueden -- falsear los datos obtenidos.

Para tratar de eliminar al máximo interferencias en éste análisis se realiza una purificación de la vitamina en la parte final, cuando se tienen las soluciones en los tubos, adicionando 0.5 ml de Permanganato de Potasio (1:25) y posteriormente adicionar 0.5 ml de agua oxigenada (3 %) para eliminar el exceso de -- permanganato de potasio. Al finalizar ésta operación se efectúa la lectura de las soluciones, una vez hecho esto se realiza una nueva lectura de cada tubo ahora reduciendo la riboflavina como ditionito de sodio o sea haciéndola no fluorescente para al to-- mar la lectura de la solución se tenga la fluorescencia debida a otro material.

Este último paso debe realizarse con mucho cuidado y rapidéz ya que la lectura solo se puede obtener de 5 a 10 seg. des-- pués de haber agregado el ditionito. Este valor influye mucho - al realizar los cálculos de la valoración por lo que es muy importante.

Como puede verse en los resultados obtenidos para este método se tuvo una variación muy alta debido en gran parte a este factor.

Finalmente, al emplear el análisis, tanto tiempo induce--

a un costo mas alto, mas del 50 % que el método colorimétrico.

METODO COLORIMETRICO DIRECTO

La sensibilidad que presenta el método colorimétrico directo es de 10 mcg de riboflavina/ml. Su especificidad es alta debido a que en el producto estudiado no existe ninguna otra substancia que intervenga en el análisis a la longitud de onda utilizada en la determinación.

La exactitud y precisión encontradas al utilizar éste método resultan muy aceptables y mejores que los otros dos métodos.

Ventajas.

Debido a la cantidad de riboflavina presente en el multivitamínico (10 mg/ml) resulta fácil obtener la concentración de la vitamina que requiere el método para la determinación (10 mcg/ml). Consecuente al utilizar menor tiempo de preparación de la solución problema se evita la exposición de la riboflavina a la luz, factor muy importante durante el análisis.

Al llevar a cabo la cuantificación de la vitamina se observa que los reactivos requeridos son mínimos resultando que el costo de éste en cuanto a reactivos es casi imperceptible. Asimismo considerando el tiempo utilizado para el análisis puede observarse una notable diferencia entre el costo horas-químico de ésta técnica analítica en comparación con las otras dos, por lo

tanto este método es mas barato que los otros.

También, se considera una ventaja mas el haber encontrado que el método colorimétrico directo puede utilizarse como método indicador de estabilidad para cuantificación de riboflavina en - este caso, previa separación cromatográfica.

Desventajas

Después de describir las características de ésta técnica, no se encuentra ninguna desventaja.

METODO CROMATOGRAFICO

En cuanto a especificidad del método ésta es alta ya que se realiza una separación completa de la vitamina B₂ del resto de vitaminas que están presentes en la solución polivitamínica, así como los posibles productos de degradación, impidiendo que exista alguna interferencia.

La exactitud y precisión resultante después de las determinaciones y estudio estadístico muestran que éste método no mejora los valores obtenidos para el método colorimétrico.

Ventajas.

De los tres métodos es el que presenta la mayor especificidad.

Desventajas

El tiempo requerido para el análisis a partir de la aplicación en la placa cromatográfica es alto aún sin tomar en cuenta el tiempo en el que el eluyente recorre la placa. Esta es -- una seria desventaja para la riboflavina pues se aumenta el riesgo de descomposición por la incidencia de la luz.

La cantidad de reactivos que se utiliza para ésta técnica es superior a los empleados en los otros dos métodos, factor muy importante que aumenta el costo del análisis. Igualmente, las - horas químico ocupadas son demasiadas. Esto da por resultado que este método llega a ser el más costoso de los tres utilizados.

Esta técnica emplea aparatos un tanto específicos tales - como: centrífuga, microjeringas, con lo que se observa que no se trata con una técnica muy adecuada para emplearse rutinariamente en el análisis de la riboflavina en el multivitamínico.

C O N C L U S I O N E S

Después de hacer el análisis de la parte experimental y de la discusión, las conclusiones del presente trabajo de tesis son:

1o. El método analítico mas adecuado para la valoración de la Riboflavina en la forma farmacéutica estudiada es el método - COLORIMETRICO DIRECTO ya que presenta varias ventajas ya descritas anteriormente sobre los otros dos métodos de análisis y que son: el menor costo, y mayor rapidéz, exactitud y precisión.

2o. Para poder ser usado como método indicador de estabilidad es necesario realizar una separación inicial de la Riboflavina por cromatografía en capa fina y después cuantificar la vitamina utilizando dicho método, siendo de esta forma una ventaja más de esta técnica de análisis.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Análisis de vitaminas Métodos comprobados
Strohecker, R. & Henning, H.M.
1a. Ed., pág. 120 a 150
Editorial Paz Montalvo
Madrid. (1967)

- 2.- Assay of Vitamins in Pharmaceutical Preparations
Manzur-UL-Haque-Hashmi
1st. edition, Págs. 105-122
John Wiley & Sons
London (1973)

- 3.- Bases Farmacológicas de la Terapéutica
Goodman, L.S. & Guillman, A.
4a. edición Pág. 1376-1377
Ed. Interamericana
México. (1974)

- 4.- British Pharmacopoeia 1973
Her Majesty's Stationary Office
Londres (1973)
Pág. 711-712

- 5.- Bristish Pharmaceutical Codex
1st Ed.
The Pharmaceutical press
London (1963)

- 6.- Control total de la Calidad.
Feigenbaum, R
7a. impresión pág. 230 a 461
Ed. C.E.C.S.A.
México, D.F. (1975)

- 7.- European Pharmacopeia
vol. 1 pág 356 - 357
France (1969)

- 8.- Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos
Sria. de Salubridad y Asistencia
4a. edición pág 1083
México, D.F. (1974)

- 9.- Farmacos 1973
Camara Nal. de Labs. Quim. Farm.
págs. 293 a 296

- 10.- Farmacología Experimental y Clínica
Litter, M.
5a. edición pág. 1102 a 1109
Ed. El Ateneo
México, D.F. (1977)

- 11.- Pharmaceutical Analisis
Higuchi, T., Hansen, E.B.
New York, U.S.A. (1961)
Interscience Publeshers
Págs. 660-668

- 12.- Pharmacopea Internationalis
1st. edition, pág. 76
vol II
Switzerland (1957)

- 13.- Riboflavin
Rivlin, R.
1st. edition
Ed. Plenum Press
New York, (1975)

- 14.- The Chemistry of the Vitamins
Dyke, S.F.
1st. edition, pág. 31-51
Ed. Interscience Publishers
(1965)

- 15.- Martindale The Extra Pharmacopoeia

- Wade, A.
27 th edition, pág. 1696
The Pharmaceutical press
London (1977)
- 16.- The Merck Index
9th, edition, pág. 795, 1065-1065
Merck and Co. Inc.
New York, (1976)
- 17.- Thin Layer Chromatography
Stahl, E.
2nd, edition, pág. 293, 296-297
Sringer-Verlag
New York (1969)
- 18.- The United States Pharmacopea
XIX ed.
Pág. 441
1975
- 19.- Vitamins and Coenzymes
Wagner, A.F.
1st, edition, pág. 46-71
Interscience Publishers
New York, U.S. . (1964)
- 20.- Remington's Pharmaceutical Science
Mack. Publishing Co.
15 5h edition, pág 593, 960, 963

ARTICULOS

- I Thaba E. Fahmy "Quantitative Separation of Riboflavin from Vitamin Mixtures", Journal of Pharmacy and Pharmacol. 17, 489 (1965)
- II Bealey L., & Alridge D.A., "The Determination of Riboflavin in Pharmaceutical Products", *J. Pharm. Pharmacol.* 8, 885, (1956)
- III William, L.C. & David, E.M., " Photochemical Degradation of Flavins ", Am. Chem. Soc., 93, 93 (1971)