

24.3  
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**



**Resonancia Magnética Nuclear para la Determinación  
cuantitativa de polivitamínicos hidrosolubles.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :**

**QUIMICO**

**Presenta :**

**MARIA ELENA CASTILLA MADRIGAL**



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 está 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.

## INDICE

I.	Introducción	1
II.	Parte Teórica	3
	1) Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear	3
	2) Vitaminas hidrosolubles	9
III.	Parte Experimental	17
	1) Análisis de espectros de muestras patrón	19
	2) Análisis de espectros de mezclas patrones	32
	3) Análisis de espectros de medicamentos	53
	4) Determinación analítica de vitaminas hidrosolubles por otras técnicas	70
IV	Discusión de resultados y conclusiones	79
	Bibliografía	87

## INTRODUCCION

Muchos han sido los avances de la espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear en las últimas décadas, es ya una técnica de rutina en la determinación de estructuras químicas y se abre como una gran posibilidad de la química analítica presentando métodos rápidos y exactos para cierto tipo de análisis cuantitativos.

El principio en que se basa el análisis cuantitativo por R.M.N. es la directa proporcionalidad del área de una banda de absorción y el número de núcleos de hidrógeno que absorben a la frecuencia de dicha banda, esto hace factible su uso en el análisis de mezclas.

Muchas son las mezclas de medicamentos estudiadas ya por R.M.N.; por ejemplo barbitúricos, relajantes musculares, antihistamínicos, tabletas conteniendo fenacetina, cafeína, aspirina, etc.

Recientemente se han empezado a estudiar las mezclas de vitaminas, que como se sabe, al tratar de separarlas para cuantificarlas se descomponen con mucha facilidad.

En este trabajo se presenta la posibilidad de emplear esta técnica en la determinación cuantitativa de vitaminas hidrosolubles que frecuentemente se encuentran en muchos medicamentos. Los métodos tradicionales para determinar estas vitaminas requieren en todos los casos de la previa separación de cada una de ellas, lo que involucra tiempo y trabajo

químico que aumenta la posibilidad de error en el método.

En esta tesis se hace un estudio comparativo de éste método y algunos de los métodos tradicionales (U.V., cromatografía de gases, etc.), y un análisis estadístico entre ellos.

## PARTE TEORICA

### ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

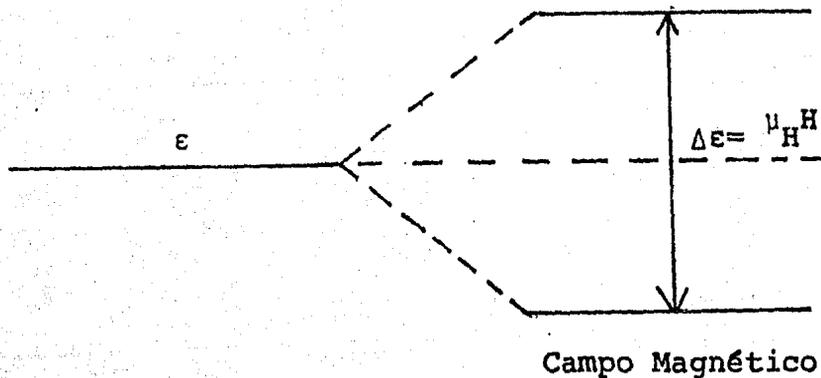
La espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (R.M.N) fué predicha teóricamente en 1936, desarrollándose diez años después por dos grupos diferentes de físicos: Purcell, Torrey y Pound en la Universidad de Harvard y Bloch, Hansen y Packard en la Universidad de Stanford, los cuales detectaron el fenómeno en sólidos y líquidos por lo que les fué otorgado el premio NObel de Química.<sup>1</sup> Desde entonces esta técnica ha tenido un gran desarrollo no solamente en el campo de la química sino hasta en Medicina.

El fenómeno de R.M.N. se basa en que los núcleos de algunos átomos absorben energía cuando se colocan en un campo magnético, debido a la interacción de dicho campo con el espín nuclear de los átomos.

Los núcleos con número cuántico de espín diferente de cero presentan propiedades magnéticas, estos al ser sometidos a un campo magnético externo se comportan como si fueran pequeños imanes y se orientan. Pero a diferencia de un imán que puede tener cualquier orientación respecto al campo, los núcleos tienen un número finito de orientaciones relacionadas con su espín, la ecuación que nos indica el número de orientaciones es  $2I + 1$ , donde  $I$  es el número cuántico de espín. Los núcleos de hidrógeno tienen un número de espín  $I = \frac{1}{2}$  por lo que solo pueden tener 2 orientaciones.

En presencia de un campo magnético hay un desdoblamiento

de los niveles de energía (Fig. 1).



$\mu_H$  = momento magnético del protón =  $14.1 \times 10^{-24}$  erg-gauss

H = Campo magnético aplicado = 14,000 gauss

Cuando la diferencia de los niveles de energía se ha estabilizado, el sistema puede absorber radiaciones electromagnéticas y pasa de un estado de baja energía a un estado de alta energía. La diferencia de energía entre estos dos estados es  $2\Delta\epsilon = 2\mu_H H$ , y por la hipótesis cuántica de Planck, la frecuencia de radiación que puede absorber es:

$$\nu = \frac{\mu_H H}{h}$$

Ecuación I

$\nu$  = frecuencia

$h$  = constante de Planck

Cada tipo de núcleo absorbe energía de diferente frecuencia al estar bajo la misma fuerza de campo, por ejemplo, el hidrógeno al estar sometido a un campo magnético de 14,000 gauss absorbe energía equivalente a una frecuencia de 60 MHz. Cuando esto sucede decimos que el sistema está en resonancia en esta frecuencia. Experimentalmente es más fácil fijar la frecuencia (del orden de radiofrecuencia) y variar el campo magnético  $H$ . Si se observa la ecuación I se puede ver que manteniendo constante  $\nu$  podemos variar  $H$  y la ecuación se satisface.

Si el fenómeno de resonancia ocurre, algunos de los protones en el nivel de baja energía se excitan a un nivel superior absorbiendo energía que se observa en los aparatos de R.M.N. como una señal.

En la figura 2, se muestra la disposición de un aparato empleado en espectroscopía de R.M.N. En este esquema se observan 2 bobinas en ángulo recto una de la otra; una es el receptor que está alrededor de la muestra y la otra, el transmisor que está paralela al tubo de la muestra. Cuando el sistema está en resonancia, la muestra absorbe radiaciones de frecuencia  $\nu_0$  en todas direcciones, esta absorción llega a una bobina receptora y es amplificada y mostrada en un graficador u osciloscopio.<sup>2</sup>

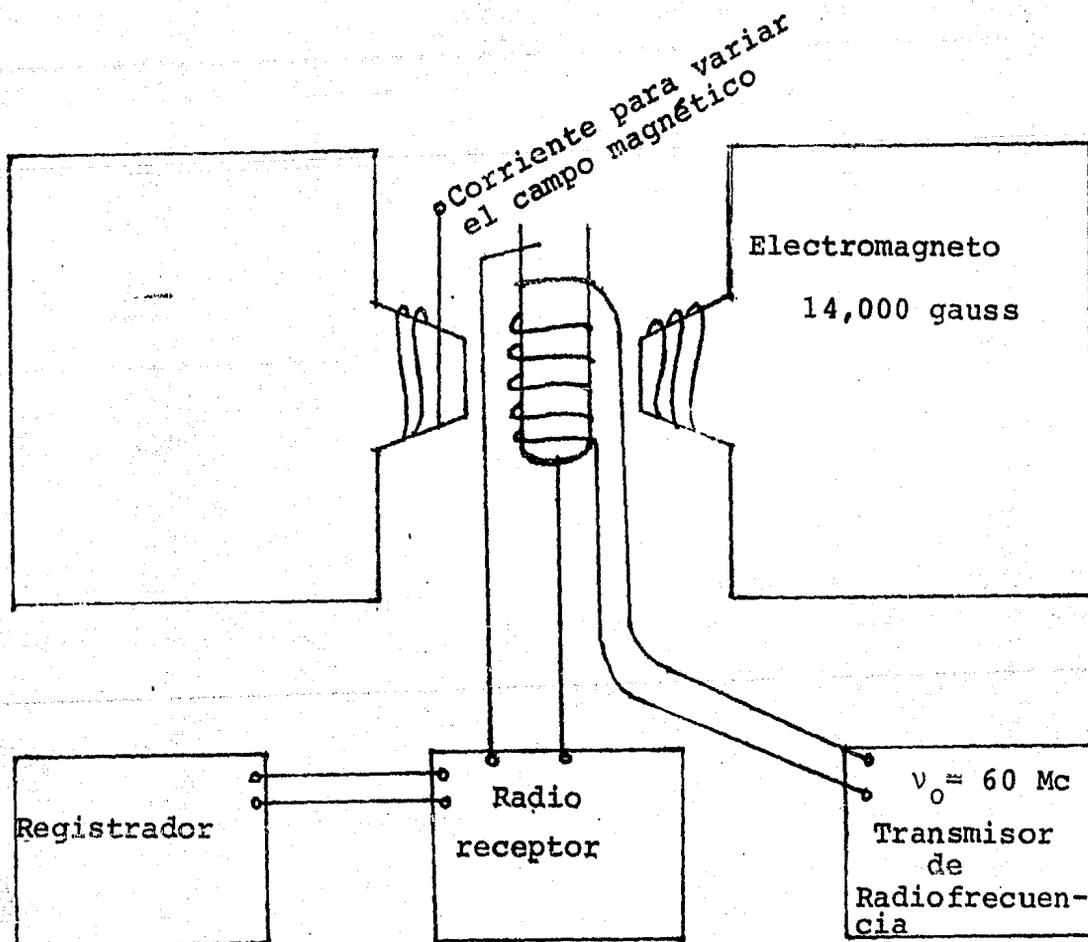


Figura 2

La medida de la energía absorbida nos produce un espectro de R.M.N., para poder interpretar dicho espectro son importantes los siguientes parámetros: desplazamiento químico, multiplicidad, constante de acoplamiento, y medida de la señal de integración.

Los electrones vecinos al núcleo originan su propio campo magnético que sumado al campo magnético aplicado hace que cada núcleo tenga diferente ambiente magnético, por lo que, cada uno de ellos aparece en diferente desplazamiento químico.

El desplazamiento químico está dado por la separación que existe en Hertz de una señal tomada como cero de referencia (TMS), dividida entre la frecuencia del instrumento. Las unidades del desplazamiento pueden ser,  $\delta$  ó  $\tau$ .

La multiplicidad es la interacción espín - espín de un grupo de protones con respecto a los protones del grupo vecino, dicha multiplicidad en los sistemas de primer orden esta dada por la ecuación  $2nI + 1$ , en donde  $n$  es el número de protones vecinos e  $I$  es el espín nuclear.

El área bajo cada señal puede darnos el número de protones que hay en ella, esto se conoce como integración. Los instrumentos modernos cuentan con un integrador electrónico, el cual nos da una medida lineal equivalente al número de protones que tien la molécula.

Las separaciones de las líneas adyacentes en una señal múltiple son constantes que miden directamente el acoplamiento espín-espín. A esta se le llama constante de acoplamiento, la cual se representa por  $J$  y es independiente del campo magnético aplicado.<sup>3</sup>

La importancia de la espectroscopia de R.M.N. es muy amplia ya que nos puede servir para: la elucidación de estructuras de compuestos orgánicos, (lo cual es aplicable en productos farmacéuticos, bioquímicos, etc.) en problemas de estereoquímica e isómeros ópticos, en análisis cualitativo, en análisis cuantitativo de mezclas, etc.

Para determinar la composición de una mezcla de componentes puros es necesario que al menos una de las bandas de

absorción de los componentes de dicha mezcla este separada del resto, la integración de dicha señal nos servirá de base para conocer la integración total del compuesto del que forma parte, y por diferencia en el caso de mezcla binaria se conocerá la integración del segundo componente de la mezcla. La relación entre las dos integraciones es una medida de la relación molar en que se encuentren los componentes.<sup>4</sup>

## VITAMINAS HIDROSOLUBLES

Antiguamente el hombre desconocía que las vitaminas eran indispensables en su dieta, creía que con proteínas, grasas y carbohidratos ésta estaba completa. Por descubrimientos del siglo pasado se vió que las vitaminas eran esenciales en la alimentación. No se admitió que la falta de dichas sustancias pudiese producir enfermedades en el hombre, hasta que se reconoció su carencia en un tipo de oftalmia, del beriberi y del escorbuto, pero estas últimas se podían curar con ciertos alimentos, por lo que se experimentaron diferentes tipos de dietas y fué así como en 1911 se aisló de la cascarrilla de arroz una fracción activa a la que se llevó vitamina. Más tarde se diferenciaron las vitaminas como solubles en grasas a las que se les denominó con la letra A y solubles en agua llamándoseles vitamina B. Tiempo después se observó que existían varios tipos de A y B y se tuvo que cambiar su terminología.<sup>5</sup>

Actualmente las vitaminas se dividen en dos tipos: liposolubles e hidrosolubles. Las liposolubles son las vitaminas A, D y E y las hidrosolubles con el complejo B, vitamina C, nicotinamida, biotina y ácido pantoténico.

### Vitamina B<sub>1</sub>

También conocida como clorhidrato del cloruro de tiamina ó cloruro de 3-(-4-amina-2 metil pirimidil-5-metil)-4-metil-4-metil-beta hidroxietiltiazolio.<sup>6</sup>

Su fórmula es  $C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS$ ; P.M. 337.28 g/mol.

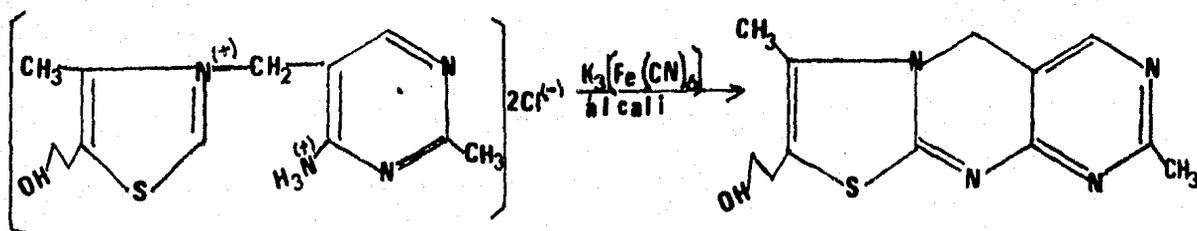
Se encuentra en plantas y tejidos animales, principalmente en la cascarilla de arroz, cereales, levadura, hígado, huevos, hojas verdes, raíces y tubérculos.

La vitamina B<sub>1</sub> combate y ayuda a la prevención del beriberi. En 1926 se aisló de la cascarilla de arroz, pero no fué sino hasta 1936 cuando se determinó su estructura.

Los cristales de la vitamina B<sub>1</sub> son monoclinicos y se descomponen a 248°C; es soluble 1 g en 1 ml de H<sub>2</sub>O; 1 g en 18 ml de glicerol; 1 g en 100 ml de alcohol, insoluble en éter, hexano, cloroformo, acetona y alcohol anhidro.

La tiamina es una pirimidina y a la vez un derivado 1,3-tiazólico. La estructura pirimidínica es de naturaleza común pero el núcleo tiazólico es poco común.

La tiamina en solución alcalina y con ferrocianuro de potasio es oxidada a tiocromo, y el compuesto resultante da una coloración azul fluorescente, por lo que esta propiedad es utilizada en su determinación.<sup>7</sup>



CLORHIDRATO DE TIAMINA

TIOCROMO

Además de ser analizada por su oxidación a tiocromo (método fluorométrico) se pueden utilizar diferentes métodos como son: gravimétrico, espectrofotométrico, volumétrico y microbiológico. El método más específico es el fluorométrico sin embargo los resultados son reproducibles únicamente con un margen de  $\pm 5-10\%$ .

La dosis diaria que requiere el organismo es de 2-5 mg y terapéuticamente de 25-100 mg diarios.<sup>8</sup>

### Vitamina B<sub>2</sub>

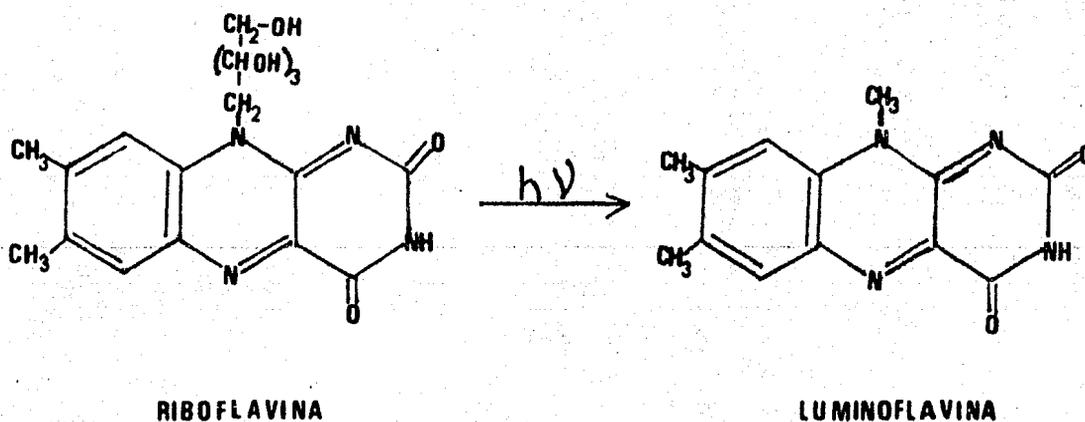
Conocida como riboflavina ó 7,8-dimetil-10-(D-ribo-2, 3,4,5-tetrahidroxipentil) iso-aloxazina. Su fórmula es  $C_{17}H_{20}N_4O_6$  P.M. 376.36 g/mol.

Es un factor nutricional que se encuentra en la leche, huevos, hígado, corazón, frijol, etc. En animales su deficiencia provoca alteraciones del crecimiento.

En 1935 se determinó su estructura y se pudo aislar de la leche, (por lo que se le conocía como lactoflavina) de la clara de huevos y del hígado.

Sus cristales son anaranjado claro que se descompone a 278-282°C; es soluble en soluciones acuosas de NaCl, ciclohexanol, acetato amflico, alcohol bencílico y fenol; menos soluble en alcohol y agua (4.5 mg/100 ml de agua o etanol absoluto a 27.5°C); insoluble en éter, cloroformo, acetona, benceno; muy soluble en soluciones alcalinas (con descomposición).<sup>9</sup>

La riboflavina en solución alcalina se irradia para formar la luminoflavina, sustancia fluorescente que se extrae con cloroformo y se utiliza en la determinación fluorométrica de riboflavina.



Existen otras técnicas de análisis para cuantificarla: espectrofotometría y polarografía.<sup>7</sup> La dosis que el organismo necesita es de 0.5-0.6 mg por día y terapéuticamente de 5-10 mg diarios.<sup>10</sup>

### Vitamina B<sub>6</sub>

Recibe también el nombre de clorhidrato de piridoxina ó clorhidrato de la 5-hidroxi-6-metil-3,4-piridinadimetanol ó clorhidrato de la 2-metil-3-hidroxi-4,5-bis (hidroximetil) piridina. Su fórmula es C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>Cl N O<sub>3</sub> su P.M. es 205.64 g/mol.

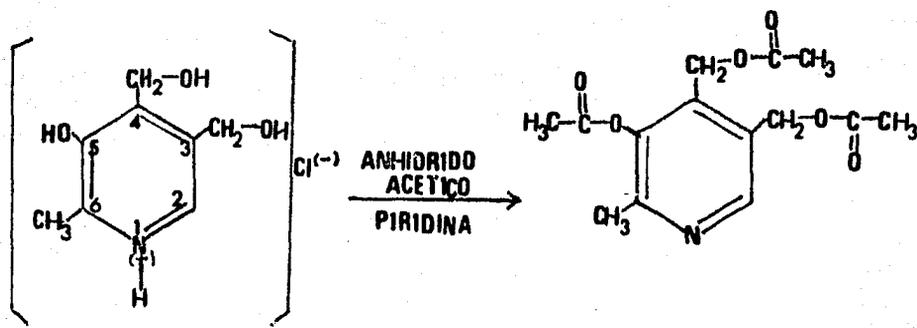
Esta presente especialmente en la levadura, el hígado y cereales. Su deficiencia produce anemia hipocrómica.

En 1938 fué aislada y su estructura se determinó en 1939.

Es estable a la luz y al aire, se descompone de 205-212°C y sublima. Es soluble en agua, alcohol, propilen glicol y acetona; prácticamente insoluble en éter y cloroformo.

La piridoxina es una de las 3 formas de la vitamina B<sub>6</sub> siendo las otras dos piridoxal y piridoxamina, las cuales solo difieren por los sustituyentes de la posición 4 de la molécula de piridina.

El análisis de piridoxina se puede hacer por espectrofotometría, volumetría, polarografía, microbiología y cromatografía de gases siendo este último el más exacto de ellos. Para aplicar este método es necesario formar un derivado acetilado y así aumentar su volatilidad.



La dosis diaria en un adulto es de 1.5 a 2 mg; terapéuticamente 150 mg diarios.

## Vitamina B<sub>12</sub>

También se le conoce con el nombre de cianocobalamina o bien  $\text{Co}\alpha\text{-}[\alpha\text{-}(5,6\text{-dimetilbenzimidazodil})\text{-Co}\beta\text{-ciano-}[^{57}\text{Co}]\text{cobamida.}^{11}$  Su fórmula es  $\text{C}_{63}\text{H}_{88}\text{CoN}_{14}\text{O}_{14}\text{P}$  su peso molecular es 1355.42 g/mol.

Una de las fuentes más ricas esta en el Milorganite (lodo activado de aguas fecales) y el estiércol. Las plantas no contienen vitamina B<sub>12</sub> por lo que la principal fuente de vitamina B<sub>12</sub> son los tejidos animales.

La vitamina B<sub>12</sub> es conocida como factor antianémico ya que se usa en el tratamiento de desnutrición.

En 1948 se aisló del hígado, pero no fué sino hasta 1955 cuando se determinó su estructura por difracción de rayos X y análisis químicos.

Sus cristales son higroscópicos de color rojo oscuro. Al exponerse al aire absorbe un 12% de agua. Los cristales hidratados son estables al aire; es soluble 1 g en 80 ml de H<sub>2</sub>O y en alcohol; insoluble en acetona, éter y cloroformo.

La cobalamina tiene un anillo reducido de tipo porfirínico en el cual está ausente un puente metálico y los heteroátomos de nitrógeno están complejados con un grupo cianocobáltico, además posee un anillo ribofuranósido y uno benzimidazol.

Su análisis es difícil debido a que se encuentra en bajas concentraciones. Los métodos de análisis principales se basan en la absorción de la luz en solución acuosa o bien

en la determinación fotométrica del grupo cianuro de la cianocobalamina. Otro método más específico es el microbiológico, pero consume mucho tiempo en su ejecución y es menos exacto.

La dosis diaria que el organismo requiere es: 1 µg diario o menos y terapéuticamente 100 µg al mes.

### Vitamina C

Su nombre es ácido-L-ascórbico o bien la lactona del ácido L-3-cetotreohehexurónico (forma enólica); su fórmula es  $C_6H_8O_6$  y su peso molecular es 176.12 g/mol.

Se encuentra en las frutas cítricas. Es esencial en la formación de materia intercelular y colágeno, se usa en la profilaxis y tratamiento del escorbuto.

Sus cristales son monoclinicos, su punto de fusión es 190-192°C. Algunos de los productos que contienen vitamina C se oxidan al exponerse al aire y a la luz. Es soluble en 1 g en 3 ml de  $H_2O$ , 1g en 25 ml de etanol, 1 g en 10 ml de metanol, 1 g en 20 ml de propilen glicol, 1 g en 100 ml de glicerol y acetona; insoluble en cloroformo y éter.

El ácido ascórbico es ópticamente activo siendo el enantiómero L el de utilidad para el organismo. Esta sustancia es una lactona y debe sus propiedades ácidas y su facilidad de oxidación a la presencia de un grupo endiol conjugado a un grupo carbonilo. Para su análisis se aprovecha su propiedad óxido-reductora (determinación volumétrica), se determina también fotométrica y polarográficamente.

El organismo necesita de 25-75 mg diarios y terapéuticamente de 250 mg diarios.

### Nicotinamida

Conocida como niacinamida o la amida del ácido-3-piridin carboxílico. Su fórmula  $C_6H_6N_2O$ ; peso molecular 122.12 g/mol. Se encuentra en plantas y animales usualmente en forma conjugada en sistemas enzimáticos. Ayuda en la prevención de pelagra. Se aisló del hígado.

Su punto de fusión es 128-131°C; es soluble 1 g en 1 ml de agua, 1 g en 1.5 ml de alcohol, 1 g en 10 ml de glicerol, altamente soluble en cloroformo.

La nicotinamida es la amida del ácido nicotínico y se prepara a partir de él. Presenta una curva de absorción muy característica en el U.V. Su coeficiente de extinción molar depende del pH. Los métodos fotométricos son los más empleados para el análisis de nicotinamida y ácido nicotínico, además de método polarográficos y los microbiológicos.

La dosis que el organismo necesita es de 15-30 diarios y la terapéutica de 50 a 250 mg diarios.

## PARTE EXPERIMENTAL

El trabajo experimental encaminado al análisis por Resonancia Magnética Nuclear Protónica de vitaminas hidrosolubles (tiamina, piridoxina, riboflavina, ácido ascórbico, nicotinamida, cianocobalamina) se dividió en cuatro etapas.

I. Análisis de espectros de muestras patrones: con este objeto se registraron espectros de R.M.N. protónica de cada una de las vitaminas patrón y se identificaron las señales observadas.

II. Análisis de mezclas patrones: se prepararon mezclas de vitaminas patrón que correspondieron a las dosificaciones más usuales en medicamentos y se hizo el estudio cuantitativo.

III. Análisis de medicamentos polivitamínicos: para facilitar la aplicación de la técnica al análisis de fármacos, se utilizaron polivitamínicos inyectables los cuales se disolvieron, se registraron sus espectros y se hizo su estudio cuantitativo.

IV. Determinación analítica de vitaminas hidrosolubles por otras técnicas para comparar los resultados obtenidos por R.M.N. protónica. En el análisis de cada medicamento se ensayaron otras técnicas analíticas específicas para cada vitamina.

El trabajo de Resonancia Magnética Nuclear Protónica se realizó usando un aparato EM-390 de Varian en máximas condiciones de resolución y homogeneidad, patrones para fines cromatográficos de Merck, agua deuterada Merck como disolvente

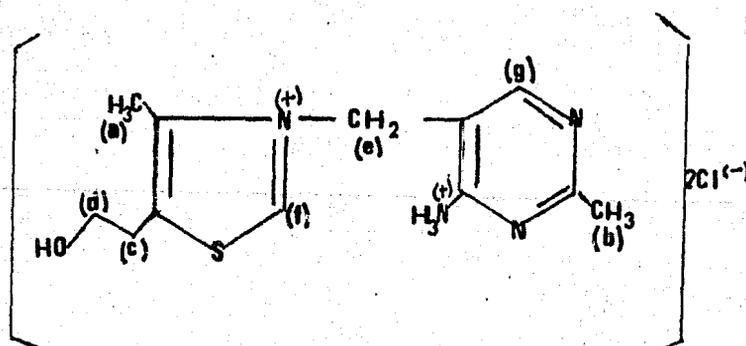
y como referencia la sal sódica del ácido 2,2-dimetil, penta,  
-2-sila-5-sulfónico (DSS).

Todos los espectros estan corridos en  $D_2O$ , por lo tanto,  
las señales de los protones intercambiables no aparecen y  
solamente aparece la señal de HDO en  $\approx 4.6$  p.p.m.

## ANALISIS DE ESPECTROS DE MUESTRAS PATRON

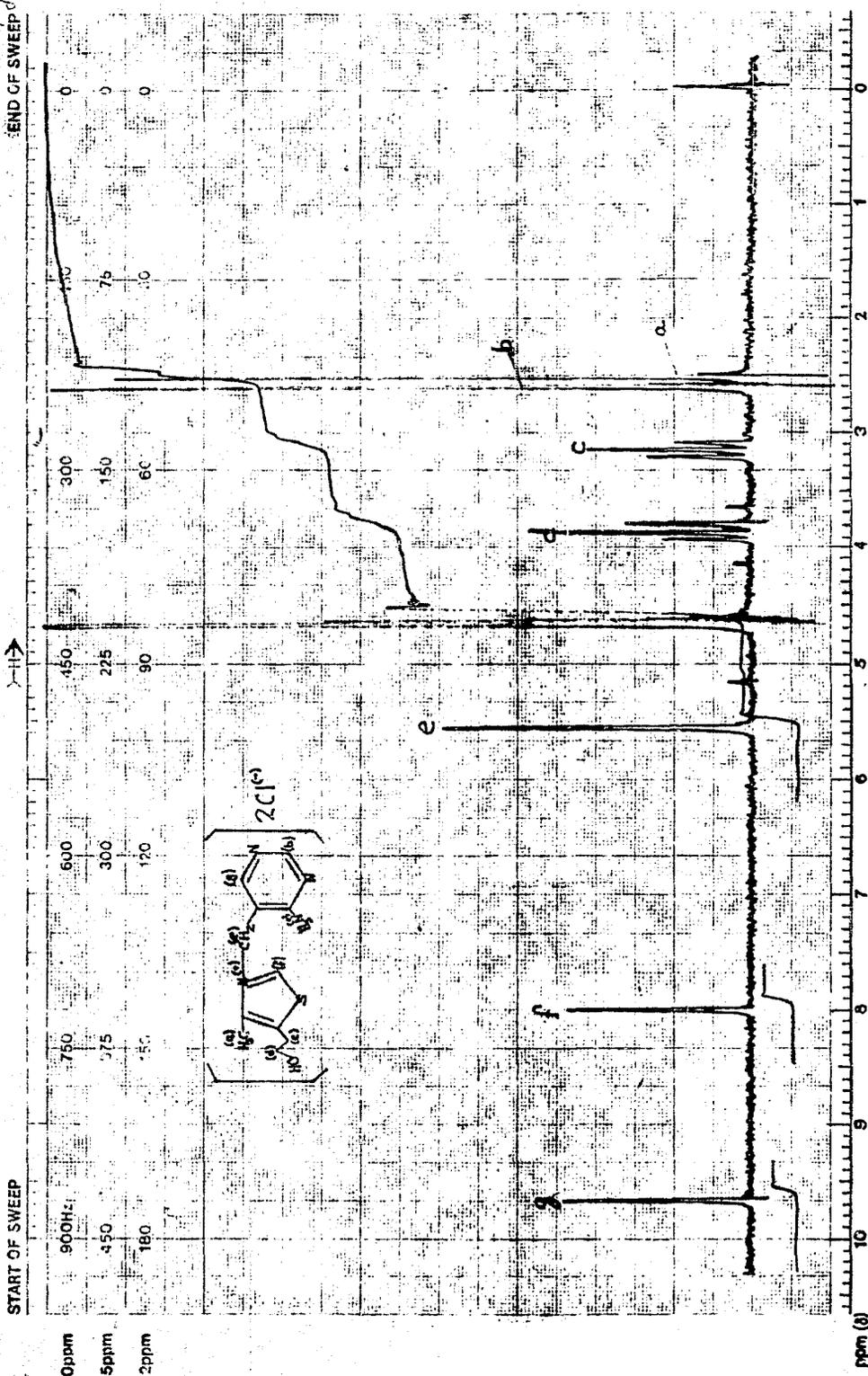
Vitamina B<sub>1</sub> (Tiamina)

## Estructura



En el espectro de la tiamina (espectro 1)<sup>1,2</sup> se observan las siguientes señales:

Protones	Desplazamiento (ppm)	Multiplicidad	Constantes de acoplamiento (Hz)
a	2.56	s	---
b	2.63	s	---
c	3.14	t	5
d	3.86	t	5
e	5.60	s	---
f	8.03	s	---
g	9.70	s	---
H <sub>2</sub> O	4.67	s	---



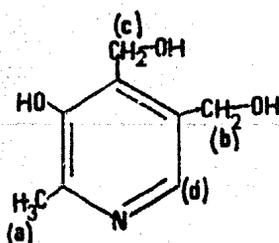
LOCK POS. \_\_\_\_\_ ppm SPECTRUM AMPL. 2.5 x 1000 SWEEP TIME 5 min NUCLEUS <sup>1</sup>H SAMPLE: M<sub>2</sub> Eluga OPERATOR: R. J. Johnson  
 LOCK POWER \_\_\_\_\_ mG FILTER 0.2C sec SWEEP WIDTH 10 ppm ZERO REF. TMS DATE: 6-2-61  
 DECOUPLE POS. \_\_\_\_\_ ppm RF POWER 0.05 mG END OF SWEEP A C SAMPLE TEMP. 7.0 SOLVENT: D<sub>2</sub>O SPECTRUM NO. 1972  
 DECOUPLING POWER \_\_\_\_\_ mG

SPECTRUM NO. 1972  
Experiment 1, I

Es de hacer notar que el proton (g) del anillo pirimidínico sufre cambios en su desplazamiento químico con variaciones en el pH, debido a una lenta protonación de los nitrógenos del anillo.<sup>13</sup>

### VITAMINA B<sub>6</sub> (Piridoxina)

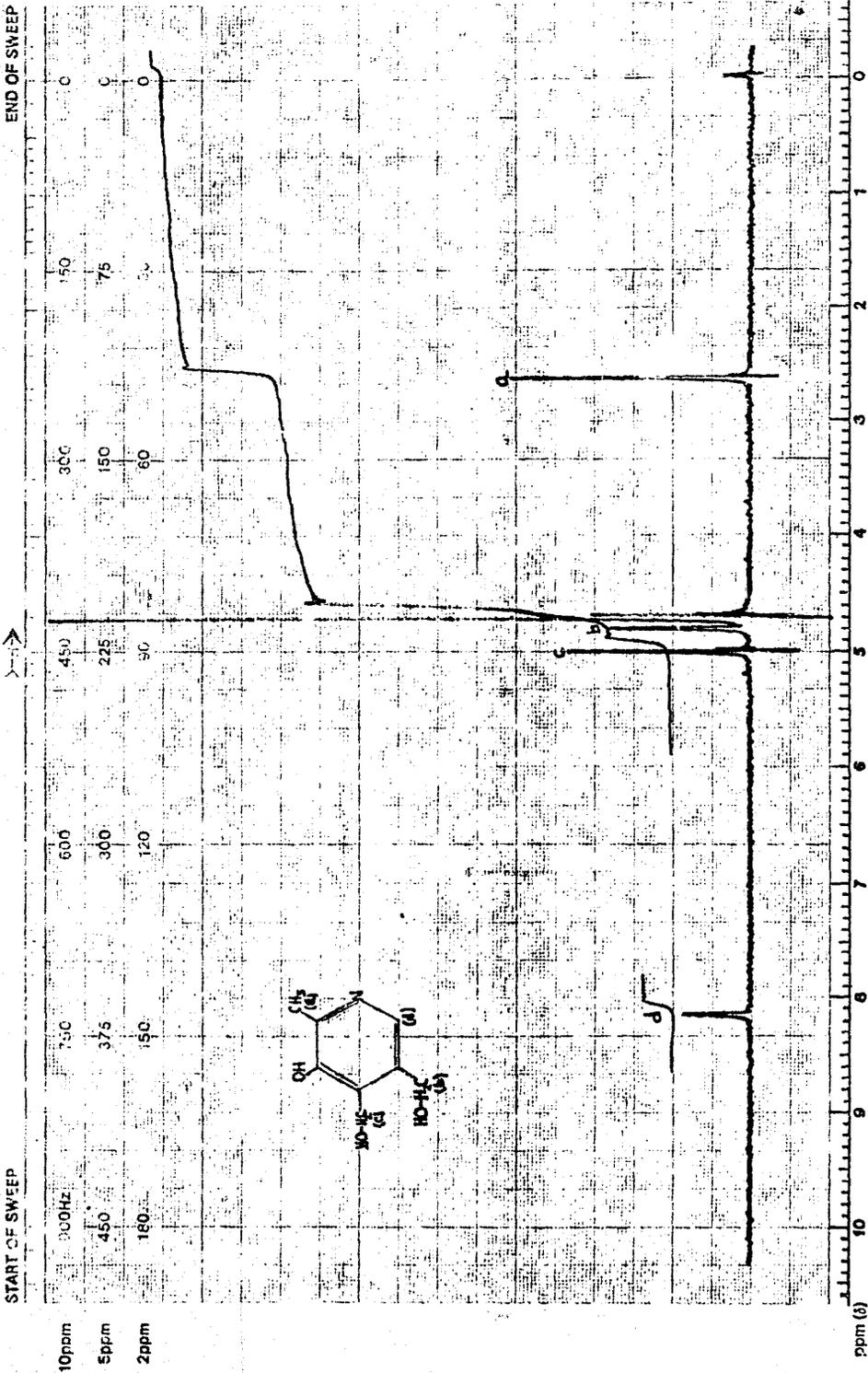
#### Estructura



En su espectro (espectro 2)<sup>12</sup> se observan las siguientes señales:

Protones	Desplazamiento (p.p.m.)	Multiplicidad
a	2.66	s
b	4.83	s
c	5.03	s
d	8.20	s
HDO	4.70	

EM-390 90 MHz NMR SPECTROMETER



Varian Instrument Division  
Palo Alto, California

PRINTED IN U.S.A.

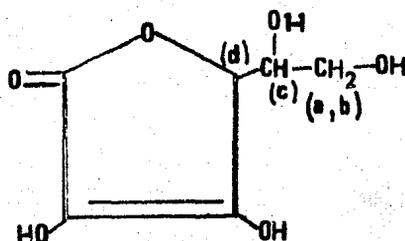
PART NO. 950209 02



LOCK POS. \_\_\_\_\_ ppm SPECTRUM AMPL.  $\times 1000$  SWEEP TIME 5 min NUCLEUS  $^1H$  OPERATOR Ally Jordan  
 LOCK POWER \_\_\_\_\_ mG FILTER 0.05 sec SWEEP WIDTH 10 ppm ZERO REF. DSS SAMPLE: mt Olive DATE 6-22-61  
 DECOUPLE PCS. \_\_\_\_\_ ppmm DECOUPLING POWER \_\_\_\_\_ mG RF POWER 0.05 mg END OF SWEEP \_\_\_\_\_ ppm SAMPLE TEMP. A SOLVENT: D<sub>2</sub>O SPECTRUM NO. 4771  
 \_\_\_\_\_

## VITAMINA C (Acido -L-ascórbico)

## Estructura

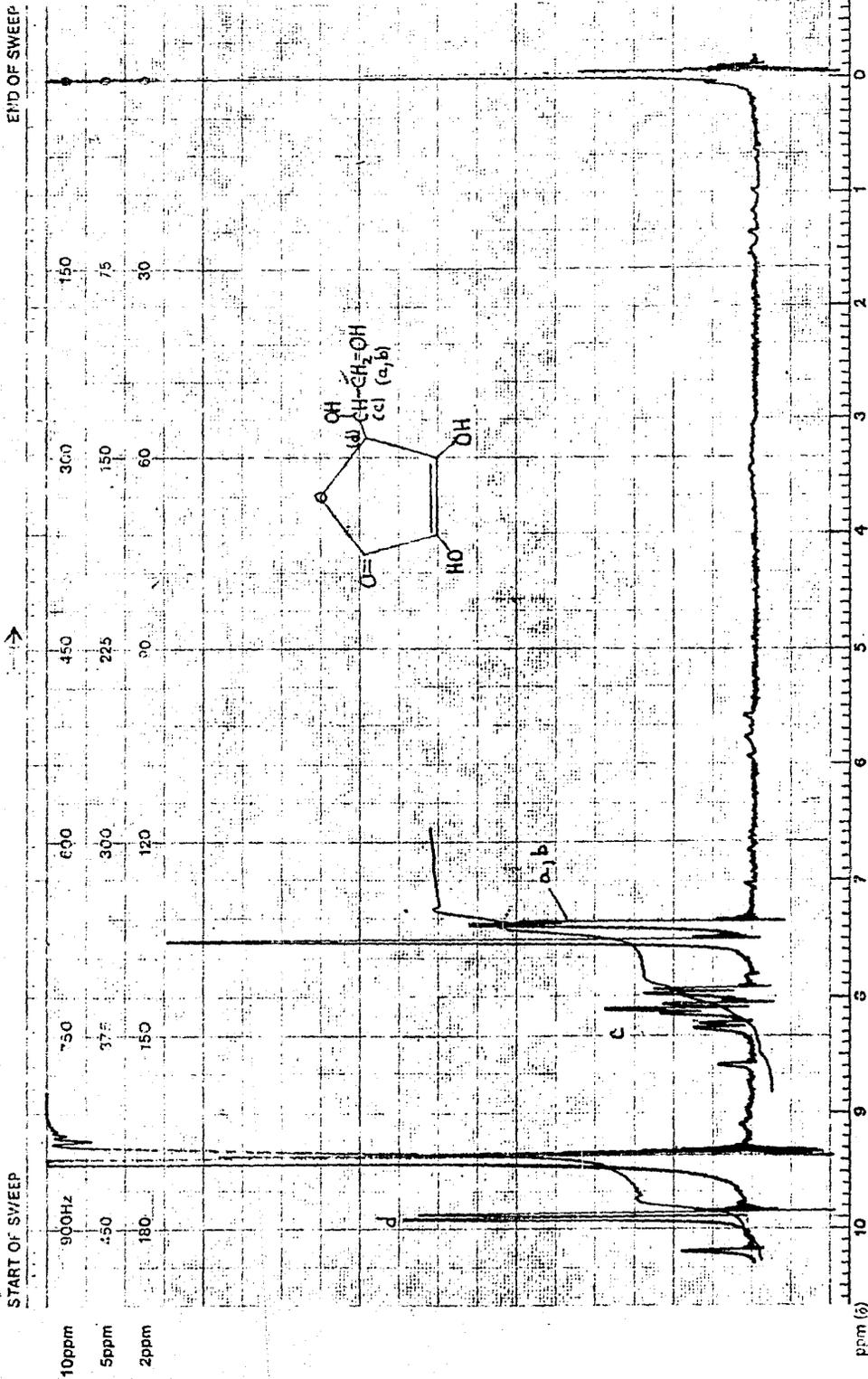


En su espectro (espectro 3)<sup>12</sup> se observan las siguientes señales:

Prótones	Desplazamiento (ppm)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento (Hz)
(a) o (b)	3.66-3.76	d,d	*
c	4.03	d,d,d	*
d	4.93	d	4

Los protones a, b y c no forman un sistema de acoplamiento de primer orden, se trata de un sistema complejo. Con objeto de hacer una mejor interpretación del espectro se realizó una expansión del doble de lo normal.

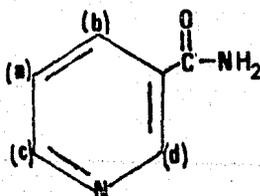
\*La medida de las constantes de acoplamiento de este sistema requerirían de una expansión del espectro y un desplazamiento de la señal de HDO.



LOCK POS. \_\_\_\_\_ ppm SPECTRUM AMPL.  $2 \times 10^{60}$  SWEEP TIME 3 min NUCLEUS H SAMPLE: Mr. Elmer OPERATOR W. J. ...  
 LOCK POWER \_\_\_\_\_ mG FILTER 0 sec SWEEP WIDTH 5 ppm ZERO REF. 365 Ac. Ascorbic  
 DECOUPLE POS. \_\_\_\_\_ ppm RF POWER 0.27 mg END OF SWEEP 0 ppm SAMPLE TEMP. A °C SOLVENT: D<sub>2</sub>O SPECTRUM NO. 8077  
 DATE: 10 - 10 - 67 Espinosa

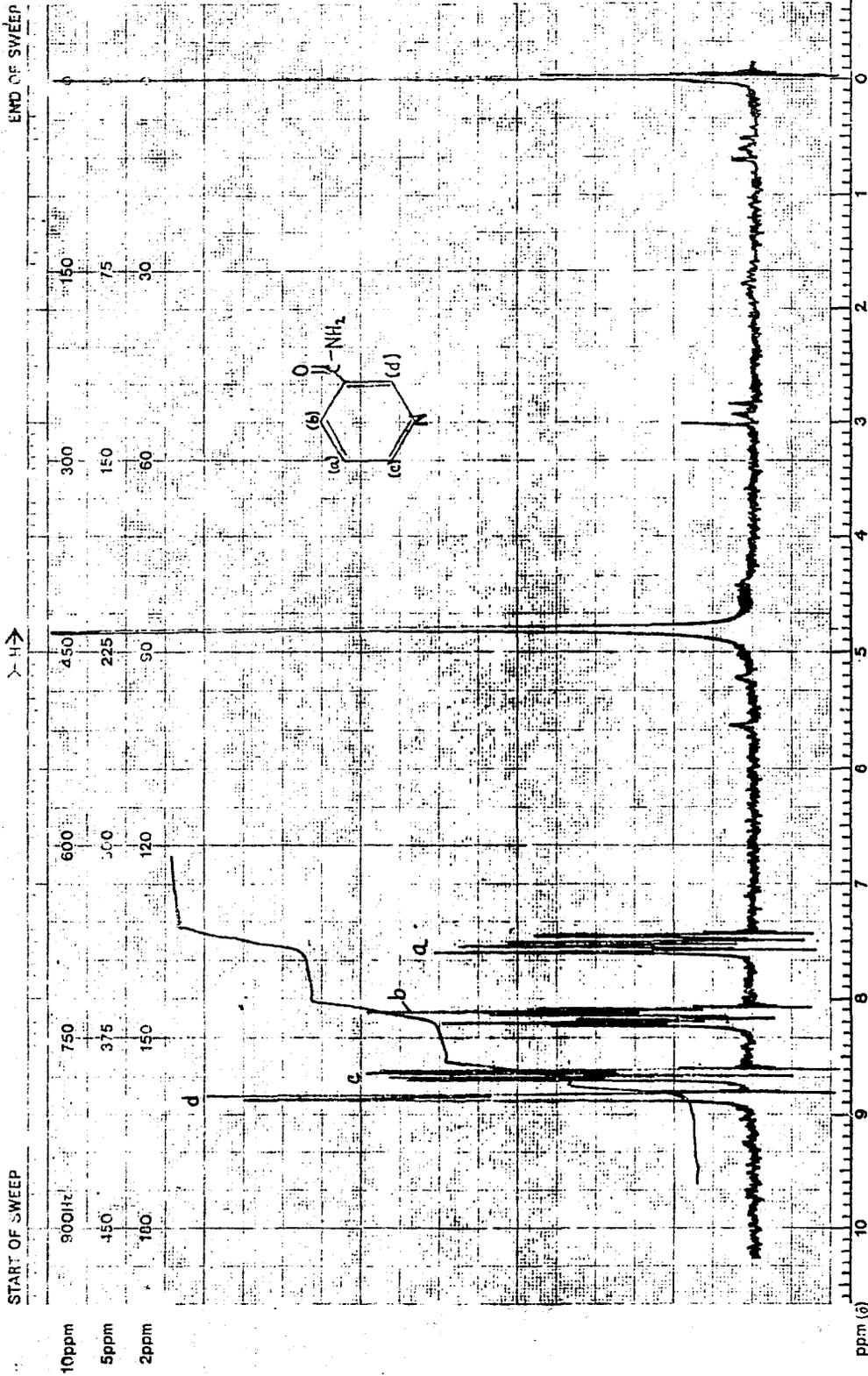
## NICOTINAMIDA

## Estructura



En el espectro (espectro 4)<sup>14</sup> se observan las siguientes señales:

Protones	Desplazamiento (p.p.m.)	Multiplicidad	Constantes de acoplamiento (Hz)
a	7.53	d, d	$J_{a,b}=9$ $J_{a,c}=4.5$
b	8.16	d, t	$J_{a,b}=9$ $J_{b,c}=2.5$ $J_{b,d}=2.5$
c	8.66	d, d	$J_{c,b}=2.5$ $J_{a,c}=4.5$
d	8.86	d	$J_{d,b}=2.5$
HDO	4.82		



LOCK POS. \_\_\_\_\_ ppm SPECTRUM AMPL.  $\downarrow$  x 10<sup>0.0</sup> SWEEP TIME 5 min NUCLEUS <sup>1</sup>H SAMPLE: Nic-Elsen OPERATOR: *Aljandria*

LOCK POWER \_\_\_\_\_ mG FILTER 0.05 sec SWEEP WIDTH 10 ppm ZERO REF. DSS Nicotinic acid DATE: 10-20-80

DECOUPLE POS. \_\_\_\_\_ ppm RF POWER 0.01 mG END OF SWEEP 0 ppm SAMPLE TEMP. 4 C SOLVENT: D<sub>2</sub>O SPECTRUM NO. 8170

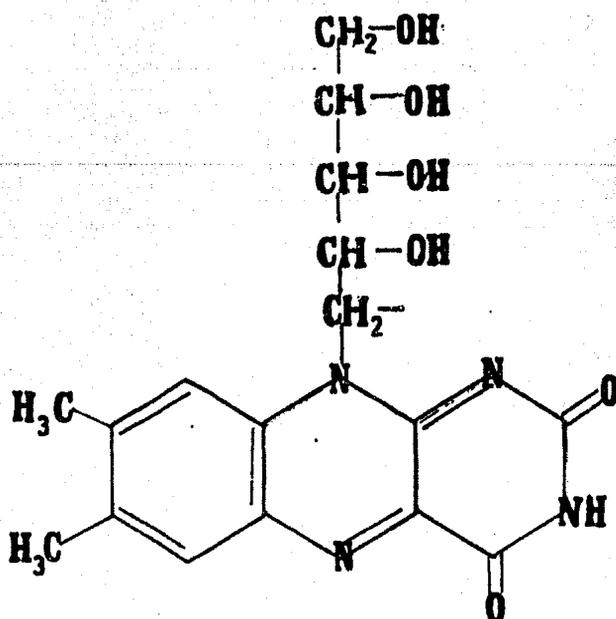
\_\_\_\_\_ ppm

*F. Spectro*



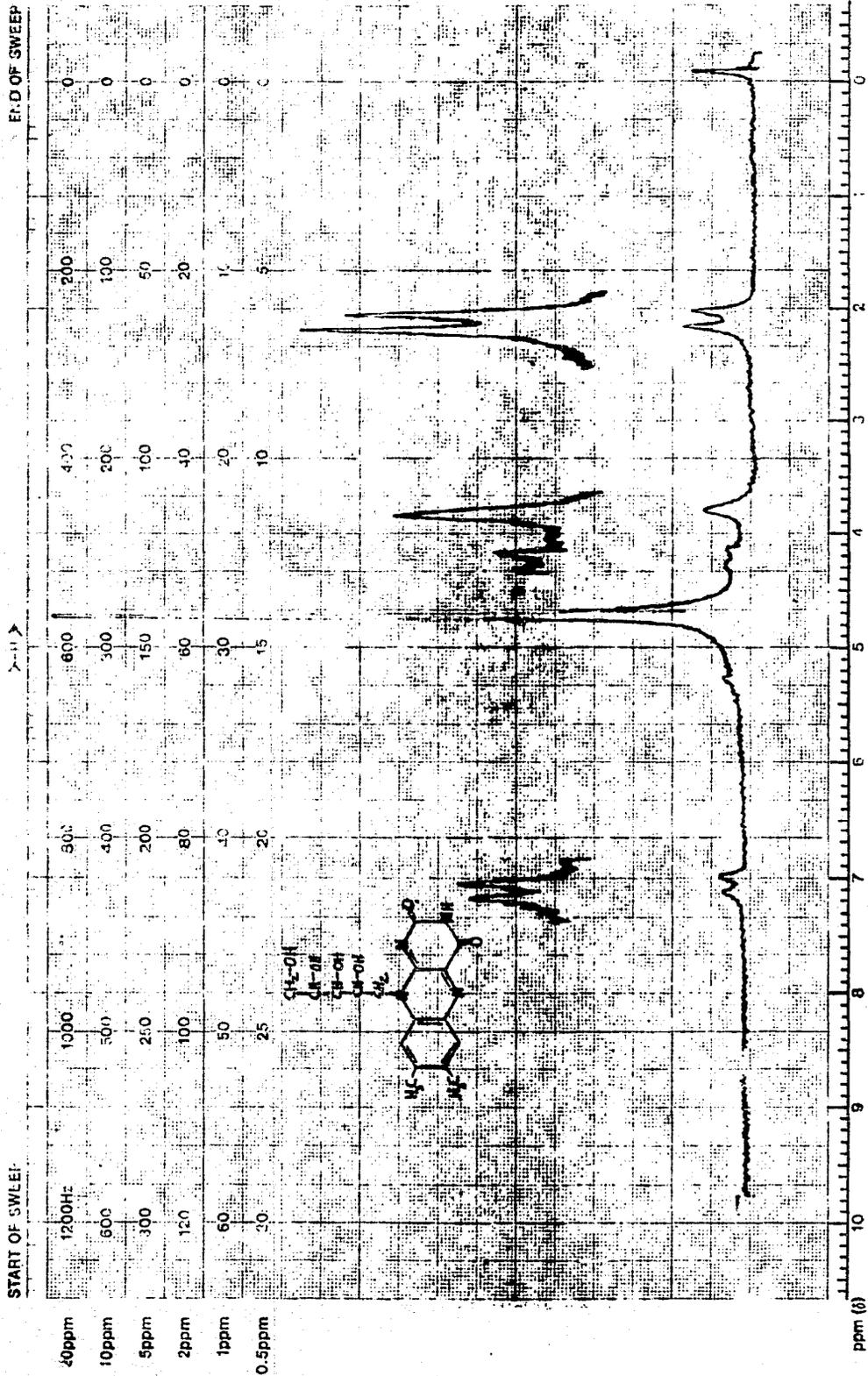
Vitamina B<sub>2</sub> (Riboflavina)

## Estructura



El espectro de la riboflavina se corrió disuelto en una solución alcalina de agua deuterada no pudiéndose interpretar satisfactoriamente ya que ésta se descompone. Por lo que esta vitamina queda excluida de nuestro análisis.

EM-360 60 MHz NMR SPECTROMETER



SPECTRUM AMPL. 4 X 10<sup>0</sup> min SWEEP TIME 5 min

FILTER 0.5 sec SWEEP WIDTH 1.0 ppm or Hz

RF POWER 6.5 mG END OF SWEEP 0 ppm or Hz

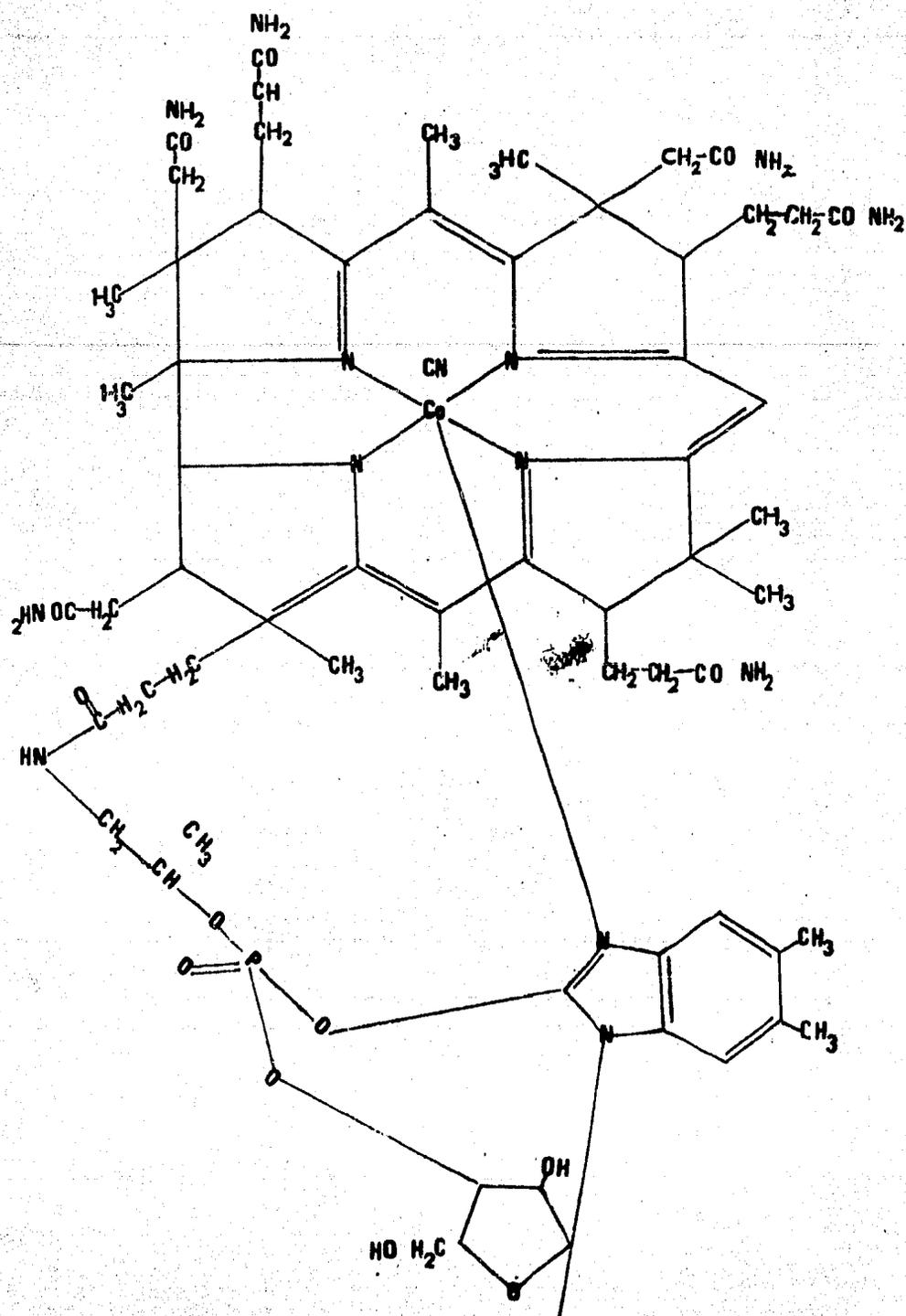
SAMPLE 0.15 mg (3) + 0.4 ml D<sub>2</sub>O REMARKS: Corridor 2.6

OPERATOR M. E. Elam DATE 11-8-51 SOLVENT: 13.6

SPECTRUM NO. 8

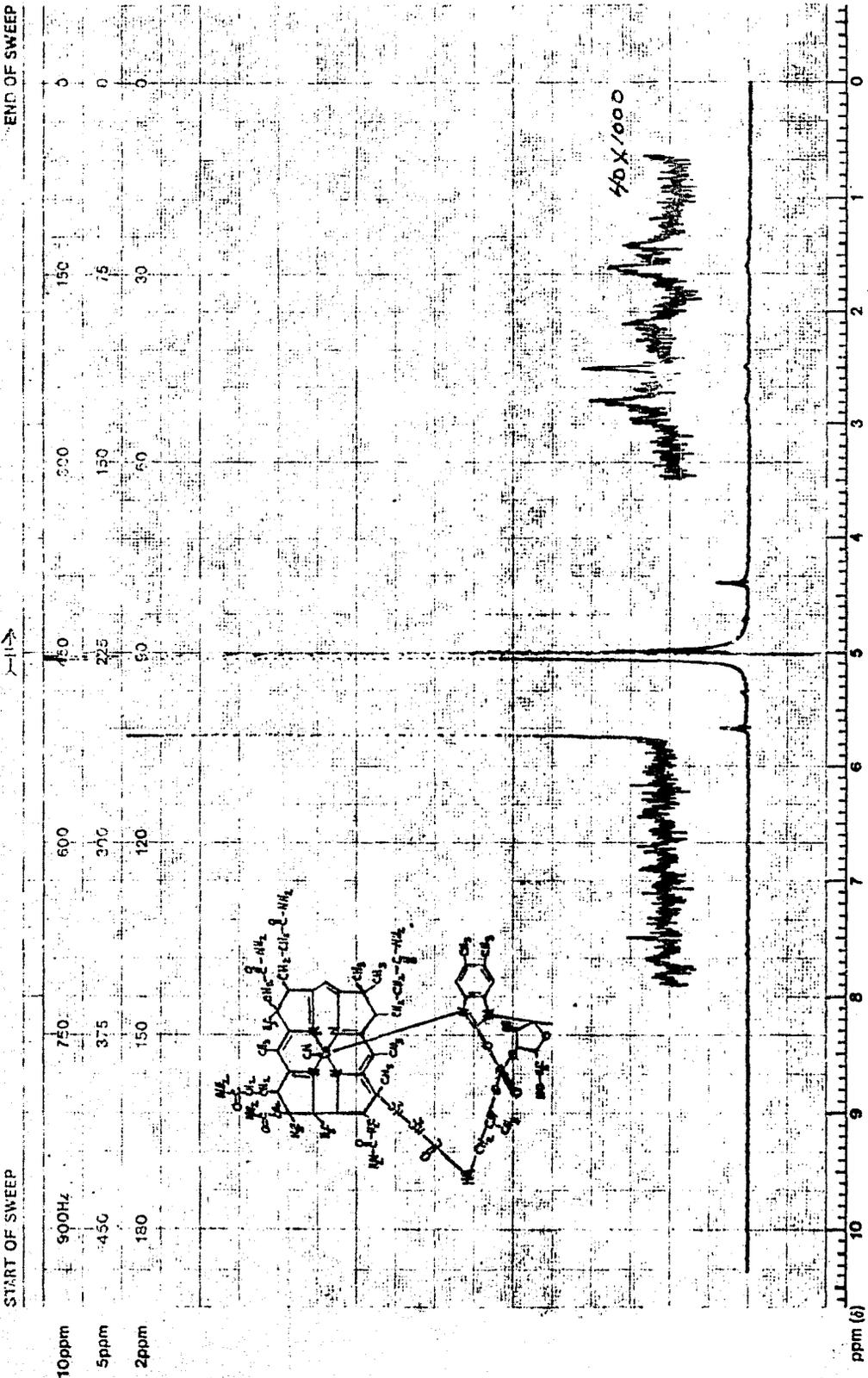
# Vitamina B<sub>12</sub> (Cianocobalamina)

## Estructura

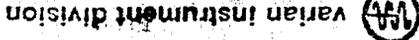


El espectro de R.M.N. de vitamina B<sub>12</sub> (espectro 6) no fué completamente interpretado pues existen muchos grupos equivalentes que sobrelapan sus señales. Otro problema fué la gran cantidad de protones intercambiables con agua deuterada que hicieron que la señal de intercambio fuera tan grande que el resto de los protones no se pudieran observar. Los desplazamientos químicos en donde aparecen señales pueden quedar comprendidos entre 0.5-3 p.p.m. así como señales entre 6-7.5 p.p.m debido a los protones presentes en insaturaciones. Estudio detallado de los desplazamientos químicos de cada uno de los protones se ha logrado haciendo uso de aparatos de mayor resolución.<sup>15</sup>

En los fármacos polivitamínicos las concentraciones máximas de vitamina B<sub>12</sub> es 5 mg por lo que se corrió el espectro de esta vitamina usando esta cantidad para que al mismo tiempo que se ve la complejidad del espectro se demuestre que en esa concentración la vitamina B<sub>12</sub> no interfiere en un análisis cuantitativo.



Varian Instrument Division  
 Palo Alto, California



LOCK POS. \_\_\_\_\_ ppm SPECTRUM AMPL. 800 SWEEP TIME 5 min NUCLEUS H SAMPLE: Ms. Elena OPERATOR: Teaca  
 LOCK POWER \_\_\_\_\_ mG FILTER 0.1 sec SWEEP WIDTH 10 ppm ZERO REF. THF DMF D12 DATE 5-07-74  
 DECOUPLE POS. \_\_\_\_\_ ppm DECOUPLING POWER \_\_\_\_\_ mG RF POWER 0.5 mg END OF SWEEP \_\_\_\_\_ ppm SAMPLE TEMP. \_\_\_\_\_ °C SOLVENT: D<sub>2</sub>O SPECTRUM NO. 206  
 Signature: \_\_\_\_\_

## II. ANALISIS DE ESPECTROS DE MEZCLAS PATRONES

Los medicamentos que contienen las vitaminas mezcladas se encuentran en las siguientes dosificaciones.

TABLA I

Vitaminas (mg)

Medicamentos	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>6</sub>	B <sub>12</sub>	C	Nicotinamida
1	12	15	12	- -	400	100
2	100	---	200	.001	- -	---
3	100	--	50	5	--	--
4	200	10	5	---	50	50
5	100	2	10	---	---	100
6	200	---	100	5	---	---
7	100	---	50	1	---	---
8	250	10	15	5	---	125
9	100	---	200	---	---	---
10	100	---	50	---	---	---
11	100	---	50	1	---	---
12	100	---	50	5	---	---
13	100	---	50	5	---	---
14	100	---	50	1	---	---

Los medicamentos publicados en la tabla anterior son los únicos que aparecen en el Diccionario de Especialidades Farmacéuticas.<sup>16</sup>

De los datos anteriores podemos ver que existen 5 tipos de polivitamínicos hidrosolubles:

Los que contienen vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, C y Nicotinamida (1,4)

Los que contienen vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> y Nicotinamida (8).

Los que contienen vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> y Nicotinamida (5).

Los que contienen B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub> (2,3,6,7,11,12,13 y 14).

Los que únicamente contienen B<sub>1</sub> y B<sub>6</sub> (9,10).

Debe hacerse notar que en este análisis, las vitaminas B<sub>2</sub> y B<sub>12</sub> no fueron cuantificadas debido a su baja solubilidad en agua y a la poca cantidad presente en el fármaco. Además como se observa en los espectros no existe interferencia entre sus señales y las de las vitaminas que van a ser cuantificadas, ya que no presentan señales de absorción que se superpongan a las señales de las vitaminas B<sub>1</sub> y B<sub>6</sub>.

## Análisis de Mezclas Patrones

Con el fin de lograr el análisis de espectros de mezclas de las 5 vitaminas hidrosolubles ( $B_1$ ,  $B_6$ ,  $B_{12}$ , C y Nicotinamida) elaboramos mezclas sencillas para llegar a la más compleja.

### Mezcla I

De acuerdo a la tabla 1, las proporciones de vitamina  $B_1$  y  $B_6$  en los fármacos son de 2:1 ó 1:2 por lo que se prepararon las siguientes mezclas:

Se preparó una mezcla de 25.6 mg de vitamina  $B_1$  y 12.8 mg de vitamina  $B_6$ .

Las señales que aparecen en el espectro (espectro 7) corresponden a:

Protones		Desplazamiento (ppm)
$B_1$	$B_6$	
a,b	a	2.4 - 2.7
c	-	3.16
d	-	3.86
-	b	4.8
-	c	5.0
e	-	5.6
f	d	8.03-8.16
g	-	9.7
HDO	-	4.7

Teniendo el espectro de la mezcla se midieron las áreas de las señales de los protones que fueron fáciles de identificar.

1. La señal en 3.86 p.p.m. que integra para 13 unidades que corresponden a 2 protones de B<sub>1</sub>.

$$2 x = 13 \text{ unidades}^*$$

$$X = 6.5 \text{ unidades}$$

Donde X = 1 protón de vitamina B<sub>1</sub>

Por otra parte la señal de 2.4-2.7 p.p.m. integró para 6 protones de B<sub>1</sub> y 3 protones de B<sub>6</sub>, su integral fué de 54 unidades por lo que:

$$6x + 3y = 54 \text{ unidades}$$

$$y = \frac{54u - 6x}{3}$$

Donde y = 1 protón de vitamina B<sub>6</sub>

Sustituyendo x = 6.5 unidades

$$y = \frac{54 u - 6(6.5)}{3}$$

$$y = 5 \text{ unidades}$$

Se puede ver que la relación molar no es la misma (x=y), en este caso guardan una relación de 1 de B<sub>6</sub> por 1.3 de B<sub>1</sub>. Multiplicando estas relaciones por el peso molecular de cada vitamina tenemos:

$$B_1 = 1.3 \text{ mol} \times 337.3 \text{ g/mol} = 438.49 \text{ g}$$

$$B_6 = 1 \text{ mol} \times 205.6 \text{ g/mol} = 205.60 \text{ g}$$

\*De aquí en adelante unidades se representará por la letra u.

Relación por R.M.N.

Relación Patrón

$$\frac{B_1}{B_6} = \frac{438.49 \text{ g}}{205.60 \text{ g}} = 2.13$$

$$\frac{B_1}{B_6} = \frac{.0256 \text{ g}}{.0128 \text{ g}} = 2.0$$

Se hicieron 3 mezclas con la relación 2:1  $B_1/B_6$  y los resultados se encuentran en la Tabla II.

Simplificando los cálculos la relación  $B_1:B_6$  queda:

$$H_{B_1} = \frac{\text{Area de 3.6 p.p.m.}}{2}$$

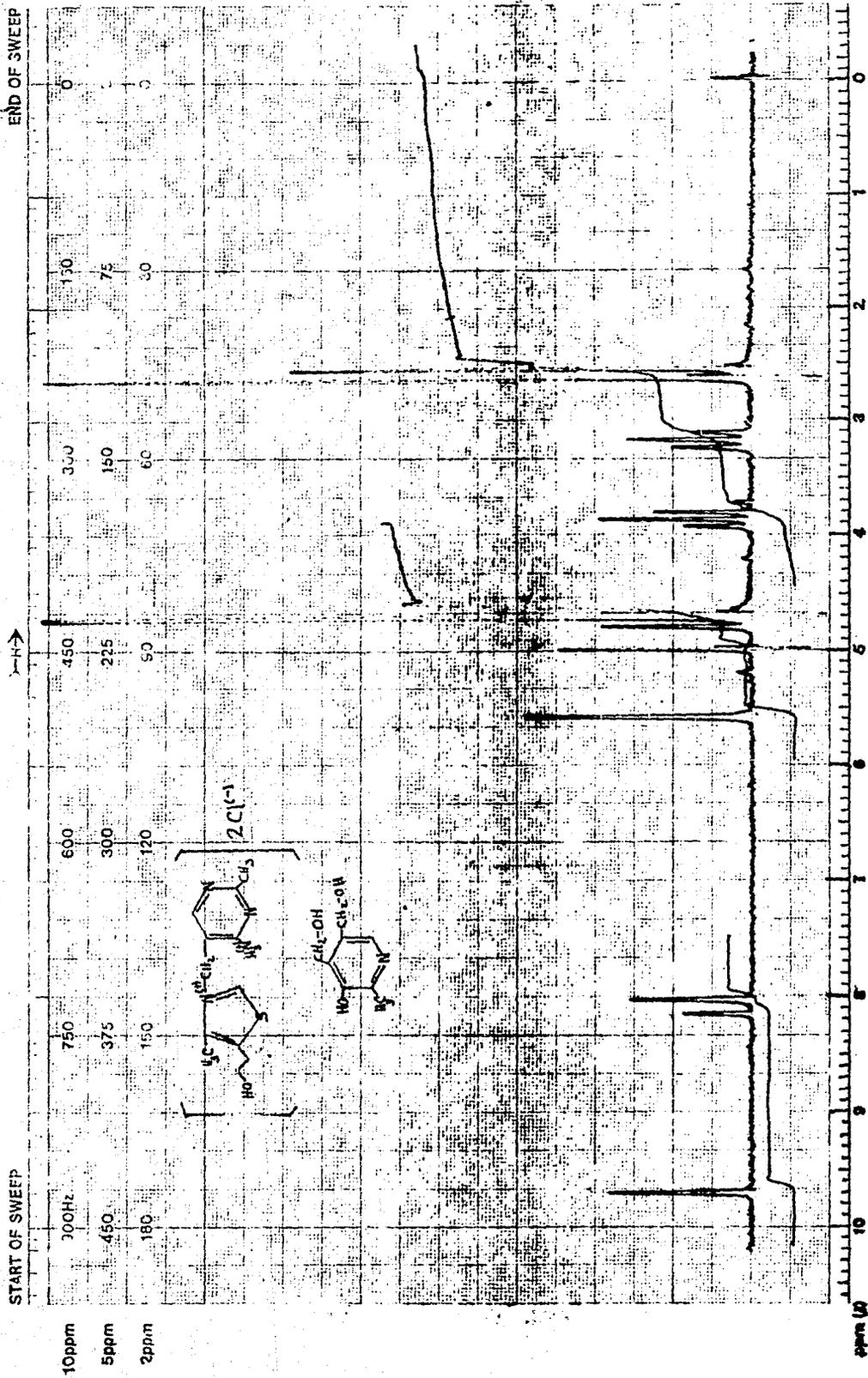
$$H_{B_6} = \text{Area de 2.6 p.p.m.} - 6H_{B_1}/3 \text{ sustituyendo } H_{B_1} \text{ tenemos:}$$

$$H_{B_6} = \frac{\text{Area de 2.6 p.p.m.} - 6 \frac{\text{Area de 3.6 p.p.m.}}{2}}{3}$$

$$\frac{B_1}{B_6} = \frac{\frac{\text{Area 3.6 p.p.m.}}{2} \times \text{P.M. de } B_1}{\frac{\text{Area 2.6 p.p.m.}}{3} - \text{Area 3.6 p.p.m.} \times \text{P.M. de } B_6}$$

Ecuación I

EM-390 90 MHz NMR SPECTROMETER



LOCK POS. \_\_\_\_\_ ppm SPECTRUM AMPL. 3.0 SWEEP TIME 5 min NUCLEUS <sup>1</sup>H SAMPLE: m's Ethanol OPERATOR: Ally

LOCK POWER \_\_\_\_\_ mG FILTER 0.05 sec SWEEP WIDTH 1.0 ppm ZERO REF. DMS DATE 7-5-61

DECOUPLE POS \_\_\_\_\_ ppm DECOUPLING POWER \_\_\_\_\_ mG RF POWER 0.05 mg END OF SWEEP \_\_\_\_\_ ppm SAMPLE TEMP. 0 °C SOLVENT: D<sub>2</sub>O SPECTRUM NO. 4752

## MEZCLA II

La mezcla 11 (espectro 8) se prepara con 20 mg de vitamina B<sub>1</sub> y 10 mg de nicotinamida.

Las señales del espectro corresponden a:

Protones		Desplazamiento
B <sub>1</sub>	Nicotinamida	(ppm)
a	-	2.56
b	-	2.63
c	-	3.25
d	-	3.93
e	-	5.63
	a	7.70
f		8.10
g	b	8.46
-	c	8.80
-	d	9.00

De la señal en 5.63 p.p.m. que corresponde a 2 protones de B<sub>1</sub> la cual integra para 8 unidades se tiene que:

$$2x = 8 \text{ unidades}$$

$$x = 4 \text{ unidades}$$

Si se toma la integral total de las señales de 7.6-9.1 p.p.m. (esto es para tener un menor error) que corresponde a 4 protones de nicotinamida y 2 protones de B<sub>1</sub> se tiene:

$$2x + 4z = 30 \text{ unidades}$$

Donde  $z =$  un protón de nicotinamida

$$z = \frac{30 - 2x}{4}$$

Sustituyendo  $x = 4$  unidades

$$z = \frac{30 - 2(4)}{4}$$

$$z = 5.5 \text{ unidades}$$

Si ambas vitaminas guardaran la misma relación molar tendríamos que  $x = z$ , en este caso la relación es de 1 de  $B_1$  por 1.37 de nicotinamida. Multiplicamos estas relaciones por su peso molecular y tenemos lo siguiente:

$$B_1 = 1 \text{ mol} \times 337.3 \text{ g/mol} = 337.30 \text{ g}$$

$$\text{Nicotinamida} = 1.37 \text{ mol} \times 122.1 \text{ g/mol} = 167.27 \text{ g}$$

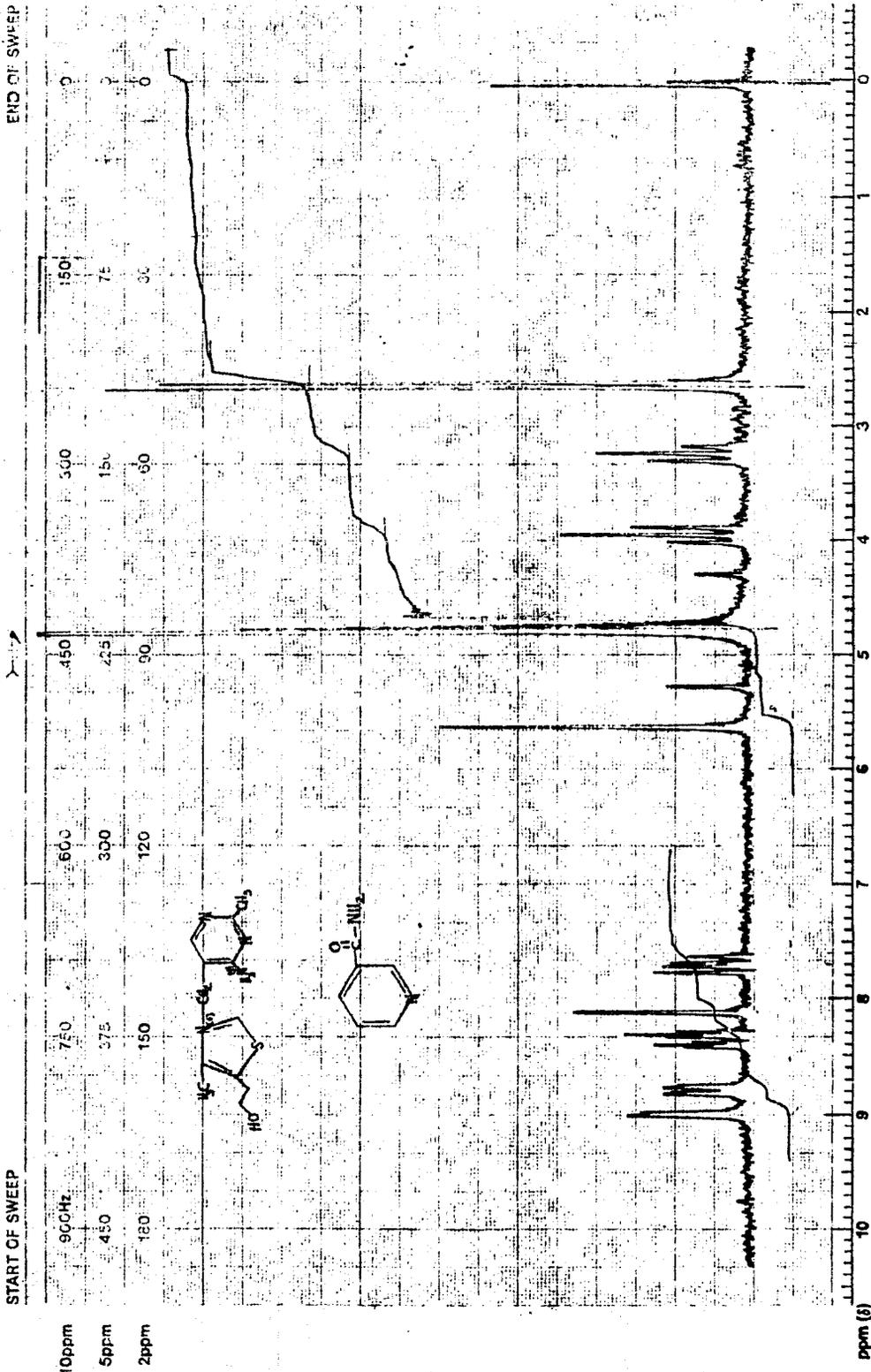
Relación R.M.N.

$$B_1/\text{Nicotinamida} = \frac{337.30 \text{ g}}{167.27 \text{ g}} = 2.01$$

Relación Patrón

$$\frac{B_1}{\text{Nicotinamida}} = \frac{0.020 \text{ g}}{0.010 \text{ g}} = 2.00$$

Se corrieron 2 muestras con una relación 1:1  $B_1/\text{Nic.}$  y 3 muestras con una relación 2:1  $B_1/\text{Nic.}$  y los resultados se encuentran en la tabla II.



EM-350 50 MHz NMR SPECTROSCOPY

LOCK POS. \_\_\_\_\_ ppm SPECTRUM AMPL. 1000 SWEEP TIME 5 min NUCLEUS <sup>1</sup>H SAMPLE mts. *Blow* OPERATOR *Blow*  
LOCK POWER. \_\_\_\_\_ mG FILTER 0.05 sec SWEEP WIDTH 10 ppm ZERO REF. *DMS* DATE *10-20-81*  
DECOUPLING POWER. \_\_\_\_\_ mG RF POWER 0.05 mG END OF SWEEP 0 ppm SAMPLE TEMP. 0 °C SOLVENT *DMS* SPECTRUM NO. *5061*

## MEZCLA III

Esta mezcla (espectro 9) se preparó con 20 mg de vitamina B<sub>6</sub> y Nicotinamida.

Las señales del espectro corresponden a:

B <sub>6</sub>	Protones		Desplazamiento (ppm)
		Nicotinamida	
a	-		2.6
b	-		sobrepuesto en la señal de HDO
c	-		5.0
-	a		7.63
d	-		8.13
-	b		8.23
-	c		8.73
-	d		8.93

La señal en 2.6 p.p.m. corresponde a 3 protones de vitamina B<sub>6</sub> y su integral es de 16 unidades por lo tanto se tiene que:

$$3y = 16 \text{ unidades}$$

$$y = 16/3$$

$$y = 5.3$$

Las señales de 7.6-8.9 p.p.m. corresponden a 4 protones

de nicotinamida y un protón de  $B_6$  e integra para 44 unidades, por lo tanto:

$$y + 4z = 44 \text{ unidades}$$

$$z = \frac{44 - y}{4}$$

Sustituyendo  $y = 5.3$  unidades

$$z = \frac{44 - 5.3}{4}$$

$$z = 9.67 \text{ unidades}$$

Si ambas vitaminas guardaran la misma relación molar tendríamos que  $z=y$ , pero en este caso la relación es de 1 de  $B_6$  por 1.82 de nicotinamida. Multiplicando estas relaciones por el peso molecular de cada vitamina:

$$B_6 = 1 \text{ mol/x} \quad 205.6 \text{ g/mol} = 205.6 \text{ g}$$

$$\text{Nicotinamida} = 1.81 \text{ mol/x} \quad 122.1 \text{ g/mol} = 22.0 \text{ g}$$

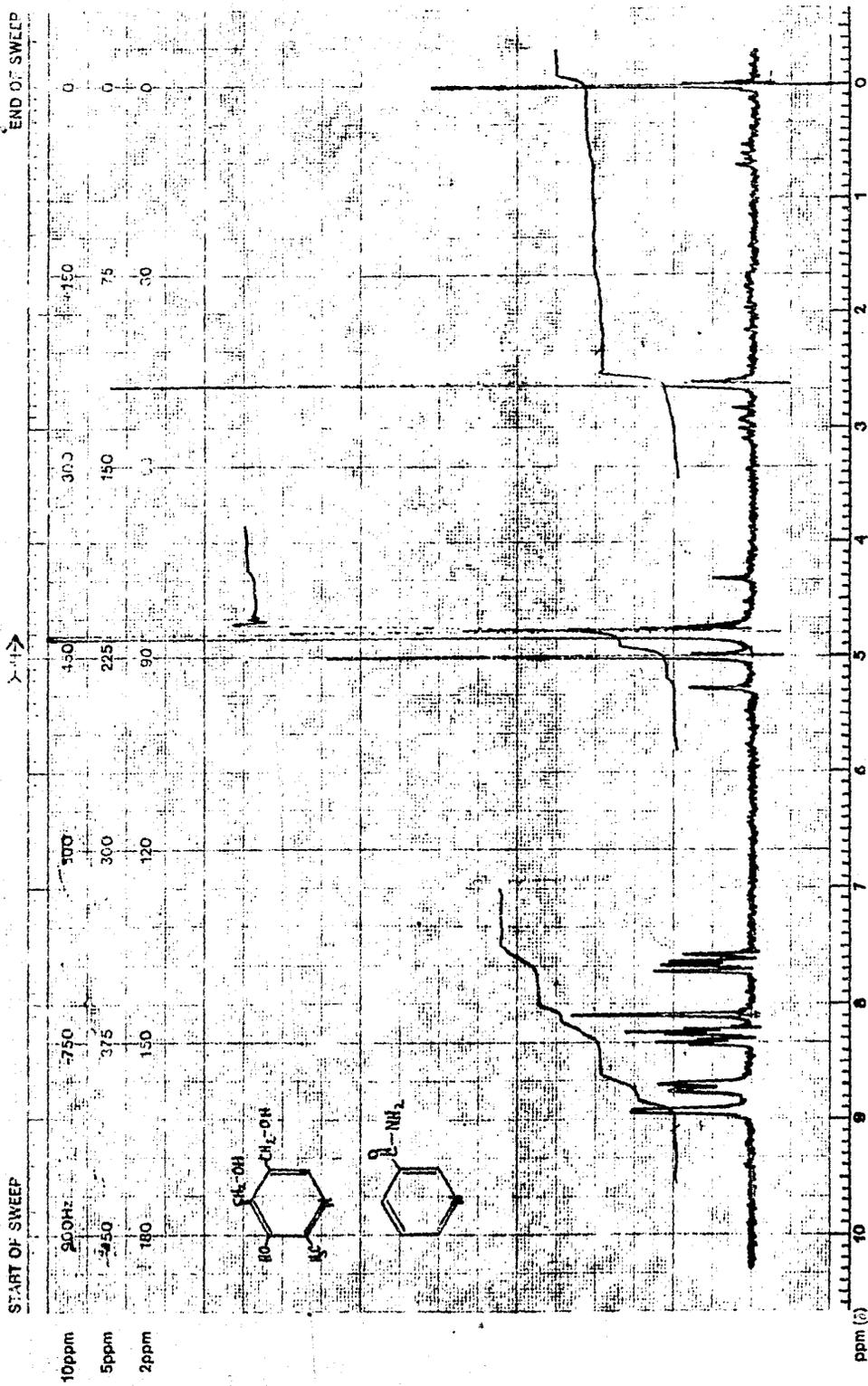
Relación Patrón

Relación por R.M.N.

$$\frac{\text{Nicotinamida}}{B_6} = \frac{0.020 \text{ g}}{0.020 \text{ g}} = 1$$

$$\frac{\text{Nicotinamida}}{B_6} = \frac{22.0 \text{ g}}{205.6 \text{ g}} = 1.08$$

Los resultados de las 5 muestras corridas aparecen en la tabla II. De los cuales 3 muestras tuvieron una relación 1:1, 1 con relación 2:1 y otra con relación 1:2  $B_6/\text{Nic}$ .



EM-300 90 MHz NMR SPECTROMETER

LOCK POS. \_\_\_\_\_ ppm SPECTRUM AMPL. 4.5 x 1000 SWEEP TIME 5 min NUCLEUS <sup>1</sup>H SAMPLE: 20% Ethanol OPERATOR: Allegretti  
 LOCK POWER \_\_\_\_\_ mC FILTER 0.05 sec SWEEP WIDTH 10 ppm ZERO REF. DBS Allyl-III  
 DECOUPLE POS. \_\_\_\_\_ ppm RF POWER 0.05 mC END OF SWEEP 0 ppm SAMPLE TEMP. 0 °C SOLVENT: D<sub>2</sub>O DATE: 28-X-61  
 SPECTRUM NO. 505V

## MEZCLA IV

Esta mezcla (espectro 10) fué preparada con 50.3 mg de vitamina B<sub>1</sub>; 10 mg de B<sub>6</sub> y 51.9 mg de nicotinamida.

Las señales del espectro corresponden a:

Protones		Nicotinamida	Desplazamiento (ppm)
B <sub>1</sub>	B <sub>6</sub>		
a, b	a	-	2.6-2.8
c	-	-	3.26
d	-	-	4.00
-	b, c	-	Se sobrelapan con la señal H <sub>2</sub> O
e	-	-	5.66
-	-	a	7.63
f, g	d	b	8.10-8.4
-	-	c	8.76
-	-	d	8.90

De la señal en 4.0 p.p.m. que corresponde a 2 protones de B<sub>1</sub> y que integra 8 unidades:

$$2x = 8 \text{ unidades}$$

$$x = 4 \text{ unidades}$$

La señal de 2.6-2.8 p.p.m. que corresponde a 6 protones de B<sub>1</sub> y 3 protones de B<sub>6</sub> y que integra 28 unidades se tiene:

$$6x + 3y = 28 \text{ unidades}$$

$$y = \frac{28 - 6x}{3}$$

Si  $x = 4$  unidades

$$y = \frac{28 - 6(4)}{3}$$

$$y = 1.33 \text{ unidades}$$

Las señales de 7.6 a 9.8 p.p.m. corresponden a 2 protones de  $B_1$ , 1 protón de  $B_6$  y 4 protones de nicotinamida y su integral es 54 unidades:

$$2x + y + 4a = 54 \text{ unidades}$$

$$z = \frac{54 - y - 2x}{4}$$

$$z = 11.16 \text{ unidades}$$

Para que las relaciones molares fueran iguales sería necesario que  $x=y=z$ , en este caso se tiene 1 de  $B_6$  por 3.01 de  $B_1$  y 8.39 de nicotinamida. Multiplicando por el peso molecular de cada vitamina.

$B_6$	1 mol	x	205.6 g/mol	=	205.60 g
$B_1$	3.01 mol	x	337.3 g/mol	=	1015.27 g
Nicotinamida	8.39	x	122.1 g/mol	=	1024.41 g

## Relación Patrón

$$B_1/B_6 = \frac{0.0503 \text{ g}}{0.010 \text{ g}} = 5.03$$

$$\text{Nic.}/B_6 = \frac{0.05190 \text{ g}}{0.010 \text{ g}} = 5.19$$

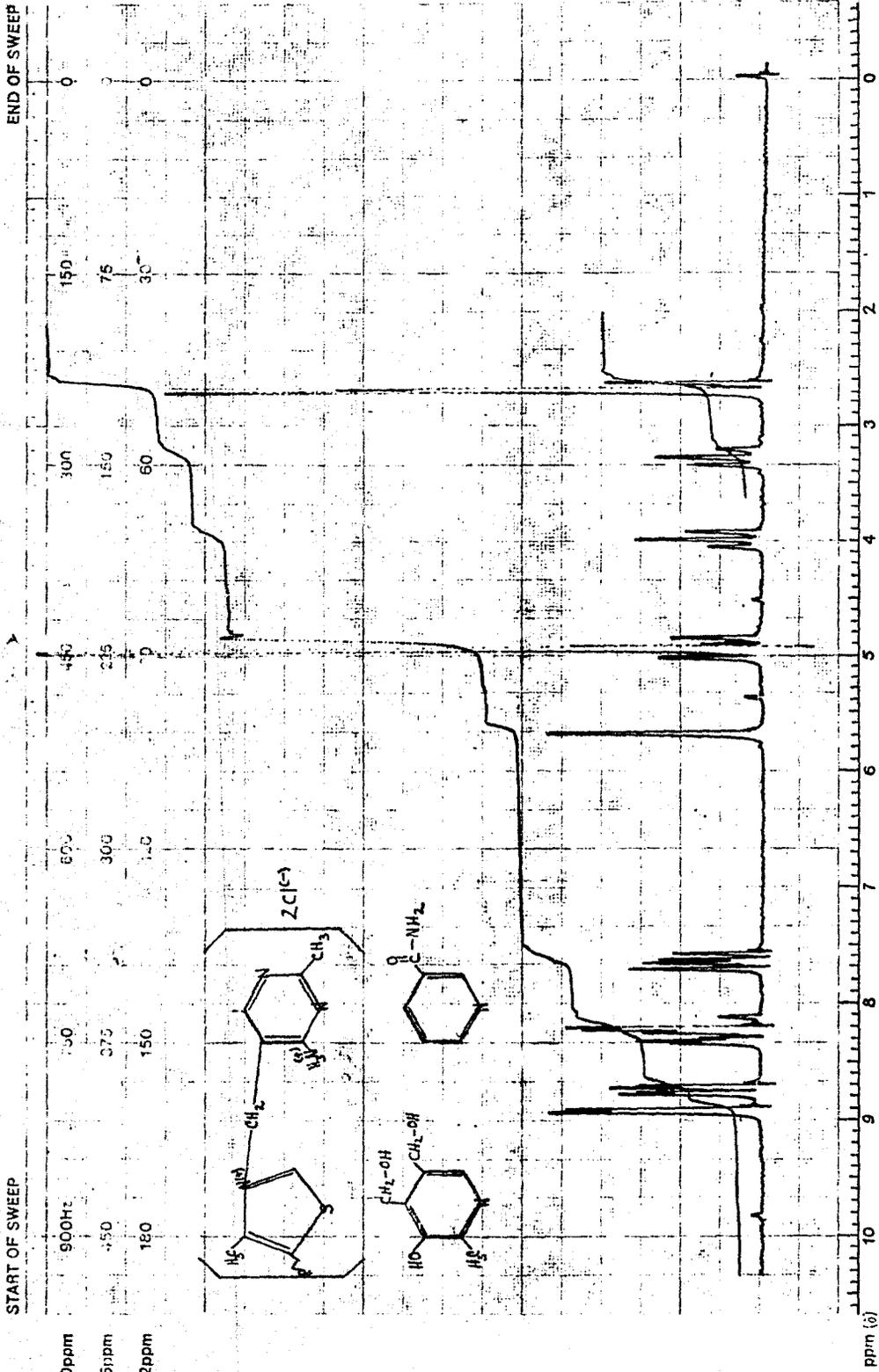
## Relación por R.M.N.

$$\frac{B_1}{B_6} = \frac{1015.27 \text{ g}}{205.60 \text{ g}} = 4.93$$

$$\frac{\text{Nicotinamida}}{B_6} = \frac{1024.41 \text{ g}}{205.60 \text{ g}} = 4.98$$

Se hicieron 5 mezclas y los resultados se encuentran en la tabla 11.

De las cuales 2 tienen una relación 1:1:1; 1 con relación 4:1:5; 1 con relación 2:1:4 y otra con relación 5:1:5  $B_1/B_6/\text{Nic.}$



LOCK POS. \_\_\_\_\_ ppm SPECTRUM AMPL. 2.5 x 100 SWEEP TIME 5 min NUCLEUS <sup>1</sup>H SAMPLE MS OPERATOR \_\_\_\_\_  
 LOCK POWER \_\_\_\_\_ mG FILTER 0.05 sec SWEEP WIDTH 10 ppm ZERO REF. 0.55 DATE \_\_\_\_\_  
 DECOUPLE FOS. \_\_\_\_\_ ppm DECOUPLING POWER 0.05 mG END OF SWEEP 5 ppm SAMPLE TEMP. A C SOLVENT: D<sub>2</sub>O SPECTRUM NO. 82

## MEZCLA V

Esta mezcla (espectro 11) se preparó con 15 mg de B<sub>1</sub>; 15 mg de B<sub>6</sub>; 15 mg de vitamina C y 15 mg de nicotinamida.

Las señales del espectro corresponden a:

B <sub>1</sub>	Protones			Desplazamiento (ppm)
	B <sub>6</sub>	C	Nicotinamida	
a,b	a	-	-	2.3-2.5
c	-	-	-	3.0
d	-	a,b,c	-	3.5-4.0
-	b	d	-	Se sobrelapa con la señal de HDO
-	c	-	-	4.83
e	-	-	-	5.40
-	-	-	a	7.56
f	d	-	-	7.93
-	-	-	b	8.26
-	-	-	c	8.60
-	-	-	d	8.80
g	-	-	-	9.53

En este caso se toma la señal de 5.40 p.p.m. porque no se sobrelapa con otras, dicha señal corresponde a 2 protones de B<sub>1</sub> e integra 3 unidades:

$$2x = 3 \text{ unidades}$$

$$x = 1.5 \text{ unidades}$$

La señal en 2.3-2.5 p.p.m. corresponde a 6 protones de  $B_1$  y 3 protones de  $B_6$  y que integra 17 unidades:

$$6x + 3y = 17 \text{ unidades}$$

$$y = \frac{17u - 6x}{3}$$

Si  $x = 1.5$  unidades

$$y = \frac{17u - 6(1.5u)}{3}$$

$$y = 2.66 \text{ unidades}$$

Las señales que aparecen de 3.5-4.0 p.p.m. corresponde a 2 protones de  $B_1$  y 3 protones de vitamina C y su integral es 12 unidades:

$$2x + 3w = 12 \text{ unidades}$$

$$w = \frac{12u - 2x}{3}$$

Donde  $w$  = un protón de vitamina C  
Sustituyendo el valor de  $x$  tenemos:

$$w = \frac{12u - 2(1.5u)}{3}$$

$$w = 3.0 \text{ unidades}$$

Las señales que aparecen entre 7.4-9.53 p.p.m. corresponden

a 1 protón de  $B_6$ , 2 protones de  $B_1$  y 4 protones de nicotina-  
mida los cuales integran 24 unidades:

$$2x + y + 4z = 24 \text{ unidades}$$

$$z = \frac{24u - y - 2x}{4}$$

4

Sustituyendo  $x = 1.5$ ,  $y = 2.66$  unidades tendremos que:

$$z = \frac{24u - 2.66u - 2(1.5u)}{4}$$

4

$$z = 4.58 \text{ unidades}$$

Para que todas las vitaminas tuviesen la misma relación molar tendríamos que  $x=y=w=z$ , en este caso se tiene 1 de  $B_1$ ; 1.77 de  $B_6$ ; 3.05 de nicotinamida y 2 de vitamina C. Multiplicando por su peso molecular:

$$B_1 = 1.0 \text{ mol} \times 337.3 \text{ g/mol} = 337.3 \text{ g}$$

$$B_6 = 1.77 \text{ mol} \times 205.6 \text{ g/mol} = 363.91 \text{ g}$$

$$C = 2.0 \text{ mol} \times 176 \text{ g/mol} = 352.0 \text{ g}$$

$$\text{Nic} = 3.05 \text{ mol} \times 122.1 \text{ g/mol} = 372.40 \text{ g}$$

Relación Patrón

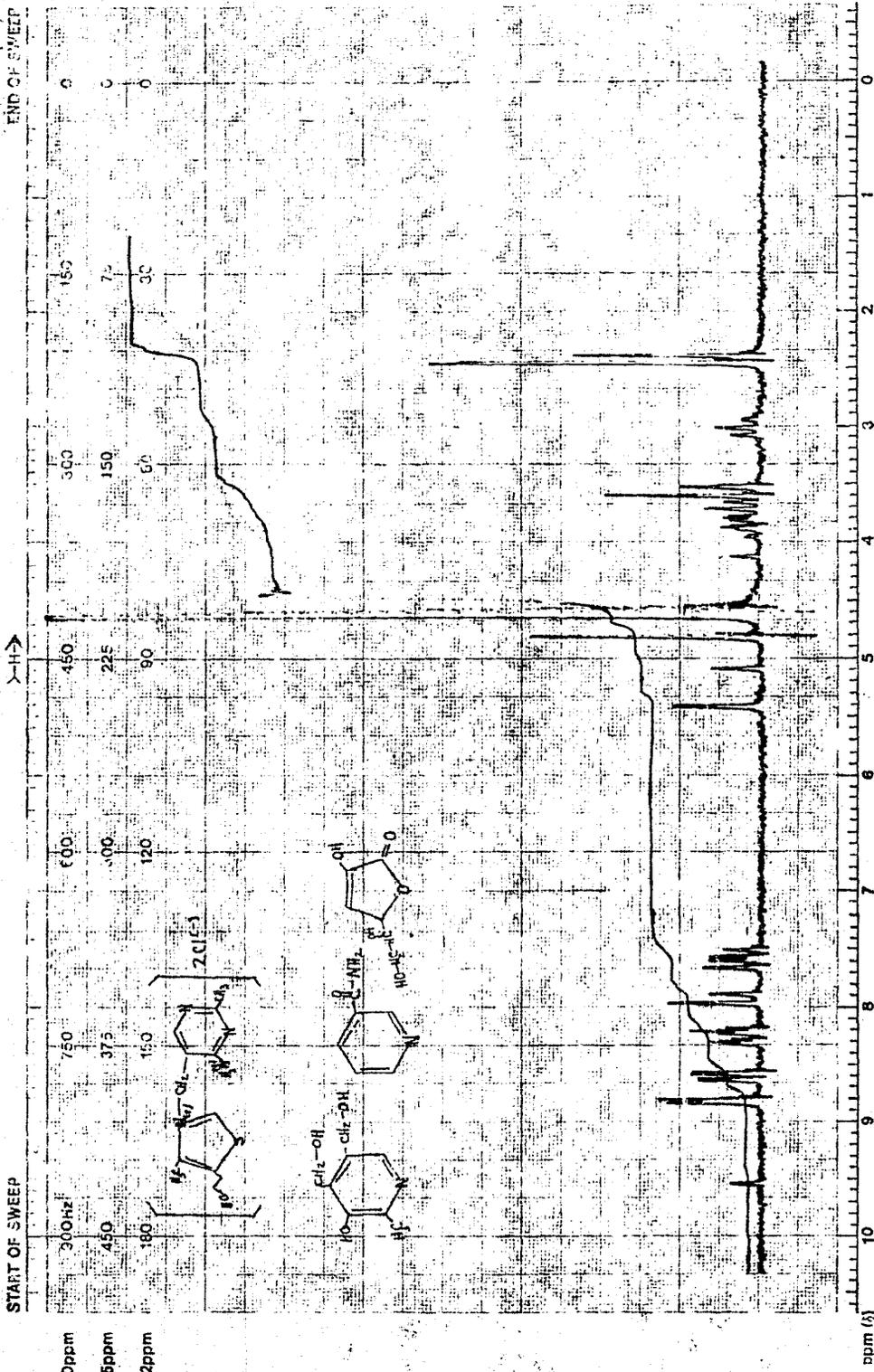
Relación por R.M.N.

$$\frac{0.015 \text{ g}}{0.015 \text{ g}} = 1 \text{ en cada caso}$$

$$\begin{aligned} C/B_1 &= \frac{352.0 \text{ g}}{337.3 \text{ g}} = 1.04; B_6/B_1 = \\ &= \frac{363.91 \text{ g}}{337.30 \text{ g}} = 1.07 \end{aligned}$$

$$\text{Nic}/B_1 = \frac{372.40 \text{ g}}{337.30 \text{ g}} = 1.10$$

Los resultados promedio de esta mezcla se reportan en la tabla 11.



START OF SWEEP

END OF SWEEP

10 ppm  
5 ppm  
2 ppm

300 Hz  
150  
75

150  
75

LOCK POS. \_\_\_\_\_ ppm SPECTRUM AMPL. 3.5 x 1000 SWEEP TIME 5 min NUCLEUS H OPERATOR \_\_\_\_\_  
 LOCK POWER \_\_\_\_\_ mG FILTER 0.5 sec SWEEP WIDTH 10 ppm ZERO REF. Me DATE \_\_\_\_\_  
 DECOUPLING POWER \_\_\_\_\_ mG RF POWER 0.5 mG END OF SWEEP D ppm SAMPLE TEMP. A °C SOLVENT D<sub>2</sub>O  
 SPECTRUM NO. 2226

TABLA 11

Mezcla	Vitaminas	Relación Patrón	Relación por R.M.N.
I	B <sub>1</sub> y B <sub>6</sub>	2:1	2.10:1
	"	2:1	1.98:1
	"	2:1	2.00:1
	"	1:2	1:1.92
	"	1:2	1:2.10
II	B <sub>1</sub> y nicotinamida	1:1	1.06:1
	"	1:1	1:1.02
	"	2:1	2.01:1
	"	2:1	2.01:1
	"	2:1	2.03:1
III	B <sub>6</sub> y nicotinamida	1:1	1:1.07
	"	1:1	1:1.02
	"	1:1	1:1.10
	"	2:1	2:03:1.09
	"	1:2	1:2.02
IV	B <sub>1</sub> , B <sub>6</sub> y nicotinamida	1:1:1	1:1.2:1.05
	"	1:1:1	1:1.04:1.09
	"	4:1:5	4.1:1:5
	"	2:1:4	2.1:1:4.3
	"	5:1:5	5.04:1:5.1
V	B <sub>1</sub> , B <sub>6</sub> , nicotinamida y C	1:1:1:1	1.2:1.1:1.3:1
	"	1:1:1:1	1:1.07:1.1:1.04
	"	1:1:1:1	1:1.01:1.15:0.92
	"	1:1:1:1.5	1:0.97:1:1.8
	"	1:1:1.1:0.97	1:1.07:1.2:0.87

### III. ANALISIS DE ESPECTROS DE MEDICAMENTOS

Los medicamentos con los cuales se trabajó fueron los siguientes:

Medicamento I.	Bedoyecta (solución)
Medicamento II.	Benexol (liofilizado)
Medicamento III.	Hidroxofofor (liofilizado)
Medicamento IV.	Permafón (liofilizado)
Medicamento V.	Triduralta (solución)

Debido al tipo de análisis y a las condiciones de trabajo, estas fueron las únicas mezclas encontradas en el mercado nacional, que cumplieran con los requisitos necesarios.

Sus espectros fueron corridos sin referencia ya que ésta presenta señales en zonas que son útiles en el análisis.

Los medicamentos I y V se liofilizaron para disolver en  $D_2O$ .

#### Medicamento I

El contenido descrito en este medicamento es el siguiente:

Vitamina $B_1$ :	100 mg
Vitamina $B_6$ :	20 mg
Vitamina $B_{12}$ :	5 mg

El espectro (espectro 12) se interpreta de la siguiente manera.

Protones		Desplazamiento (ppm)
B <sub>1</sub>	B <sub>6</sub>	
a,b	a	2.3
c	-	2.9
d	-	3.6
-	b	se sobrepone con la señal de HDO
-	c	4.7
e	-	5.3
f	-	7.1
g	d	7.83

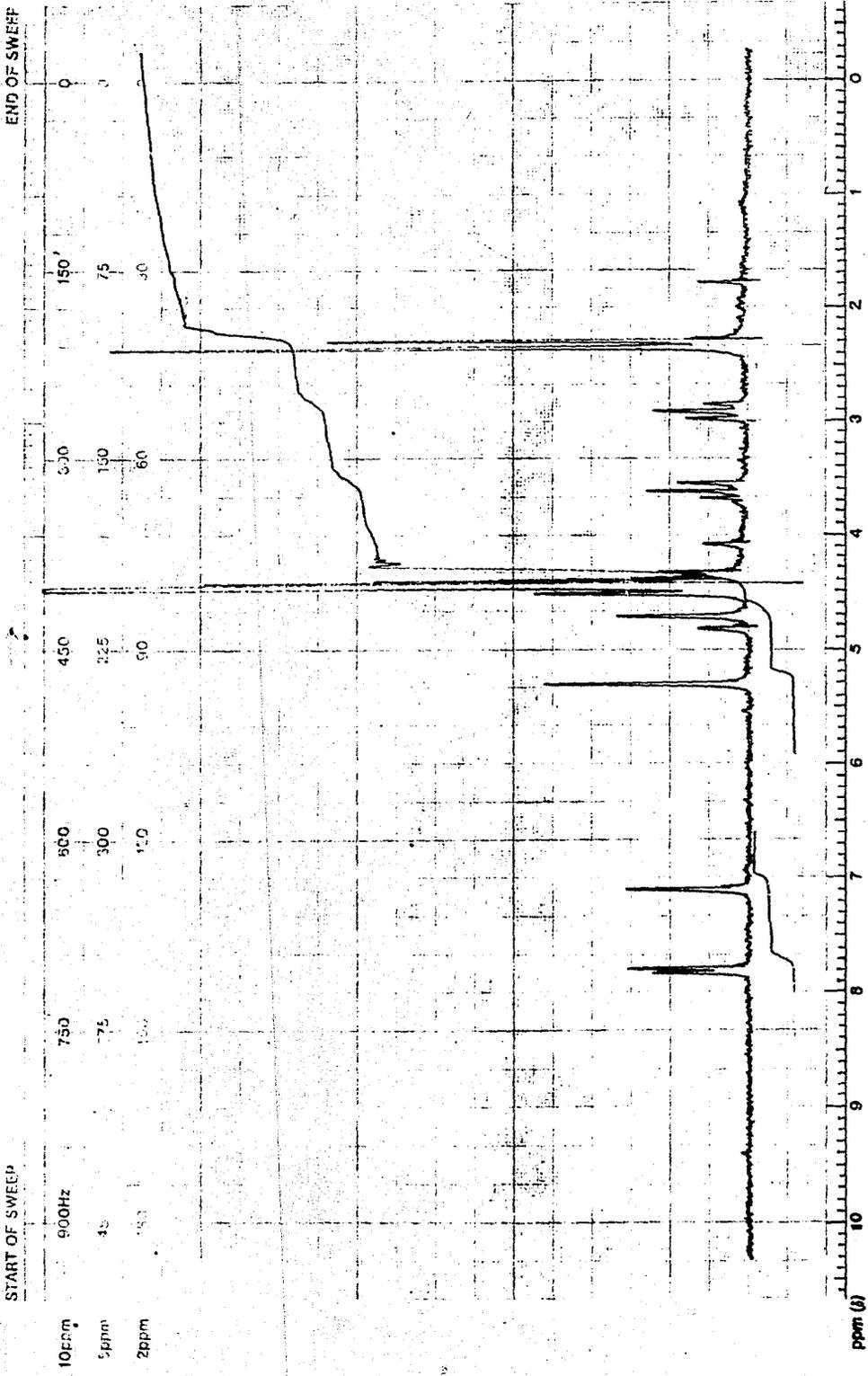
Las señales de los grupos amino e hidroxilo aparecen a 4.5 p.p.m. como protones intercambiados con D<sub>2</sub>O.

Calculos:

Ecuación I

$$B_1 = \frac{\frac{\text{Area}_{3.6 \text{ p.p.m.}}}{2} \times \text{P.M. de } B_1}{\frac{\text{Area}_{2.6 \text{ p.p.m.}}}{3} - \frac{\text{Area}_{3.6 \text{ p.p.m.}}}{3} \times \text{P.M. de } B_6}$$

EM-390 90 MHz NMR SPECTROMETER



LOCK POS. \_\_\_\_\_ ppm SPECTRUM AMP. 2.2 x 1000 SWEEP TIME 5 NUCLEUS <sup>14</sup>N  
 LOCK POWER \_\_\_\_\_ mG FILTER 0.01 sec SWEEP WIDTH 10 ppm ZERO REF. None  
 DECOUPLE POS. \_\_\_\_\_ ppm WT POWER 1.06 mG END OF SWEEP 0 ppm SAMPLE TEMP. A C SOLVENT D<sub>2</sub>O  
 DECOUPLING POWER \_\_\_\_\_ mG SPECTRUM NO. 5958  
 SAMPLE: 70% Ethanol OPERATOR: D. J. ... DATE 2-3-10-12

Sustituyendo los valores:

Area<sub>2.6 p.p.m.</sub> = 27 unidades

Area<sub>3.6 p.p.m.</sub> = 6 unidades

$$\frac{B_1}{B_6} = \frac{\frac{6 \text{ unidades}}{2} \times 337.3 \text{ g/mol}}{\frac{27 \text{ unidades}}{3} - 6 \text{ unidades} \quad 205.6 \text{ g/mol}} = \frac{1011.9 \text{ g}}{616.8 \text{ g}} = 1.64$$

Relación Patrón

$$\frac{0.100 \text{ g}}{0.050 \text{ g}} = 2$$

Relación R.M.N.

$$\frac{1011.9 \text{ g}}{616.8 \text{ g}} = 1.64$$

Se corrieron 5 muestras y los resultados se encuentran en la tabla III.

## Medicamento II

El contenido del Medicamento es el siguiente:

Vitamina B<sub>1</sub>: 100 mg

Vitamina B<sub>6</sub>: 200 mg

Vitamina B<sub>12</sub>: 1 mg

Su espectro (espectro 13) se corrió con un valor de hoja de 0-5 ppm y se interpreta de la siguiente manera:

Protones		Desplazamiento (ppm)
B <sub>1</sub>	B <sub>6</sub>	
a,b	a	2.6
c	-	3.15
d	-	3.85
-	c	4.98

Las señales de los grupos amino e hidróxilo aparecen en 4.75 ppm como protones intercambiados con D<sub>2</sub>O.

Sustituyendo en la ecuación I:

$$\text{Area}_{3.85 \text{ ppm}} = 7 \text{ unidades}$$

$$\text{Area}_{2.6 \text{ ppm}} = 53 \text{ unidades}$$

Sustituyendo los valores en la ecuación I:

$$\frac{B_1}{B_6} = \frac{\frac{7u}{2u} \times 337.3 \text{ g/mol}}{\frac{53u}{3u} - 7u \times 205.6 \text{ g/mol}} = \frac{1180.55}{2193.06} = 0.5383$$

Relación Patrón

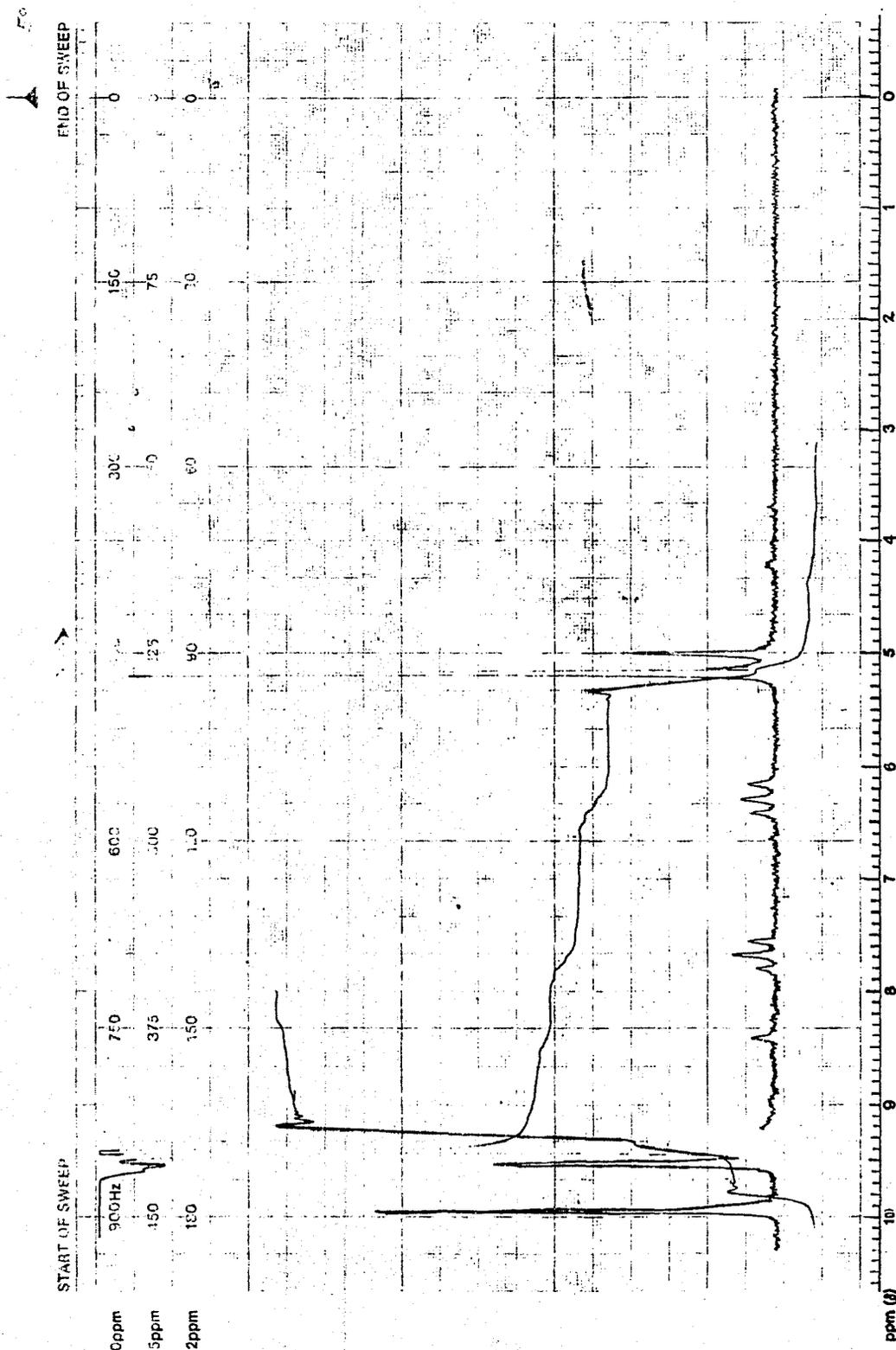
$$\frac{B_1}{B_6} = \frac{0.100 \text{ g}}{0.200 \text{ g}} = 0.5$$

Relación por RMN

$$\frac{B_1}{B_6} = \frac{1180.55 \text{ g}}{2193.06 \text{ g}} = 0.5383$$

Los resultados aparecen en la tabla III

EM-390 90 MHz NMR SPECTROMETER



START OF SWEEP → END OF SWEEP ←

10ppm 900Hz 750 600 300 150 75 30 0  
 5ppm 450 375 300 150 75 30 0  
 2ppm 150 100 50 0

LOCK POS. \_\_\_\_\_ ppm SPECTRUM AMPL. 9.3 x 1000 SWEEP TIME 5 min NUCLEUS <sup>1</sup>H SAMPLE: ms Elen OPERATOR: Aljanderson  
 LOCK POWER \_\_\_\_\_ mG FILTER 0.05 SWEEP WIDTH 5 ppm ZERO REF. \_\_\_\_\_ DATE 18-VII-63  
 DECOUPLE POS. \_\_\_\_\_ ppm DECOUPLING POWER \_\_\_\_\_ mG RF POWER 6.05 SWEEP END OF SWEEP \_\_\_\_\_ ppm SAMPLE TEMP. A SOLVENT: D<sub>2</sub>O SPECTRUM NO. 7671  
 5-1-63

palo alto, california

Varian Instrument Division



## Medicamento III

Las dosificaciones reportadas en este medicamento fueron:

Vitamina B<sub>1</sub>: 100 mg

Vitamina B<sub>6</sub>: 50 mg

Vitamina B<sub>12</sub>: 2.5 mg

Su espectro (espectro 14) se interpreta como sigue:

Protones		Desplazamiento (ppm)
B <sub>1</sub>	B <sub>6</sub>	
-	c	5.2
e	-	5.77
f	d	8.25-8.35
g	-	9.9

Este espectro fué corrido con un valor de hoja de 5 a 10 ppm por que la vitamina B<sub>12</sub> es tan poca que prácticamente no interfiere con el análisis. Se tomó la señal de 5.77 ppm como la base de los cálculos, esta señal corresponde a 2 protones de vitamina B<sub>1</sub>.

Area de 5.77 ppm = 22 unidades

Area de 8.25 a 9.9 ppm = 30 unidades

En este caso se tiene la siguiente ecuación:

$$B_1 = \frac{\text{Area de 5.77 ppm}}{2} \times \text{P.M. de } B_1$$

$$B_6 = \text{Area de 8.25 a 9.9 ppm} - \frac{2 \times \text{Area de 5.77 ppm}}{1} \times \text{P.M. de } B_6$$

De la relación  $B_1/B_6$  nos queda la siguiente ecuación:

$$\frac{B_1}{B_6} = \frac{\frac{\text{Area de 5.7 ppm}}{2} \times \text{P.M. de } B_1}{\text{Area de 8.25 a 9.9} - \text{Area de 1.56 ppm} \times \text{P.M. de } B_6}$$

Sustituyendo los valores:

$$\frac{B_1}{B_6} = \frac{\frac{22u}{2u} \times 337.3 \text{ g/mol}}{30u - 22u \times 205.6 \text{ g/mol}} = \frac{3710.3 \text{ g}}{1644.8 \text{ g}} = 2.2$$

Relación reportada

$$\frac{0.100 \text{ g}}{0.050 \text{ g}} = 2.0$$

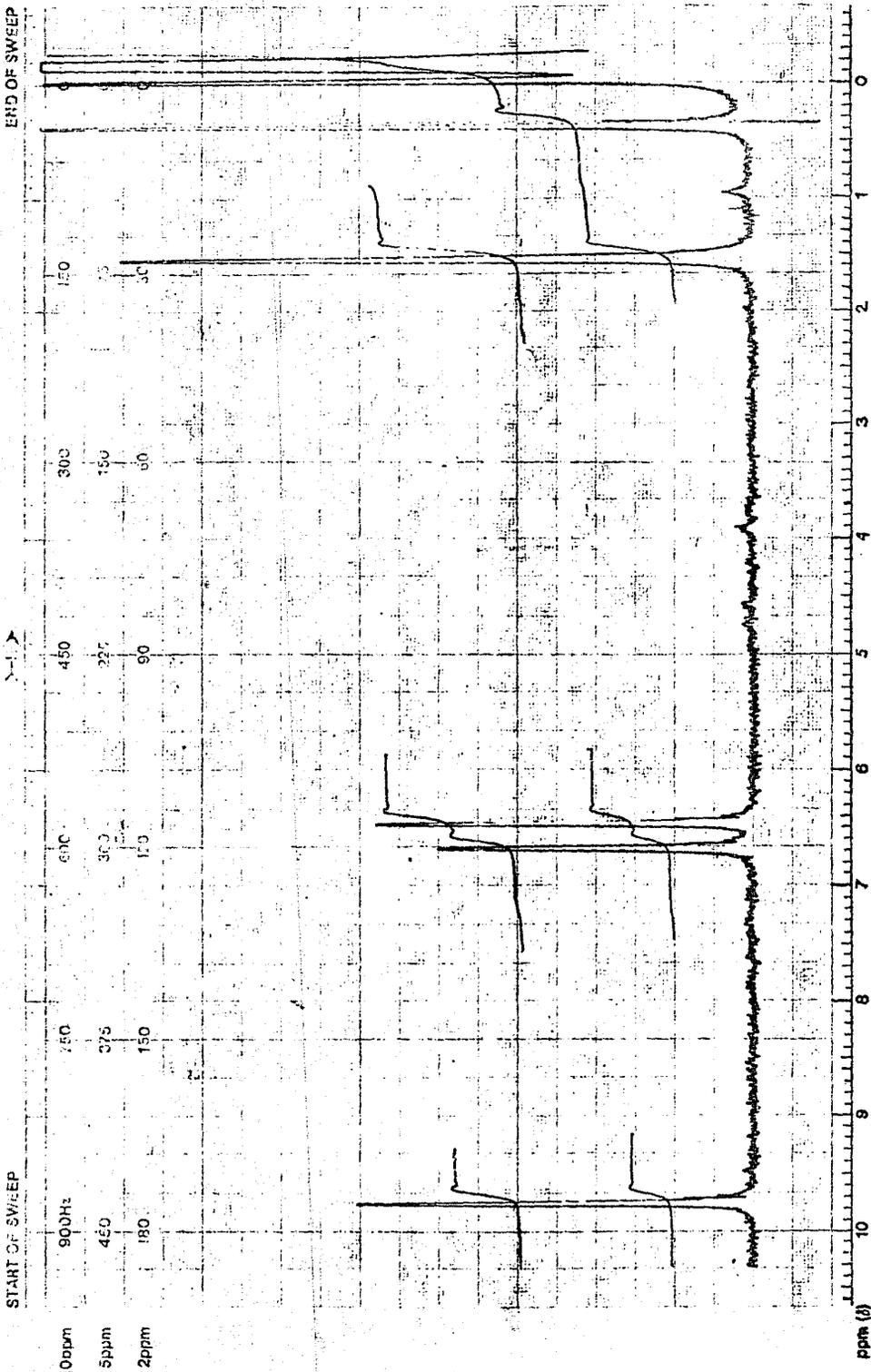
Relación por RMN

$$\frac{3710.3 \text{ g}}{1644.8 \text{ g}} = 2.2$$

Se corrieron 5 muestras del Medicamento y los resultados aparecen en la tabla III.



EM-390 50 MHz NMR SPECTROMETER



10ppm  
5ppm  
2ppm

900Hz  
450  
180

610  
300  
150

450  
225  
90

300  
150  
60

150  
60

LOCK POS. \_\_\_\_\_ ppm SPECTRUM AMPL. 5 x 1000 SWEEP TIME 5 min NUCLEUS H OPERATOR W. J. ...  
 LOCK POWER \_\_\_\_\_ mG FILTER 0.01  $\mu$ c SWEEP WIDTH 5 ppm ZERO REF. - DATE 2-9-54  
 DECOUPLE POS. \_\_\_\_\_ ppm RF POWER 0.05 mG END OF SWEEP 5 ppm SAMPLE TEMP. A C SOLVENT CDCl<sub>3</sub>  
 SPECTRUM NO. 5413

### Medicamento IV

La composición del Medicamento IV era:

Vitamina B<sub>1</sub>: 200 mg  
 Vitamina B<sub>6</sub>: 400 mg  
 Vitamina B<sub>12</sub>: 5 mg

Su espectro (espectro 15) se interpreta como sigue:

Protones		Desplazamiento (ppm)
B <sub>1</sub>	B <sub>6</sub>	
a,b	a	2.3
c	-	2.9
d	-	3.56
-	b	4.46 aparece con la señal de intercambio con D <sub>2</sub> O
-	c	4.66
e	-	5.26
f,g	d	7.73-7.86

Las señales de los grupos amino e hidroxilo aparecen en 4.4 ppm como protones intercambiados con D<sub>2</sub>O.

Sustituyendo sus valores en la ecuación I:

$$\text{Area}_{3.56 \text{ ppm}} = 4 \text{ unidades}$$

$$\text{Area}_{2.3 \text{ ppm}} = 34 \text{ unidades}$$

$$\frac{B_1}{B_6} = \frac{\frac{4u}{2u} \times 337.3 \text{ g/mol}}{\frac{34u}{3u} - 4 \cdot 205.6 \text{ g/mol}} = \frac{674.60 \text{ g}}{1507.73 \text{ g}} = 0.447$$

Relación por RMN

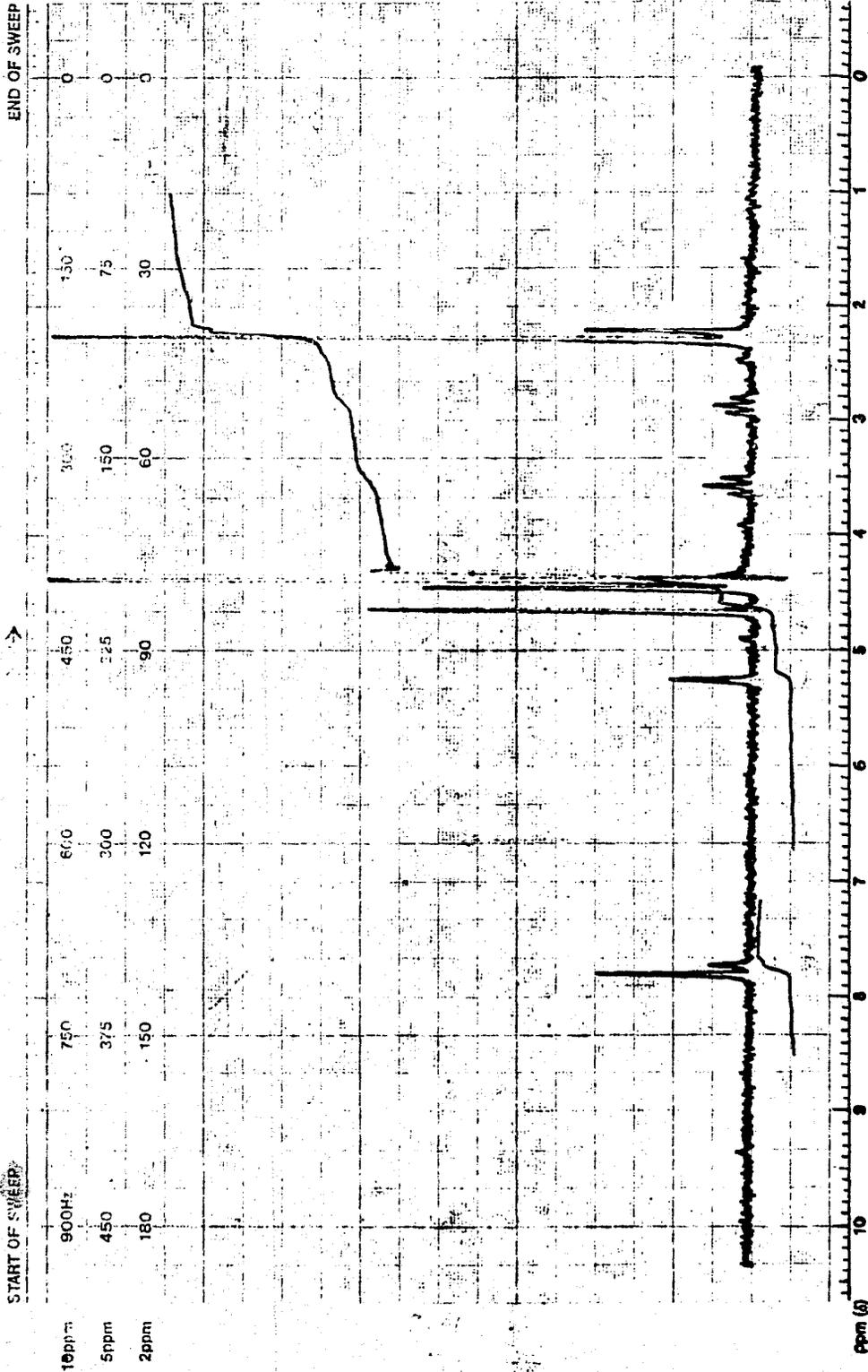
Relación Patrón

$$\frac{B_1}{B_6} = \frac{674.60 \text{ g}}{1507.73 \text{ g}} = 0.447$$

$$\frac{B_1}{B_6} = \frac{0.200 \text{ g}}{0.400 \text{ g}} = 0.5$$

Se corrieron 5 muestras del medicamento y los resultados estan en la tabla III.

EM-390 90 MHz NMR SPECTROMETER



Varian Instrument Division  
Palo Alto, California



PRINTED IN U.S.A.

PART NO. 95209 02

LOCK POS. ... ppm SPECTRUM AMPL. 3.5 x 10<sup>6</sup> SWEEP TIME ... 5 min NUCLEUS ... <sup>14</sup>C SAMPLE ... Benzofin OPERATOR ...  
 LOCK POWER ... mG FILTER 0.05 sec SWEEP WIDTH ... 10 ppm ZERO REF. ... Dec 4 DATE ...  
 DECOUPLING POWER ... mG IN POWER 0.05 mG END OF SWEEP 0 ppm SAMPLE TEMP. ... °C SOLVENT: D<sub>2</sub>O SPECTRUM NO. 52  
 Experiment 15

## Medicamento V

Las concentraciones de vitamina en este medicamento es la siguiente:

Vitamina B<sub>1</sub>: 100 mg

Vitamina B<sub>6</sub>: 50 mg

Vitamina B<sub>12</sub>: 1 mg

Al correr el espectro (espectro 16) se encontraron las siguientes señales:

Protones		Desplazamiento (ppm)
B <sub>1</sub>	B <sub>6</sub>	
a,b	a	2.46
c	-	3.1
d	-	3.8
-	b	se sobrelapa con la señal de HOD
-	c	4.87
e	-	5.43
f,g	d	7.96-9.6

Las señales de los grupos amino e hidróxilo aparecen a 4.6 ppm como protones intercambiados con D<sub>2</sub>O.

Sustituyendo los valores en la ecuación I

Area 3.8 ppm = 4 unidades

Area 2.46 ppm = 17 unidades

$$\frac{B_1}{B_6} = \frac{\frac{4u}{2u} \times 337.3 \text{ g/mol}}{\frac{17u}{3u} - 4u \times 205.6 \text{ g/mol}} = \frac{674.60 \text{ g}}{342.66 \text{ g}} =$$

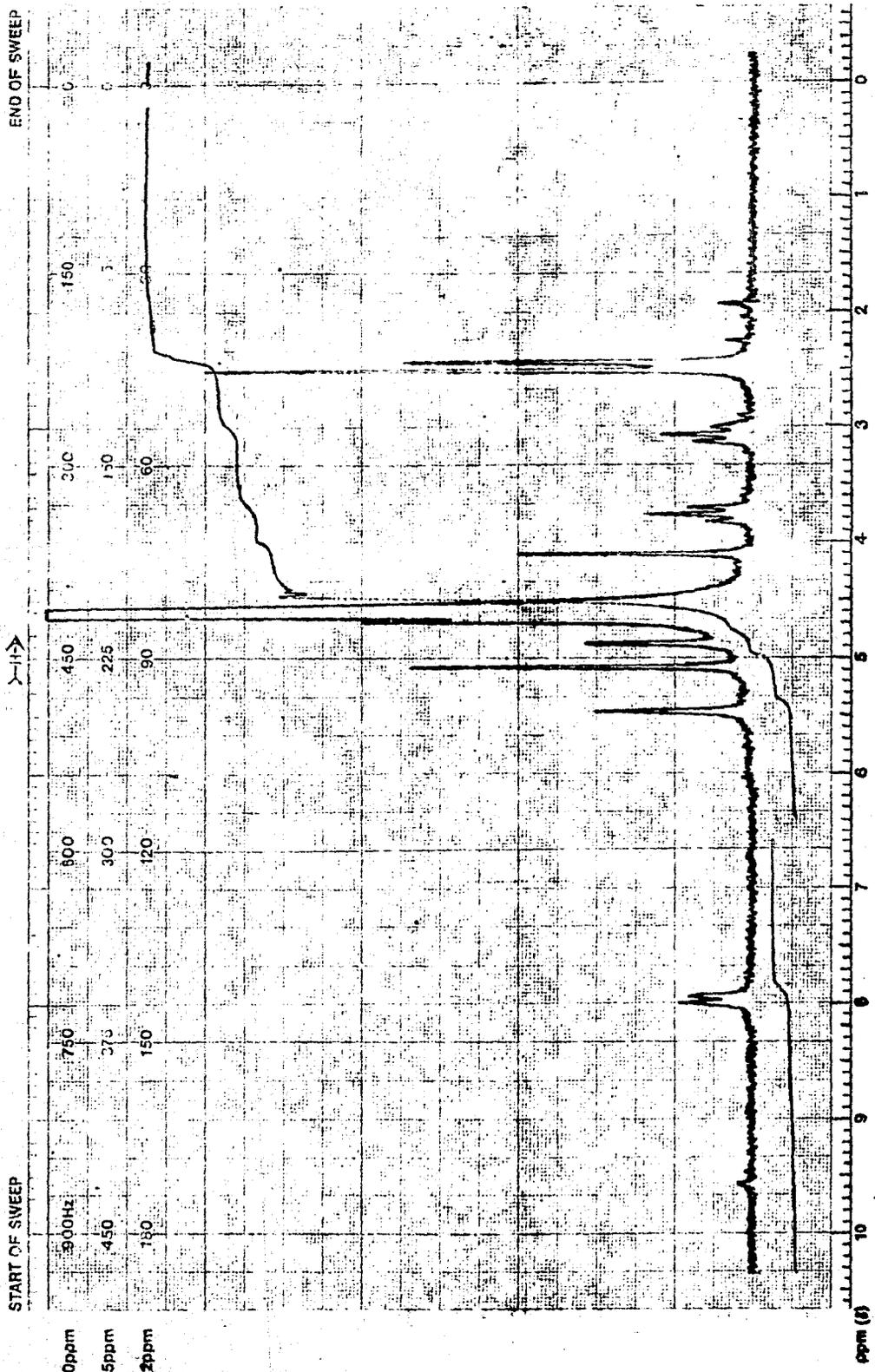
Relación Patrón

Relación por RMN

$$\frac{0.100 \text{ g}}{0.050 \text{ g}} = 2$$

$$\frac{674.60 \text{ g}}{342.66 \text{ g}} = 1.96$$

Se corrieron 5 muestras del medicamento y los resultados aparecen en la tabla III.



START OF SWEEP

END OF SWEEP

10ppm  
5ppm  
2ppm

900Hz  
450  
150

750  
375  
150

600  
300  
120

450  
225  
90

300  
150  
60

150  
60

ppm (δ)

LOCK POS. \_\_\_\_\_ ppm SPECTRUM AMPL 3.1  $\times 10^2$  SWEEP TIME 5 min NUCLEUS  $^{13}C$  OPERATOR W. J. ...  
 LOCK POWER \_\_\_\_\_ mG FILTER 0 - 0.5 sec SWEEP WIDTH 0 ppm ZERO REF. TMS SAMPLE NO. ...  
 DECOUPLE POS. \_\_\_\_\_ ppm RF POWER 0.05 mG END OF SWEEP 0 ppm SAMPLE TEMP. A SOLVENT CDCl<sub>3</sub> SPECTRUM NO. 5793  
 DATE 22 MAR 61 OPERATOR ... SOLVENT ... SPECTRUM NO. ...

TABLA III

Medicamento	Relación $B_6:B_1$	Relación por RMN $B_6:B_1$
I	1 : 2	1 : 1.70
	1 : 2	1 : 1.20
	1 : 2	1 : 1.64
	1 : 2	1 : 1.19
	1 : 2	1 : 1.74
II	1 : 0.5	1 : 0.45
	1 : 0.5	1 : 0.48
	1 : 0.5	1 : 0.47
	1 : 0.5	1 : 0.48
	1 : 0.5	1 : 0.47
III	1 : 2	1 : 2.20
	1 : 2	1 : 2.10
	1 : 2	1 : 2.15
	1 : 2	1 : 1.96
	1 : 2	1 : 1.98
IV	1 : 0.5	1 : 0.44
	1 : 0.5	1 : 0.43
	1 : 0.5	1 : 0.47
	1 : 0.5	1 : 0.48
	1 : 0.5	1 : 0.47
V	1 : 2	1 : 2.05
	1 : 2	1 : 1.97
	1 : 2	1 : 1.90
	1 : 2	1 : 2.04
	1 : 2	1 : 1.96

#### IV. DETERMINACION ANALITICA DE VITAMINAS HIDROSOLUBLES POR OTRAS TECNICAS.

Determinación de vitamina B<sub>1</sub> por el método Fluorométrico.

A 5 ml de solución patrón de vitamina B<sub>1</sub> con una concentración de 1 mg/ml se le agregaron 3 ml de solución alcalina de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> para llevar a cabo la oxidación al tiocromo, después se extrajo con 25 ml de isobutanol libre de impurezas fluorescentes y se prepararon soluciones con concentraciones de 0.02-0.12 µg/ml. Obteniéndose las siguientes lecturas con las que se construyó la curva de calibración (Gráfica I).

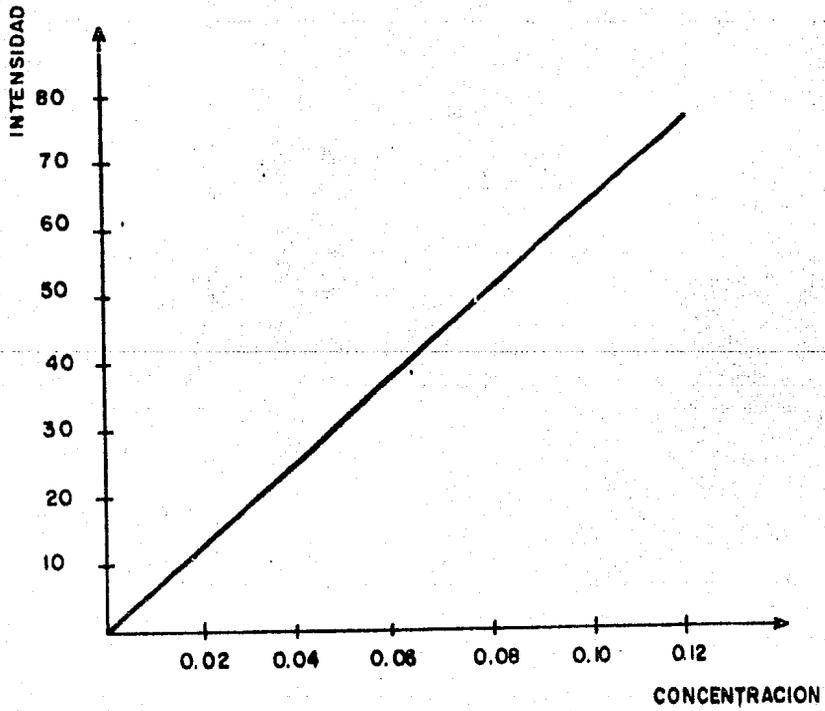
Los medicamentos se trataron de igual manera usando concentraciones dentro del intervalo de la curva de calibración. Los resultados del análisis se reportan en la tabla IV.

TABLA. IV

Medicamento	Intensidad	Concentración de Vitamina B <sub>1</sub> (µg/ml)
I	41.3	0.059
II	43.0	0.062
III	37.1	0.053
IV	24.0	0.032
V	37.0	0.053

La experiencia se repitió 6 veces sin haber logrado afinar el método por lo que se decidió determinar la vitamina B<sub>1</sub> por otra técnica.

# GRAFICA I



**CURVA PATRON**

CONCENT. (mg./ml.)	INTENSIDAD
0.02	15.0
0.03	23.0
0.04	28.6
0.05	35.3
0.06	46.8
0.07	47.6
0.08	53.1
0.09	59.9
0.10	66.5
0.11	72.2
0.12	76.0

$$r = 0.9957$$

$$m = 609.46$$

$$b = 4.95$$

$$s = 20.30$$

### Determinación de B<sub>1</sub> por Ultravioleta

Las vitaminas B<sub>1</sub> y B<sub>6</sub> presentan bandas de absorción característica en el ultravioleta a  $\lambda_{\text{máx.}} = 247 \text{ nm}$  para la vitamina B<sub>1</sub> y  $\lambda_{\text{máx.}} = 266.5$  y  $304 \text{ nm}$  para la vitamina B<sub>6</sub>. Buscando en la literatura se encontró que el método más adecuado para separar las vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub> era por cromatografía en capa fina ya que los r.f. son diferentes como se muestra en la siguiente tabla:

	r. f. x 100												
	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	L <sub>4</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>5</sub>	L <sub>5</sub>	L <sub>6</sub>	L <sub>1</sub>	L <sub>7</sub>	L <sub>6</sub>	L <sub>1</sub>	L <sub>7</sub>
	S <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>	S <sub>7</sub>	S <sub>7</sub>
	na	na	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>					
vitamina B <sub>1</sub>	0	54	0	0	22	0	0	40	15	86	32	10	93
vitamina B <sub>6</sub>	12	26	15	35	30	-	-	60	45	74	58	59	77
vitamina B <sub>2</sub>	29	24	35	42	53	52	82	18	22	29	20	29	24
vitamina B <sub>12</sub>	0	23	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
vitamina C	25	0	30	-	0	-	-	98	88	90	90	85	98
Nicotinamida	-	-	-	-	-	-	-	53	43	60	52	55	70

L<sub>1</sub> = silica gel      L<sub>2</sub> = alumina      L<sub>3</sub> = silica gel con indicador fluorescente.

L<sub>4</sub> = resina intercambiadora WOFATIT CP 300

L<sub>5</sub> = ITLC-SAF

L<sub>7</sub> = poliamida

L<sub>6</sub> = poliamida-silica gel

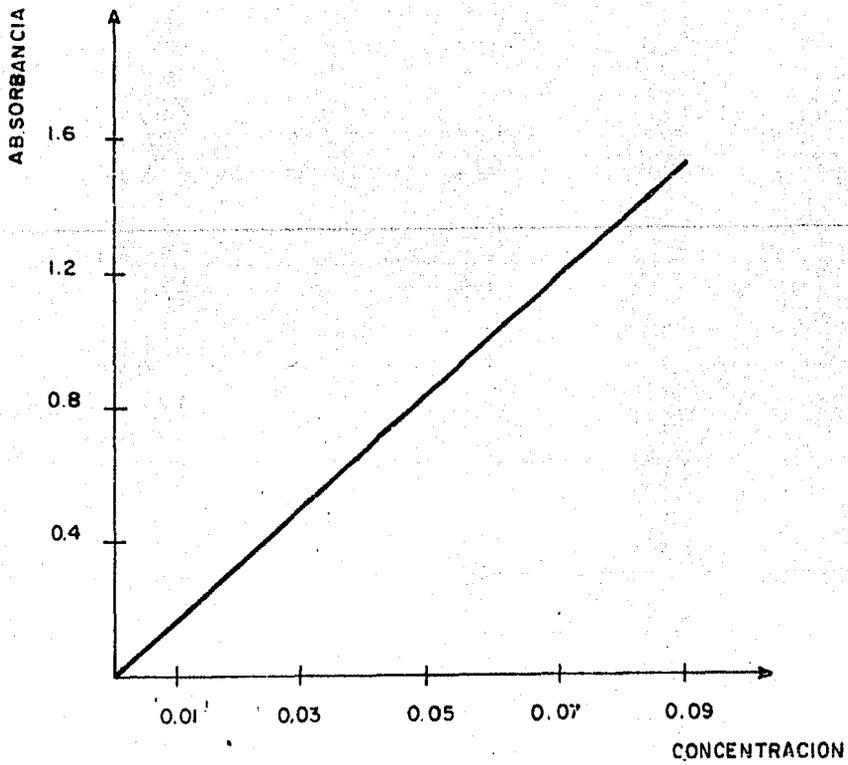
- $S_1$  = ácido acético glacial-acetona-metanol-benceno (1:1:4:14)  
 $S_2$  = ácido acético glacial-acetona-metanol-benceno (5:5:20:70)  
 $S_3$  = 10% etanol  
 $S_4$  = agua destilada  
 $S_5$  = acetona-metanol-agua-ácido acético (70:20:5:5)  
 $S_6$  = 10% de NaCl (ac.)  
 $S_7$  = 10% de acetato de sodio en agua  
 $T_1$  = ascendiendo 19 cm en obscuro  
 $T_2$  = ascendente  $T_3$  = circular  
 $T_4$  = ascendiendo 13 cm  
 $T_5$  = ascendiendo 10 cm en obscuro en camara saturada  
na = no disponible

Después de probar con algunas de ellas el que presentaba menos inconvenientes a nuestro análisis fué el sistema  $L_1/S_1$ . Ya escogida esta mezcla se procedió a preparar una curva estandar con diferentes concentraciones de vitamina  $B_1$  tratándola del mismo modo como se iba a tratar el medicamento.

Para esto se prepararon soluciones de diferentes concentraciones, se aplicaron en placas preparativas\* de 20 x 20 mm y se corrieron usando una mezcla ácido acético glacial-acetona-metanol-benceno (1:1:4:14) se revelaron con luz ultravioleta y se determinó la absorbancia a  $\lambda_{\text{máx}}$  de 247 nm. Con estas soluciones se obtuvo la curva de calibración con la cual se construyó la gráfica II. Los medicamentos se trataron de igual manera.

\*La sílica utilizada es Sílica gel 60 GF<sub>254</sub> para cromatografía en capa fina de Merck.

# GRAFICA II



**CURVA PATRON**

CONCENT. (mg./ml.)	ABS.
0.01	0.169
0.02	0.340
0.03	0.511
0.04	0.682
0.05	0.853
0.06	1.024
0.07	1.195
0.08	1.366
0.09	1.537

$$r = 0.9999$$

$$m = 17.3$$

$$b = 0.002$$

$$s = 0.4683$$

El resultado promedio de 5 experiencias se dan en la Tabla V.

TABLA V

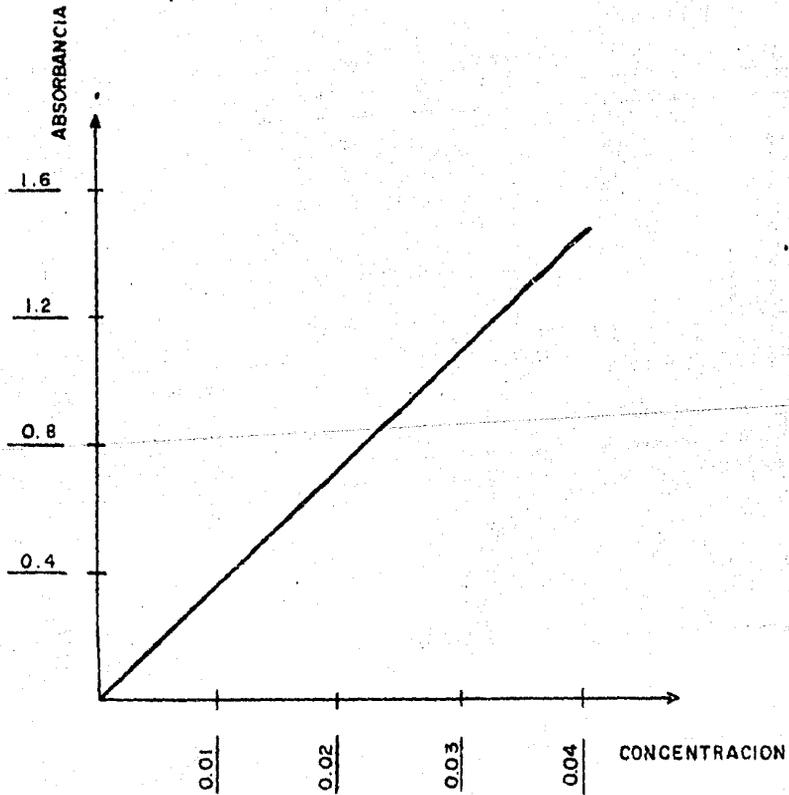
Medicamento	Absorbancia	Concentración de B <sub>1</sub> (mg/ml)
I	0.20	0.0117
II	0.27	0.0158
III	0.26	0.0152
IV	0.25	0.0147
V	0.24	0.0141

#### Determinación de vitamina B<sub>6</sub> por ultravioleta.

La absorción U.V. de piridoxina depende del pH de la solución, para la determinación espectrofotométrica se usa la  $\lambda_{\text{máx}}$  que presenta a 290.5 nm a pH= 2. El primero paso del método consistió en elaborar una curva de calibración con las concentraciones adecuadas a los medicamentos por analizar. Los resultados se presentan en la gráfica III.

Al tratar los medicamentos por U.V. se vió que además de piridoxina se tienen otros productos que absorben a esa misma longitud de onda, por lo que se procedió primero a tratar de separarla por el método de cromatografía en capa fina y resina de intercambio iónico pero ninguno de estos fué eficiente para aplicar el análisis de U.V. por lo que se descarta esta técnica del análisis comparativo.

### GRAFICA III



#### CURVA PATRON

CONCENT. ( mg./ml.)	ABSOR - BANCIA.
0.010	0.450
0.015	0.643
0.020	0.840
0.025	0.985
0.030	1.170
0.035	1.327
0.040	1.480

$r = 0.9970$
$m = 36.48$
$b = 0.063$
$s = 0.2086$

## Determinación de vitamina B<sub>6</sub> por cromatografía de gases.

El análisis de vitamina B<sub>6</sub> y sus análogos por cromatografía de gases ha sido aplicada con éxito a productos farmacéuticos reportando una desviación estandar de  $\pm 2\%$ .

Para aplicar este método es necesario formar su derivado acetilado que aumenta la volatilidad de la molécula facilitando así su análisis.<sup>18</sup> Esta reacción es rápida y cuantitativa.

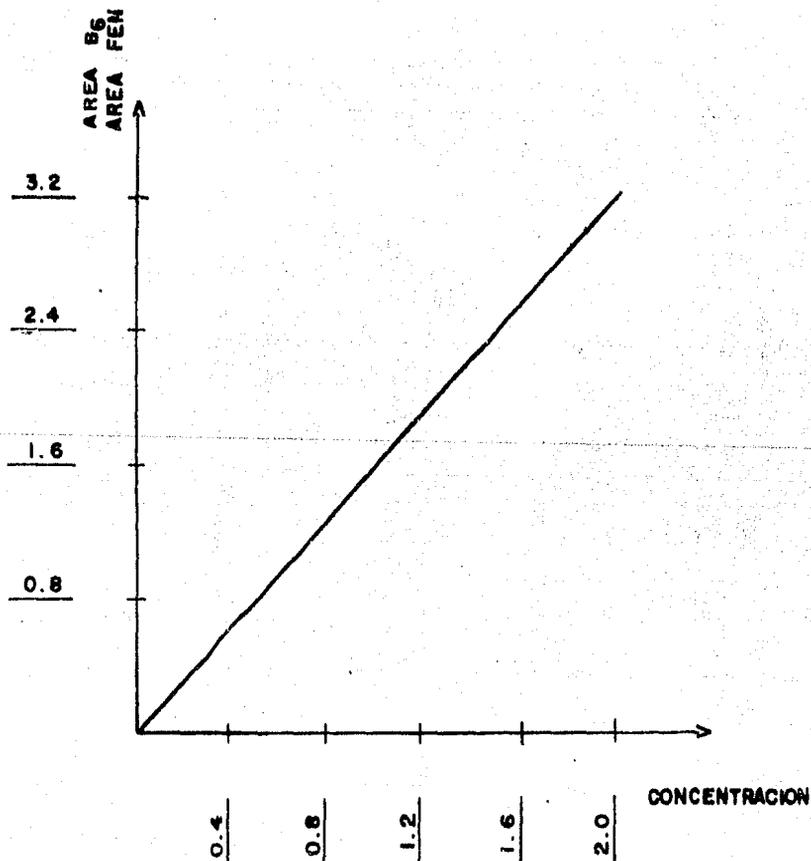
Para preparar el derivado acetilado a 10 mg de vitamina B<sub>6</sub> estandar se le agregó 1 ml de solución piridina-anhídrido acético (25:75 v/v), se agitó por una hora; después se ajusto el volumen con cloroformo para obtener una concentración de 1 mg/ml, se agitó 15 minutos más y se filtró por gravedad.

Con este filtrado se prepararon soluciones de diferentes concentraciones, las cuales se inyectaron a un cromatógrafo de gases usando como referencia interna fenantreno. Los resultados obtenidos se reportan en la gráfica IV.

Los medicamentos se tratan del mismo modo tomando muestras equivalentes de acuerdo a la dosificación de su caja.

Los resultados se interpolan de la gráfica IV obteniéndose los siguientes datos:

# GRAFICA IV



**CURVA PATRON**

CONCENT. (mg./ml.)	AREA B <sub>6</sub> AREA FEN.
0.2	0.140
0.4	0.520
0.6	0.816
0.8	1.120
1.0	1.480
1.2	1.840
1.6	2.460
2.0	3.230

$r = 0.9992$
$m = 1.69$
$b = 0.19$
$s = 0.76$

Medicamentos	Area $B_6$ Fen.	Concentración $B_6$ ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
I	1.73	1.38
II	1.31	1.99
III	1.19	1.81
IV	1.10	1.66
V	0.897	1.32

Los aparatos utilizados para la determinación analítica de vitaminas hidrosolubles por otras técnicas fueron:

- a) Fluorometro Turner
- b) Espectrofotómetro de U.V.-Visible Perkin-Elmer Hitachi-200
- c) Espectrofotómetro de U.V.-Visible Perkin-Elmer Modelo 202
- d) Cromatógrafo de gases Varian Aerograph-2100 con detector de ionización de flama.

El sistema cromatográfico que se usó fué el siguiente:

Columna OV-101

Temperaturas 195-230°C

Columna 180°C

Detector 240°C

Inyector 240°C

Flujo de  $N_2$

## DISCUSION DE LOS RESULTADOS Y CONCLUSIONES

El análisis de polivitamínicos hidrosolubles por R.M.N. se hizo de acuerdo a las condiciones de trabajo (90 MHz) solo factible de aplicarlo a mezclas de vitaminas B<sub>1</sub> y B<sub>6</sub> de las cuales, en este trabajo, solo se llegó a conocer la relación relativa de sus masas sin encontrar sus concentraciones.

La vitamina B<sub>12</sub> queda excluida del análisis por usarse en concentraciones tales que no se puede registrar su espectro y la B<sub>2</sub> por su baja solubilidad en D<sub>2</sub>O.

Los resultados obtenidos en mezclas patrones B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub> fueron satisfactorios, estos se reportan en la Tabla II. La desviación estandar que presentaron al aplicar la ecuación II fueron  $s = 0.0155$  por lo que dichos resultados son exactos.

### ECUACION II

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Donde:  $\bar{X}$  = media aritmética

X = valores de la muestra

n = total de valores de la muestra

S = desviación estándar

Los resultados obtenidos aplicando el método directamente a los medicamentos se reportan en la página 69, tabla III. Las desviaciones estándar encontradas aplicando la

ecuación II fueron las siguientes:

Medicamento	Relación R.M.N.	S
I	1:1.50	0.28
II	1:0.47	0.01
III	1:2.08	0.11
IV	1:0.45	0.02
V	1:1.98	0.06

De la tabla anterior se concluye que el método es exacto porque S es pequeña en todos los casos.

Con el fin de comparar los resultados obtenidos por R.M.N., con otras técnicas ya establecidas se analizaron los mismos medicamentos usando para la vitamina B<sub>6</sub> cromatografía de gases y para B<sub>1</sub> fluorometría y U.V.

Análisis estadístico del método fluorométrico para vitamina B<sub>1</sub>

De la curva patrón obtenida en la tabla IV, gráfica I se tiene el siguiente análisis de regresión lineal:

$$r = 0.9957$$

$$m = 609.45$$

$$b = 4.95$$

$$s = 20.30$$

Para que una recta sea precisa deberá tener valores de

$r = 0.9999$ , el valor obtenido para este método nos muestra que este no tiene la precisión deseada y se debe tender a cero para considerarse un método exacto podemos concluir que el método es preciso pero no exacto.

Por otra parte la confiabilidad del método la obtenemos aplicando un estimador de la media a cada uno de los medicamentos, obteniendo así la siguiente tabla:

Medicamento	$\bar{X}$	$\mu_0$	S	z	F(z)
I	$6 \times 10^{-5}$	$5.9 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-6}$	2.50	0.4941
II	"	$6.2 \times 10^{-5}$	$1.7 \times 10^{-6}$	-5.80	0
III	"	$5.3 \times 10^{-5}$	$3.5 \times 10^{-6}$	10.08	70.9999
IV	"	$3.2 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-6}$	66.60	70.9999
V	"	$5.3 \times 10^{-5}$	$5.3 \times 10^{-6}$	6.60	70.9999

Donde:

$\bar{X}$  = media

$\mu_0$  = estimador de  $\bar{X}$

S = desviación estándar usada como estimador de  $\sigma$

$$z = \frac{\bar{X} - \mu_0}{\sigma / \sqrt{25}}$$

F(z) = función de la distribución normal (z)

De los datos anteriores se tiene para el medicamento I  $F(z) = 49.41\%$  lo que la hace un 50% confiable para el medicamento II se dice que no hay confiabilidad.

Para los medicamentos III, IV y V los valores  $F(z) > 99.99\%$

para estos se dice que el método es confiable.

Análisis estadístico del método por U.V. para  
vitamina B<sub>1</sub>

La curva patrón obtenida en la tabla V, gráfica II  
presenta el siguiente análisis de regresión lineal:

$$r = 0.9999$$

$$m = 17.1$$

$$b = -0.002$$

$$s = 0.4683$$

Para este caso se dice que el método es exacto y preciso.

La confiabilidad del método se calcula aplicando un estimador de la media a cada uno de los medicamentos con lo que se obtiene la siguiente tabla:

medicamento	$\bar{X}$	$\mu_0$	S	z	F(z)
I	$1.6 \times 10^{-2}$	$1.17 \times 10^{-2}$	$1.53 \times 10^{-3}$	14.05	>0.9999
II	"	$1.58 \times 10^{-2}$	$1.3 \times 10^{-3}$	0.077	0
III	"	$1.52 \times 10^{-2}$	$4 \times 10^{-4}$	13.33	>0.9999
IV	"	$1.47 \times 10^{-2}$	$5.7 \times 10^{-4}$	11.40	>0.9999
V	"	$1.41 \times 10^{-2}$	$1.7 \times 10^{-4}$	55.83	>0.9999

Para estos valores  $F(z) = 99.99\%$  por lo que se dice que son confiables, excepto para el medicamento II el cual no es confiable.

De los datos anteriores se concluye que el método por U.V. es más exacto, preciso y confiable por lo que se propone para comparar los datos obtenidos por R.M.N. para la vitamina B<sub>1</sub>.

Análisis estadístico del método de cromatografía de gases para vitamina B<sub>6</sub>

De los resultados en la tabla VII, gráfica IV se obtiene el siguiente análisis de regresión lineal:

$$r = 0.9992$$

$$m = 1.69$$

$$b = -0.19$$

$$s = 0.79$$

Estos valores nos indican que es un método exacto y preciso.

La confiabilidad del método se calcula estimando la media en cada medicamento donde obtenemos la siguiente tabla:

medicamento	X	$\mu_0$	S	z	F(z)
I	2	1.38	0.0208	149.11	>0.9999
II	"	1.99	0.0346	1.44	0.4222
III	"	1.81	0.0264	35.98	>0.9999
IV	"	1.66	0.0099	17.17	>0.9999
V	"	1.32	0.0208	163.46	>0.9999

De lo anterior se puede decir que con excepción del medicamento II el cual es confiable solo un 42.22% el método es confiable ya que tiene un valor de  $F(z) > 99.99\%$ . Lo que lo hace útil como método para compararse con R.M.N.

COMPARACION DE RELACIONES OBTENIDAS POR R.M.N. Y POR LOS METODOS YA DESCRITOS

Medicamento	mg reportados en el medicamento/100 mg	mg encontrados Crom-U.V. (B <sub>6</sub> ) (B <sub>1</sub> )	100 mg Crom-U.V. (B <sub>6</sub> ) (B <sub>1</sub> )	Relación reportada en el medicamento	Relación encontrada Crom-U.V. (B <sub>6</sub> ) (B <sub>1</sub> )	Relación R.M.N.
	B <sub>6</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>6</sub>	B <sub>6</sub> : B <sub>1</sub>	B <sub>6</sub> : B <sub>1</sub>	B <sub>6</sub> : B <sub>1</sub>
I	32.25	64.51	22.40 ±0.28	1 : 2	1:2.09± 0.24	1:1.5 ± 0.28
II	66.14	33.07	65.56 ± 0.62	1 : 0.5	1:0.49 ± 0.03	1:0.47 ± 0.01
III	33.33	66.66	30.16 ± 0.36	1 : 2	1:2.09 ± 0.05	1:2.08 ± 0.11
IV	62.33	31.16	55.83 ± 0.32	1 : 0.5	1:0.51 ± 0.02	1:0.45 ± 0.02
V	33.11	66.22	22.00 ± 0.28	1 : 2	1:2.64 ± 0.05	1:1.98 ± 0.06

De la tabla anterior se concluye que los resultados obtenidos por U.V. para  $B_1$  y cromatografía de gases para  $B_6$ ; comparandolos con los resultados por R.M.N. son similares, por lo que, este método es aplicable presentando la ventaja de su rapidez, ya que no necesita una separación previa de las vitaminas.

Con el fin de llegar a conocer las concentraciones de las vitaminas y no solo la relación en la que se encuentran, este trabajo podría continuarse del siguiente modo: buscar y agregar un componente adicional a las mezclas cuyo espectro de R.M.N. presentará señales a frecuencias tales, donde los protones de las vitaminas no absorbieran.

Las mezclas de nicotinamida, ac. ascórbico,  $B_6$  y  $B_1$  solo fueron estudiadas en mezclas patrón, no encontrándose medicamentos existentes en el mercado nacional, aunque en la literatura si se reportan dichas mezclas para ser usadas con fines terapéuticos.

## BIBLIOGRAFIA

1. Nathan, J.P.  
Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno  
Serie Monográfica #9  
Cap. I. Introducción  
pág. 9-11  
Organización de los Estados Americanos (O.E.A)  
México (1973)
2. Lambert, B.J., Shurvell, F., et al  
Organic Structural Analysis  
Cap. II Resonance Magnetic  
pag. 319-22  
1a. Ed.  
Edt. Mac Millan Publishing Co., Inc.  
New York (1976)
3. Jackman, L.M. and Sternhell, S.  
Aplicaciones de Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy  
in Organic chemistry  
pág. 11-13, 49-52  
2a. Ed.  
Edt. Pergamon Press  
Londrés (1969).
4. Addison, O. and Dudek G.  
N.M.R. an Introduction to Proton Nuclear Magnetic  
Resonance Spectroscopy  
Cap. I Feature of Nuclear Magnetic Resonance  
Spectrum  
pág. 14-15

- 1a. Ed.  
Edt. Holden-Day, Inc.  
San Fco. California (1971)
5. Fieser and Fieser  
Química Orgánica  
Cap. XXXIX Vitaminas  
pág. 1207-1211  
4a. Ed.  
Edt. Grijalbo  
México (1968)
6. Gessner, H.G.  
Diccionario de Química  
2a. Ed.  
Ediciones Omega, S.A.  
Barcelona (1975)
7. Strohecker, R. and Henning H.M.  
Análisis de vitaminas. Métodos comprobados  
pags. 80-119, 151-183  
Edt. Paz Montalvo  
Madrid (1967)
8. British Pharmacopoeia  
Vol. I Monografía Medicinal and Pharmaceutical  
Substances  
págs. 451, 504  
Publisher of Department of Health and Social Security  
scottish home and healt Department Printed for Her  
Majesty's Stationery Office at the University Press,  
Cambridge  
Londrés (1980)

9. Windholz, M., Budavari S., Strountsos L., Fertic, N.M.  
The Merck Index  
pag. 120, 935, 1151, 1183, 1331, 1434-1435  
10a. Ed.  
Edt. Merck Co. Rahway  
New York (1983).
  
10. Goodman, S.L. and Gilman, A.  
Bases Farmacológicas de la Terapéutica  
pags. 1324-1339, 1549-1552, 1556-1558, 1564-1568  
1a. Ed.  
Edt. Macmillan Publishing Co., Inc.  
New York (1975).
  
11. Rodríguez, C.R.  
Vademécum Académico de Medicamentos  
Pags. 137, 673  
1a. Ed.  
Edt. Facultad de Medicina, UNAM  
México (1984).
  
12. The Sadtler  
Standard Spectra NMR  
Sadtler Research Laboratories, Inc.  
Espectros No. 2804, 5804, 1601  
Piladelphia (1968)
  
13. Forunier, J., Vincent, E.J., Chauvet, A.M., Crevat A.  
"Etude par Résonance Magnétique Nucleaire de la  
Thiamine. (Vitamina B<sub>1</sub>) site de Protonation equilibre  
tautomerie.  
Organic Magnetic Resonance 5, [2] pags. 573-578 (1973)

14. High Resolution N.M.R. spectra catalog  
Varian Associates  
Vol. 2  
Espectro No. 454  
U.S.A. (1963)
  
15. Brodie, D.J. and Poe, M.  
"Proton Magnetic Resonance Studies of vitamin B<sub>12</sub>.  
Proton Magnetic Resonance Spectra of some cobalamins  
and Cobinamides"  
Biochemistry 10, [5] pags. 914-922 (1971)
  
16. Rosenstein, E., Martin del Campo, A.  
Diccionario de Especialidades Farmacéuticas  
30a. Ed.  
Edt. PLM  
México (1984).
  
17. Zweig, G. and Sherma, J.  
Handbook of Chromatography  
Vol. I  
pags. 655-656  
Ed. 1a.  
Edt. CRC Press  
USA (1972)
  
18. Sheppard, A.J. and Prosser, A.R.  
Methods of Enzymology  
Vol. XVIII-A Vitamins and coenzymes  
Cap. VI Pyridoxine, Pyridoxamine, and Pyridoxal:  
Analogos and Derivates  
pags. 494-505  
1a. Ed.  
Edt. Academic Press  
New York (1970)