



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

*Revisión bibliográfica sobre la cuantificación de
Tiamina y Piridoxina (Vitaminas hidrosolubles)
en medicamentos y muestras biológicas*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

CARLA NAYELLY PAULIN SAUCEDO

ASESORA:

QFB ELIA GRANADOS ENRÍQUEZ



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.

AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios por bendecirme con salud, paciencia y voluntad para terminar esta etapa importante en mi proyecto de vida; pues solo tú y el ángel que enviaste para cuidarme saben lo complicado que esto fue para mí.

A ese ángel (**Mi mamá**) que siempre está para cuidarme y echarme porras por sobre todas las cosas, gracias por tu amor, confianza, fe, etc., etc., y sobre todo por ser una gran mamá. Te amo.

A mi padre por enseñarme el valor de la responsabilidad y ética profesional, que me han llevado a siempre esforzarme en mi carrera como QFB. Te quiero mucho.

A mi hermano Pablo porque es mi mejor ejemplo de renovación y voluntad. Deseo que también tengas el privilegio de lograr tus sueños y que nunca se te olvide lo difícil que pudo ser conseguirlos... Y a mi hermana Vanessa que se ha librado de mi yugo y a quien extraño mucho. Espero jamás dejes de sonreír y de esforzarte por ser mejor. Ambos, los quiero mucho.

Omar gracias por compartir tu vida conmigo, gracias por el amor y el cuidado que me demuestras siempre; sabes lo importante que eres en mi vida y lo mucho que TE AMO, gracias por ayudarme a cerrar este círculo...

A mi Abuelita y mi Tía Yazmín quienes han sido parte fundamental en mi formación como mujer y ser humano, gracias por enseñarme que lo menos importante en este mundo son los lazos de sangre para poder amar con todo tu corazón a alguien, y por siempre estar cerca de mí y mi familia. Las quiero mucho.

A mis amigos del alma Gaby, Memo, Miriam, Quique, Wble, Vanessa, que tanto quiero y admiro, por ser quienes son...

A mis súper amigos-colegas QFB's, porque sin ellos no habría habido tan divertidos momentos (como la novatada a los 26 o la Quema), ni tampoco con quien compartir los recursos, extras y esos gajes del oficio para poder ser un buen QFO. Gracias Alexa, Mimis, Edgar (Tortugo), Alex Navarrete, Benito y por supuesto Omarcito que tanto lidio para explicarme análisis...

A mi maestra y asesora de tesis **QFB Elia Granados** quien me dio la oportunidad de colaborar en este proyecto. Gracias por su ayuda y apoyo incondicional... y gracias por preocuparse por nosotros sus alumnos.

A esos buenos amigos y compañeros de trabajo, gracias por sus enseñanzas, amistad y compañerismo pues sé que siempre están dispuestos a ayudar: QFB Miriam Cruz, QFB Angélica Cordero, Ana García, Ing. Alejandra Rodríguez, Biol. Arturo Pineda-Reyes, QFB Erika Varela, QFB Héctor Camacho.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, a la que con gran orgullo pertenezco y por quien ejerceré mi profesión con ética y responsabilidad.

INDICE GENERAL

	Página
1. Introducción	1
2. Objetivo	
2.1 Generales	3
2.2 Particulares	3
3. Antecedentes	
3.1 Importancia de las vitaminas	4
3.2 Definición de vitamina	4
3.3 Generalidades de las vitaminas	5
3.4 Ingesta Diaria Recomendada (RDA)	6
3.5 Food and Drug Administration (FDA)	6
3.6 Causas generales del déficit de vitaminas	7
3.7 Clasificación de vitaminas	7
3.8 Tiamina o Vitamina B ₁	
3.8.1 Historia	8
3.8.2 Propiedades y Estructura química	9
3.8.3 Acciones Farmacológicas	10
3.8.4 Características Fisiológicas	10
3.8.5 Síntomas de Deficiencia	11
3.8.6 Absorción, Destino y Eliminación	12
3.8.7 Aplicaciones Terapéuticas	12
3.8.8 Método biológico de diagnóstico	13

3.9	Piridoxina o Vitamina B ₆	
3.9.1	Historia	14
3.9.2	Propiedades y Estructura química	14
3.9.3	Acciones Farmacológicas	15
3.9.4	Interacciones con fármacos	16
3.9.5	Síntomas de Deficiencia	17
3.9.6	Requerimiento diario	17
3.9.7	Fuentes de obtención	17
3.9.8	Absorción, Destino y Eliminación	17
3.9.9	Aplicaciones Terapéuticas	18
3.10	Métodos Analíticos (MA)	
3.10.1	Importancia en la selección de MA	19
3.10.2	Proceso Analítico	19
3.10.3	Clasificación Histórica de los MA	20
4.	Tiamina	
4.1	Generalidades	24
4.2	Técnicas y Procedimientos Oficiales para cuantificar Tiamina en medicamentos	
4.2.1	Procedimiento FEUM	25
4.2.2	Procedimiento USP	28
4.2.3	Procedimiento Farmacopea Británica	30

4.3 Técnicas y Procedimientos No Oficiales para cuantificar Tiamina en medicamentos.	31
4.4 Técnicas y Procedimientos para cuantificar Tiamina en muestras biológicas.	37
5. Piridoxina	
5.1 Generalidades	42
5.2 Técnicas y Procedimientos Oficiales para cuantificar Piridoxina en medicamentos	
5.2.1 Procedimiento FEUM	43
5.2.2 Procedimiento USP	47
5.2.3 Procedimiento Farmacopea Española	47
5.2.4 Procedimiento Farmacopea Europea	47
5.3 Técnicas y Procedimientos No Oficiales Para cuantificar Piridoxina en medicamentos	48.
5.4 Técnicas y Procedimientos para cuantificar Piridoxina En muestras biológicas	53
6. Discusión	56
7. Conclusiones	60
8. Referencias	61

INTRODUCCIÓN

Actualmente en el mercado laboral se requieren profesionistas egresados con habilidades y conocimientos especializados que les permitan un óptimo desarrollo profesional. Por ello, actualmente existe un proyecto para la creación de dos nuevas carreras: **Lic. Farmacia** y **Lic. Bioquímica Diagnóstica** las cuales serán impartidas en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan (FES Cuautitlan), cuyos planes de estudio se encuentran en proceso de aprobación; es por ello que los nuevos programas de las asignaturas correspondientes demandan la información necesaria para la propuesta y diseño de nuevas prácticas de laboratorio, específicamente del área de química analítica, con el fin de transmitir al estudiante los conocimientos mínimos a nivel teórico-práctico y técnico-tecnológico que requiere, para un óptimo desarrollo en áreas de la industria farmacéutica y clínica, incorporando los avances científicos y tecnológicos adaptados a la enseñanza y de esta forma familiarizar al alumno en el uso de las tecnologías empleadas en su entorno laboral. Considerando lo anterior, se ha tomado como punto de partida a dos vitaminas del complejo B (Tiamina y Piridoxina), que por su importancia e interés biológico se han desarrollado diferentes técnicas para su análisis en medicamentos y muestras biológicas, ayudando al alumno a incrementar su competitividad laboral y profesional.

Algunas razones importantes para la cuantificación de estas vitaminas son:

- a) Mantener el control de calidad en la producción de multivitamínicos, los cuales dentro de sus componentes comunes se encuentran la **tiamina** y la **piridoxina**, entre otras.
-

- b) Realizar una prueba diagnóstica que confirme el déficit de estas vitaminas cuando sean confundidos los síntomas de deficiencia con los de otras enfermedades.

Dentro de los propósitos de este trabajo está el seleccionar técnicas analíticas adecuadas para optimizar tiempos de análisis, costos, y ayudar en la mejora del control de calidad en una empresa farmacéutica. Por otra parte, en el área clínica es importante difundir la información de los métodos de análisis existentes en el diagnóstico de estas vitaminas, para mejorar la labor de los profesionales de la salud.

OBJETIVO GENERAL

Obtener la información necesaria acerca de la cuantificación de vitaminas hidrosolubles (Tiamina y Piridoxina) en medicamentos y muestras biológicas, mediante la revisión bibliográfica y electrónica de documentos referentes al área, como apoyo bibliográfico para la elaboración de prácticas de laboratorio de química analítica en las nuevas carreras de Lic. Farmacia y Lic. Bioquímica Diagnóstica.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Exponer los métodos de análisis actualmente empleados por la industria farmacéutica y estudios en muestras biológicas (bioequivalencia y/o análisis clínicos), para la cuantificación de tiamina y piridoxina, en el control de calidad de medicamentos y niveles en el organismo.
 - Proponer prácticas de laboratorio en el área de química analítica, para el análisis de tiamina y piridoxina en medicamentos y muestras biológicas, como parte de las nuevas carreras de Lic. Farmacia y Lic. Bioquímica Diagnóstica, tomando en cuenta los recursos de infraestructura, equipo y materiales para su realización.
-

ANTECEDENTES

La dieta de los seres humanos es la fuente de alrededor de 40 nutrimentos que se dividen clásicamente en componentes que proporcionan energía (carbohidratos, grasas y proteínas), fuentes de aminoácidos esenciales (proteínas), ácidos grasos insaturados (grasas), minerales (incluso oligominerales) y vitaminas (compuestos orgánicos liposolubles e hidrosolubles).^[1]

Las vitaminas a pesar de su composición química diversa, pueden definirse como sustancias orgánicas que deben obtenerse en pequeñas cantidades a partir del ambiente, dado que los seres humanos no pueden sintetizarlas, o su velocidad de síntesis es inadecuada para la conservación de la salud. El término vitamina se restringe aquí para incluir únicamente las sustancias orgánicas preformadas y necesarias para la nutrición de mamíferos; cuando las vitaminas se encuentran en más de una forma química (p. ej., piridoxina, piridoxal, piridoxamina), como un precursor, esos análogos a veces se denominan vitámeros.

Las vitaminas difieren de los demás nutrientes, en que no forman parte de los tejidos corporales, sino que son componentes de ciertos sistemas hormonales y enzimáticos, y por ello, son esenciales en los procesos normales de la vida.

Ciertas observaciones hechas han contribuido al conocimiento de este hecho, por ejemplo, se sabía desde hacía 300 años, que el escorbuto podía evitarse o curarse comiendo frutas o verduras frescas. También se sabía desde hacía algún tiempo que el raquitismo se podía curar por ingestión oral de hígado de bacalao. En 1897, Eijkmann demostró que la enfermedad denominada beri-beri, resultante de ingerir prolongadamente arroz descascarillado, podía curarse incorporando a la dieta las

cascarillas del arroz, al igual que también se conoció el papel que desempeñaban los cereales o el hígado en la prevención de la ceguera nocturna.

Estas observaciones sugerían la presencia de sustancias orgánicas en los alimentos naturales que eran indispensables para la salud, pero que no entraban dentro de ninguna de las categorías más familiares de carbohidratos, grasas o proteínas. Hopkins, en 1906 llamó a estas sustancias "factores accesorios de los alimentos" y en 1911 Casimir Funk, introdujo el término **vitamina** que fue finalmente aceptado en 1913.

[2]

Inicialmente se hacía reconocida la existencia de dos factores vitamínicos como, uno de ellos era soluble en líquidos y solventes orgánicos se le llamó factor liposoluble A. El otro fue denominado factor hidrosoluble B.

Posteriormente se fueron descubriendo otros factores a los cuales se les asignó las letras C, D, E, siguiendo el orden alfabético. En algunos casos, como el de la vitamina K el nombre corresponde a la inicial de su función principal (Koagulation, en danés), idioma de su descubridor. El factor B resultó tener un conjunto de sustancias diferentes a medida que se aislaban, por lo que se les designaba con su índice numérico (B₁, B₂, B₁₂).

Aunque la designación con letras es todavía usada actualmente se aconseja utilizar nombres con la estructura química o función biológica. En tan sólo 20 años (1928-1948) se identificaron todas las vitaminas, se determinó su estructura química, se produjeron de forma sintética en el laboratorio y se estableció su papel en los procesos nutritivos.

En 1941, se publicaron por vez primera las raciones recomendadas en la dieta (RDA) para nutrimentos con el fin de asegurar la salud y la organización de Tablas de alimentos y nutrición (Food and Nutrition Board) las revisa de manera periódica para incorporar conocimientos nuevos; se distribuyen con la publicación Dieta Recomendadas Permitidas (Recommended Dietary Allowances).

La Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration, FDA) de los Estados Unidos Americanos, bajo la autoridad del Acta Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (Federal Food, Drug, and Cosmetic Act), regula el etiquetado de productos vitamínicos y minerales que se expenden como alimentos o medicamentos. Para facilitar el etiquetado de alimentos convencionales con respecto a vitaminas y minerales; la FDA utiliza las Referencias de Ingesta Diaria (Reference Daily Intakes, RDI), que aparecen en la etiqueta como Valores Diarios (Daily Values), calculados con base en una ingestión de 2000 Kcal.

Muchos millones de estadounidenses ingieren con regularidad cantidades de vitaminas mucho mayores que las recomendadas (RDI). Una razón por la cual las personas toman complementos de vitaminas es la creencia errónea de que ese tipo de preparaciones proporcionan energía adicional y los hacen "sentirse mejor".

El uso de complementos vitamínicos es recomendable desde el punto de vista médico en diversas circunstancias, en las cuales es probable que sobrevengan deficiencias vitamínicas. Esas situaciones pueden surgir por ingestión inadecuada, mala absorción, incremento de las necesidades titulares o errores congénitos del metabolismo. En la práctica, esas causas pueden superponerse, en alcohólicos, quienes tienen tanto ingestión inadecuada de alimentos como alteraciones de absorción.

En tanto en áreas no industrializadas del mundo se encuentran deficiencias gruesas de vitaminas por ingestión inadecuada.

Algunos individuos están expuestos a consumo deficiente de vitaminas como resultado de dietas excéntricas, como tendencias a seguir las costumbres en cuanto al consumo de alimentos y por evitar la comida debido a anorexia. También puede haber ingestiones de vitaminas menores a las recomendadas en sujetos que se encuentran bajo dietas para perder peso y entre ancianos que comen poco por razones económicas o sociales.

La mala absorción de vitaminas también se observa en diversos padecimientos. Los ejemplos comprenden enfermedades hepato biliares y pancreáticas, enfermedad diarreica prolongada, hipertiroidismo, anemia perniciosa y operaciones de derivación intestinal. Además dado que las bacterias del tubo digestivo producen una proporción sustancial de vitamina K y biotina, el tratamiento con antimicrobianos que alteran la flora bacteriana intestinal conduce de modo inevitable a decremento de la biodisponibilidad de esas vitaminas. Cada vez se registran más pacientes en quienes las anomalías genéticas generan incremento de las necesidades de una vitamina; esto suele deberse a una anomalía de la estructura de una enzima para la cual la vitamina proporciona un cofactor, lo cual conduce a un decremento en la afinidad de la proteína enzima anormal por el cofactor. ^[3]

Dentro del grupo de vitaminas existe una clasificación en dos grupos, de acuerdo a su capacidad de disolución en grasa o en agua.: **vitaminas hidrosolubles** (del grupo B y la vitamina C) y **vitaminas liposolubles** (A, D, E y K) ^[3]. Las vitaminas hidrosolubles sólo se almacenan en una cantidad limitada, y se requiere consumo frecuente para conservar la saturación de los tejidos. Las vitaminas liposolubles pueden almacenarse en cantidades muy abundantes, y esta propiedad les confiere un potencial de

toxicidad grave que excede mucho la del grupo hidrosoluble. En la forma en que se consumen, muchas vitaminas no tienen actividad biológica y requieren procesamiento in vivo. En el caso de varias vitaminas hidrosolubles, la activación incluye fosforilación (tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, piridoxina) y dentro de sus principales efectos conocidos, participan como cofactores para enzimas específicas.

[1]

Habiendo mencionado anteriormente las características generales de las vitaminas existentes en base a su clasificación y en lo que respecta al objetivo de este trabajo, se realizará con mayor detalle una descripción de las propiedades y características de vitaminas específicas (Tiamina y Piridoxina).

El complejo B comprende muchos compuestos que muestran grandes diferencias en cuanto a estructura química y efecto biológico. Se agrupan en una clase única ya que originalmente se aislaron a partir de las mismas fuentes entre las que destacan hígado y levadura. El complejo B consta principalmente de 11 miembros, a saber, **tiamina**, riboflavina, ácido nicotínico, **piridoxina**, ácido pantoténico, biotina, ácido fólico, cianocobalamina, colina, inositol, y ácido p-aminobenzóico.

Tiamina o Vitamina B₁

Fue el primer miembro que se identificó del complejo B. En 1911, Casimir Funk aisló la sustancia activa de la cascarilla de arroz que curaba el beri-beri, le dio el nombre de vitamina por considerar que era un compuesto vital y aminado. El factor activo se denominó después vitamina B₁; en 1926, Cansen y Donath, la aislaron en forma

cristalina y en 1936 Williams determinó su estructura. El Council on Pharmacy and Chemistry adoptó el nombre tiamina para designar a la vitamina B₁ cristalina.

- **Propiedades Químicas.**

La tiamina tiene un núcleo pirimidina y uno tiazol enlazados por un puente metileno. La presencia de azufre y un grupo amino sirvió de base para su denominación como **tiamina**. La tiamina funciona en el organismo en forma de la coenzima tiaminpirofosfato (TTP). Las estructuras de la tiamina y el tiaminpirofosfato son como sigue:

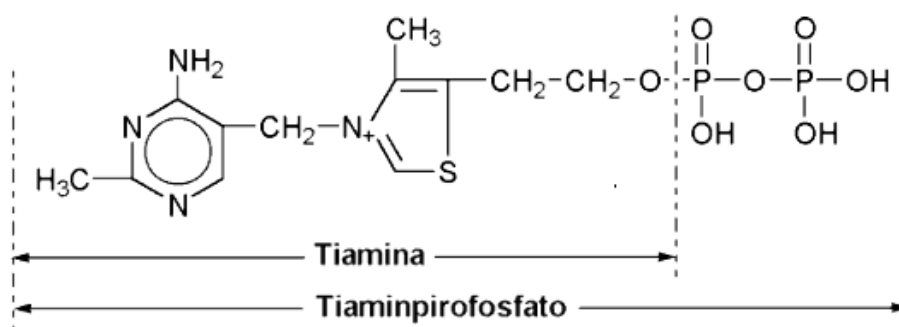


Figura 1: Estructura de la tiamina y la tiaminpirofosfato. ^[1]

Se considera que el contenido total en el cuerpo humano de tiamina es de alrededor 30 mg. La mayor concentración se encuentra en hígado, riñón y corazón, que superan de 2-3 veces la del encéfalo. La tiamina libre representa menos del 5% de la existente en el organismo, mientras que el resto se encuentra principalmente como pirofosfato.

La vitamina resiste al calor seco, presentándose una destrucción parcial a los 100°C en la cocción por breve tiempo. Resulta inestable en soluciones neutras y a la exposición al aire. Se degrada con rapidez en medio alcalina y más lentamente en medio ácido. En los alimentos se pierde al freírlos y en los cereales refinados.

La Tiamina se comercializa como clorhidrato y mononitrato: el primero es estable en forma seca y soluciones ácidas, pero su descomposición aumenta con la temperatura; el segundo es más resistente al calor.

La conversión de la tiamina a su forma de coenzima es llevada a cabo por la tiamina difosfocinasa, el adenosintrifosfato (ATP) es el donador de pirofosfato (PP). Se han sintetizado antimetabolitos para la tiamina que inhiben a esta enzima. Los más importantes son neopiritiamina (piritiamina) y la oxitiamina.

- **Acciones Farmacológicas.**

La tiamina está prácticamente desprovista de efectos farmacológicos cuando se administra a las dosis terapéuticas habituales. Incluso las dosis grandes no producen acciones discernibles. Informes clínicos aislados de respuestas tóxicas a la administración de tiamina por vía parenteral a largo plazo quizá constituyen infrecuentes de hipersensibilidad.

- **Características fisiológicas.**

Las vitaminas del complejo B funcionan en muchas reacciones esenciales del metabolismo intermediario. El fosfato de tiamina, la forma fisiológicamente activa de la tiamina, funciona en el metabolismo de los carbohidratos como una coenzima en la descarboxilación de α -cetoácidos como piruvato y α -cetoglutarato, así como en la utilización de pentosa en la derivación de hexosa monofosfato, esta última función comprende a la transcetolasa dependiente de tiaminpirofosfato. Varios cambios metabólicos de importancia clínica pueden tener vínculo directo con el efecto bioquímico de la tiamina. En la deficiencia de esta última hay alteraciones de la oxidación de los α -cetoácidos y se ha utilizado un incremento en la concentración sanguínea de piruvato como uno de los signos diagnósticos del estado de deficiencia. Una prueba más específica para la deficiencia de tiamina se basa en la medición de la

actividad de transcetolasa en eritrocitos. El requerimiento de Tiamina se relaciona con el índice metabólico y es mayor cuando los carbohidratos son la fuente de energía. Este hecho tiene importancia práctica en pacientes que se conservan mediante alimentación parenteral y que así, reciben una porción sustancial de las calorías en forma de dextrosa.

- **Síntomas de Deficiencia.**

La falta de tiamina produce una forma de polineuritis conocida como beriberi. En 1880 se propuso por vez primera que la enfermedad dependía de la dieta, cuando el Almirante Tataki redujo mucho la incidencia de beriberi en la marina japonesa al agregar pescado, carne, cebada y vegetales a la dieta de arroz pulido de los marineros. En 1897, Eijkman, un médico holandés que laboraba en Java, mostró que las aves de corral alimentadas con arroz pulido presentaban una polineuritis similar al beriberi y que podía curarse al agregar de nuevo el material que se obtenía del pulido del arroz (cáscaras).

La deficiencia se observa más a menudo en alcohólicos, aunque los enfermos con insuficiencia renal crónica bajo diálisis y quienes reciben alimentación parenteral total también pueden estar en riesgo. Así mismo en lactantes sobreviene una forma grave de deficiencia aguda de tiamina.

Los principales síntomas de deficiencia de tiamina se relacionan con los sistemas nervioso (beriberi seco) y cardiovascular (beriberi húmedo). Muchos de los signos y síntomas neurológicos son característicos de neuritis periférica, con alteraciones sensitivas en las extremidades, incluso áreas localizadas de hiperestesia o anestesia. Hay pérdida gradual de la fuerza muscular y puede originar caída de la muñeca o parálisis completa de una extremidad. La falta de vitamina también puede generar alteraciones de la personalidad, depresión, falta de iniciativa y memoria inadecuada. Al

igual que muchos síndromes tan extremos como la encefalopatía de Wernicke y la psicosis de Korsakoff.

Los síntomas cardiovasculares pueden ser notorios e incluyen disnea de esfuerzo, palpitaciones, taquicardia y otras anormalidades cardiacas caracterizadas por un ECG anormal, e insuficiencia cardiaca del tipo gasto alto. Esa insuficiencia se ha denominado beriberi húmedo; hay edema extenso, en gran parte como resultado de hipoproteinemia por ingestión inadecuada de proteína o hepatopatía concomitante, junto con insuficiencia de la función ventricular.

- **Absorción, destino y eliminación.**

La absorción de las cantidades habituales de tiamina en la dieta a partir del tubo digestivo ocurre por medio de transporte activo dependiente de Na^+ ; a concentraciones más altas, también la difusión pasiva es importante.

En adultos los tejidos desintegran por completo cada día aproximadamente 1 mg de tiamina y esto es a grandes rasgos el requerimiento diario mínimo. Cuando el consumo es menor a esta cifra, se excreta poca tiamina o ninguna en la orina. Cuando la ingestión excede el requerimiento mínimo, primero se saturan las reservas titulares. A partir de entonces, el exceso aparece de manera cuantitativa en la orina como tiamina intacta o como pirimidina, que surge a partir de la desintegración de la molécula de tiamina. A medida que el consumo de tiamina aumenta más, una proporción mayor del exceso se excreta sin cambios.

- **Aplicaciones Terapéuticas.**

El único uso terapéutico establecido de la tiamina es el tratamiento o la profilaxis de deficiencia de la misma. Para corregir el trastorno más rápido como es posible, por lo

general se administran dosis por vía intravenosa de hasta 100 mg/L de líquido parenteral.

- **Método biológico de Diagnóstico.**

Para evaluar el estado nutricional con respecto a la tiamina, se determina la actividad de la transcetolasa eritrocitaria, la cual disminuye en etapas precoces de la deficiencia de esta vitamina. Su determinación en orina de 24 horas resulta útil para confirmar la sospecha clínica del déficit de tiamina. [4]

Los primeros estudios sobre vitaminas tuvieron principalmente una base cualitativa. A partir de observaciones generales se desarrollaron métodos de ensayo, basados en las respuestas animales, para medir la potencia y distribución de las vitaminas. No hace demasiados años, todas las vitaminas eran factores aún no identificados. Sólo se reconocían como resultados de pruebas de nutrición. Tales ensayos conservan aún su validez, pero han sido reemplazados para análisis rutinarios por métodos químicos o microbiológicos, más rápidos y reproducibles [2].

Actualmente es posible conocer con precisión la potencia y/o contenido de vitaminas en los preparados que las contengan (medicamentos, alimentos, etc.). La estandarización de la actividad o potencia de éstas se puede medir por tres tipos de métodos principales:

1. Biológicos
2. Microbiológicos
3. Químicos

Para unificar la manera de expresar dichos ensayos se denomina la potencia de vitaminas con Unidades USP las cuales son comparables con las Unidades Internacionales.

Piridoxina o Vitamina B₆

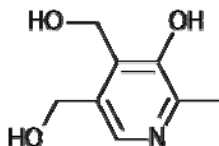
La piridoxina fue descubierta en 1930, como resultado de una serie de investigaciones nutricionales en ratas, se produjo dermatitis en estas al alimentarlas con una dieta deficiente en vitamina B₆. En 1936 György distinguió entre la vitamina B₁₂ y el factor hidrosoluble cuya deficiencia causó la dermatitis y lo denominó vitamina B₆. En 1939, se elucidó la estructura de la vitamina.

Se ha demostrado que la vitamina B₆ esta formada por varios compuestos (piridoxina, piridoxal, piridoxamina) los cuales poseen las mismas propiedades biológicas; empero el Consejo en Farmacia y Química (Council on Pharmacy and Chemistry) ha asignado a la vitamina con el nombre de **piridoxina**.

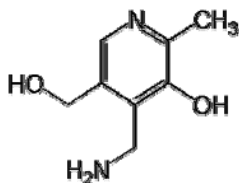
- **Propiedades químicas.**

A continuación se muestran las estructuras de las tres formas de vitamina B₆, es decir, piridoxina, piridoxal, piridoxamina y la forma activa de la vitamina.

Piridoxina



Piridoxamina



Piridoxal

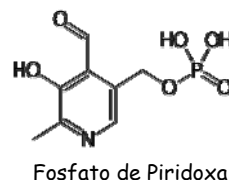
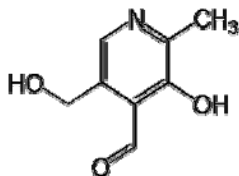


Figura 2. Piridoxina, piridoxal, piridoxamina y piridoxal 5'-fosfato (forma metabolitamente activa de la vitamina B₆)^[1]

Estos compuestos difieren en cuanto a la naturaleza del sustituyente en el átomo de carbono, en la posición cuatro del núcleo pirimidina; un alcohol primario (piridoxina), el aldehído correspondiente (piridoxal) y un grupo aminoetil (piridoxamina). Los mamíferos pueden utilizar con facilidad cada uno de esos compuestos después de convertirlos en el hígado en el **piridoxal 5'-fosfato**, la forma activa de la vitamina.

Se han sintetizado antimetabolitos contra la piridoxina y tienen capacidad para bloquear el efecto de la vitamina y producir signos y síntomas de deficiencia. El más activo es el 4-desoxipiridoxina, para la cual, la actividad contra vitamina se ha atribuido a la formación in vivo de 4-desoxipiridoxina-5-fosfato, un inhibidor competitivo de varias enzimas dependientes de fosfato piridoxal.

La hidrazida del ácido isonicotínico (isoniazida o INH) es el fármaco de elección para el tratamiento de la tuberculosis y para profilaxis en pacientes con prueba de la tuberculina positivo. La INH, ejerce su acción toxicológica al producir alteraciones en el metabolismo de la piridoxina, reduciendo los depósitos de la misma. Se produce un incremento la excreción renal de piridoxina a través de la formación de hidrazonas piridoxina-INH. Las hidrazonas actúan competitivamente con la enzima piridoxina kinasa, la cual es la encargada de transformar la piridoxina en su forma fisiológicamente activa que es el fosfato de piridoxina. La piridoxina a su vez es un cofactor en la producción del neurotransmisor inhibidor GABA (ácido gamma-aminobutírico). El resultado final en una sobredosis de INH es la depleción del GABA y como consecuencia una desinhibición supraespinal, lo cual explicaría las convulsiones en la intoxicación por INH. ^[5]

- **Acciones farmacológicas.**

La piridoxina tiene toxicidad aguda baja y no desencadena efectos farmacodinámicos notorios después del suministro por vía oral o intravenosa. Aún así, es posible que

sobrevenga nefrotoxicidad después de consumo prolongado de apenas 200 mg de piridoxina al día y se han notado síntomas de dependencia en adultos que reciben 200 mg/día.

- **Características fisiológicas.**

Como coenzima el fosfato de piridoxal participa en varias transformaciones metabólicas de aminoácidos, entre ellas descarboxilación, transaminación y racemización, así como pasos enzimáticos en el metabolismo de aminoácidos que contienen sulfuro e hidroxilo. En el caso de la transaminación, el fosfato de piridoxal unido a enzima es objeto de aminación hacia fosfato de piridoxal mediante el aceptor α -cetoácido.

La vitamina B₆, también participa en el metabolismo del triptófano en 5-hidroxitriptamina. En seres humanos con deficiencia de vitamina B₆, diversos metabolitos de triptófano se excretan en cantidades anormalmente grandes. La medición de esos metabolitos en la orina, en particular el ácido xanturénico, después de saturación con triptófano, se utiliza como prueba del estado de vitamina B₆. La conversión de metionina a cisteína también depende de esta vitamina.

- **Interacciones con fármacos.**

Ocurren interacciones bioquímicas entre el fosfato de piridoxal y algunos fármacos y toxinas. El uso prolongado de penicilamina puede causar deficiencia de la vitamina. Los compuestos cicloserina e hidralazina, también son antagonistas de la vitamina B₆ y la administración de la vitamina y la administración de vitamina B₆ reduce las reacciones adversas neurológicas vinculadas con el suministro de esos compuestos. La vitamina B₆ aumenta la descarboxilación periférica de levodopa y reduce su eficacia para tratar enfermedad de Parkinson.

- **Síntomas de deficiencia.**

Piel. Es posible que se produzcan lesiones cutáneas parecidas a la seborrea alrededor de ojos, nariz y boca, acompañadas de glositis y estomatitis. Las lesiones desaparecen con rapidez después de la administración de piridoxina.

Sistema nervioso. Pueden sobrevenir crisis convulsivas cuando existe dieta con deficiencia de piridoxina, estas crisis convulsivas pueden depender de una concentración disminuida de ácido γ -aminobutírico (neurotransmisor); la enzima glutamato descarboxilasa requiere fosfato de piridoxal para sintetizar este neurotransmisor. La deficiencia de la vitamina genera cifras disminuidas de los neurotransmisores noradrenalina y 5-hidroxitriptamina. En algunos enfermos una neurosis periférica relacionada con inflamación de la membrana sinovial del carpo e hipersensibilidad de la misma (síndrome del túnel carpiano) se atribuye a la deficiencia de la vitamina. *Eritropoyesis.*

El requerimiento de piridoxina aumenta con la cantidad de proteína en la dieta. El requerimiento mínimo promedio de piridoxina en adultos es de 1.5 mg/día en sujetos que ingieren aproximadamente 100 g de proteína.

- **Fuentes en alimentos.**

Esta vitamina se encuentra en carne, hígado, pan, cereales integrales, soya, vegetales. Ocurren pérdidas sustanciales durante la cocción y la piridoxina es sensible tanto a la luz UV como a la oxidación.

- **Absorción, destino y eliminación**

Las 3 formas de vitamina se absorben con facilidad a partir del tubo digestivo luego de hidrólisis de sus derivados fosforilados. Se cree que el fosfato de piridoxal es la forma primaria que cruza las membranas celulares. El principal producto excretado cuando en la dieta se incluye alguna de las tres formas de la vitamina es el ácido 4-

piridóxico, formado por el efecto de la adenilato oxidasa hepática sobre el piridoxal libre.

- **Aplicaciones terapéuticas.**

El síndrome clínico de deficiencia de piridoxina es infrecuente. Puede considerarse que un individuo con una deficiencia de otros miembros del complejo B, también pueden presentar deficiencia de piridoxina. Por ende, esta última ha de ser un componente del tratamiento para quienes padecen una deficiencia de otros miembros del complejo B. Con base en que la piridoxina es esencial en la nutrición de seres humanos, se incorpora en muchas preparaciones polivitamínicas para uso profiláctico.

Como se ha mencionado la vitamina B₆ influye sobre el metabolismo de algunos fármacos y viceversa. Con considerable justificación, la vitamina B₆ se administra de modo profiláctico en pacientes que reciben isoniazida, para evitar la aparición de neuritis periférica. Además la piridoxina es un antídoto en las crisis convulsivas y la acidosis en sujetos que han ingerido una dosis excesiva de isoniazida. ^[5]

La concentración sanguínea de fosfato de piridoxal es baja en embarazadas o en usuarias de anticonceptivos orales, aunque las ingestiones recomendadas de vitamina B₆ parecen bastar para satisfacer los requerimientos en esas mujeres.

La anemia con capacidad de respuesta a piridoxina es un padecimiento bien documentado pero infrecuente.

MÉTODOS ANALÍTICOS

Con base a los aspectos generales antes mencionados para tiamina y piridoxina; y considerando su importancia biológica es importante el desarrollo de métodos analíticos para su análisis cuali-cuantitativo, en diferentes muestras ya sea en biológicos (muestras para estudios de bioequivalencia o diagnóstico clínico) o productos de consumo (medicamentos, alimentos).

Por ello la selección del método de análisis constituye una etapa crucial en la resolución de un problema analítico. En esta etapa se debe decidir el diseño y planificación del proceso analítico más adecuado para alcanzar los objetivos propuestos.

El proceso analítico debe proyectarse en toda su extensión, es decir, diseñando todos y cada uno de los pasos que unen la muestra con la obtención de los resultados puesto que todos ellos afectarán nuestro resultado final:

- Toma, almacenamiento y conservación de la muestra.
- Tratamiento de la muestra para el posterior análisis
- Determinación del analito o analitos
- Evolución y presentación de resultados
- Informe final

La tarea de seleccionar el método apropiado, en principio, no es sencilla, ya que el químico cuenta con una gran cantidad de herramientas a la hora de realizar un análisis, herramientas que van desde los numerosos procedimientos de puesta en disolución de la muestra, hasta las diferentes técnicas de medida, pasando por todas aquellas herramientas que se encaminan a la preparación previa de la muestra. ^[6]

Los métodos analíticos se suelen clasificar en clásicos e instrumentales. Esta clasificación es, en gran medida histórica, ya que los métodos clásicos a veces denominados *métodos de química húmeda*, precedieron en un siglo o más a los métodos instrumentales. ^[7]

1. **Métodos clásicos.**

En los primeros años de la Química, la mayor parte de los análisis se realizaban separando los componentes de interés de una muestra (analito) mediante un procedimiento de precipitación, extracción o destilación. En los análisis cualitativos, los componentes separados se trataban seguidamente con reactivos originándose unos productos que se podían identificar por su color, punto de ebullición o fusión, solubilidad (en diferentes solventes), por su actividad óptica o índice de refracción. En los análisis cuantitativos, la cantidad de analito se determinaba mediante medias *gravimétricas* (determinación de masa del analito o de algún componente generado a partir de este) o *volumétricas* (determinación de volumen o peso de un reactivo patrón que reaccionase completamente con el analito).

Actualmente el grado de aplicación de estos métodos va disminuyendo al ser desplazados por los métodos instrumentales.

2. **Métodos instrumentales.**

Para el análisis cuantitativo de diferentes tipos de analitos se empezaron a utilizar las medidas de sus propiedades físicas tales como, absorción de luz, relación masa-carga, conductividad, fluorescencia, etc. Además en la separación de mezclas

complejas técnicas cromatográficas y electroquímicas muy eficaces comenzaron a reemplazar a los métodos clásicos.

Tabla 1.

Propiedades químicas y físicas que se emplean en algunos métodos instrumentales.

PROPIEDADES	MÉTODO INSTRUMENTAL
Emisión de la radiación	Espectroscopia de emisión (rayos X, UV, visible, de electrones)
Absorción de la radiación	Espectrofotometría y fotometría (rayos X, UV, visible, IR); espectroscopia fotoacústica; resonancia magnética nuclear, espectroscopia de resonancia de espín electrónico.
Dispersión de la radiación	Turbidimetría: nefelometría, espectroscopia Raman
Potencial eléctrico	Potenciometría, cronopotenciometría
Carga eléctrica	Culombimetría
Corriente eléctrica	Polarografía, amperometría
Razón masa-carga	Espectrometría de masas
Radiactividad	Métodos de activación y de dilución isotópica

En la tabla anterior se mencionan algunas de las propiedades características que se utilizan actualmente en análisis instrumental. La mayor parte de ellas requieren de una fuente de energía para estimular una respuesta medible que procede del analito.

Un método instrumental puede ser más selectivo para ciertos compuestos o combinaciones de elementos; pero para otros, un análisis volumétrico o gravimétrico puede tener menores interferencias. Son igualmente difíciles de establecer las generalizaciones sobre la exactitud, la idoneidad o el tiempo empleado.

Dentro de la elección adecuada del método analítico y por medio de la literatura científica, es posible la elección de alguno de los siguientes métodos:

-
- Métodos Oficiales de Análisis: Son métodos establecidos por ley o por regulaciones de naturaleza estatutaria (directivas europeas, BOE, EPA, etc.)
 - Métodos Normalizados de Análisis o Estándar: Son métodos que han sido estudiados por diferentes organizaciones y utilizan estudios interlaboratorios para validarlos (ISO, UNE, ASTM).
 - Métodos recomendados por una serie de expertos que son el resultado de trabajos de investigación originales y se encuentran en la literatura científica específica, tales como las revistas *The Analyst*, *Analytica Chimica Acta*, *Química Analítica*.
 - Métodos realizados en el laboratorio "in house" para cubrir unas necesidades concretas. Generalmente estos análisis son oficiales o estándar que han sufrido ligeras o profundas modificaciones con el fin de adaptarlos a las necesidades actuales o a otro tipo de muestras diferentes a las que dieron lugar al método inicial.

La garantía de éxito que nos proporciona la aplicación de uno de estos métodos a nuestro caso concreto, es decir, su grado de validación disminuye en el orden que aparece en el listado anterior, por ello y siempre que sea posible debemos utilizar un Método Oficial o Normalizado, como ejemplo podemos citar los incluidos en las diferentes farmacopeas (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP), etc.), si bien esto solo será factible en tanto los analitos a determinar sean los mismos a los que se refiera el método oficial. En caso contrario, será necesario introducir modificaciones que darán lugar a un nuevo método de análisis. Obviamente habrá que demostrar que el nuevo

método proporciona resultados trazables, exactos y por lo tanto exentos de sesgos o errores sistemáticos.

Otra clasificación de los métodos de análisis, considerada desde un punto de vista muy distinto a su grado de trazabilidad, es aquella que se basa en el grado de confianza que se exige a los resultados, y por tanto su elección dependerá de la finalidad del trabajo planteado, esta clasificación es la siguiente:

- **Métodos de "barrido" o de "criba":** Hace referencia a un barrido rápido de las muestras a analizar. Estos métodos deben cumplir con ciertos requisitos como es deben ser rápidos, de bajo costo, suelen ser cuanti o cualitativos y no deben dar falsos negativos.

 - **Métodos de vigilancia:** Éstos son similares a los de barrido pero en general más lentos ya que el número de muestras analizadas por unidad de tiempo es menor

 - **Métodos reguladores**
 - *Confirmatorios:* se utilizan para confirmar un análisis y suelen ser métodos de rutina.

 - *Referencia:* son métodos perfectamente validados y probados
-

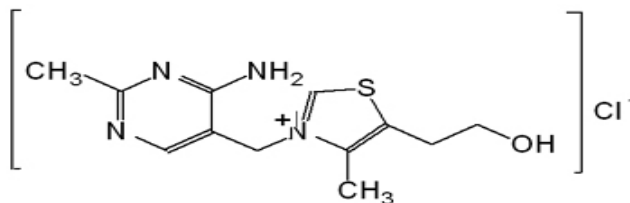
Tiamina

La Tiamina es una vitamina hidrosoluble cuya principal función, después de convertirse en fosfato de tiamina (forma activa de la tiamina), es actuar como coenzima en la descarboxilación de los α -oxiácidos y en la formación de oxoles en los eritrocitos, proceso catalizado por la transacetolasa.

	TIAMINA NITRATO	TIAMINA HCL
Nombre sistemático	3-[(4-amino-2-metilpirimidin-5-il)metil]-5-(2-hidroxi-etil)-4-metiltiazolio nitrato	3-[(4-amino-2-metilpirimidin-5-il)metil]-5-(2-hidroxi-etil)-4-metiltiazolio cloruro hidrocloruro
Fórmula condensada	$C_{12}H_{17}N_5O_4S$	$C_{12}H_{17}ClN_4OS$
Peso molecular	327.37 g/mol	337.29 g/mol
Características	Polvo cristalino blanco o casi blanco o pequeños cristales incoloros.	Polvo cristalino blanco o casi blanco o pequeños cristales incoloros. Sensible a la luz, higroscópico.
Solubilidad	Muy soluble en agua, poco soluble en alcohol y en metanol, fácilmente en agua a ebullición	Muy soluble en agua, soluble en glicerina y poco soluble alcohol.

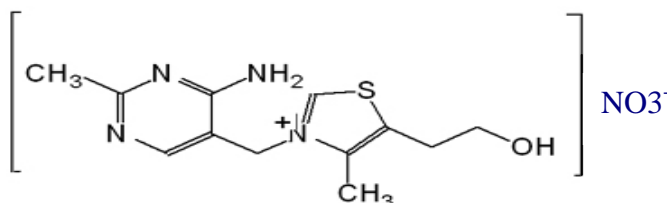
Tabla 2. Características generales de Tiamina, en sus dos formas de comercialización para la elaboración de medicamentos.

Estructura química:



Tiamina HCl

Tiamina NO₃



Con base en lo anterior, a continuación se realizará una descripción de las técnicas de análisis más utilizadas en la Industria Farmacéutica para la cuantificación de Tiamina en preparados farmacéuticos y muestras biológicas.

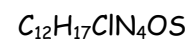
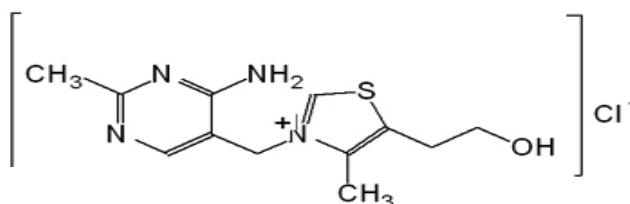
Técnicas y procedimientos para valorar Tiamina en medicamentos

De acuerdo a los *métodos oficiales* empleados por la industria farmacéutica, en la valoración de tiamina, podemos citar y describir los siguientes:

I. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 8ª Edición (2006) MGA 0241, Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) ^[8]

Materia Prima.

I.i TIAMINA, CLORHIDRATO DE



Procedimiento:

Solución A: Preparar una solución de 1-octanosulfonato de sodio 0.005 M en ácido acético glacial (1:1000)

Solución B: Metanol HPLC: Acetonitrilo HPLC (3:2)

Fase Móvil: Solución A: Solución B (60:40), filtrar y desgasificar hacer ajustes si es necesario

Preparación del Patrón Interno: Colocar 2.0 mL de benzoato de metilo en un matraz volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con metanol y mezclar.

Preparación de Referencia: Disolver una cantidad tal de la Solución Referencia (SRef) de clorhidrato de tiamina, en fase móvil para obtener una concentración de 1.0 mg/mL. Tomar una alícuota de 20 mL de esta solución, colocarla en un matraz de 50 mL, añadir 5.0 mL de solución patrón interno y llevar a aforo con fase móvil, mezclar para obtener una solución con una concentración final de 400 µg/mL.

Preparación de la Muestra: Colocar 200 mg de la muestra en un matraz volumétrico de 100 mL. Disolver y llevar a volumen con fase móvil. Mezclar. Transferir 10 mL de esta solución de patrón interno a un matraz volumétrico de 50 mL, llevar a aforo con fase móvil y mezclar.

Condiciones del Equipo: Cromatógrafo de líquidos con un detector de 254 nm y una columna de 4.0 X 300 cm, empacada con L1. Velocidad de flujo 1.0 mL/min.

Nota: la velocidad de flujo puede ser ajustada para obtener un tiempo de retención alrededor de 12 min. para el clorhidrato de tiamina.

Procedimiento: Inyectar por separado 10 µL de la preparación referencia y de la preparación de la muestra, graficar los cromatogramas y medir las áreas de los picos principales. Calcular la cantidad en miligramos de clorhidrato de tiamina, en la muestra tomada, mediante la fórmula:

$$DC \left(\frac{A_m}{A_{ref}} \right)$$

Donde:

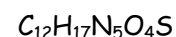
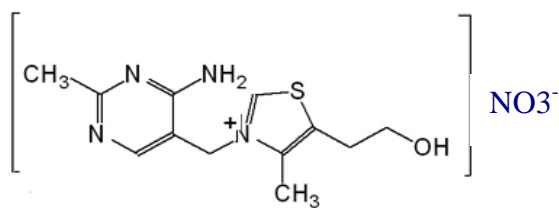
D= Factor de dilución

C= Concentración en microgramos por mililitro ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de la Solución Referencia (SRef) clorhidrato de tiamina en la preparación referencia.

A_m = Área bajo el pico obtenido en el cromatograma con preparación de la muestra

A_{ref} = Área bajo el pico obtenido en el cromatograma con preparación de referencia

I.ii TIAMINA MONONITRATO, DE



Procedimiento:

Solución A, Solución B, Solución Patrón Interno, Preparación de Referencia, Condiciones del Equipo. Proceder como se indica en la monografía de *Clorhidrato de Tiamina*.

Preparación de la Muestra: Pasar 200 mg de la muestra a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y llevar a volumen con fase móvil. Mezclar. Transferir una alícuota de 10 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 50 mL, añadir 5.0 mL de solución patrón interno. Llevar a volumen con fase móvil y mezclar.

Procedimiento: Inyectar por separado 10 μL de la preparación de referencia y de la preparación de la muestra, graficar los cromatogramas y medir las áreas de los picos

principales. Calcular la cantidad en microgramos de clorhidrato de tiamina en la muestra tomada, mediante la fórmula:

$$\left(\frac{327.37}{337.27}\right)0.5C\left(\frac{A_m}{A_{ref}}\right)$$

Donde:

327.37 g/mol = Peso molecular del mononitrato de tiamina

337.27 g/mol = Peso molecular del clorhidrato de tiamina

C = Concentración de la Solución Referencia de clorhidrato de tiamina en la preparación referencia en microgramos por mililitro

A_m = Área bajo los picos de tiamina y benzoato de metilo obtenido en el cromatograma con preparación de la muestra

A_{ref} = Área bajo picos de tiamina y benzoato de metilo obtenido en el cromatograma con preparación de referencia

II. Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP) 25 Edición (2006) ^[9]

II.i. El procedimiento empleado para la valoración de Tiamina HCl como materia prima, es el mismo que el empleado en la FEUM 8ª edición.

II.ii. Tiamina mononitrato, como materia prima, es el mismo procedimiento que el empleado en la FEUM 8ª edición.

II.iii Valoración de acuerdo a forma farmacéutica.

- Tiamina HCl, ELIXIR.

Fase Móvil: Preparar una mezcla desgasificada y filtrada de fosfato monobásico de potasio 0.04 M y metanol (55:45). Realizar ajuste si es necesario.

Solución Estándar Interno: Preparar una solución de metilparabeno en fase móvil teniendo una concentración de 100 µg/mL.

Preparación Estándar: Preparar una solución referencia de Tiamina Clorhidrato USP en fase móvil con una concentración de 500 µg/mL. Transferir 10 mL de esta solución y 10 mL de estándar interno a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir con fase móvil y mezclar para obtener la preparación estándar con una concentración final de 50 µg/mL.

Preparación de la Muestra: Diluir una cantidad de la muestra (elixir) con fase móvil para obtener una concentración de 500 µg/mL de Tiamina HCl. Tomar 10 mL de esta solución y 10 mL del estándar interno, transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar a aforo con fase móvil y mezclar.

Sistema Cromatográfico: El cromatógrafo necesita un detector de 254 nm y una columna de 3.9 X 300 mm con empaque L1. El flujo será de 1.0 mL/min.

Procedimiento: Inyectar por separado volúmenes iguales de 25 µL de la solución estándar y la solución muestra respectivamente, en el cromatógrafo obtener los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Los tiempos de retención para tiamina y metilparabeno son 0.35 y 1.0 min, respectivamente. Calcular la cantidad en mg de Tiamina HCl por mililitro de elixir.

$$DC\left(\frac{A_m}{A_{ref}}\right)$$

Donde:

C= Concentración en mg/mL de Tiamina HCl USP en la solución estándar.

L= Cantidad en mg/mL de Tiamina HCl en el elixir

D= Concentración en mg/mL en la muestra.

R_u= Respuesta de Tiamina

R_s= Respuesta de metilparabeno

II.iv La Valoración de Tiamina HCl en las formas farmacéuticas como inyectables, y soluciones orales se realiza bajo el mismo procedimiento que el empleado para la forma farmacéutica de elixir.

III. Farmacopea Británica (2006) ^[10]

Valoración de Materia Prima.

III.i. Tiamina Clorhidrato

Disolver 0.110 g de muestra en 5 mL de ácido fórmico anhidro, adicionar 50 mL de anhídrido acético. Titular inmediatamente con 0.1 M de ácido perclórico, llevar a cabo la valoración dentro de los primeros 2 min., determinar el punto final de la valoración potenciométricamente. Realizar un blanco.

Equivalencia: 1 mL de ácido perclórico 0.1 M equivale a 16.86 mg de $C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS$ (Tiamina HCl)

III.ii. Tiamina Mononitrato

Disolver 0.0140 g de muestra en 5 mL de ácido fórmico anhidro, adicionar 50 mL de anhídrido acético. Titular inmediatamente con 0.1 M de ácido perclórico, llevar a cabo la valoración dentro de los primeros 2 min., determinar el punto final de la valoración potenciométricamente. Realizar un blanco.

Equivalencia: 1 mL de ácido perclórico 0.1 M equivale a 16.37 mg de $C_{12}H_{17}N_5O_4S$ (Tiamina Mononitrato).

Técnicas y procedimientos de análisis (No oficiales) para Tiamina en preparados farmacéuticos

I. "Determinación de tiamina por espectrofotometría visible" ^[11]

Método: Curva Calibración Indirecta

Preparación Soluciones:

Estándar de Tiamina: Pesar una cantidad tal de de clorhidrato de tiamina en un matraz volumétrico, disolver y llevar a aforo con agua. Para obtener una concentración de 0.2 mg/mL. Tomar una alícuota de 5 mL y transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar a aforo con agua, para obtener una concentración final de 0.1 mg/mL.

Muestra: Triturar no menos de 20 tabletas, pesar una cantidad tal así como llevar a cabo las diluciones necesarias hasta obtener una concentración final de 0.1 mg/mL.

Ferricianuro de potasio: Pesar 0.501 g de Ferricianuro de potasio ($K_3(Fe(CN)_6)$), transferir a un matraz volumétrico de 50 mL con agua destilada, tomar una alícuota de 6 mL y llevar a aforo de 50 mL con agua destilada. Preparar una solución de NaOH al 5.0 %.

Preparación de sistemas:

SISTEMA	BCO	2	3	4	5	6	MTRA
$K_3(Fe(CN)_6)$	2	2	2	2	2	2	2
Tiamina Std	----	1	2	3	4	5	----
Tiamina Mtra	----	----	----	----	----	----	3
NaOH 5.0%	8	7	6	5	4	3	5

Tabla 3. Tabla para realizar la preparación de cada sistema utilizado en el análisis.

Nota: El aforo final se realiza con NaOH 5.0 %, una vez que vaya a realizarse la lectura de absorbancia en el instrumento, el tiempo máximo de lectura debe ser de 2 min., a partir de realizar el aforo, debido a la degradación de Tiamina en medio alcalino.

Longitud de onda: 418 nm

Blanco: Preparación como se indica en el sistema 1.

II. Matriz: Tabletass ^[12]

Preparación de la muestra: Sonicar 75 mg de polvo de tabletas con 25 mL de fase móvil por 15 min., filtrar e inyectar 135 μ L de muestra al equipo.

Condiciones de trabajo:

Columna: Ultrabase C18 (Scharlau Science, Spain) 250 X 4.6 mm, 5 μ m

Fase Móvil: Metanol: Fosfato monobásico de de potasio 20 mM (KH₂PO₄), ajustar a pH 4.0 con ácido ortofosfórico.

Flujo: 1.5 m/min

Inyección: 135 μ L

Detector: UV 246 nm

Tiempo de retención: 2.3 min

Límite de cuantificación: 1.9 μ g/mL

Sustancias cuantificables simultáneamente: aspirina, cafeína, ácido salicílico.

III. Matriz: Tabletadas ^[12]

Preparación de la muestra:

Técnica para tabletas sin hierro. Triturar 5 tabletas hasta obtener un polvo fino, adicionar 10 mL de monotioglicerol y 800 mL de buffer, sonicar por 30 min, adicionar 150 mL de metanol, llevar a 1.0 Litro con buffer, filtrar (GF/C papel), tirar los primeros mL y tomar una alícuota de 10 mL llevar 25 mL de aforo, con fase móvil e inyectar una alícuota.

Técnica para tabletas con sulfosuccinato dioctil de sodio. Triturar 5 tabletas, adicionar 10 mL de 2-monotioglicerol y 1 g de cloruro de bario, llevar a 1.0 litro de solución con buffer. Agitar vigorosamente durante 30 min, filtrar, desechar los primeros mililitros e inyectar una alícuota.

Cápsulas con hierro. Adicionar el contenido de una cápsula + 5 mL de 2-monotioglicerol + 2 mL de ácido acético glacial + 75 mL de buffer. Sonicar durante 5 min, llevar a aforo de 100 mL con buffer, agitar vigorosamente durante 30 min, filtrar. Adicionar 300 mg de cupferron, agitar por 10 min. Dejar reposar por 1 h a temperatura ambiente, filtrar, dejar reposar durante 30 min, filtrar nuevamente (si es necesario). Desechar los primeros mililitros e inyectar una alícuota.

Preparación del Buffer: Mezclar 48 mL de ácido acético glacial, con 10 mL de trietilamina en 1 L de agua. Ajustar a pH 3.6 con ácido acético o trietilamina, llevar a aforo de 1.7 L con agua.

Condiciones de trabajo:

Columna: 100mm X 8 Radial Pak A C18 (Waters)

Fase Móvil: Metanol: Buffer (15:85), el Buffer se prepara con 2.20 g de heptanosulfonato de sodio, 100 mg de EDTA, 48 mL de ácido acético glacial y 10 mL de trietilamina llevar a aforo de 1.7 L. Ajustar a pH de 3.6.

Flujo: 2.0 m/min

Inyección: 10 μ L

Detector: UV 280 nm

Tiempo de retención: 9.0 min

Sustancias cuantificables simultáneamente: niacinamida, riboflavina, **piridoxina**, ácido ascórbico (UV 254 nm)

IV. Matriz: Solución ^[12]

Condiciones de trabajo:

Columna: Accubond Amino (J&W) 250 X 4.6 mm, 5 μ m

Fase Móvil: MeCN: Buffer (10:90) (preparación del buffer, 20 mM ácido fosfórico ajustar a pH 3.0 con 20 mM NaOH)

Flujo: 1.0 m/min

Volumen Inyección: No se indica

Detector: UV 254 nm

Tiempo de retención: 1.2 min

Sustancias cuantificables simultáneamente: Ac. p-aminobenzoico, niacinamida, piridoxal, piridoxamina, riboflavina, piridoxina, vitamina B₁₂

V. Matriz: Solución^[12]

Condiciones de trabajo:

Columna: Supelcosil LC-8-DB, 33 X 4.6 mm, 3 μ m con temperatura de análisis 35°C

Fase Móvil: Metanol: Buffer (15:85), la preparación del buffer es con hexanosulfonato de sodio 4.3 mM conteniendo 0.1% de trietilamina, ajustar pH a 2.8 con ácido fosfórico.

Flujo: 1.0 m/min

Volumen Inyección: No se indica

Detector: UV 200 nm

Tiempo de retención: 2.2 min

Sustancias cuantificables simultáneamente: niacin, ácido pantoténico, piridoxina, riboflavina, niacinamida, ácido ascórbico.

VI. Matriz: Solución^[12]

Condiciones de trabajo:

Columna: Zorbax Rx, 250 X 4.6 mm, temperatura de análisis 30° C

Fase Móvil: Gradiente. **A** es con 10 mL de ácido ortofosfórico concentrado y 7 mL de trietilamina en 1 litro de agua. **B** es con 10 mL de ácido ortofosfórico concentrado, más 7 mL de trietilamina en 200 mL de agua, llevar a aforo a 1 L con MeCN. La proporción **A:B** va desde 100:0 a 0:100 por 30 min manteniendo de 0:100 por 5 min.

Flujo: 2.0mL/min

Volumen Inyección: No se indica

Detector: UV 210 nm

Sustancias cuantificables simultáneamente: acepromacina, acetaminofén, albuterol, anfetamina, aspirina, atropina, ácido benzóico, clorfenamina, clonazepam, clonixin, dexametasona, cocaína, codeína, cortisona, cumarina, diazepam, diclofenaco, efedrina, eugenol, hidromorfona, ketoprofeno, metocarbamol, morfina, oxicodona, naproxen.

VII. **Matriz:** Formulaciones medicamentosas ^[15]

Preparación de la muestra: Pulverizar 20 tabletas, disolver en un matraz de 100 mL con agua y filtrar. Transferir el filtrado a un matraz volumétrico de 1000 mL y llevar a aforo con agua. Se transfiere de esta solución 1.0 mL a un matraz de 100 mL y se lleva a aforo con agua, para su análisis.

Procedimiento general: Adicionar a un matraz volumétrico de 10.0 mL un volumen apropiado de solución estándar de tiamina o muestra (según corresponda) 1.0 mL de solución buffer Britton-Robinson y 3.0 mL de dodecibenceno sulfonato de sodio (SDBS) o dodecilsulfonato de sodio (SDS) y Laurel sulfato de sodio (SLS). Mezclar después de cada adición para que interactúen los componentes. Llevar a aforo con agua.

Transferir 1.0 mL de tetraclorometano, 1.0 mL de la mezcla anterior y 1.0 mL de SDBS en una celda óptica de cuarzo seca, agitar vigorosamente y dejarla durante 15

min antes de la medición de Total Internal Reflected - Resonance Light Scattering (TIR-RLS). La intensidad del espectro de TIR-RLS debe medirse paralelamente con la solución blanco preparado de la misma manera que la muestra.

Técnicas y procedimientos de análisis para Tiamina en muestras biológicas

I. Matriz: Sangre ^[12]

Preparación de la muestra: A 1 mL de hemolizado adicionar 30 μL 4.0 M de estándar interno, en 100 mM de HCl. Agitar vigorosamente. Adicionar lentamente 2.0 mL de metanol, mezclar dejar reposar por 30 min. Centrifugar a 2000 g/10 min. Adicionar 50 μL de ferrocianuro de potasio 30.4 mM, recién preparado y 50 μL de NaOH 0.8 mM, a 1 mL de sobrenadante. Filtrar (0.45 μm) e inyectar una alícuota de 50 μL .

Precolumna: Spherisorb NH_2 50 x 4.0 mm

Columna: 125 x 4.0, 5 μm , Spherisorb NH_2

Fase Móvil: Metanol: Buffer de fosfato de potasio 100 mM a pH 7.5 (45:55)

Flujo: 1.0 mL/min

Volumen de inyección: 50 μL

Detector: Fluorescencia con excitación 375 y emisión 430

Tiempo de retención: 4.0 min

Estándar interno: acetilaneurina (3.0)

II. Matriz: Sangre ^[12]

Preparación de la muestra: A 200 μL de plasma, sangre de ballena o eritrocitos, adicionar 200 μL o 100 mg/mL de ácido tricloroacético. Agitar vigorosamente, centrifugar a 3500g/5min. Inyectar una alícuota de 100 μL de sobrenadante.

Columna: 125 x 4.0, 5 μm , Spherisorb NH_2

Fase Móvil: MeCN: Buffer (3.8:96.2) (fase móvil con 200 mM de NaH_2PO_4 en 3 g/L de MeCN en agua)

Flujo: 1.0 mL/min

Volumen de inyección: 100 μL

Detector: Fluorescencia con excitación 375 y emisión 450 siguiendo a una reacción post-columna. La mezcla con el reactivo se bombea a 0.5 mL/min hacia el detector. (Reactivo es 100 $\mu\text{g/mL}$ de ferrocianuro de potasio en 150 g/L de NaOH)

Tiempo de retención: 8.0 min (tiamina), 3.1 min (trifostato de tiamina), 3.8 min (pirofosfato de tiamina), 5.0 min (monofosfato de tiamina)

Límite de detección: 30 fmol

III. **Matriz:** Sangre completa ^[14]

Reactivos: Ferricianuro de potasio, tiamina, tiamina monofosfato, tiamina difosfato, trietilamina, ácido perclórico, metanol. Los reactivos fueron grado analítico. La pureza de Tiamina y sus derivados > 99.0%.

Preparación de la muestra: Las muestras fueron colectadas en tubos con EDTA, y conservadas en congelación a una temperatura de -20°C , hasta su análisis. El día de análisis descongelar a temperatura ambiente. Después mezclar 0.5 mL de bemolizado y transferirlo a un tubo de propileno. Adicionar 50 μL de agua destilada y 0.5 mL de ácido perclórico frió al 7.2%, mezclar en vórtex. Colocar las muestras a -20°C durante 5 min, mezclar en vórtex, volver a congelar a -4°C durante 10 min. Mezclar

nuevamente en el vórtex y centrifugar a 3500 g/15 min. El filtrar el sobrenadante con un filtro de 0.22m/25 mm protegiéndolo de la luz.

Preparación de los calibradores: Preparar diferentes soluciones stock de tiamina, tiamina monofosfato y tiamina difosfato con una concentración de 3.0 mmol/L en HCl 0.01 M, hacer una dilución 1:100 con agua destilada. Hacer una mezcla con cada una de las soluciones stock diluidas, tomando 5.0 mL de cada una de ellas y llevar a aforo a 100 mL con agua destilada. Obteniendo una concentración final de 1.5 μ mol/L.

Condiciones de trabajo:

Gradiente: *Eluente 1* consistente en Agua:Metanol:Trietilamina:HCl (94.0:5.2:0.52:0.26) ajustando a pH 10, con HCl conc. o Trietilamina. *Eluente 2* consistente en Agua:Metanol (30:70). El perfil del gradiente es como sigue: t=0, 100% eluente 1; t=2, 90% eluente 1 más 10% de eluente 2; t=6, 80% eluente 1 más 20% eluente 2.

Flujo: 1.0 mL/min a 25°C.

Columna: fase reversa Zorbax Extend C-18, 4.6X150mm, dp= 3 μ m, protegida con una guardacolumna de 10 mm long

Detección: La excitación de los compuestos blanco fue a los 367 nm, el resultado de emisión de fluorescencia fue medida a los 435 nm

En lo que se refiere al diagnóstico en el laboratorio clínico la cuantificación de Tiamina se realiza como sigue ^[13]:

IV. En Orina de 24 horas

La Tiamina ingerida es absorbida en el duodeno y excretada en orina, por ello los niveles de tiamina en orina reflejan la ingesta diaria y la cantidad almacenada en el organismo.

El propósito de la prueba es confirmar la deficiencia de la Vitamina B₁ y distinguirla de otras causas de polineuritis.

Para la recolección de la orina es necesario realizarlo descartando o desechando la primera orina de la mañana para comenzar con la recolección de la orina de 24 horas, coleccionar todas las micciones realizadas durante ese lapso de tiempo y terminar con la recolección de la orina del día siguiente para completar el periodo de 24 horas. Es importante que durante la recolección de la muestra se mantenga en refrigeración para evitar su descomposición.

"Determinación de tiamina por espectrofotometría visible, para cuantificación de Tiamina en orina de 24 horas" ^[11.1]

Método: Curva de Calibración Indirecta

Preparación Soluciones:

Stock de Tiamina: Pesar 50 mg de estándar de clorhidrato de tiamina, transferirlo a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y llevar a aforo con agua. Para obtener una concentración de 500 µg/mL.

Muestra: Recolección de la orina de 24 horas. Homogenizar la muestra, tomar una alícuota de 5 mL. Filtrar a través de una membrana de 0.45 µm.

Ferrocianuro de potasio: Pesar 50.0 mg de Ferrocianuro de potasio ($K_3(Fe(CN)_6)$), transferir a un matraz volumétrico de 50 mL con agua destilada. Preparar una solución de NaOH al 5.0 %.

Preparación de sistemas:

SISTEMA	BCO	2	3	4	5	MTRA
$K_3(Fe(CN)_6)$	3	3	3	3	3	3
Tiamina Std	1	2	3	4	5	----
Mtra	----	----	----	----	----	3
NaOH 5.0%	6	5	4	3	2	4

Tabla 4. Tabla para la preparación de cada sistema utilizado en el análisis de Tiamina en orina.

Nota: El aforo final se realiza con NaOH 5.0 %, una vez que vaya a realizarse la lectura de absorbancia en el instrumento, el tiempo máximo de lectura debe ser de 2 min., a partir de realizar el aforo, debido a la degradación de Tiamina en medio alcalino.

Longitud de onda: 418 nm

Blanco: Preparación como se indica en el sistema 1.

Valores de Referencia: El rango normal es de 100 a 200 $\mu\text{g}/24$ horas.

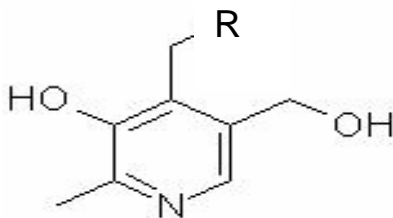
Piridoxina

La Piridoxina es una vitamina hidrosoluble cuya principal función, después de convertirse en 5-fosfato de piridoxal, es actuar como coenzima en diferentes reacciones del metabolismo de los aminoácidos, especialmente del **triptófano**.

PIRIDOXINA HCL	
Nombre sistemático	5-hidroxi-6-metil-3,4-piridindimetanol hidrocloreuro
Sinónimo	Piridoxal HCl, Vitamina B ₆
Peso molecular	205.64 g/mol
Fórmula condensada	C ₈ H ₁₂ ClNO ₃
Características	Polvo cristalino blanco o casi blanco o pequeños cristales incoloros,
Solubilidad	Muy soluble en agua, poco soluble en alcohol y en metanol, fácilmente en agua a ebullición

Tabla 5. Características generales de Piridoxina, en su forma de comercialización para la elaboración de medicamentos

Estructura química:



Donde:

R= -CH₂OH = Piridoxina

R= -CHO = Piridoxal

R= -CH₂NH₂ = Piridoxamina

Fig 3. Estructura química de piridoxina.

Teniendo descritas las características generales a continuación se realizará una descripción de las técnicas de análisis más utilizadas en la Industria Farmacéutica

para la cuantificación de Piridoxina en preparados farmacéuticos y muestras biológicas.

Técnicas de análisis para determinar Piridoxina en preparados farmacéuticos, de acuerdo a bibliografía de carácter oficial

De acuerdo a los métodos oficiales empleados por la industria farmacéutica, en la valoración de Piridoxina, podemos citar y describir los siguientes:

I. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), 8ª Edición 2006.

I.i. Valoración. MGA 0241, CLAR.^[8]

Fase Móvil: Mezclar en un matraz volumétrico de 2000 mL, 20 mL de ácido acético glacial, 1.2 g de 1-hexano sulfonato de sodio y 1400 mL de agua. Ajustar el pH a 3.0 con ácido acético glacial o con solución de Hidróxido de sodio 1 N. Agregar 470 mL de metanol, diluir con agua a volumen, mezclar y filtrar a través de un filtro de 0.5 μm , desgasificar. Hacer los ajustes necesarios.

Preparación de patrón interno: Preparar una solución de ácido p-hidroxibenzóico con la fase móvil, que contenga 5 mg/mL.

Preparación de referencia: Pasar 50 mg de la Sref de clorhidrato de piridoxina a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con la fase móvil y mezclar. De esta solución pasar 10 mL, a un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 1 mL de la

preparación de patrón interno diluir a volumen con la fase móvil y mezclar. Esta solución contiene 0.05 mg/mL.

Preparación de la muestra: Pasar 50 mg de la muestra a una matraz volumétrico de 100 mL, disolver, diluir a volumen con la fase móvil y mezclar. De esta solución pasar 10 mL a un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 1 mL de preparación de patrón interno, diluir a volumen con la fase móvil y mezclar.

Condiciones del equipo: Detector UV a 280 nm; columna de 4.6 X 250 mm que contenga empaque LI; velocidad de flujo de 1.5 mL/min. Inyectar la preparación de referencia y registrar los picos respuesta como se indica en el *procedimiento*.

Procedimiento: Inyectar por separado, 20 μ L de la preparación de la muestra. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos mayores. El tiempo de retención relativo para el clorhidrato de piridoxina es de 0.7 min y para el ácido p-hidroxibenzóico es de 1 min. Calcular la cantidad en miligramos de clorhidrato de piridoxina en la muestra tomada por la fórmula:

$$1000C(A_M / A_{Ref})$$

Donde:

C= Concentración en miligramos por mililitro de la Sref de clorhidrato de piridoxina en la preparación de referencia.

A_m= Área bajo el pico obtenido en el cromatograma con la preparación de la muestra.

A_{ref} = Área bajo el pico obtenido en el cromatograma con la preparación de referencia.

I.ii. Valoración de Piridoxina HCl, en tabletas. Método General de Análisis (MGA) 0361.

SA. Pasar 16 g de cloruro de amonio a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 70 mL de agua, agregar 16 mL de hidróxido de amonio, llevar a aforo con agua, mezclar y filtrar.

Solución de Clorimida. Disolver 40 mg de 2,6-dicloroquinona-clorimida en 100 mL de alcohol isopropílico. Almacenar la solución en refrigeración durante un mes. No utilizar la solución si ha cambiado a color rosa.

Preparación Referencia: Solución concentrada. Pesar una cantidad de la Solución Referencia equivalente a 10 mg de clorhidrato de piridoxina, pasar a un matraz volumétrico de 100 mL disolver y llevar a aforo con solución de ácido clorhídrico 0.1 N, mezclar. Esta solución contiene 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de clorhidrato de piridoxina. Conservar la solución en frasco color ámbar y en refrigeración.

Solución de Trabajo: Pasar una alícuota de 10 mL de la solución concentrada de referencia a un matraz volumétrico de 100 mL llevar al aforo con agua y mezclar. Esta solución contiene 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de clorhidrato de piridoxina. Preparar el día de su uso.

Preparación de la muestra: Triturar hasta polvo fino, no menos de 20 tabletas, pesar una cantidad de polvo equivalente a 10 mg de clorhidrato de piridoxina, pasar a un matraz cónico de 500 mL con ayuda de agua, agregar 5 mL de ácido clorhídrico y 250

mL de agua. Calentar sobre baño de vapor hasta desintegración completa. Enfriar pasar cuantitativamente a un matraz volumétrico de 1000 mL, llevar al aforo con agua, mezclar y centrifugar una porción de la solución. Usar el líquido sobrenadante claro para la prueba.

Procedimiento:

a) Pasar una alícuota de 5 mL de la preparación de la muestra a un matraz cónico de 50 mL agregar una alícuota de 25 mL de alcohol isopropílico, mezclar. Pasar una alícuota de 5 mL de esta solución a un tubo de ensayo graduado de 25 mL provisto de tapón, agregar sucesivamente y agitando después de cada adición, los siguientes reactivos: 1 mL de una solución de acetato de sodio al 20% (m/v) y 1 mL de agua. Enfriar a 25°C, agregar 1 mL de la solución de clorimida, determinar la absorbancia de esta solución a una longitud de onda de 650 nm, utilizando celdas de 1 cm y agua como blanco de ajuste. Realizar la lectura rápidamente para evitar la decoloración de la muestra.

b) Repetir el procedimiento anterior, sustituyendo el mililitro de agua por 1 mL de solución de ácido bórico al 5% (m/v). Esta es la solución blanco de la muestra.

c) Repetir el procedimiento a) sustituyendo la alícuota de 5 mL de la preparación de la muestra, por una alícuota de la solución de trabajo de la preparación de referencia.

d) Repetir el procedimiento c) sustituyendo el mililitro de agua por 1 mL de la solución de ácido bórico al 5% (m/v). Esta solución es el blanco de referencia.

Calcular la cantidad de $C_8H_{12}NO_3 \cdot HCl$ en la porción de la muestra tomada, por medio de la siguiente fórmula:

$$DC = \left(\frac{A_m - A_{m'}}{A_{ref} - A_{ref'}} \right)$$

Donde:

D= Factor de dilución de la muestra.

C= Cantidad por mililitro de la preparación de referencia

A_m= Absorbancia de la muestra

A_{ref}= Absorbancia del blanco de la muestra

A_{m'}= Absorbancia de la solución de trabajo de referencia

A_{ref'}= Absorbancia del blanco de referencia

II. Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (USP), 28ª Edición ^[9]

La **Valoración** de materia prima, piridoxina en tabletas e inyección, está reportada siguiendo el mismo procedimiento que el empleado en la FEUM 8ª edición, 2006.

III. Real Farmacopea Española, 2ª Edición ^[16]

Disolver 0.150 g de la sustancia a examinar en una mezcla de 5 mL de ácido clorhídrico 0.01 M y 50 mL de alcohol isopropílico.

Realizar una valoración potenciométrica, utilizando hidróxido de sodio 0.1 M. Leer el volumen añadido entre los dos puntos de inflexión.

El cálculo se realiza siguiendo la siguiente equivalencia:

1 mL de hidróxido de sodio 0.1 M equivale a 20.56 mg de $C_8H_{12}NO_3 \cdot HCl$.

IV. Farmacopea Europea. ^[17]

Precauciones: Para evitar calentamiento en el medio de la reacción, mézclase a fondo totalmente y pare la titulación inmediatamente después que se ha alcanzado el punto final.

Realizar una valoración potenciométrica. Disolver 0.50 g en 5 mL de ácido fórmico anhidro. Adicionar 50 mL de anhídrido acético, titular con ácido perclórico 0.1 M y correr un blanco bajo las mismas condiciones.

El cálculo se realiza siguiendo la siguiente equivalencia:

1 mL de ácido perclórico es equivalente a 20.56 mg de $C_8H_{12}NO_3 \cdot HCl$.

Técnicas y procedimientos de análisis (No oficiales) de Piridoxina en preparados farmacéuticos

I. "Determinación de Vitamina B6 (Piridoxina) en un producto farmacéutico por HPLC, mediante una curva de calibración" ^[18]

Preparación de la Fase Móvil: En un vaso de precipitados de 500 mL, adicionar 2.5 mL de ácido acético glacial, 0.15 g de octano sulfonato de sodio, 175 mL de agua, mezclar hasta completa disolución. Ajustar a pH 3.0 con HCl o NaOH 1.0 M.

Agregar 59 mL de metanol HPLC y diluir con 250 mL de agua HPLC, mezclar y filtrar a través de un filtro de 0.45 μm . Colocar en un frasco ámbar y colocar en ultrasonido durante 15 min.

Preparación de la muestra: Pesar no menos de 20 comprimidos y obtener su peso promedio. Triturar y pesar el equivalente a 0.1 g de polvo, disolver en 25 mL de agua, transferir una alícuota de 4 mL a un matraz volumétrico de 10 mL, y llevar a aforo.

Preparación del estándar: En un matraz volumétrico de 50 mL, pesar 50 mg de Piridoxina HCl, disolver en 100 mL con agua y lleva a aforo con agua. Transferir una alícuota de 5 mL a un matraz de 50 mL y llevar a aforo con agua.

Preparación de los sistemas de la curva de calibración:

SISTEMA	1	2	3	4	5	6
*Estándar	3	4	5	6	7	0
*Muestra	0	0	0	0	0	3
FM	7	6	5	4	3	7

Tabla 6. Preparación de los sistemas para la curva de calibración empleada en el análisis de Piridoxina; donde las unidades de volumen están dadas en mL, para cada uno de los sistemas a preparar.

Condiciones de trabajo:

Fase móvil (FM): 75:24:1 (Agua HPLC:Metanol:Ácido Acético)

Flujo: 2.2 mL/min.

Columna: C-18 250mmX4.6, 5mcm

Longitud de onda: 280 nm

II. Matriz: Tabletas ^[12]**Condiciones de trabajo**

Preparación de la muestra: Pulverizar las tabletas. Transferir el polvo a un matraz volumétrico de 200 mL, adicionar 100 mL de buffer de fosfato monobásico de potasio 5 mM. Sonicar a 75 W, durante 2 min, enfriar a temperatura ambiente. Llevar a aforo con el buffer de fosfatos, filtrar (45 μ m), inyectar una alícuota de 10 μ L de la muestra.

Columna: LiChrosorb NH₂ aminopropil de 250 X 4.6 mm, 10 μ m

Fase Móvil: MeCN: KH₂PO₄ 5 mM (87:13). Lavar la columna con MeCN:Agua (10:90) hasta el fin del día.

Temperatura de la columna: 25°C

Flujo: 2 mL/min

Volumen de inyección: 10 μ L

Detector: UV 210 nm

Tiempo de retención: 2.2 min

Otras sustancias detectadas: ácido pantoténico, tiamina, riboflavina, niacinamida.

III. Matriz: Tabletas ^[12]

Preparación de la muestra: *Tabletas sin hierro:* Triturar 5 tabletas hasta polvo fino, adicionar 10 mL de monotioglicerol y 800 mL de ^abuffer, sonicar durante 30 min. Adicionar 150 mL de Metanol, llevar a 1 L de aforo con buffer. Filtrar, desechar los primeros mililitros y tomar una alícuota de 10 mL, transferirla a un matraz volumétrico de 25 mL y llevar a aforo con fase móvil. Inyectar una alícuota. *Tabletas con dioctil-sulfosuccinato de sodio:* Triturar 5 tabletas hasta polvo fino, adicionar 10 mL de 2-monotioglicerol y 1 mL de cloruro de bario, llevar a 1 L en un matraz volumétrico con buffer. Agitar vigorosamente durante 30 min, filtrar, descartar los

primeros mililitros e inyectar una alícuota. *Cápsulas con hierro*: verter el contenido de una cápsula a un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 5 mL de 2-monotioglicerol, 2 mL de ácido acético glacial, 75 mL de buffer. Sonicar durante 5 min, llevar a aforo con buffer. Agitar vigorosamente durante 30 min, filtrar, adicionar al filtrado 300 mg de cupferron. Agitar por 10 min, dejar sedimentar durante 1 h a temperatura ambiente, filtrar y dejar sedimentar 30 min, filtrar nuevamente (si es necesario). Descartar los primeros mililitros. Inyectar una alícuota de esta muestra.

^aBuffer: Preparación con 48 mL de ácido acético glacial, 10 mL de trietilamina en 1 L de agua, ajustar a pH 3.6 ± 0.05 , con ácido acético o trietilamina, llevar a aforo de 1.7 L con agua.

Columna: Radial Pak A C18 (Waters)

Fase Móvil: Metanol:Buffer (15:85), Buffer preparado con 2.20 g de heptanosulfonato de sodio, 100 mg de EDTA, 48 mL de ácido acético glacial y 10 mL de trietilamina. Llevar a volumen (1.7 L) con agua. Ajustar a pH 3.6 ± 0.05 , con ácido acético o trietilamina.

Flujo: 2 mL/min

Volumen de inyección: 10 mL

Detector: UV 280 nm

Tiempo de retención: 4 min

Otras sustancias detectadas: niacinamida, tiamina, riboflavina, ácido ascórbico (UV 254).

IV. Matriz: Tabletas / Cápsulas ^[12]**Condiciones de trabajo**

Preparación de la muestra: Disolver las tabletas o contenido de cápsulas en agua (calentar si es necesario), filtrar (0.5 μm PTFE), inyectar una alícuota de 50 mL del filtrado. Disolver las tabletas u otras formulaciones contenidas en material proteínico, en agua a 60°C y adicionar ácido tricloroacético al 5%, filtrar e inyectar alícuota de 50 mL.

Guarda Columna: pellicular Corasil

Columna: $\mu\text{Bondapak C18}$, 10 μm

Fase Móvil: *Gradiente A:* Disolver 1 g de dioctilsulfosuccinato de sodio en 170 mL de metanol, adicionar 10 mL de ácido fórmico concentrado, agregar 800 mL de agua. Ajustar a pH 2.5 con KOH 1 M y llevar a aforo de 1 L. *Gradiente B:* disolver 1 g de dioctilsulfosuccinato de sodio en 450 mL de metanol, adicionar 10 mL de ácido fórmico concentrado agregar 800 mL de agua ajustar a pH 4.6, llevar a aforo de 1 L. *A:B* 100:0 durante 19 min, pasar a 0:100 ó *A:B* desde 100:0 a 0:100 por 25 min (curva cóncava 9), mantener a 0:100 por 3 min, regresar a las condiciones iniciales por 2 min.

Flujo: 1.5 mL/min

Volumen de inyección: 50 mL

Detector: UV 280 nm

Tiempo de retención: 17 min, 16 min

Técnicas y procedimientos de análisis para Piridoxina en muestras biológicas

I. Matriz: Sangre ^[12]

Condiciones de trabajo

Preparación de la muestra: Agregar a 2 mL de suero 100 μ L de estándar interno 1 μ M, 200 μ L de ácido perclórico. Mezclar, centrifugar a 1500 g durante 5 min. Filtrar a través de un filtro de 0.45 μ m e inyectar una alícuota del filtrado.

Columna: Spherisorb ODS2 (12% C, encape) 250 X 4.6 μ m

Fase Móvil: Preparar una solución de KH_2PO_4 67 mM, que contenga hexanosulfonato de sodio 125 μ M, ajustar a pH 2.5 con ácido ortofosfórico concentrado.

Flujo: 1.0 mL/min

Volumen de inyección: 200 μ L

Detector: Fluorescencia con una excitación de 325 y emisión de 400 seguida de una reacción post-columna. El efluente de la columna es mezclado con reactivo (compuesto por Fosfato dibásico de potasio 67 mM, contenido en 1 L de sulfito de sodio, ajustado a pH 7.5 con Fosfato Monobásico de Sodio), bombeado a 0.5 mL/min a través de un tubo hacia el detector.

Tiempo de retención: 18.1 min

Estándar Interno: piridoxamina-5'-fosfato

II. Matriz: Sangre y orina ^[12]

Condiciones de trabajo

Preparación de la muestra: Adicionar 1 mL de sangre completa u orina a un toxi-tubo A (Toxi-Lab, Irving CA), agregar 3 mL de agua, mezclar suavemente por inversión

durante 5 min, centrifugar a 1500 g durante 5 min. Remover la fase orgánica y evaporar hasta sequedad bajo un chorro de nitrógeno a 40° C, reconstituir el residuo con 50 μ L de MeCN:Agua (50:50). Agitar en vórtex por 10 segundos, centrifugar a 7500 g durante 2 min. Inyectar 10 o 30 μ L de muestra orina o sangre, respectivamente. Realizar un barrido para determinar la longitud de onda óptima, ya sea en un detector de arreglo de diodos o puede comenzar a escanear a partir de la longitud de 220 nm. La matriz puede interferir.

Guarda Columna: 20 mm longitud Symmetry C18

Columna: 250 X 4.6 μ m, Symmetry C8 (Waters). Temperatura 30°C

Fase Móvil: *Gradiente A* es de buffer fosfato de sodio 50 mM pH 3.8. *Gradiente B* es de MeCN. *A:B*, 85:15 por 6.5 min., 65:35 por 18.5 min., 20:80 por 3 min., regresar a las condiciones iniciales por 7 min.

Flujo: 1.0 mL/min. por 6.5 min. a 1.5 en los 18.5 min. Mantenerlo a 1.5 por 3 min regresar a 1.5 mL/min

Volumen de inyección: 10-30 μ L

Detector: UV 200.5 nm

Tiempo de retención: 2.895 min.

III. **Matriz:** Sangre ^[12]

Condiciones de trabajo

Preparación de la muestra: Agregar a 2 mL de suero 100 μ L de estándar interno 1 μ M, 200 μ L de ácido perclórico. Mezclar, centrifugar a 1500 g durante 5 min. Filtrar a través de un filtro de 0.45 μ m e inyectar una alícuota del filtrado.

Columna: Spherisorb ODS2 (12% C, encape) 250 X 4.6 μ m

Fase Móvil: Preparar una solución de KH_2PO_4 67 mM, que contenga hexanosulfonato de sodio 125 μM , ajustar a pH 2.5 con ácido ortofosfórico concentrado.

Flujo: 1.0 mL/min

Volumen de inyección: 200 μL

Detector: Fluorescencia con una excitación de 325 y emisión de 400 seguida de una reacción post-columna. El efluente de la columna es mezclado con reactivo (compuesto por Fosfato dibásico de potasio 67 mM, contenido en 1 L de sulfito de sodio, ajustado a pH 7.5 con Fosfato Monobásico de Sodio), bombeado a 0.5 mL/min a través de un tubo hacia el detector.

Tiempo de retención: 18.1 min

Estándar Interno: piridoxamina-5'-fosfato

En el laboratorio clínico la determinación indirecta de Piridoxina consiste en un análisis de enzimas por HPLC. Los valores de referencia de las cuatro enzimas son: ^[13]

Piridoxol: Normal 0.2 a 2.5 $\mu\text{g/L}$. Bajo 0.1 a 0.2 $\mu\text{g/L}$

Piridoxal: Normal 2 a 30 $\mu\text{g/L}$. Bajo 1 a 2 $\mu\text{g/L}$

Fosfato de Piridoxal: Normal 5 a 50 $\mu\text{g/L}$. Bajo 3 a 5 $\mu\text{g/L}$

Ácido Piridóxico: Normal 3 a 30 $\mu\text{g/L}$. Bajo 1 a 3 $\mu\text{g/L}$

Los valores bajos de estas enzimas indican deficiencia de la vitamina.

DISCUSIÓN.

Debido a la importancia de las vitaminas como sustancias necesarias para el correcto funcionamiento del organismo, es necesario contar con métodos analíticos que permitan su identificación y cuantificación a nivel industrial (industria farmacéutica o alimenticia) y a nivel clínico (como parámetro de diagnóstico o a nivel investigación), pudiendo controlar la calidad de un producto o conocer el estado nutricional de un paciente. Como consecuencia de esto, se han desarrollado diversos métodos que permiten hacer las determinaciones analíticas en tiempos más cortos, mejorando la exactitud, precisión, sensibilidad y, en muchas ocasiones, reduciendo costos.

Así mismo, debido a la creciente necesidad de asegurar la máxima calidad en salud, ha sido necesario establecer criterios que brinden un alto grado de confiabilidad en la elaboración de los productos que la población consume, tales como son los medicamentos, teniendo una regulación puntual y estricta que nos brinda tal confianza. Para el cumplimiento de estos requerimientos regulatorios, se hace indispensable el desarrollo de métodos analíticos lo suficientemente confiables para detectar con exactitud el/los analito(s) en cuestión de un producto, evitando con ello desviaciones que puedan poner en riesgo la seguridad del paciente.

Para lograr lo anteriormente mencionado, es importante preparar a los futuros profesionistas responsables de cumplir con dichos requerimientos regulatorios y/o contribuir con el diagnóstico a pacientes, incluyendo como parte de su formación temas de relevancia para su crecimiento profesional, y como propósito de este trabajo se tienen propuestas para la elaboración de prácticas de laboratorio de química analítica, sobre los métodos empleados para la cuantificación de tiamina y piridoxina, tanto en medicamentos como en fluidos biológicos.

Las propuestas planteadas para realizar la cuantificación de Tiamina en medicamentos es la siguiente, siendo descrito completamente el procedimiento del análisis con anterioridad:

- I. *"Determinación de tiamina por espectrofotometría visible"* ^[11], el cual se realiza mediante una curva de calibración indirecta. (Página 31).

- II. *"Determinación potenciométrica de Tiamina Clorhidrato"* ^[10], obtenido de la Farmacopea Británica (BP). (Página 30)

- III. *"Determinación potenciométrica de Tiamina Mononitrato"* ^[10], obtenido de la Farmacopea Británica (BP). (Página 31)

Con respecto a la cuantificación de Tiamina en muestras biológicas, se propone:

- I. El método empleado en medicamentos, *"Determinación de Tiamina por espectrofotometría visible"* ^[11], el cual fue adaptado para realizar la cuantificación de Tiamina en Orina de 24 h ^[11.1] (Páginas 40 y 41).

Respecto a las prácticas propuestas para la cuantificación de piridoxina en medicamentos, tenemos:

- I. *"Determinación de Vitamina B₆ (Piridoxina) en un producto farmacéutico por HPLC, mediante una curva de calibración"* ^[18]. (Páginas 48-49)

 - II. *"Determinación de Vitamina B₆, mediante una valoración potenciométrica"* ^[16]. Farmacopea Española (Página 47)
-

III. "Determinación de Vitamina B₆, mediante una valoración potenciométrica" ^[17].
(Ver página 48)

Para cuantificar Piridoxina en muestras biológicas, la técnica de análisis propuesta es la siguiente:

I. Determinación de Piridoxina en suero, por HPLC con detección fluorométrica" ^[12]. (Páginas 54-55)

En estas técnicas propuestas se consideraron los recursos económicos, de infraestructura y materiales con los que cuenta el área de química analítica para obtener resultados óptimos en la ejecución de las prácticas de laboratorio propuestas, para las carreras Lic. Farmacia y Lic. Bioquímica Diagnóstica. Además de estas consideraciones, cabe destacar que estas prácticas permitirán que el alumno adquiera experiencia en el manejo de equipos de vanguardia, debido a que las técnicas seleccionadas son las más utilizadas actualmente en la industria y en el área diagnóstica, proporcionando al alumno bases más sólidas ante las necesidades que su entorno laboral exige.

Con respecto a la espectrofotometría, las ventajas que presenta son: su fácil manejo, su amplia difusión y su fácil adquisición tecnológica. Sin embargo, las desventajas que presenta son: baja selectividad, sensibilidad y largos tiempos de análisis, lo que ha ocasionado el desarrollo de técnicas más confiables. Una de estas técnicas es la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC). Esta técnica de separación es la más utilizada actualmente en la industria farmacéutica debido a las ventajas en cuanto a costo, confiabilidad y tecnología y a la posibilidad de utilizar diferentes tipos de detección (UV, fotometría, etc.), optimizando recursos humanos, técnicos y económicos.

Otras técnicas utilizadas actualmente por la gran variedad de aplicaciones que día a día se le atribuyen y que prometen grandes beneficios no solo a nivel científico-tecnológico, sino a nivel económico a largo plazo, podemos mencionar a la espectrometría de masas y a la electroforesis capilar; sin embargo, su utilización aun es limitada debido a que la adquisición de esta tecnología implica una inversión inicial elevada.

Dentro del área clínica, la cuantificación de estos metabolitos no se realiza con frecuencia, por lo que la utilización de técnicas para su análisis es limitado empleándose principalmente la espectrofotometría y la determinación indirecta a través de enzimas; sin embargo actualmente se están desarrollando diferentes técnicas, con cualidades de análisis que permiten cuantificar de manera confiable estos analitos en muestras biológicas, estas técnicas son utilizadas en los estudios de bioequivalencia de medicamentos. ^[36]

CONCLUSIONES

- Se obtuvo la información bibliográfica y electrónica necesaria sobre la cuantificación de Tiamina y Piridoxina, en medicamentos y muestras biológicas, como base en la elaboración de prácticas de química analítica para las nuevas carreras de Lic. Farmacia y Lic. Bioquímica Diagnóstica.
 - Se expusieron los métodos analíticos actualmente empleados en la Industria Farmacéutica y Diagnóstico Clínico, para la cuantificación de Tiamina y Piridoxina, utilizados en el control de calidad de medicamentos y/o los niveles en el organismo.
 - Se propusieron prácticas de laboratorio de química analítica, para el análisis de Tiamina y Piridoxina en medicamentos y muestras biológicas, como parte de los planes de estudio de las nuevas carreras de Lic. Farmacia y Lic. Bioquímica Diagnóstica, considerando los recursos económicos, materiales y de infraestructura.
-

REFERENCIAS

- [1] Goodman & Gilman, **Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica**, 9ª edición, Vol. II, Mc Graw-Hill Interamericana, 1996 (México), pp. 1648-1673
- [2] Asociación de Químicos de Vitaminas INC, **Métodos de Análisis de Vitaminas**, 1969 (España), pp. 21-27
- [3] Alfonso R. Gennaro, **Farmacía Remington**, 19ª Edición, Editorial Médica Panamericana, pp. 1796-1824
- [4] Guéant JL, Gasten J, Vidailhet M. **Méthodes biologiques de diagnostique positif et etiologique des carence vitaminiques**, Nutr. Clin. Métabol 1995;9:29-42.
- [5] MUNNE, P., SAENZ BANUELOS, J.J., IZURA, J.J. et al. **Intoxicaciones medicamentosas (II): Analgésicos y anticonvulsivantes**. Anales Sis San Navarra. [online]. 2003, vol.26 supl.1 [citado 20 Agosto 2006], p.65-97. Disponible en la World Wide Web: <http://www.scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272003000200005&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1137-6627.
- [6] Cámara Carmen, Fernández H. Pilar, **Toma y tratamiento de muestras**, Edit. Síntesis, España, 2002, pp. 38
- [7] Douglas A. Skoog, **Principios de Análisis Instrumental**, 5ª edición, Mc-Graw Hill, España, 2001, pp. 1-3
-

-
- [8] **Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos**, 8ª edición, 2006, pp. 1279-1281
- [9] **USP 28 NF 23** official Jan 1º- Dec 31 2005
- [10] **British Pharmacopeia**, 2004 Vol. I y II.
- [11] *Práctica experimental realizada en el laboratorio de Química Analítica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. Dirigida por QFB Elia Granados Enríquez.*
- [11.1] *Práctica experimental realizada en el laboratorio de Química Analítica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. Dirigida por QFB Elia Granados Enríquez. (Modificación al método)*
- [12] *George Lunn, HPLC Methods for pharmaceutical analysis*, Vol. 4, Edit. Jhon Wiley & Sons. INC, Canadá (2000), pp 1287-1289, 1292
- [13] **Clinical Laboratory Test Values and Implications**, 3rd Edition, USA, 2001, pp 692
- [14] **Bart A.J. van Landeghem, Johan Puts and Henk A. Claessens, The analysis of thiamin and its derivatives in whole blood samples under high pH conditions of the mobile phase**, *Journal of Chromatography B*, Volume 822, Issues 1-2, 5 August 2005, Pages 316-321
- [15] **Wei Lu, Cheng Zhi Huang and Yuan Fang Li, Novel assay of thiamine based on its enhancement of total internal reflected resonance light scattering signals of**
-

sodium dodecylbenzene sulfonate at the water/tetrachloromethane interface, *Analytica Chimica Acta*, Volume 475, Issues 1-2, , 3 January 2003, Pages 151-161.

[16] **Real Farmacopea Española**, 2^a edición, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, 2003.

[17] **European Pharmacopoeia**, 5th Edition, Jun 2004, Vol 2, Council of Europe.

[18] Práctica realizada en el laboratorio de Química Analítica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. Dirigida por QFB Elia Granados Enríquez.

[19] Luis J. Núñez-Vergara, J. A. Squella, J. C. Sturm, H. Báez and Cristián Camargo, **Simultaneous determination of melatonin and pyridoxine in tablets by gas chromatography-mass spectrometry**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 26, Issues 5-6, , December 2001, Pages 929-938.

[20] Cynthia L. Deitrick, Richard E. Katholi, David J. Huddleston, Kathy Hardiek and Lucienne Burrus, **Clinical adaptation of a high-performance liquid chromatographic method for the assay of pyridoxal 5'-phosphate in human plasma**, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, Volume 751, Issue 2, , 25 February 2001, Pages 383-387.

[21] Dinesh Talwar, Tara Quasim, Donald C. McMillan, John Kinsella, Cathy Williamson and Denis St. J. O'Reilly, **Optimisation and validation of a sensitive high-performance liquid chromatography assay for routine measurement of pyridoxal 5-phosphate in human plasma and red cells using pre-column semicarbazide derivatisation**, *Journal of Chromatography B*, Volume 792, Issue 2, , 25 July 2003, Pages 333-343.

[22] Wei Li, Jian Chen, Bingren Xiang and Dengkui An, **Simultaneous on-line dissolution monitoring of multicomponent solid preparations containing vitamins B1, B2 and B6 by a fiber-optic sensor system**, *Analytica Chimica Acta*, Volume 408, Issues 1-2, , 9 March 2000, Pages 39-47.

[23] C. K. Markopoulou, K. A. Kagkadis and J. E. Koundourellis, **An optimized method for the simultaneous determination of vitamins B1, B6, B12, in multivitamin tablets by high performance liquid chromatography**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 30, Issue 4, , 7 November 2002, Pages 1403-1410.

[24] D. Ivanovic, A. Popovic, D. Radulovic and M. Medenica, **Reversed-phase ion-pair HPLC determination of some water-soluble vitamins in pharmaceuticals**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 18, Issue 6, , January 1999, Pages 999-1004.

[25] Imrana Siddiqui and K. S. Pitre, **Voltammetric determination of vitamins in a pharmaceutical formulation**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 26, Issues 5-6, , December 2001, Pages 1009-1015.

[26] Llorenç Monferrer-Pons, M. Elisa Capella-Peiró, Mayte Gil-Agustí and Josep Esteve-Romero, **Micellar liquid chromatography determination of B vitamins with direct injection and ultraviolet absorbance detection**, *Journal of Chromatography A*, Volume 984, Issue 2, , 17 January 2003, Pages 223-231.

[27] Lai-Sheng Li, Shi-Lu Da, Yu-Qi Feng and Min Liu, **Study on the chromatographic behavior of water-soluble vitamins on p-tert-butyl-**

calix[8]arene-bonded silica gel stationary phase by HPLC, *Talanta*, Volume 64, Issue 2, 8 October 2004, Pages 373-379.

[28] Erdal Dinc, Gamze Ko"kdill, Feyyaz Onur, **A comparison of matrix resolution method, ratio spectra derivative spectrophotometry and HPLC method for the determination of thiamine HCl and pyridoxine HCl in pharmaceutical preparation**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* Volume 22 (2000), Pages 915-923x

[29] Erdal Dinc, Dumitru Baleanu, **A zero-crossing technique for the multidetermination of thiamine HCl and pyridoxine HCl in their mixture by using one-dimensional wavelet transform**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* Volume 31 (2003) Pages 969-978

[30] Krisztina Takács-Novák, Gergely Völgyi, **Alkalimetry in alcohol-water mixtures with potentiometric end-point detection Critical remarks on a newer method of European Pharmacopoeia**, *Analytica Chimica Acta* 507 (2004) Pages 275-280

[31] C. Nsengiyumva, J. O. De Beer, W. Van de Wauw, A. J. Vlietinck, E. Parmentier, **An Experimental Design Approach to Selecting the Optimum Liquid Chromatographic Conditions for the Determination of Vitamins B1, B2-Phosphate, B3, B6 and C in Effervescent Tablets Containing Saccharin and Sunset Yellow FCF**, *Chromatographia* Vol. 44, No. 11-12, June 1997.

[32] Ulrich Ho"ller, Christine Brodhag, Andreas Kno"bel, Peter Hofmann, **Automated determination of selected water-soluble vitamins in tablets using a bench-top robotic system coupled to reversedphase (RP-18) HPLC with UV**

detection, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Volume 31 (2003), Pages 151-158

[33] Pilar Viñas, Carmen López-Erroz, Nuria Balsalobre, Manuel Hernández-Córdoba, **Comparison of ion-pair and amide-based column reversed-phase liquid chromatography for the separation of thiamine-related compounds**, Journal of Chromatography B, Volume 757 (2001) Pages 301-308.

[34] P. Moreno, V. Salvado, **Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography**, Journal of Chromatography A, Volume 870 (2000) Pages 207-215

[35] L. Fotsing, M. Fillet, I. Bechet, Ph. Hubert, J. Crommen, **Determination of six water-soluble vitamins in a pharmaceutical formulation by capillary electrophoresis**, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Volume 15 (1997) Pages 1113- 1123

[36] Marianne R. Bisp, Mustafa Vakur Bor, Else-Marie Heinsvig, Morten A. Kall, † and Ebba Nexø, **Determination of Vitamin B6 Vitamers and Pyridoxic Acid in Plasma: Development and Evaluation of a High- Performance Liquid Chromatographic Assay**, Analytical Biochemistry, Volume 305 (2002), Pages 82-89
