



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

6

DETERMINACION POR CROMATOGRAFIA DE
LIQUIDOS DE ALTA PRESION DE NICOTINAMIDA
Y CLORHIDRATO DE PIRIDOXINA EN UN VINO
MEDICINAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

ARACELI PATRICIA PEÑA ALVAREZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Presidente, Prof. ETELVINA MEDRANO DE JAIMES
Vocal " HECTOR JARA FARJEAT
Jurado Secretario " RAFAEL ZENDEJAS GUIZAR
Asignatura 1er. Suplente" ARTURO PEREZ ALONSO
do según el Tema 2o. Suplente" JOSE LUIS IBARMEA AVILA

Sitio donde se desarrollo el tema:

LABORATORIOS SENOSIAIN, S.A.

Sustentante : ARACELI PATRICIA PEÑA ALVAREZ.

Asesor del tema: ETELVINA MEDRANO DE JAIMES

Supervisor técnico: GRACIELA SOSA GARCIA

A MIS PADRES

CON CARIÑO Y RESPETO.

A MIS HERMANOS.

A LA Q.F.B. MAGDALENA REBOLLAR

A MIS PROFESORES Y COMPAÑEROS.

MI AGRADECIMIENTO A LA
Q.F.B. ETELVINA MEDRANO DE JAIMES
POR SUS ATENCIONES Y SU VALIOSA -
ASESORIA.

DE UNA MANERA ESPECIAL AGRADEZCO
A LA Q.F.B. GRACIELA SOSA SU VA
LIOSA ASESORIA Y COLABORACION PA
RA LA REALIZACION DEL PRESENTE -
TRABAJO.

MI AGRADECIMIENTO AL IN-
GENIERO JUAN SENOSIAIN -
POR LAS FACILIDADES QUE-
ME BRINDO PARA EL DESA--
RROLLO DE ESTA TESIS.

C O N T E N I D O

- I.- INTRODUCCION
- II.- GENERALIDADES
- III.- MATERIALES Y METODOS
- IV.- RESULTADOS
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

Existen en el comercio muchos preparados - vitamínicos en forma de soluciones tales como elíxires, jarabes o vinos.

Generalmente estas preparaciones son mezclas complejas que además de las vitaminas contienen sales inorgánicas, colorantes, preservativos, etc.

De las vitaminas que más comúnmente se encuentran en las formas farmacéuticas mencionadas son: Nicotinamida, Clorhidrato de Piridoxina, Riboflavina y Clorhidrato de Tiamina. Los métodos de análisis existentes para cada una de las vitaminas son adecuados, sin embargo son complejos y en algunos casos tanto la preparación como el manejo de los reactivos necesarios requiere una atención especial debido a su inestabilidad y a sus propiedades caústicas.

Los métodos oficiales para la determinación de Clorhidrato de Tiamina y Riboflavina son fluorimétricos. Los que determinan Clorhidrato de Piridoxina y Nicotinamida son Colorimétricos y presentan el inconveniente de la inestabilidad de la coloración y principalmente de no ser específicos (la Niacina es incluida en los resultados como Nicotinamida debido a la hidrólisis de la muestra antes de la determinación).

La Cromatografía de Líquidos a alta Presión resulta atractiva para aplicarse en mezclas complejas como son los multivitamínicos, por su es

pecificidad, precisión, facilidad de la preparación de la muestra y corto tiempo en el que se pueden obtener análisis simultáneos.

Por estas razones se escogió para el presente estudio el desarrollo de un método por Cromatografía Líquida de alta Presión para la determinación de Nicotinamida y Clorhidrato de Piridoxina.

La Cromatografía es una técnica que hace posible la separación de una mezcla de compuestos, basada en la partición de la muestra entre una fase en movimiento, la cual puede ser un gas o un líquido y una fase estacionaria, que puede ser líquida o sólida.

En 1905, Ramsey utilizó por primera vez técnicas cromatográficas para separar mezclas de gases y vapores. Posteriormente en 1906 el botánico Ruso Tswett (1) empleó la cromatografía de elución utilizando una columna de vidrio empacada con CaCO_3 para separar los pigmentos de extractos vegetales. En esta columna introdujó el extracto vegetal disuelto en éter de petróleo; observando que a medida que adicionaba más éter este pasaba a través de la columna separándose bandas de diversos colores que correspondían a cada uno de los pigmentos del extracto (carotenos, xantofilas).

Para describir este fenómeno se introdujo el término de Cromatografía que literalmente significa "color escrito", no teniendo que ver nada esta separación con el color de los componentes, sino con la diferente afinidad de adsorción de los pigmentos hacia el CaCO_3 así, los que adsorben más débilmente avanzan con más rapidez a lo largo de la columna que los que lo hacen con mayor fuerza.

La Cromatografía permaneció ignorada por varios años, hasta que en 1930 el investigador Tiselius y colaboradores (2) introdujeron dos términos diferentes a la técnica de elución, que son el "análisis frontal" y el "análisis por desplazamiento", técnicas que hoy en día han caído en desuso.

En 1938 fue desarrollado el fundamento para Cromatografía en capa delgada por Izmailov y Schraiber (3) siendo refinada por Stahl en 1958 (4).

En 1941, Martin y Synge (5) introdujeron la Cromatografía de reparto (por lo que ganaron el premio nobel). Posteriormente Martin y James (6) en 1952 publicaron el primer artículo en cromatografía de gases, evolucionando rápidamente en una técnica analítica sofisticada.

Durante muchos años se practicó la Cromatografía "líquida clásica" que consiste básicamente en una columna de vidrio empacada con algún material como sílice, alúmina, azúcar, etc. cuyas partículas son por lo general de un tamaño reducido (cerca de las 200 milimicras), el procedimiento consiste en aplicar la muestra disuelta en el disolvente por medio de un cuenta gotas o de una micropipeta, agregando posteriormente el disolvente a través de la columna por efecto de la gravedad produciéndose apenas una débil presión ejercida por el volumen de la fase móvil.

Uno de los inconvenientes de esta técnica es el tiempo de análisis requerido, que va desde horas e incluso días; otra desventaja es que el material de empaque se utiliza una sola vez debido a que parte de la muestra se adsorbe en forma irreversible. Siendo el problema principal la identificación y la cuantificación de los componentes que eluyen de la columna disueltos en la fase móvil, se hace necesario el uso de técnicas auxiliares tales como: Espectrofotometría (Infrarojo, Masas, Resonancia, etc.) y análisis químicos.

Aproximadamente a partir de 1960 hubo gran interés en el desarrollo de la Cromatografía de Líquidos a alta Presión como una técnica complementaria a la Cromatografía de gases (7).

En la Cromatografía Líquida de alta Presión se usan columnas de diámetro reducido (2 a 4 mm), empacadas con materiales especiales cuyas partículas pueden tener un diámetro hasta de 5 micras. (8)

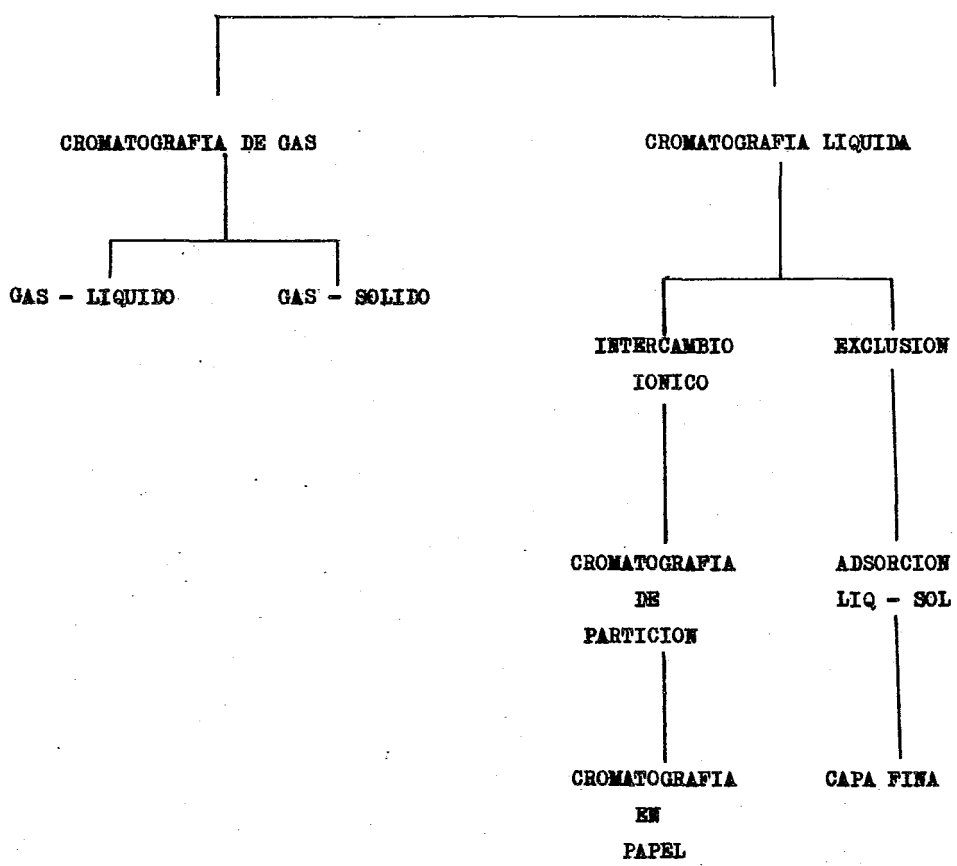
Al ser introducido este tipo de columnas se requirió el empleo de sistemas de bombeo de alta presión (hasta 400 atm.) que hicieran fluir la fase móvil a una velocidad razonable a través de la columna ya que este nuevo empaque ofrece una gran resistencia al flujo del disolvente.

Al igual que en la cromatografía de líquidos tradicional hay cuatro tipos básicos de interacción que pueden ser utilizados en Cromatografía de Líquidos a Alta Presión (9). Cada uno de ellos basado en diferentes mecanismos de separación de los componentes de la muestra.

- Cromatografía Líquido-Sólido
- Cromatografía Líquida por Exclusión
- Cromatografía por Intercambio Iónico
- Cromatografía de Partición (Líquido-Líquido)

Cromatografía Líquido-Sólido: Esta técnica depende de la adsorción del soluto en adsorbentes polares (sílica gel o alúmina), siendo la cromatografía en capa fina un ejemplo de esta separación.

C R O M A T O G R A F I A



Este tipo de cromatografía se aplica a moléculas de baja o alta polaridad cuyo peso molecular sea inferior a 1000.

Existe una variedad en este tipo de cromatografía denominada elución por gradiente o programación de la fase móvil, que se efectúa cuando hay una fuerte adsorción o retención de los componentes de la muestra en el sólido activo, entonces se aumenta la polaridad de la fase móvil en forma constante y uniforme con lo cual se logra un aumento en la solubilidad en los componentes de la fase móvil.

Cromatografía Líquida por Exclusión: Esta técnica es la única en que la separación está basada en el tamaño molecular del soluto. Este tipo de Cromatografía se conoce también como Cromatografía de filtración o de permeación y efectúa la separación de acuerdo al tamaño de partículas.

La columna se empaca con un gel cuyos poros son de tamaño similar al tamaño de las moléculas de la muestra, permitiendo que las moléculas pequeñas puedan penetrar dichos poros y quedar retenidos, en tanto que las grandes no.

El intervalo de pesos moleculares en que se puede trabajar en este tipo de cromatografía varía desde 2000 hasta varios millones.

Esta técnica es muy aplicada en el análisis de polímeros y otros compuestos de alto peso molecular.

Cromatografía por Intercambio Iónico: Esta separación se basa en la competencia de iones entre la fase móvil y la muestra iónica por los sitios o grupos activos de una resina intercambiadora de iones.

Este tipo de cromatografía se aplica a compuestos de un intervalo de pesos moleculares muy amplio (péptidos, aminoácidos), siendo una de las ventajas el poder variar la fuerza iónica o el pH para obtener la elución de los componentes de la mezcla en un tiempo razonable.

Cromatografía de Partición (líquido-líquido): Esta separación depende de la partición del soluto entre los solventes inmiscibles, uno de los cuales es fijo (fase estacionaria) y el otro es la fase móvil de ahí que los compuestos más solubles en la fase estacionaria sean selectivamente retenidos por ella, en tanto, que los menos solubles sean transportados más rápidamente por la fase móvil. El mayor de los inconvenientes de esta técnica era la solubilidad de la fase estacionaria en la fase móvil esto se evitaba por el uso de precolumnas(10) que contenían un alto porcentaje de fase estacionaria, hoy en día el uso de precolumnas ha sido sustituido, al introducirse una nueva técnica para el empaque de columnas de cromatografía líquida-líquida, en donde la fase estacionaria (polar o no polar) es recubierta en un soporte inerte y empacada en una columna y está siendo rápidamente una de las formas más usadas en cromatografía de líquidos a alta presión.

La Cromatografía de partición ya sea líquido-líquido o fase enlazada es nombrada "Fase Nor--

mal" si la fase estacionaria, es más polar que la fase móvil y "Fase Reversa" si la fase móvil, es más polar que la fase estacionaria.

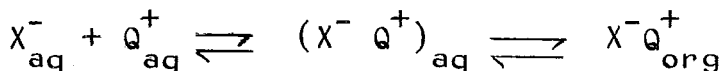
La Cromatografía de "Fase Reversa" presenta varias formas: Adsorción, Supresión Iónica, Ion-Par; siendo la de más uso la cromatografía de Ion-Par fase Reversa (11), en donde se usa una fase estacionaria hidrofóbica y un "Counterion" orgánico en la fase móvil (aminas orgánicas, sales de amonio, alquil y aril sulfonatos, alquil sulfatos).

El pH de la fase móvil es ajustado para maximizar la ionización del soluto, así el grado de ionización del ion-par.

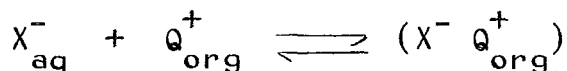
La fase móvil usada es generalmente una mezcla de agua o amortiguadores acuosos con un solvente orgánico miscible con agua (generalmente metanol o acetonitrilo).

En la Cromatografía Ion-Par fase reversa la muestra iónica X^{-n} más el counterion, Q^{+n} se combinan para formar un ión-par ($X^{-n} Q^{+n}$), el cual presenta afinidad por la columna de fase reversa que es retenida por ella (12).

Existen dos modelos fundamentales para la cromatografía de Ion-Par: El primero postula, que la muestra iónica se combina con el counterion en solución y participa en el proceso cromatográfico como un ion-par (13).



El otro mecanismo postula que la parte lipofílica del counterion es adsorbido en la fase hidrocarbónica del empaque de la columna. La muestra iónica entonces puede ser atraída a los sitios iónicos en la superficie lipofílica.



El tiempo de retención de un soluto en cromatografía líquida a alta presión esta dado por:

$$t_r = (L/u) (1 + K)$$

donde:

L = longitud de onda

u = velocidad lineal del eluente

K = factor de capacidad; $K = \frac{(XQ_{org}) V_s}{(X_{aq}) V_m}$

Para columnas de fase enlazada: V_s/V_m es cte. por lo tanto:

$$t_r = (L/u) (1 + K (X_{aq}^-))$$

Podemos ver que la retención no es controlada solo por la relación del volúmen de las dos fases y la temperatura (14), sino también por:

- a) el tipo, tamaño y concentración del counterion.
- b) el tipo y composición del modificador orgánico

- c) la fuerza iónica de la fase acuosa.
- d) el pH de la fase acuosa para sustancias ácido-base.
- e) la fase estacionaria de la columna.

La selectividad variará con todos estos factores ya que cualquier pequeño cambio en uno o más de estos factores, pueden afectar grandemente la separación.

El sistema ion-par tiene varias propiedades que pueden fácilmente ser adaptadas para diferentes tipos de muestras por una selección propia del tipo y concentración del counterion. Otra ventaja es la alta selectividad que puede ser obtenida.

Ventajas que presenta la Cromatografía Líquida a alta Presión:

- Velocidad
- Resolución
- Sensibilidad
- Columnas rehusables
- Ideal para moléculas grandes y especies iónicas
- Fácil recuperación de la muestra.

Velocidad:

El tiempo de análisis es muy corto

Resolución:

Por el uso de columnas selectivas y líqui-

dos móviles la cromatografía de líquidos a alta - presión puede suministrar resolución de muchos com puestos no volátiles que no responden a las técnicas de cromatografía de gases.

Sensibilidad:

Los detectores comunmente empleados de adsorción ultravioleta pueden detectar cantidades de nanogramos (10^{-9} g) de una gran variedad de materia les. Detectores de fluorescencia y electroquímicos pueden detectar cantidades en la región de picogramos (10^{-12} g). También se pueden usar detectores de índice de refracción y espectrofotómetros - de masas.

Recuperación de la muestra:

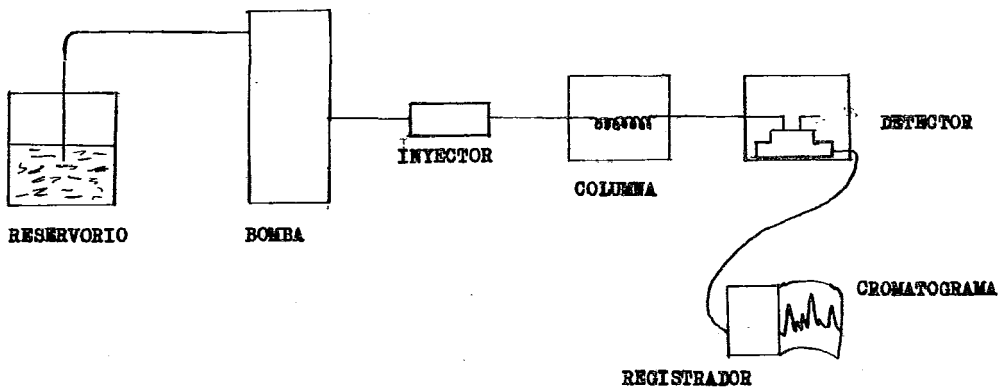
La mayoría de los detectores empleados no destruyen los componentes y pueden ser recolectados fácilmente después de pasar a través del detec tor.

Columnas Reusables:

Las Fases móviles utilizadas generalmente no alteran las características de la columna.

PARTES FUNDAMENTALES DE UN CROMATOGRFO DE LIQUIDOS

- BOMBA
- INYECTOR
- COLUMNA
- RESERVORIO PARA FASE MOVIL
- DETECTOR
- REGISTRADOR



MATERIAL Y METODOS

Reactivos:

- Metanol grado Reactivo
- Agua destilada
- Dioctil sulfosuccinato de sodio
- Acido Sulfúrico
- Nicotinamida Estandar
- Clorhidrato de Piridoxina estadar

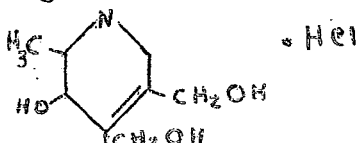
Aparatos:

Cromatógrafo de Líquidos de Alta Presión - Modelo 5000 Varian Aerograph equipado con un registrados y un Detector de luz Ultravioleta con longitud de onda variable (Varicrom).

Columna:

Para la determinación de vitaminas se utilizó una columna de acero inoxidable (35 x 4 mm), - empacada con una capa monomolecular de octadecil - triclorosilano enlazada con silica (Varian-MCH-10)

Para llevar a cabo la determinación de Ni-cotinamida y Clorhidrato de Piridoxina por cromatografía de líquidos a alta presión fue necesario - trabajar con un estandar, el cual, cumple con las - especificaciones indicadas en la Farmacopea (15). - Estas especificaciones se le determinaron, obte- - niéndose los siguientes resultados:



P.M = 205.64

Clorhidrato de Piridoxina (Vitamina B₆)

Descripción:

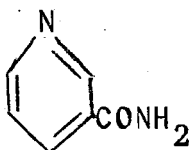
Polvo blanco cristalino, inodoro

Pérdida al secado: 0.0002%

Punto de Fusión: 200°C

Pureza: 99.28%

Identificación: Se determino el espectro de adsorción en el infrarojo encontrandose los picos característicos a 1536,- 1237 y 1207 nm.



P.M = 122.13

Nicotinamida

Descripción:

Polvo cristalino, inodoro, sabor amargo.

Pérdida al secado: 0.0001%

Punto de fusión: 127-128°C

Pureza: 101.05%

Identificación: Se determinó el espectro de adsorción en el infrarojo encontrándose los picos característicos a - 1300 y 744 nm.

Fundamento del Método.

Aparentemente la separación depende de la formación reversible del ion-par dentro del sistema cromatográfico y de las diferencias en la lipofilicidad del ion-par formado.

Inicialmente se trabajó con cada una de las vitaminas por separado para determinar su tiempo de retención y encontrar las condiciones óptimas para la separación.

En base a la información de la literatura (16,17,18) se trabajó con el siguiente sistema:

Fase móvil: Metanol - Agua (60:40)
Conc. del counterion: $5 \times 10^{-3}M$
Velocidad de la carta: 1 cm/min
Velocidad de Flujo: 2 ml/min
Presión de la columna: 174 atm.

Determinación de la longitud de onda.

Se probaron diferentes longitudes de onda en base a la curva de absorción de ambas vitaminas (19) a un pH de 2.5 (Fig. 1 y 2), observándose que al trabajar con el máximo de la Piridoxina (290 nm) la Nicotinamida presenta una absorptividad muy pequeña.

Se encontró que a 284 nm la respuesta del detector es favorable a las dos vitaminas. Por consiguiente se trabajó a esta longitud de onda que facilita la determinación simultánea de ambas-

CURVA DE ABSORCION DE
NICOTINAMIDA .

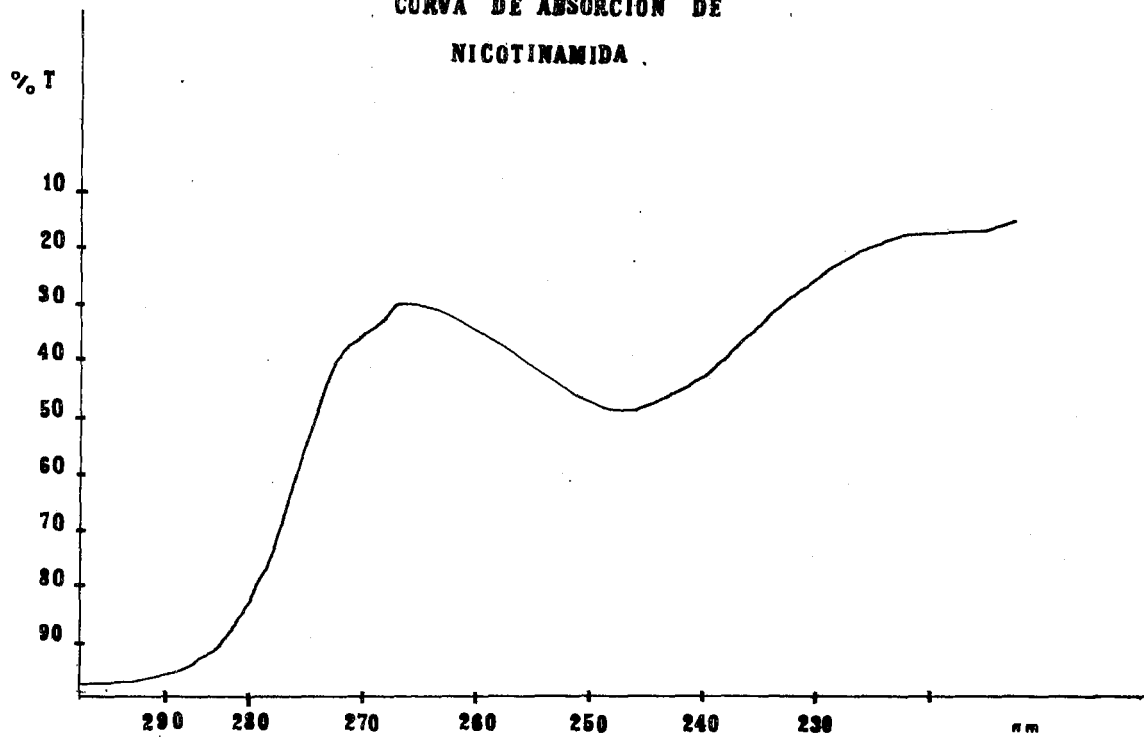


FIG. 1

CURVA DE ABSORCION DE
VITAMINA B₆

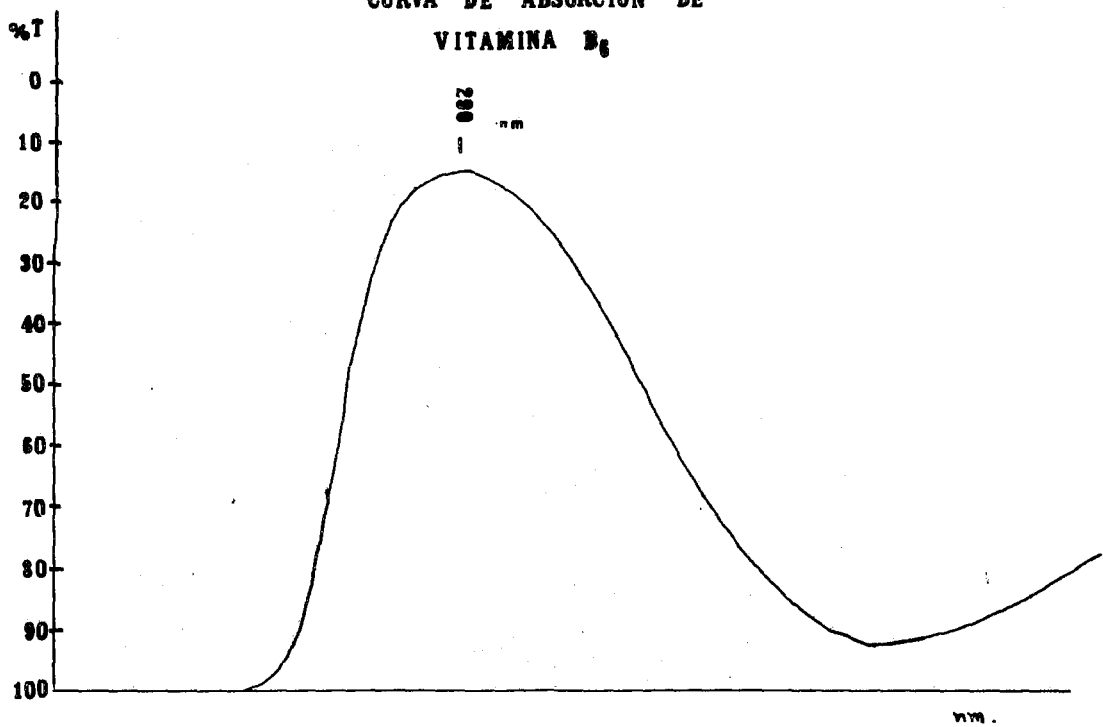


FIG. 2

vitaminas.

Con las condiciones anteriores se encontraron los siguientes tiempos de retención: Nicotinamida 4 min y Clorhidrato de Piridoxina 8.7 min.

Después de trabajar por separado cada una de las vitaminas se procedió a trabajarlas juntas, obteniéndose el cromatograma mostrado en la fig. - 3 observándose buena resolución y los tiempos de retención permanecieron constantes.

Generalmente las soluciones multivitamínicas orales contienen gran cantidad de vehículos - que pueden interferir en el análisis de las vitaminas. Por este motivo se preparó un vino suprimiendo las vitaminas en estudio con el objeto de ver - si alguno de los componentes presentaba el mismo tiempo de retención.

En este cromatograma (fig. 4) se pudo observar que aparentemente no había ningún compuesto con el mismo tiempo de retención.

Ya establecidas las condiciones de separación y haber obtenido los tiempos de retención para cada una de las vitaminas, se procedió a aplicar bajo las mismas condiciones de operación, la muestra de la solución multivitamínica seleccionada para el presente estudio. Presentando esta solución la siguiente formulación:

- Formulación No. 1 -

Vitamina B ₁₂	15 microgramos
Vitamina B ₆	5 mg.
Vitamina B ₂ (Riboflavina)	4 mg.
Vitamina B ₁ (Clorhidrato de Tiamina 4,329 U.l.).....	13 mg.
Nicotinamida.....	50 mg.
Vehiculo c.b.p.	100 ml.

Pudiéndose observar en el cromatograma una buena resolución para la Vitamina B₆, permaneciendo constante su tiempo de retención. En cuanto a la Nicotinamida no se obtuvo buena resolución, observándose que un compuesto eluye con un tiempo de retención muy cerca al obtenido para la Nicotinamida estandar, lo que impidió la separación.

Determinación de la Fase Móvil.

Se trabajó con diferentes proporciones en la fase móvil de Metanol-Agua con el objeto de modificar el tiempo de retención de la Nicotinamida y de esta manera separarla del compuesto que eluye cerca de ella.

Al variar la proporción de la fase móvil no se obtuvo ninguna mejoría en la resolución, ya que, el tiempo de retención del compuesto que interfería con la Nicotinamida no se ve afectado por estos cambios, debido a que los tiempos de retención variaban proporcionalmente, lo que no permiti-

tia la separación. Observándose también que al aumentar la proporción de agua en la fase móvil los tiempos de retención obtenidos eran muy grandes y se deformaba la forma de los picos haciendo difícil la cuantificación de las vitaminas.

Concentración del Counterion.

Utilizando la misma proporción Metanol - Agua (60:40) en la fase móvil se probaron diferentes concentraciones del counterion observándose variaciones en los tiempos de retención pero lográndose la separación de los compuestos.

Trabajando con una concentración de counterion más baja que la usada inicialmente se logró una buena separación para las vitaminas obteniendo se una disminución en los tiempos de retención obtenidos inicialmente.

En resumen se obtuyeron las siguientes condiciones de operación:

Fase móvil: Metanol-Agua (60:40)
 Conc. del Counterion : $3.5 \times 10^{-3} M$
 Velocidad de Flujo : 2 ml/min
 Velocidad de la carta : 1 cm/min
 Longitud de onda : 284 nm
 Presión de la Columna : 200 atm.
 Temperatura : Ambiente

Comportamiento de la Ley de Lambert-Beer.

Bajo las mismas condiciones de separación encontradas se determinó una curva de concentración para cada una de las Vitaminas para ver el comportamiento de la ley de Lambert-Beer.

Esta curva se elaboró con un intervalo de concentraciones de 0.1 mg/ml a 1 mg/ml para Nicotinamida y 0.08 mg/ml para Clorhidrato de Piridoxina.

De cada una de estas soluciones se inyectó con una microjeringa 10 ul obteniéndose los cromatogramas mostrados en la Fig. 5 y 6.

La cuantificación de las vitaminas se determinó relacionando el área de los picos de la sustancia problema con el área de los picos del estándar.

Con las condiciones de separación ya establecidas se determinó Clorhidrato de Piridoxina y Nicotinamida en las siguientes formulaciones existentes en el mercado.

Fórmula No. 2

Aspartato de Potasio.....	0.400 g.
Aspartato de Magnesio.....	0.400 g.
Vitamina B ₁₂	10 microgramos
d-Alcohol Pantotenílico.....	0.166 ml
Nicotinamida	0.100 g.

Vitamina B₆ (Clorhidrato
de Piridoxina)..... 0.010 g.
Vehículo c.b.p. 100 ml.

Fórmula No. 3

Clorhidrato de tiamina
(66,600 U.I.) 0.2 g.
Clorhidrato de Piridoxina.. 0.020 g.
Vitamina B₁₂..... 266.6 mg.
Acido Fólico 0.025 g.
Pirofosfato férrico..... 2.0 g
(equivalente a 230 mg de fierro)
Monoclorhidrato de L-Lisina.4.666 g.
Solución de Sorbitol 70 ml.
Vehículo c.b.p. 100 ml.

Fórmula No. 4

Clorhidrato de ciprohepta
dina 2 mg
Gluconato ferroso 100 mg
(equivalente a 11.6 mg de fierro)
Glucoheptonato de calcio... 250 mg
(equivalente a 20.4 mg de calcio)
Monoclorhidrato de L-Lisina.233.3 mg
Clorhidrato de Tiamina.....10 mcg.
Clorhidrato de Piridoxina... 2 mg.
Cianocobalamina15 mcg.

Sorbitol (solución al 70%)... 3 ml.

Fórmula No. 5

Totaquina 0.010 g.
 Vitamina B₁ 5561 U.I.
 Clorhidrato de tiamina..... 23 mg
 Vitamina B₂ 9 mg
 Nicotinamida112 mg
 Tintura de Nuez Vómica..... X gotas
 Vehículo c.b.p.100 ml.

Fórmula No. 6

Lactato de Calcio..... 3.06 g.
 (equivalente a 387.4 de Ca)
 Lactobionato de calcio..... 1.00 g.
 (equivalente a 47.39 mg de Ca)
 Vitamina B₁ 23 mg
 Nicotinamida.....112 mg.
 Totaquina 10 mg
 Tintura de Nuez Vómica X gotas
 Vehículo c.b.p.100 ml.

Preparación de la Fase Móvil

La fase móvil se prepara por la disolución de la sal ($3.5 \times 10^{-3}M$) en 600 ml de metanol, combinando la solución resultante con 400 ml de agua destilada y ajustando el pH a 2.5, utilizando ácido sulfúrico concentrado. Ya preparada la solución, se filtra por vacío antes de ser usada.

Preparación del Estandar.

La solución de la mezcla estandar se preparó a una concentración de 0.5 mg/ml de Nicotinamida y 0.05 mg/ml de Clorhidrato de Piridoxina.

Pesar 250 mg de Nicotinamida y 25 mg de Vit. B₆ disolver con la fase móvil en un matraz aforado de 100 ml y llevar a volumen.

Medir una alícuota de 5 ml de esta solución y colocarlos en un matraz aforado de 25 ml y se lleva al aforo con la fase móvil.

Preparación del Problema

Medir una alícuota del vino medicinal y se lleva a volumen con la fase móvil a obtener la concentración requerida. Si la concentración de las vitaminas en el problema es muy baja puede aplicarse directamente sin ser diluido.

Para este estudio se utilizó una concentración de 5×10^{-3} mg para Nicotinamida y 5×10^{-4} para la Vit. B₆ y el problema se aplicó directamente.

Procedimiento

Se determina la presión de trabajo de la columna dejando correr unos 30 ml aproximadamente de la fase móvil, posteriormente se determina la línea base y ya establecida se procede a la inyección de la muestra.

Con una jeringa Hamilton inyectar 10 ul de la solución estandar y dejar correr el programa hasta obtener el análisis (El análisis es obtenido en 8 minutos).

Posteriormente se aplica 10 ul de la muestra problema bajo las mismas condiciones que el estandar, obteniéndose el análisis cromatográfico en 12 min.

Existen diferentes métodos para determinar el área de los picos obtenidos en el cromatograma:

- Altura de los picos
- Triangulación
- Por medio del uso de un Planímetro
- Integrador DISC
- Corte y Peso de los picos

En la actualidad se cuenta con aparatos electrónicos (integradores digitales) que hacen esta función automáticamente durante la separación.

El área para cada uno de los picos en el cromatograma se determinó manualmente por el método de triangulación.

$$\frac{\text{Area de Nicotinamida Prob.}}{\text{Area de Nicotinamida Estandar}} \times \text{Conc. estandar Nicotinamida} \times 100 = \% \text{ Nicotinamida.}$$

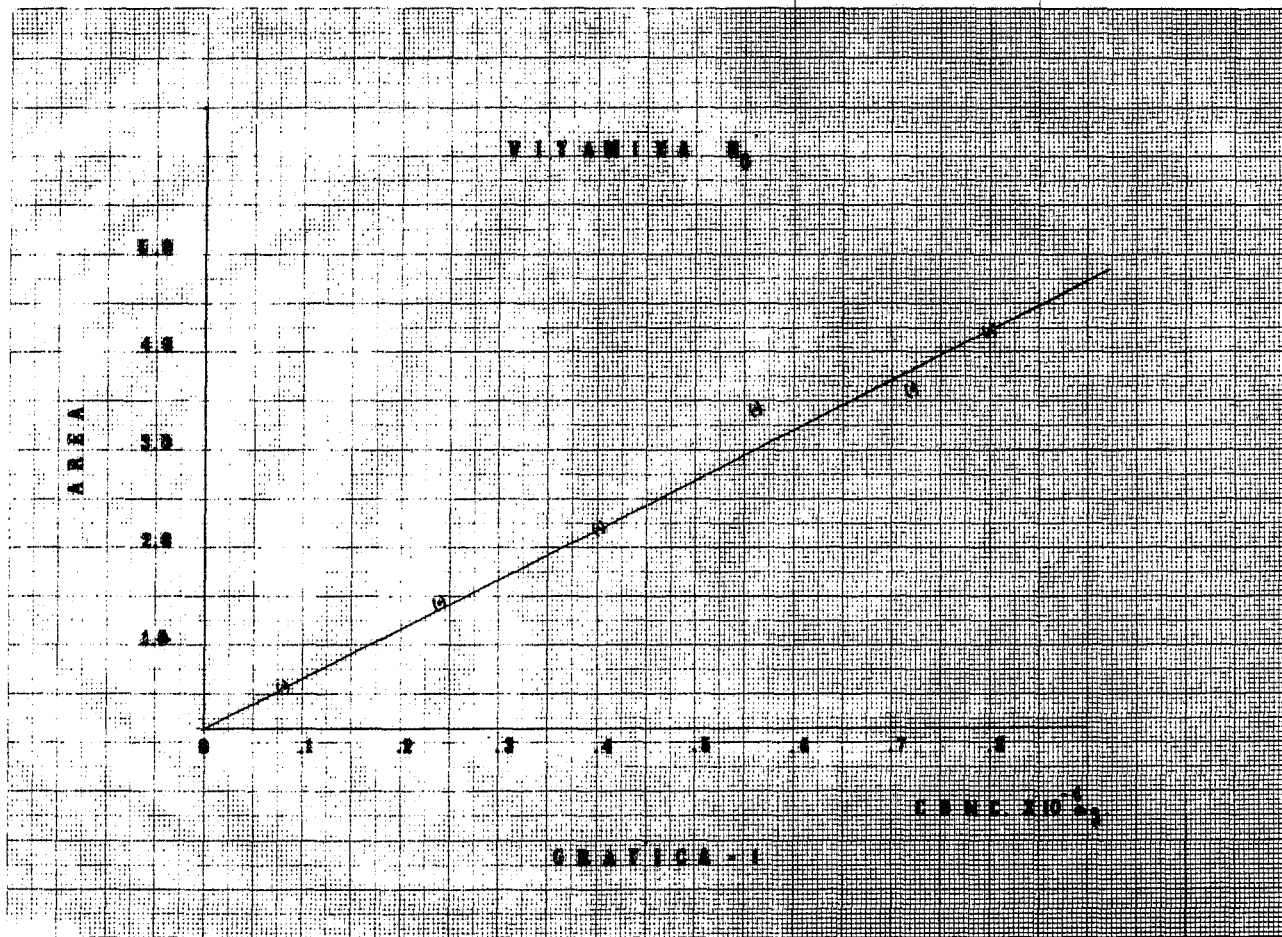
$$\frac{\text{Area de Vit. B}_6 \text{ Prob.}}{\text{Area de Vit. B}_6 \text{ Estandar}} \times \text{Conc. de Vit. B}_6 \text{ estandar} \times 100 = \% \text{ Vitamina B}_6.$$

Tabla No. 1

Determinación de la ley de -
Lambert-Beer

Vit. B ₆		Nicotinamida	
Concentración mg	Area	Concentración mg	Area
0.8×10^{-4}	0.595	1.0×10^{-3}	0.563
2.4×10^{-4}	1.438	3.0×10^{-3}	1.540
4.0×10^{-4}	2.226	5.0×10^{-3}	2.575
5.6×10^{-4}	3.420	7.0×10^{-3}	3.694
7.2×10^{-4}	3.604	9.0×10^{-3}	4.633
8.0×10^{-4}	4.223	10.0×10^{-3}	5.630

La tabla No. 1 muestra los datos obtenidos para -
clorhidrato de Piridoxina y Nicotinamida para la -
determinación de la Ley de Lambert-Beer. Mostrán-
dose en las gráficas 1 y 2 la curva de absorbancia
en función de la concentración.



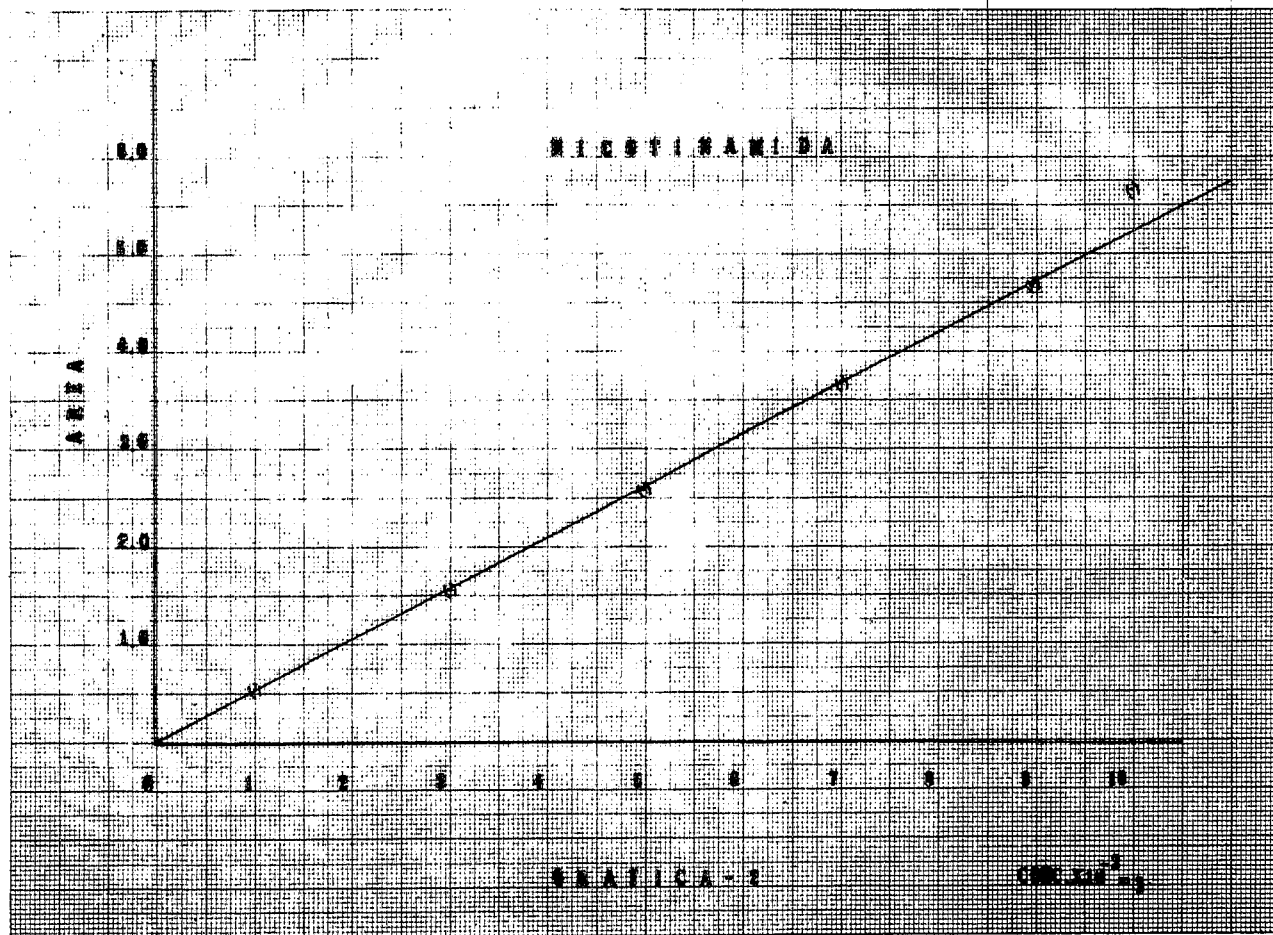


Tabla No. 2
 Análisis Estadístico del Método para
 la Determinación de Vitamina B₆
 en la Formulación No. 1

mg Adicionados	mg Recuperados	% Recuperado	$(x - \bar{x})$	$(x - \bar{x})^2$
5.5×10^{-4}	5.383×10^{-4}	97.87	-0.62	0.384
"	5.383×10^{-4}	97.76	-0.73	0.532
"	5.499×10^{-4}	99.98	1.49	2.220
"	5.450×10^{-4}	99.00	0.51	0.260
"	5.383×10^{-4}	97.87	-0.62	0.384
"	5.537×10^{-4}	100.67	2.18	4.752
"	5.370×10^{-4}	97.63	-0.86	0.739
"	5.438×10^{-4}	98.87	0.38	0.144
"	5.377×10^{-4}	97.73	-0.73	0.532
"	5.273×10^{-4}	95.87	-2.62	6.864
"	5.302×10^{-4}	96.40	-2.09	4.368
"	5.374×10^{-4}	97.70	-0.79	0.624
"	5.364×10^{-4}	97.52	-0.97	0.940
"	5.220×10^{-4}	94.90	-3.59	12.888
"	5.513×10^{-4}	100.23	-1.74	3.027
"	5.349×10^{-4}	97.25	-1.24	1.537
"	5.445×10^{-4}	99.00	0.51	0.260
"	5.435×10^{-4}	98.81	0.32	0.102
"	5.370×10^{-4}	97.63	-0.86	0.739
"	5.349×10^{-4}	97.25	-1.24	1.537

$$\bar{x} = 98.490 \%$$

$$S = 1.501 \%$$

$$V = 2.254$$

$$S_m = 0.335 \%$$

$$L.C_{95\%} = 98.49 \pm 0.701 \%$$

$$L.C_{99\%} = 98.49 \pm 0.958 \%$$

Tabla No. 2

Análisis Estadístico del Método para la -
 Determinación de Nicotinamida en la
 Formulación No. 1

mg Adicionados	mg Recuperados	% Recuperado	$(x-\bar{x})$	$(x-\bar{x})^2$
5.5×10^{-3}	5.033×10^{-3}	91.5	-3.03	9.180
"	5.171×10^{-3}	94.01	-0.52	0.270
"	5.208×10^{-3}	94.41	0.16	0.025
"	5.193×10^{-3}	94.41	-0.112	0.014
"	5.361×10^{-3}	97.47	2.940	8.643
"	5.379×10^{-3}	97.80	3.270	10.692
"	5.117×10^{-3}	93.03	-1.500	2.250
"	5.193×10^{-3}	94.41	-0.120	0.014
"	5.193×10^{-3}	94.41	-0.120	0.014
"	5.160×10^{-3}	93.81	-0.720	0.518
"	5.204×10^{-3}	94.61	0.080	0.006
"	5.100×10^{-3}	96.72	2.190	4.796
"	5.100×10^{-3}	96.72	2.190	4.796
"	4.951×10^{-3}	90.01	4.520	20.430
"	5.361×10^{-3}	97.47	2.940	8.643
"	5.320×10^{-3}	92.72	1.810	3.276
"	5.156×10^{-3}	93.74	-0.790	0.624
"	5.212×10^{-3}	94.76	0.230	0.052
"	5.171×10^{-3}	94.01	-0.520	0.270
"	5.193×10^{-3}	94.41	-0.120	0.140

$$\bar{x} = 94.53 \%$$

$$s = 1.98 \%$$

$$v = 3.922$$

$$s_m = 0.442 \%$$

$$L_{C95\%} = 94.53 \pm 0.925 \%$$

$$L_{C99\%} = 94.53 \pm 1.26 \%$$

Tabla No. 3

- Nicotinamida -

Muestra	mg Adicionados	mg Recuperados	% Adicionado	% Recuperado
Fórmula 1-A	-	-	-	-
Fórmula 1-B	1.1×10^{-3}	0.924×10^{-3}	22.00	18.49
Fórmula 1-C	2.2×10^{-3}	1.840×10^{-3}	44.00	36.80
Fórmula 1-D	3.3×10^{-3}	3.228×10^{-3}	66.00	64.56
Fórmula 1-E	4.4×10^{-3}	3.988×10^{-3}	88.00	79.77
Fórmula 1-F	5.5×10^{-3}	5.334×10^{-3}	110.00	106.68
Fórmula 1-G	6.6×10^{-3}	6.701×10^{-3}	132.00	134.03
Fórmula 1-H	7.7×10^{-3}	8.000×10^{-3}	154.00	160.15
Fórmula 1-I	8.8×10^{-3}	8.885×10^{-3}	176.00	177.70
Fórmula 1-F	9.9×10^{-3}	10.703×10^{-3}	198.00	214.06

- Clorhidrato de Piridoxina -

Muestra	mg Adicionados	mg Recuperados	% Adicionado	% Recuperado
Fórmula 1-A	6.6×10^{-4}	6.623×10^{-4}	132.00	132.47
Fórmula 1-B	-	-	-	-
Fórmula 1-C	-	-	-	-
Fórmula 1-D	3.3×10^{-4}	3.122×10^{-4}	66.00	62.44
Fórmula 1-E	4.4×10^{-4}	4.057×10^{-4}	88.00	81.14
Fórmula 1-F	5.5×10^{-4}	5.257×10^{-4}	110.00	105.15
Fórmula 1-G	6.6×10^{-4}	6.203×10^{-4}	132.00	124.06
Fórmula 1-H	7.7×10^{-4}	7.352×10^{-4}	154.00	147.05
Fórmula 1-I	6.05×10^{-4}	5.939×10^{-4}	121.00	118.79
Fórmula 1-J	11.00×10^{-4}	10.537×10^{-4}	220.00	210.74

La tabla No. 3 muestra los datos obtenidos en el análisis simultáneo de Clorhidrato de Piridoxina y Nicotinamida a diferentes concentraciones empleando la formulación No. 1; pudiéndose observar la sensibilidad del detector utilizado.

Tabla No. 4

- Clorhidrato de Piridoxina -

Fórmula 1	V	S	L.C _{95%}	L.C _{99%}
Lote # 1	0.837	0.914	103.95 ± 0.604	103.95 ± 0.826
" # 2	3.614	1.901	99.60 ± 0.889	99.60 ± 1.215
" # 3	3.371	1.836	102.89 ± 0.864	102.89 ± 1.178
" # 4	3.401	1.844	106.80 ± 0.859	106.80 ± 1.175
" # 5	3.642	1.908	102.63 ± 0.891	102.63 ± 1.218
" # 6	2.426	1.557	107.81 ± 0.728	107.81 ± 0.995

-Nicotinamida -

Fórmula 1	V	S	L.C _{95%}	L.C _{99%}
Lote # 1	1.298	1.139	107.28 ± 0.753	107.28 ± 1.030
Lote # 2	12.303	3.507	106.02 ± 1.638	106.02 ± 2.240
" # 3	4.164	2.040	102.68 ± 0.954	102.68 ± 1.304
" # 4	1.381	1.175	102.48 ± 0.548	102.48 ± 0.749
" # 5	3.036	1.742	109.89 ± 0.814	109.89 ± 1.112
" # 6	4.561	2.135	103.78 ± 0.998	103.78 ± 1.364

La tabla No. 4 muestra los datos obtenidos del análisis estadístico de varios lotes del mismo vino medicinal formulación No. 1.

La tabla No. 5 presenta los datos obtenidos en la determinación simultánea de Clorhidrato de Piridoxina y Nicotinamida para las Formulaciones No. 2, 3, 4, 5 y 6.

- Clorhidrato de Piridoxina -

Fórmula No. 2

mg Adicionados	mg Recuperados	% Recuperado	$(x-\bar{x})$	$(x-\bar{x})^2$
0.5×10^{-4}	0.446×10^{-4}	89.24	-0.64	0.409
"	0.446×10^{-4}	89.24	-0.64	0.409
"	0.456×10^{-4}	91.39	1.51	2.280
"	0.451×10^{-4}	90.32	0.44	0.193
"	0.446×10^{-4}	89.24	-0.64	0.409

$$\bar{x} = 89.88 \%$$

$$v = 0.925$$

$$s = 0.962 \%$$

$$s_m = 0.431 \%$$

Fórmula No. 3

mg Adicionados	mg Recuperados	% Recuperado	$(x-\bar{x})$	$(x-\bar{x})^2$
0.4×10^{-4}	0.422×10^{-4}	105.55	1.72	2.958
"	0.427×10^{-4}	106.75	2.92	8.526
"	0.413×10^{-4}	103.25	-0.58	0.336
"	0.397×10^{-4}	99.45	-4.38	19.180
"	0.416×10^{-4}	104.15	0.32	0.102

$$\bar{x} = 103.83 \%$$

$$v = 7.776$$

$$s = 2.788 \%$$

$$s_m = 1.250 \%$$

Continuación: Tabla No. 5

Fórmula No. 4

mg Adicionados	mg Recuperados	% Recuperado	$(X-\bar{X})$	$(X-\bar{X})^2$
0.404×10^{-4}	0.403×10^{-4}	99.77	-0.050	2.500×10^{-3}
"	0.403×10^{-4}	99.77	-0.050	2.500×10^{-3}
"	0.404×10^{-4}	100.04	0.220	4.800×10^{-3}
"	0.403×10^{-4}	99.77	0.050	2.500×10^{-3}
"	0.403×10^{-4}	99.77	0.050	2.500×10^{-3}

$$\bar{X} = 99.82 \%$$

$$V = 0.925 \times 10^{-3}$$

$$S = 0.962 \times 10^{-3} \%$$

$$S_m = 0.215 \times 10^{-3} \%$$

- Nicotinamida -

Fórmula No. 2

mg Adicionados	mg Recuperados	% Recuperado	$(X-\bar{X})$	$(X-\bar{X})^2$
5.0×10^{-3}	5.407×10^{-3}	108.15	-0.71	0.504
"	5.407×10^{-3}	108.15	-0.71	0.504
"	5.496×10^{-3}	109.93	1.07	1.144
"	5.407×10^{-3}	108.15	-0.71	0.504
"	5.496×10^{-3}	109.93	1.07	1.144

$$\bar{X} = 108.86 \%$$

$$V = 0.95$$

$$S = 0.974 \%$$

$$S_m = 0.437 \%$$

Continuación: Tabla No. 5

Fórmula No. 5

mg Adicionados	mg Recuperados	% Recuperado	$(x-\bar{x})$	$(x-\bar{x})^2$
5.6×10^{-3}	6.286×10^{-3}	112.26	-0.71	0.504
"	6.286×10^{-3}	116.41	3.44	11.833
"	6.246×10^{-3}	111.54	-0.86	0.739
"	6.294×10^{-3}	112.40	0.14	0.019
"	6.286×10^{-3}	112.26	-0.71	0.504

$$\bar{x} = 112.97 \%$$

$$v = 3.399$$

$$s = 1.843 \%$$

$$s_m = 0.826 \%$$

Fórmula No. 6

mg Adicionados	mg Recuperados	% Recuperado	$(x-\bar{x})$	$(x-\bar{x})^2$
5.6×10^{-3}	5.949×10^{-3}	106.23	0.33	0.476
"	5.949×10^{-3}	106.23	0.33	0.476
"	5.856×10^{-3}	104.57	-1.33	1.768
"	5.949×10^{-3}	106.23	0.33	0.476
"	5.949×10^{-3}	106.23	0.33	0.476

$$\bar{x} = 105.9 \%$$

$$v = 0.918$$

$$s = 0.958 \%$$

$$s_m = 0.424 \%$$

Los tiempos de retención encontrados son: 3.5 min para Nicotinamida 5.4 min para Clorhidrato de Piridoxina en la solución multivitamínica; en la solución estándar son: 3.8 min para Nicotinamida y 5.3 min para Clorhidrato de Piridoxina.

Se identificó cada uno de los picos que aparecen en el cromatograma del vino medicinal formulación No. 1. Los picos que interferían en la separación de Nicotinamida se identificaron como el ácido Nicotínico y un Conservador.

En la Tabla No. 6, se presenta el análisis comparativo entre el método por Cromatografía de Líquidos a alta Presión y el método Oficial para la determinación de Clorhidrato de Piridoxina y Nicotinamida en la formulación No. 1.

Tabla No. 6

- Nicotinamida -

Fórmula No. 1	mg Adicionados	mg Recuperados HPLC	mg Recuperados Oficial	% Recuperado HPLC	% Recuperado Oficial
Lote # 1	5.5×10^{-3}	5.124×10^{-3}	5.445×10^{-3}	102.48	108.90
Lote # 2	"	5.189×10^{-3}	5.513×10^{-3}	103.78	110.27
Lote # 3	"	5.364×10^{-3}	5.665×10^{-3}	107.28	113.30
Lote # 4	"	5.134×10^{-3}	5.635×10^{-3}	102.68	112.70
Lote # 5	"	5.494×10^{-3}	5.585×10^{-3}	109.89	111.70
Lote # 6	"	5.301×10^{-3}	5.615×10^{-3}	106.02	112.30

- Clorhidrato de Piridoxina -

Fórmula No. 1	mg Adicionados	mg Recuperados HPLC	mg Recuperados Oficial	% Recuperado HPLC	% Recuperado Oficial
Lote # 1	5.5×10^{-4}	5.340×10^{-4}	5.345×10^{-4}	106.80	106.90
Lote # 2	"	5.390×10^{-4}	4.961×10^{-4}	107.81	99.22
Lote # 3	"	5.197×10^{-4}	5.204×10^{-4}	103.95	104.08
Lote # 4	"	4.979×10^{-4}	5.010×10^{-4}	99.59	100.20
Lote # 5	"	5.131×10^{-4}	5.485×10^{-4}	102.63	109.70

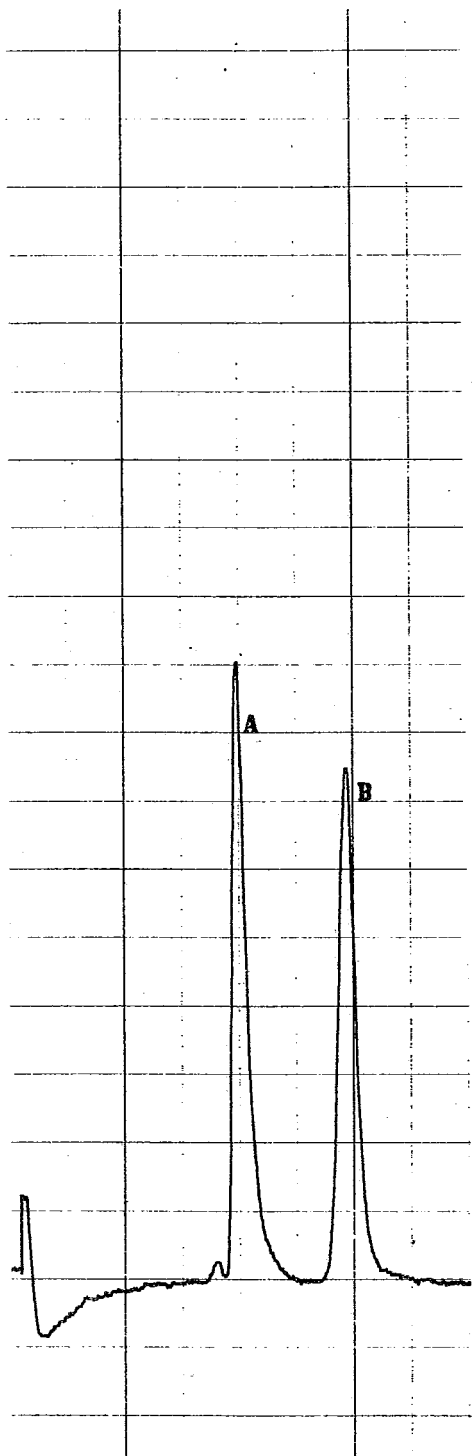


Fig. 3

Estandar de la mezcla de vitaminas "A" representa a Nicotinamida y "B" a Clorhidrato de Piridoxina.





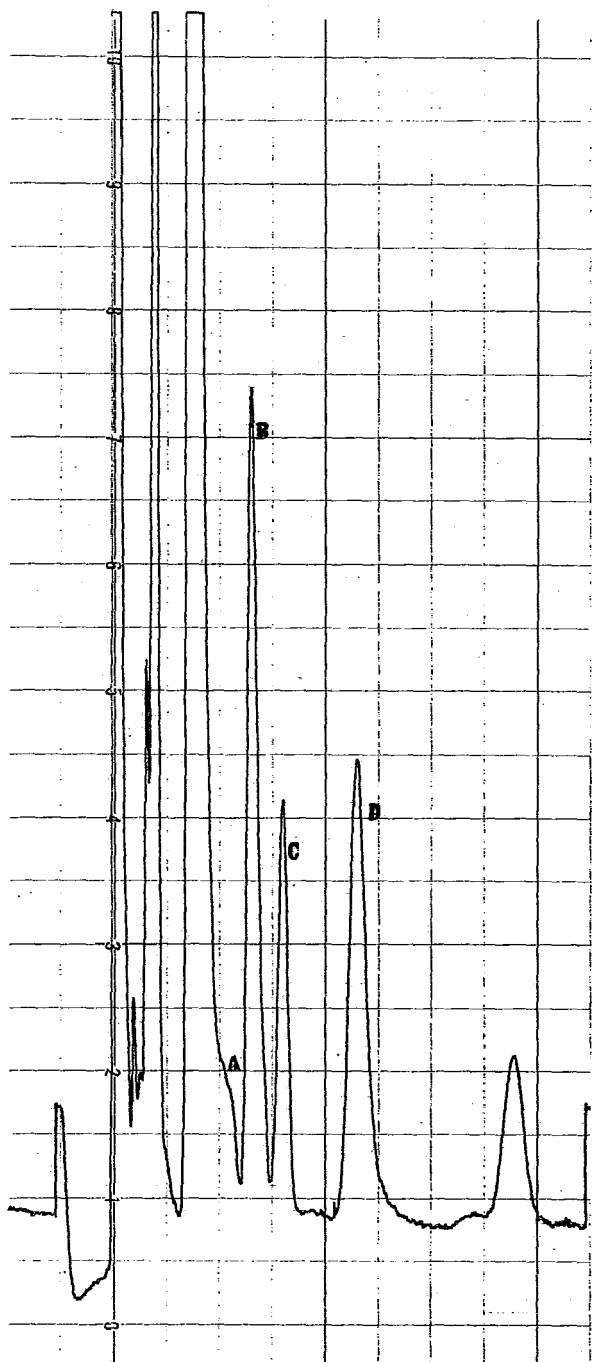


Fig. 7

Cromatograma de la separación de Nicotinamida y Vitamina B₆ en un vino medicinal (fórmula No. 1).

A = Acido Nicotínico
B = Nicotinamida
C = Conservador
D = Vitamina B₆

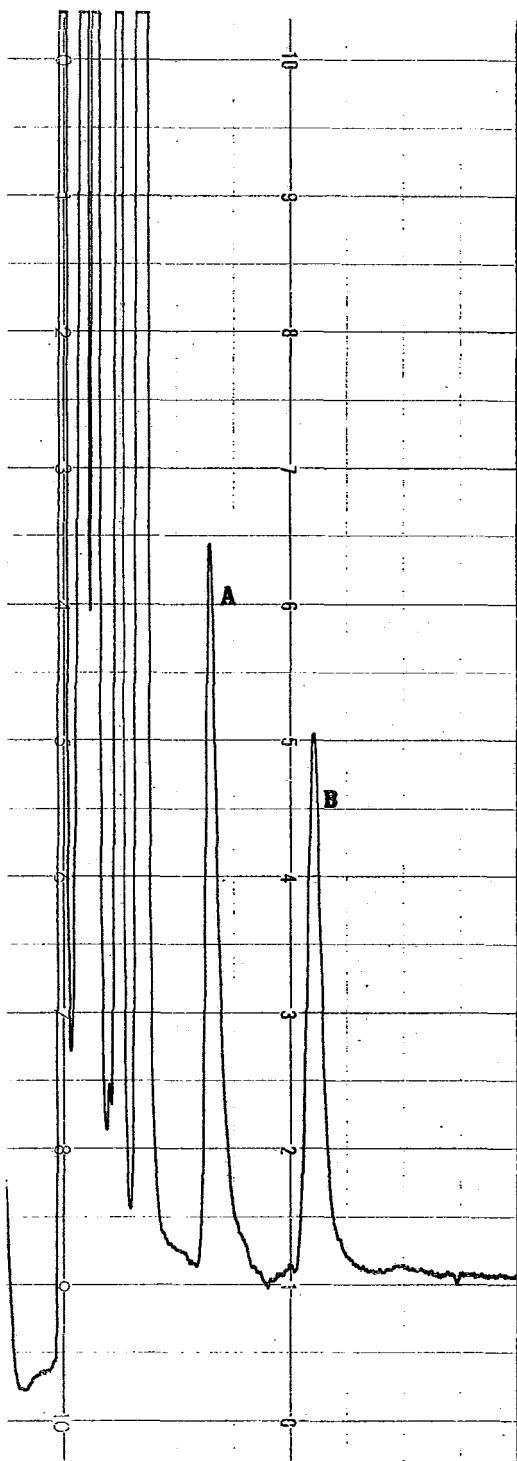


Fig. 8

Cromatograma de líquidos a alta presión de la formulación No. 2

A = Nicotinamida
 B = Clorhidrato de Piridoxina.

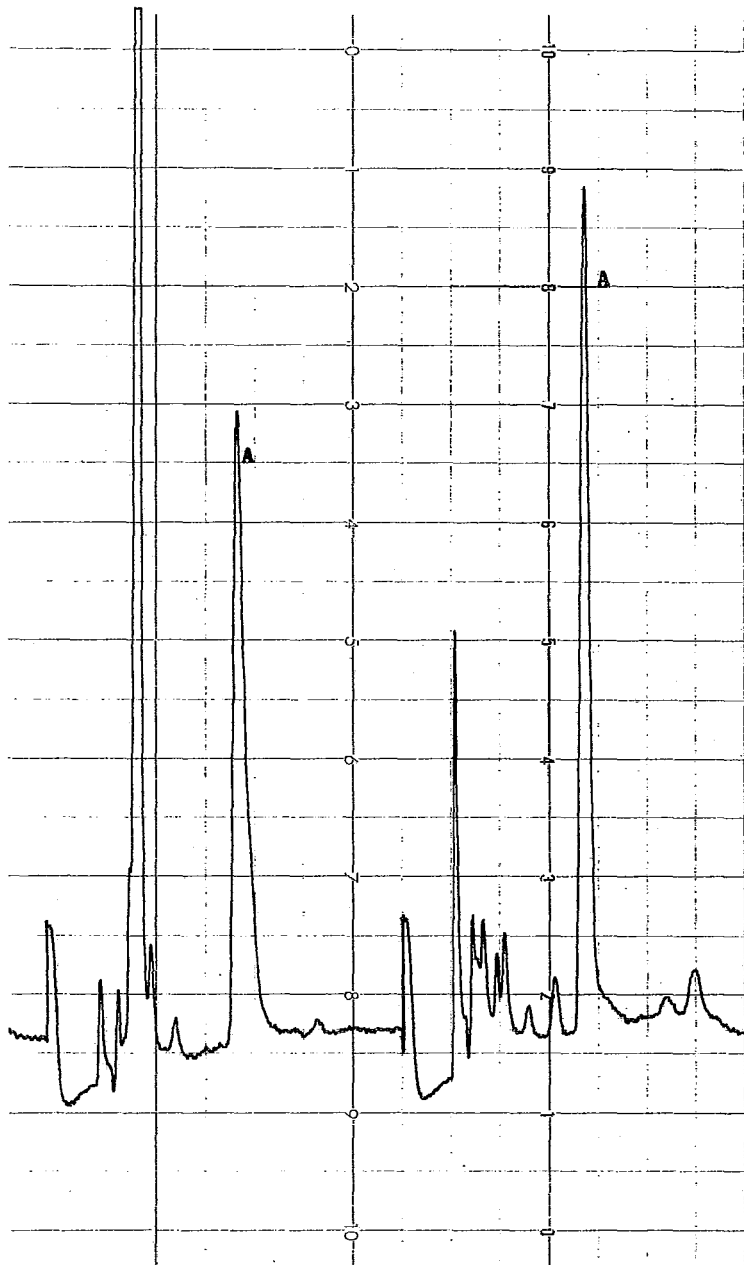


Fig. 9

Cromatograma de las Formu-
laciones No. 5 y No. 6

A = Nicotinamida

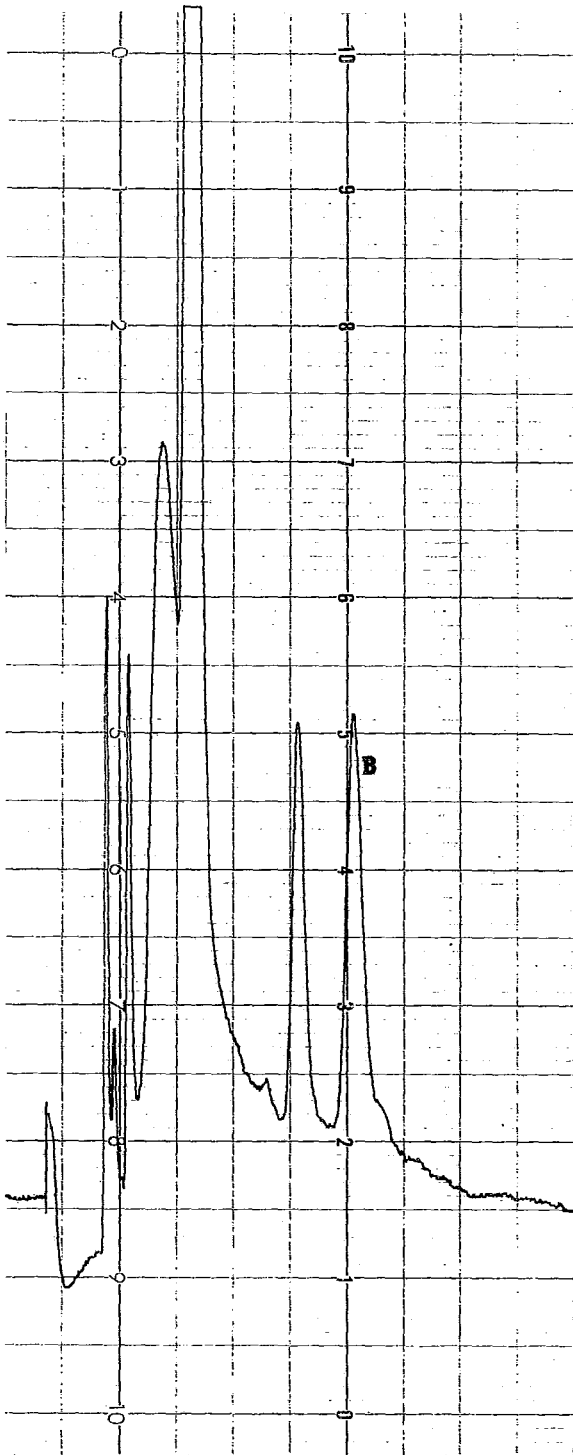


Fig. 10

Cromatograma de la formulación No. 3 en donde:

B = Clorhidrato de Piridoxina.

CONCLUSIONES

1.- La Cromatografía de Líquidos de alta - Presión es una de las más modernas técnicas analíticas que esta teniendo gran aplicación en el análisis farmacéutico.

2.- El método desarrollado para la determinación de Nicotinamida y Clorhidrato de Piridoxina es un ejemplo de las múltiples aplicaciones que presenta la Cromatografía Líquida a alta Presión.

3.- El tipo de técnica cromatográfica que se encontró aplicable fue el de "Ion-Par Fase Reversa".

4.- El método analítico que se presenta es fácil, requiere el mínimo de operaciones (ya que solo hay que preparar la fase móvil), es específico, exacto y emplea poco tiempo para su realización.

5.- Se encontró que pueden determinarse satisfactoriamente desde 0.8 a 8.0×10^{-4} mg de Piridoxina y 1.0 a 10.0×10^{-3} mg de Nicotinamida.

6.- El método desarrollado es aplicable además de al vino medicinal en el que se realizó el estudio a otras soluciones de importancia comercial, que contienen Minerales y aspartatos.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Tswett, M., Ber. Deut. Botan. Ges. 24, 383 -
(1906)
- 2) Tiselius A., Ark. Kemi Mineral. Geol, 1940, -
14 B, No. 22
- 3) Izmailov, N.A., and Shraiber, M.S.,
Farmatsiya, 3 (1938)
- 4) Stahl, E., Chemiker Ztg. 82, 323 (1958)
- 5) Martin, A. J.P., and Synge, R. L.M.,
Biochem. J., 35, 91, 1358 (1941)
- 6) James, A. T., Martin, A.J.P.,
Analyst 77, 915 (1952)
- 7) F. Baley
"Applications of High-Performance Liquid Chromatography in the Pharmaceutical Industry".
J. Chromatogr.
122 (1976) 73-84
- 8) Basic Liquid Chromatography
Varian Aerograph;
Publication number 03-913805-00
- 9) Abdel-Monem. Henkel, Ph. D., et al.
Essentials of Drug Product Quality Concepts -
and Methodology
The C.V. Mosby Company. Saint Louis 1978.

- 10) Karl. Karch, Iwrich Sebestian and István Halász
"Preparation and Properties of Reversed Phases"
J. Chromatogr.
122; (1976) 3-16
- 11) Ronald E. Mayors
"Recent Advances in High Performance
Liquid Chromatography Packings and Columns"
J. Chromatog. Sci.
15; 333 (1977)
- 12) Edward L. Johnson and Robert Steverson
Basic Liquid Chromatography
Varian Associates, Inc.
Library of Congress; Catalog Card Number -
7852840
Palo Alto California 1978.
- 13) R. Gloor and E. L. Johnson
"Practical Aspects of Reverse Phase
Ion Pair Chromatography"
J. Chromatogr. Sci.
15 : 413 (1977)
- 14) Bengt-Arne Persson and Barry L. Karger
"High Performance Ion Pair Partition Chromato-
graphy;
The Separation of Biogenic Amines and Their Me-
tabolites".
J. Chromatogr. Sci.
12 : 521 (1974)
- 15) The United States Pharmacopeia XIX
Official From July 1, 1975.

- 16) J.T. Stewart, I.L. Honingberg, et al.
"Determination of an Isoniazid-Pyridoxine Hydrochloride Mixture".
J. Pharm. Sci.
65 (10) : 1536 (1976)
- 17) R. L. Kirchmeier and R. P. Upton
"Simultaneous Determination of Niacin, Niacinamide, Pyridoxine, Thiamine, and Riboflavin in Multivitamin Blends by Ion-Pair High-Pressure-Liquid Chromatography"
J. Pharm. Sci.
67 (10) ; 1444 (1978)
- 18) S. Paul Sood, D.P. Wittmer, S.A. Ismael and W. G. Haney
"Simultaneous High-Pressure Liquid Chromatography Determination of Niacin and Niacinamide in Multivitamin"
J. Pharm. Sci.
66 (1) : 40 (1977)
- 19) Rolf. Strohecker, Heinz M. Henning
Análisis de Vitaminas
pág. 154 y 231
Editorial Paz Montalvo
Madrid 1967.
- 20) Harold M. Mc. Nair y B. Esquivel
"Cromatografía Líquida de Alta Presión"
Programa Regional de Desarrollo Científico
Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos
Washington D.C. 1973.