

ESTUDIO Y EVALUACION DE UN METODO PARA LA DETERMINACION DE TIAMINA

JAIME ROJAS B., Q. F.*

(Trabajo realizado en el Laboratorio de Análisis Aplicados,
Departamento de Farmacia, Universidad Nacional).

INTRODUCCION

Shibazaki, Yamamoto y Sasaki (1), han desarrollado un método absortiométrico para la determinación de tiamina, el cual se basa en la medida del color amarillo que resulta al tratar la tiamina con una solución acuosa de Bromo-Piridina y posterior adición de tiosulfato de sodio e hidróxido de sodio.

El presente trabajo tiene como finalidad la verificación del método y la evaluación y utilidad del mismo respecto a otros métodos ya establecidos de tiempo atrás.

PARTE EXPERIMENTAL

I — TECNICA DE LA DETERMINACION (1)

“Pasar una solución de tiamina que contenga por cada 9 ml., 100 a 500 mcg. de la misma, a un balón aforado de 50 ml. y enfriar sobre baño de hielo; agregar a esta solución 20 ml. de una solución

* Instructor Asociado.

acuosa que contenga 0.25% de bromo y 6.5% de piridina, 4 ml. de tiosulfato de sodio 0.5N y 15 ml. de hidróxido de sodio 1.0N, agitando bien después de cada adición. Diluir a 50 ml. con agua destilada. La absorbancia del color desarrollado se mide a 445 m μ ., contra el reactivo como blanco”.

Los autores, que disponen de un Autoanalizador Technicon, elaboran curvas por variación de cantidades de reactivos, tal como el bromo y la piridina. Igualmente estudian el efecto del pH de la solución de tiamina, efecto del tiempo de oxidación, así como también la interferencia de otras sustancias.

Como no disponemos de dicho instrumento, el presente trabajo se realizó manualmente y empleando un Espectrofotómetro Coleman 139 UV-VIS, Hitachi, Perking Elmer. El espesor de las celdas fue siempre de 1 cm.

II — EXPERIENCIAS REALIZADAS

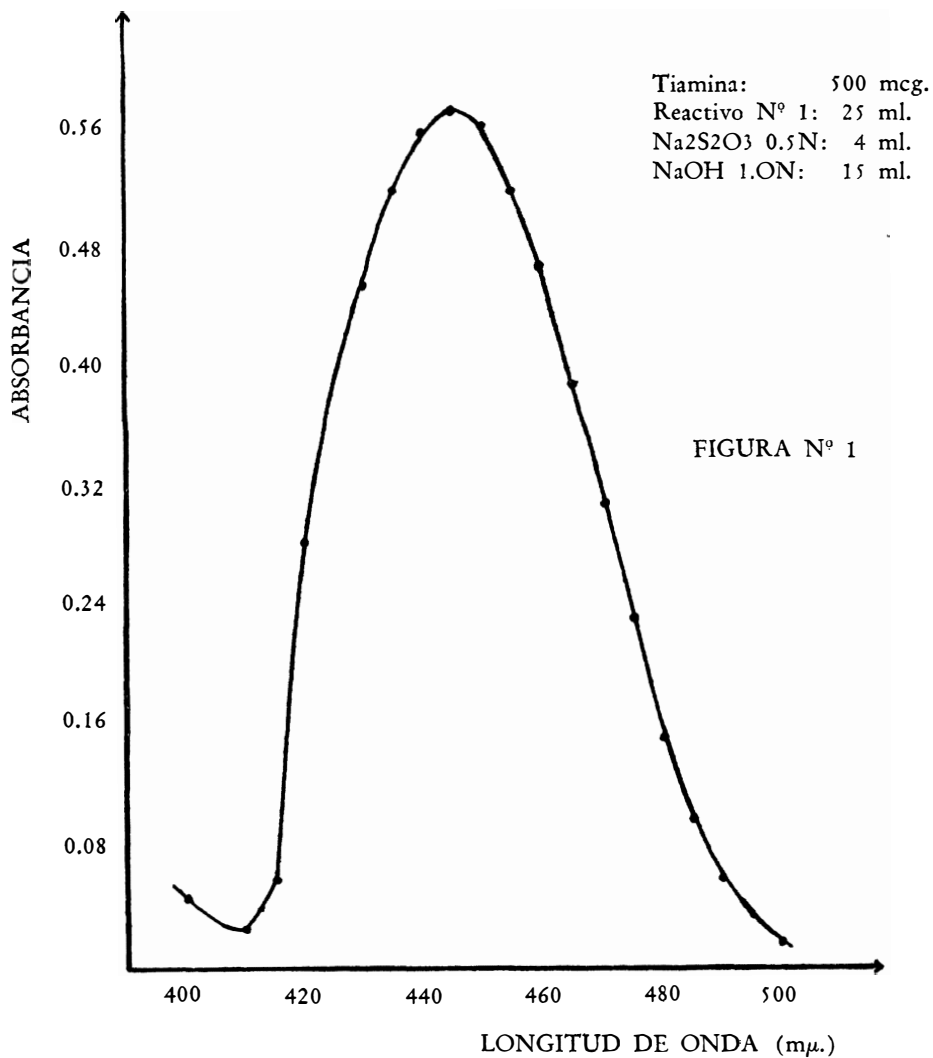
A) En base a la técnica anteriormente descrita, se prepararon los siguientes reactivos:

Reactivo N ^o 1:	Bromo	0.25%	V/V
	Piridina	6.50%	V/V
Reactivo N ^o 2:	Bromo	1.00%	V/V
	Piridina	6.50%	V/V
Reactivo N ^o 3:	Bromo	1.00%	V/V
	Piridina	26.00%	V/V
Reactivo N ^o 4:	Bromo	1.00%	V/V
	Piridina	6.50%	V/V
	Na ₂ S ₂ O ₃ 0.5N	4.00%	V/V
	NaOH 1.0N	15.00%	V/V

B) Empleando los reactivos anteriores y 10 ml. de una solución de tiamina que contenía 10 mcg/ml., se obtuvo:

Reactivo	Coloración
1	Amarillo pálido
2	Amarillo pálido
3	Amarillo rojizo
4	Ninguna

De acuerdo a lo anterior y para no emplearlos más en el transcurso del trabajo, se rechazaron los reactivos 3 y 4.



ESPECTRO DE ABSORCION DE LA TIAMINA

C) *Determinación del espectro de absorción:*

El espectro de absorción fue elaborado mediante el empleo del Reactivo N° 1 (figura N° 1) en cantidad de 25 ml. y tiamina en cantidad de 500 mcg.

La longitud de onda de máxima absorción que se observa es de 445 m μ ., la que concuerda con la bibliografía (1).

D) *Efecto por variación de la cantidad de reactivos:*

Para establecer el efecto sobre el grado de coloración, se variaron las cantidades de los Reactivos N° 1 y N° 2, sobre una alícuota de una solución de tiamina que contenía 500 mcg. Los resultados se detallan en las figuras números 2 y 3 para los Reactivos números 1 y 2 respectivamente.

En base a lo anterior, en adelante se seguirá usando el Reactivo N° 2, en cantidad de 10 ml., a excepción de los pasos siguientes, E y F.

E) *Efecto del tiempo de oxidación:*

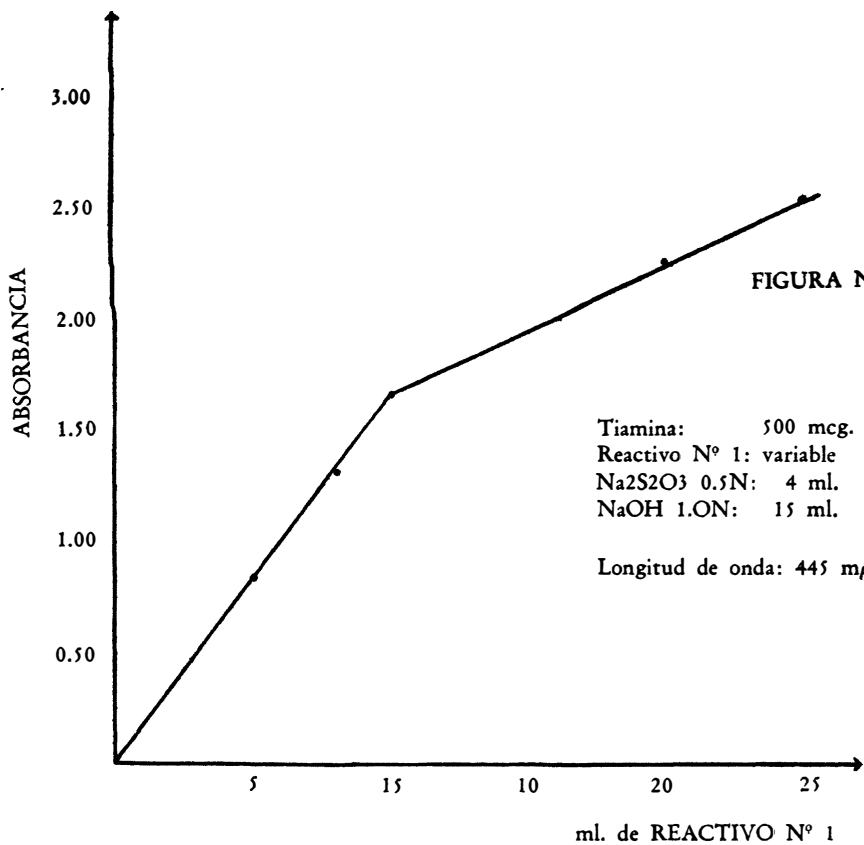
Este efecto se estudió para el Reactivo N° 1 (figura N° 4-A) y para el Reactivo N° 2 (figura N° 4-B), observándose en ambos casos la disminución de la intensidad de color con el tiempo. Igualmente se elaboró una curva para el Reactivo N° 1 con todos los demás reactivos a excepción de la tiamina, resultando una curva horizontal (figura N° 4-C).

F) *Efecto del tiempo de preparación del reactivo:*

En la figura N° 5 se traduce el efecto que se presenta sobre la intensidad de la coloración al emplear un reactivo (Reactivo N° 1) después de varias horas de preparado. Se aclara en este caso, que el reactivo una vez preparado, fue sometido a filtración, porque de lo contrario, en poco tiempo adquiere un color amarillo rojizo más intenso que cuando es filtrado.

G) *Efecto de la variación del tiosulfato de sodio y del hidróxido de sodio:*

Las figuras N° 6 y N° 7 muestran el resultado por variación del volumen del tiosulfato de sodio 0.5N y del hidróxido de sodio 1.0N, respectivamente.



EFFECTO POR VARIACION DE CANTIDAD DEL REACTIVO No. 1

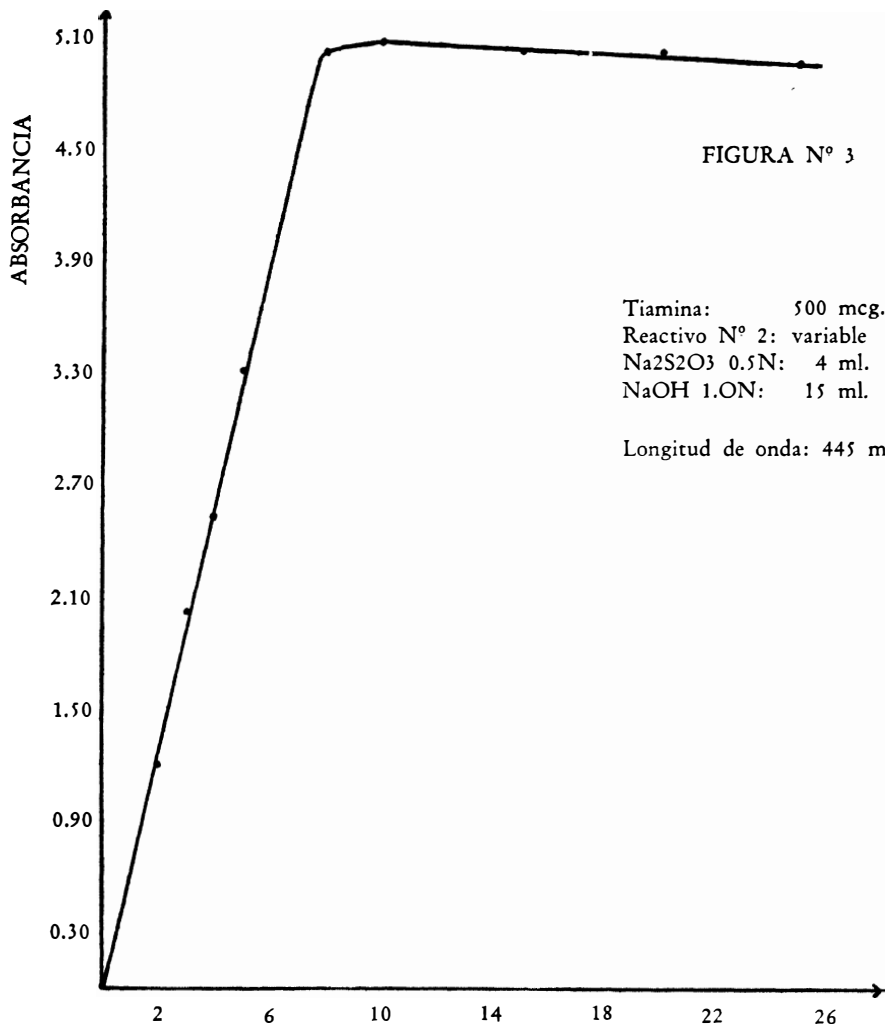


FIGURA N° 3

Tiamina: 500 mcg.
 Reactivo N° 2: variable
 Na₂S₂O₃ 0.5N: 4 ml.
 NaOH 1.0N: 15 ml.

Longitud de onda: 445 mμ.

EFFECTO POR VARIACION DE CANTIDAD DEL REACTIVO No. 2

EFFECTO DEL TIEMPO DE OXIDACION

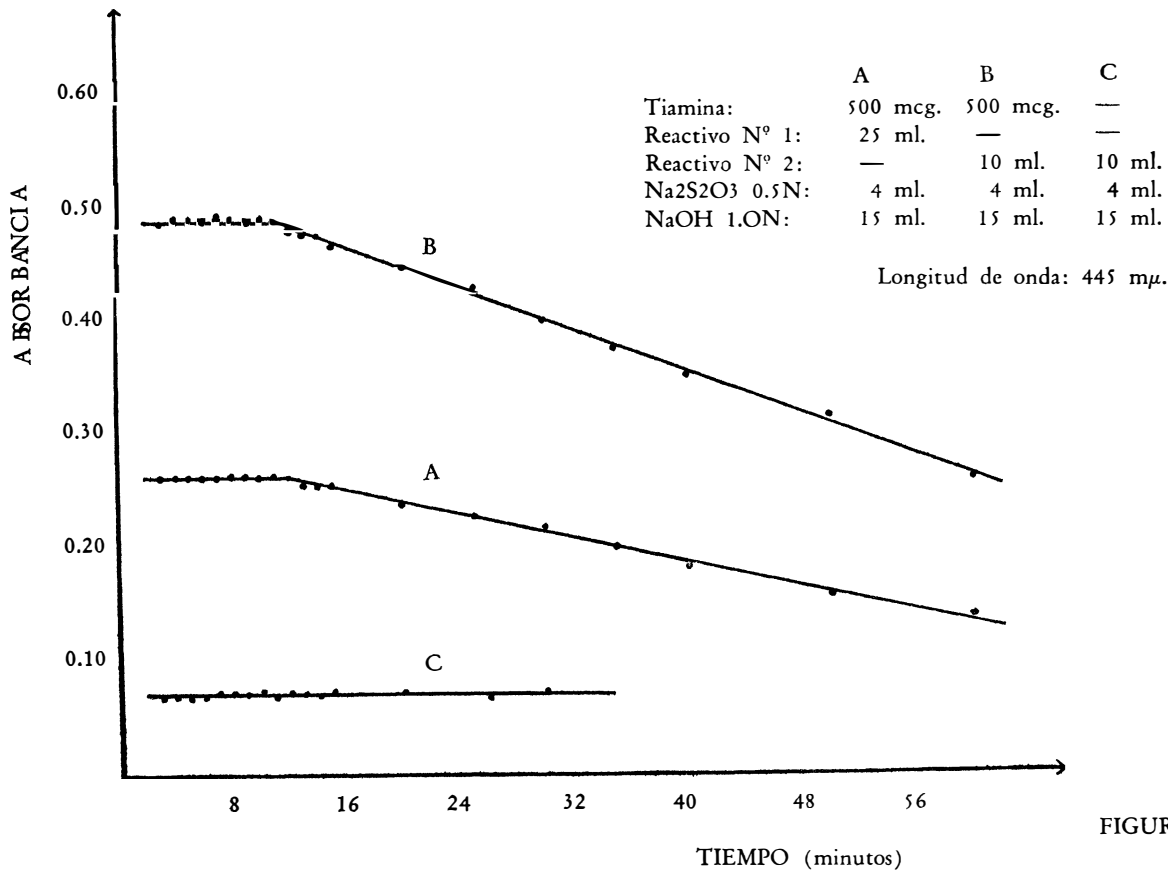


FIGURA N° 4

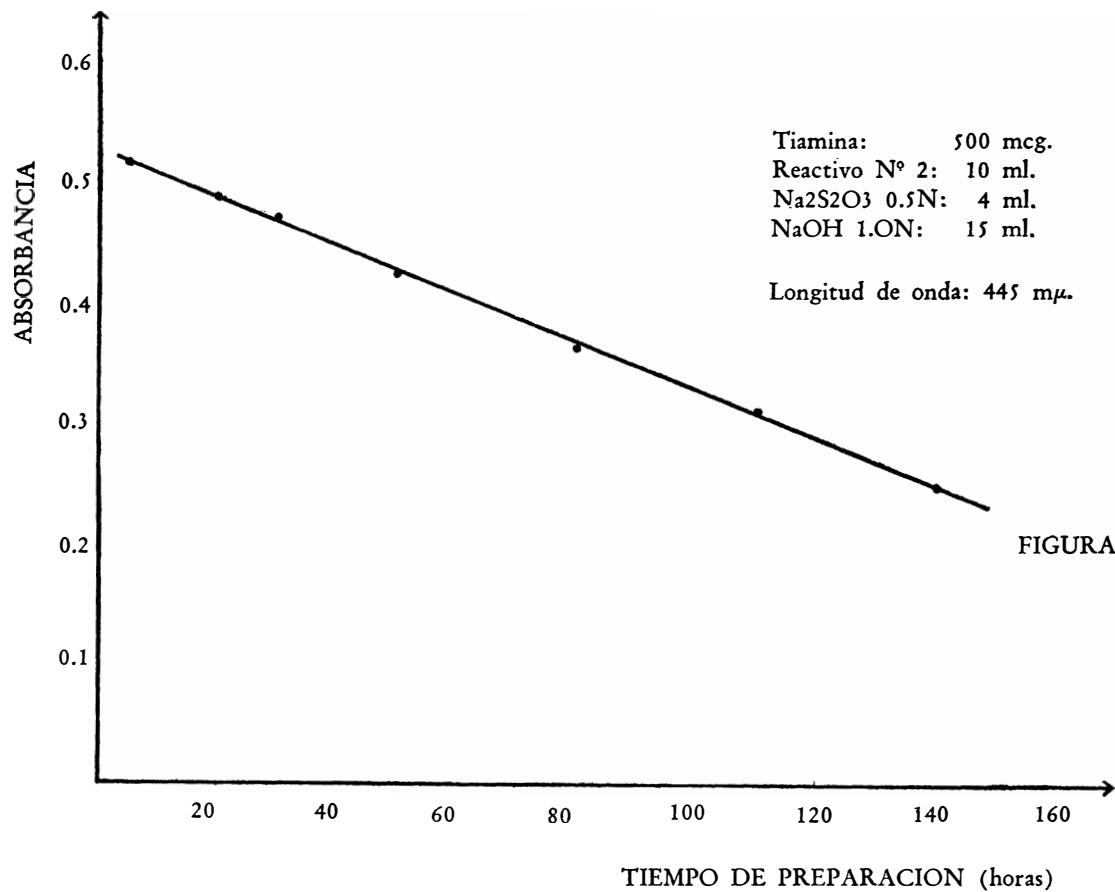


FIGURA N° 5

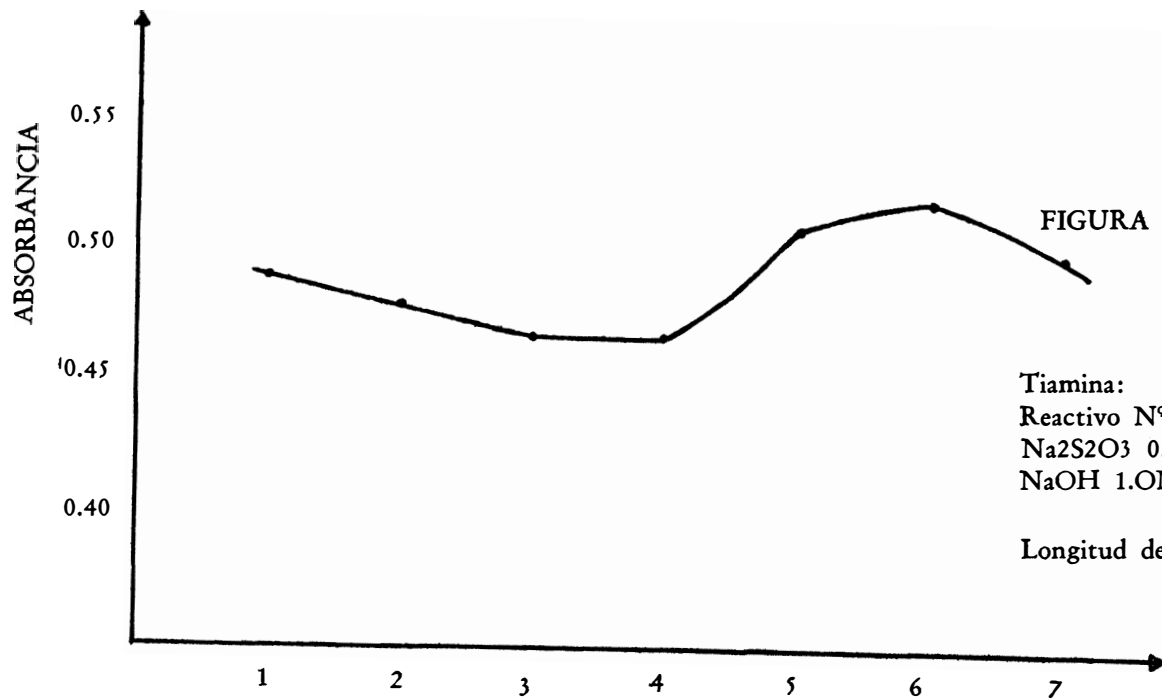


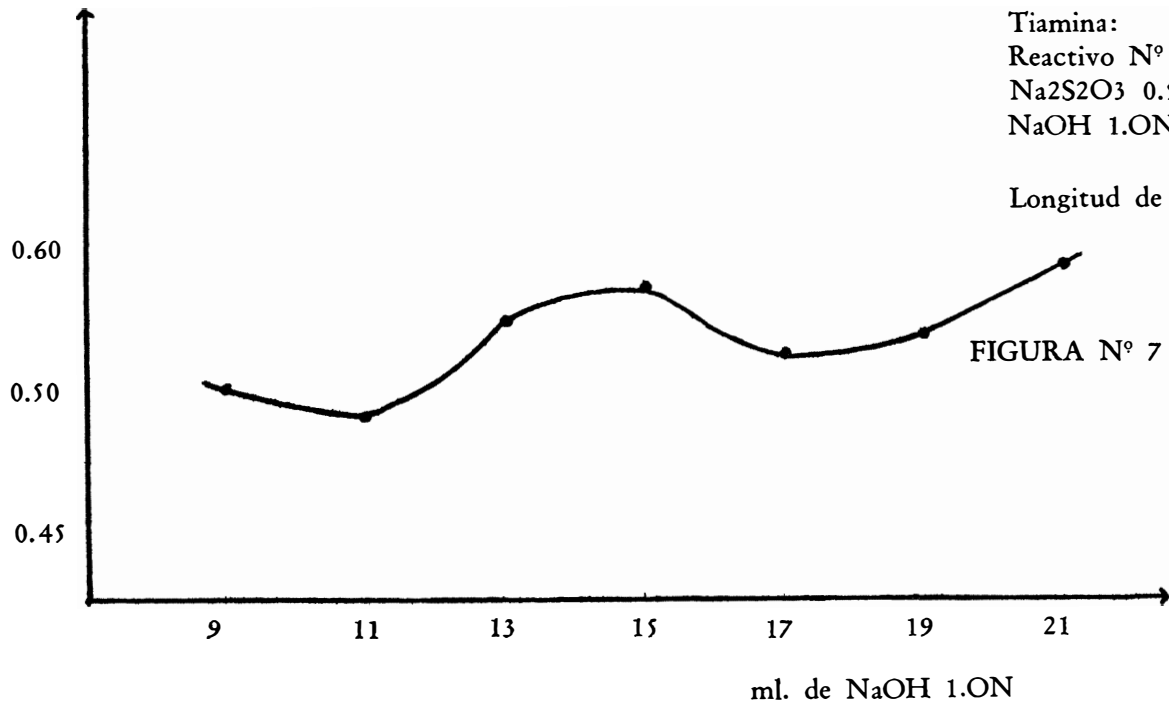
FIGURA N° 6

Tiamina: 500 mcg.
Reactivo N° 2: 10 ml.
Na₂S₂O₃ 0.5N: variable
NaOH 1.0N: 15 ml.

Longitud de onda: 445 m μ .

ml. de Na₂S₂O₃ 0.5N

EFFECTO POR VARIACION DEL TIOSULFATO DE SODIO



Tiamina: 500 mcg.
 Reactivo N° 2: 10 ml.
 Na₂S₂O₃ 0.5N: 4 ml.
 NaOH 1.ON: variable

Longitud de onda: 445 mμ.

FIGURA N° 7

EFFECTO POR VARIACION DEL HIDROXIDO DE SODIO

Se anota el mínimo de absorción que se presenta para 4 ml. de tiosulfato y el máximo para 15 ml. de hidróxido, que son las cantidades que emplean Shibazaki, Yamamoto y Sasaki.

H) *Curva de calibración:*

En la curva de calibración obtenida (figura N° 8), no se observa desviación de la Ley de Beer, mientras no se alcance una concentración superior a 900 mcg. de tiamina en la alícuota tomada para desarrollar el color, en contraste con la cantidad máxima que menciona la técnica original (1).

III — VALORACIONES EFECTUADAS

Para la confrontación y evaluación del método se emplearon tres muestras diferentes, cuya procedencia se indica a continuación:

Tiamina clorhidrato (materia prima): Laboratorios Eaton de Colombia.

Tabletas de tiamina clorhidrato por 100 mg.: Laboratorio de Farmacia Industrial, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia.

Tabletas de tiamina clorhidrato y piridoxina clorhidrato por 250 mg. cada una: Laboratorios Roche de Colombia.

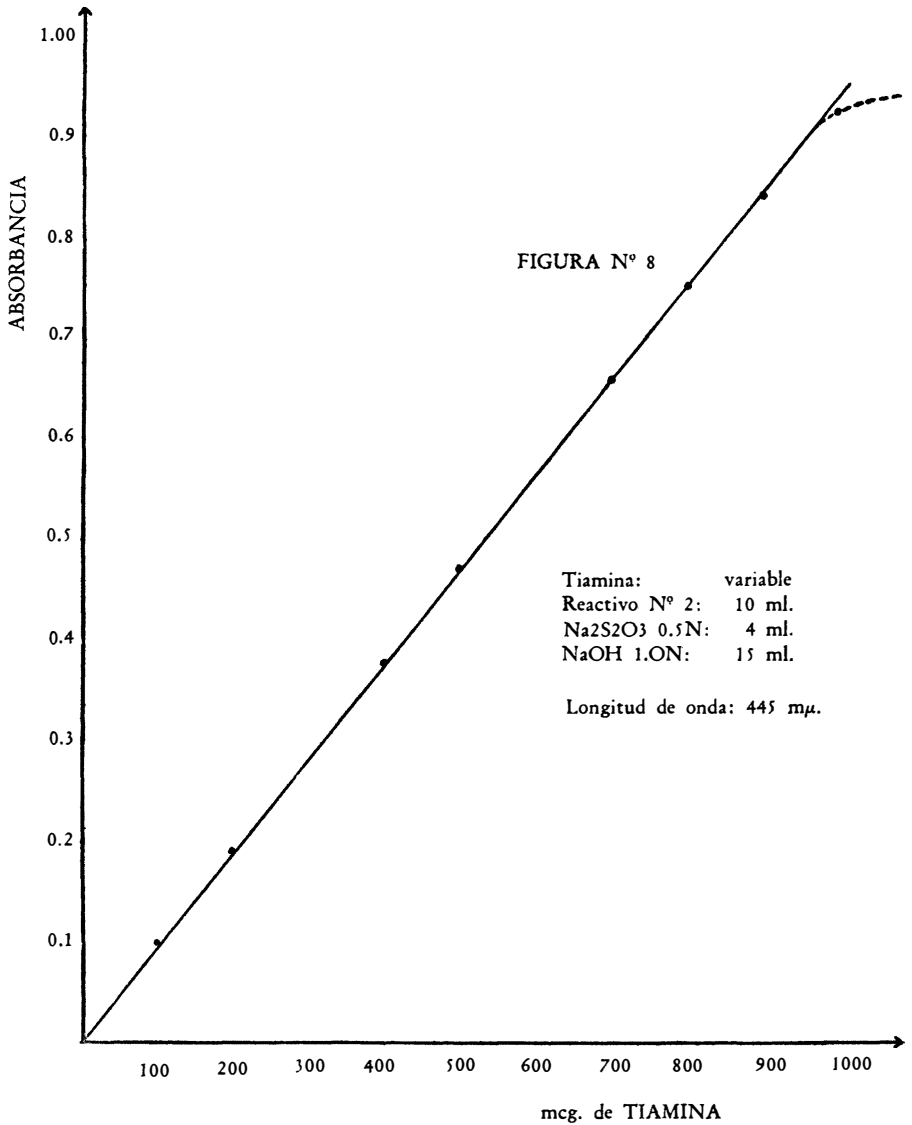
Como técnicas de confrontación se efectuaron sobre cada muestra y por triplicado las siguientes:

a) Método gravimétrico por precipitación con ácido silicotúngstico (2).

b) Método colorimétrico por diazotación o método de Auerbach (3).

c) Método fluorométrico por formación del tiocromo (4).

Nota: Los anteriores métodos se ensayaron por triplicado a excepción del método del tiocromo.



CURVA DE CALIBRACION PARA LA TIAMINA

1. *Resultados para la tiamina clorhidrato (materia prima).*

A continuación se dan los diferentes resultados para cada uno de los métodos empleados y para un promedio de tres determinaciones.

Método	Resultado promedio %	Desviación promedio
Precipitación con ácido silico- túngstico	98.33	0.153
Diazotación	99.05	0.090
Tiocromo	99.15	0.000
Bromo-piridina	98.63	0.147

2. *Resultados para las tabletas de tiamina clorhidrato por 100 mg.*

Los resultados para un total de tres determinaciones por método:

Método	Resultado promedio mg./tab.	Desviación promedio
Precipitación con ácido silico- túngstico	96.43	0.317
Diazotación	97.81	0.187
Tiocromo	98.09	0.000
Bromo-piridina	102.58	0.090

3. *Resultados para las tabletas de tiamina clorhidrato por 250 mg.*

En un total de tres determinaciones por método se encontró:

Método	Resultado promedio mg./tab.	Desviación promedio
Precipitación con ácido silico- túngstico	263.60	1.000
Diazotación	248.60	0.383
Tiocromo	249.00	0.000
Bromo-piridina	261.90	0.600

IV — TECNICA DE LA DETERMINACION SEGUIDA

El procedimiento para la valoración de las tres muestras anteriormente mencionados, con el reactivo de bromo-piridina, fue el

que se estableció a lo largo del presente estudio y para nuestras condiciones de trabajo. La modificación de la técnica seguida se transcribe a continuación :

A) *Reactivos necesarios :*

1. Tiamina clorhidrato U.S.P., patrón de referencia.
2. Solución acuosa de bromo-piridina al 1.0 y 6.5%, respectivamente, recientemente preparada y luego filtrada.
3. Tiosulfato de sodio 0.5 normal.
4. Hidróxido de sodio 1.0 normal.

B) *Procedimiento para la tiamina clorhidrato (materia prima) :*

Pesar exactamente unos 100 mg. de muestra, disolver y diluir a 100 ml. con agua destilada. Tomar 10 ml. de esta dilución y llevar a 100 ml. Para efectuar la valoración, pasar 5 ml. de la última dilución a un balón aforado de 50 ml. y enfriar sobre baño de hielo. Agregar sucesivamente 10 ml. de la solución de bromo-piridina, 4 ml. de tiosulfato de sodio y 15 ml. de hidróxido de sodio, mezclando bien después de cada adición. Diluir y llevar a la marca con agua destilada.

Antes de 10 minutos leer la absorbancia a una longitud de onda de 445 m μ . contra un blanco preparado en iguales condiciones. Deducir la cantidad de tiamina en el problema de una curva de calibración de tiamina clorhidrato, patrón de referencia, previamente secado a 105°C por tres horas, tratado de una manera similar y dentro de un límite de concentraciones de 200 a 800 mcg.

C) *Procedimiento para tabletas e inyectables de tiamina :*

Se sigue el mismo procedimiento indicado para la materia prima, tomando una alícuota del producto que contenga aproximadamente 500 mcg. por 5 ml. Para las tabletas es necesario extraer la tiamina previamente con ácido clorhídrico al 4% o con alcohol al 50%, antes de efectuar las diluciones necesarias.

V — COMENTARIOS Y CONCLUSIONES

1. El método se basa en la oxidación que sobre la tiamina ejerce el bromo y el producto de dicha oxidación presenta un máximo de absorción a 445 m μ .

2. El hidróxido de sodio y el tiosulfato de sodio tienen como fin el de eliminar el exceso de agente oxidante por decoloración del mismo, de acuerdo a las siguientes reacciones:



3. Observando las figuras números 6 y 7, vemos que la disminución de la intensidad del color que produce la cantidad empleada de tiosulfato de sodio 0.5N (4 ml.) se ve compensada por el aumento que produce en la misma el hidróxido de sodio 1.ON (15 ml.).

4. El orden de mezcla de los diferentes reactivos empleados en la técnica debe ser el que se anota, pues de lo contrario, como se comprobó, la intensidad del color disminuye notablemente.

5. La figura número 2 corresponde al efecto del volumen de Reactivo número 1, observándose que entre 0 y 10 ml. hay un aumento de absorción normal; entre 10 y 25 ml. el aumento es menor.

La figura número 3 demuestra que utilizando el Reactivo número 2 con un volumen de 10 ml. se obtiene el máximo de absorbancia y entre 10 y 25 ml. la absorción decrece ligeramente. En conclusión se recomienda el empleo del Reactivo número 2 usando un volumen de 10 ml.

6. La intensidad de la coloración, como demuestran las figuras números 4-A y 4-B se mantiene constante hasta unos 10 minutos después de agregado el reactivo, tiempo a partir del cual, descien- de progresivamente y al cabo de una hora ha disminuido aproximadamente en un 48.5%.

La degradación, como lo comprueba la figura número 4-C, se debe exclusivamente al producto de la oxidación.

7. El reactivo debe ser recientemente preparado antes de su empleo (figura número 5) por su poca estabilidad.

8. Es necesario, para efectuar la determinación de la tiamina, utilizar el mismo reactivo para elaborar la curva de calibración y para la determinación del problema.

9. Sobre la confiabilidad del método y como resultado de las confrontaciones hechas en comparación con los métodos corrientes, puede decirse que en general presenta resultados reproducibles y al mismo tiempo acordes con los mismos, cuando se trata de tiamina pura y aun para el caso de tabletas, ya que los excipientes comunes de esta forma farmacéutica no interfieren en la determinación, como fue comprobado por los autores del método (1). Lo anteriormente dicho puede hacerse extensivo a otra clase o forma de productos que lleven en su composición tiamina como único principio activo. En caso contrario debe consultarse la tabla que se elaboró en el desarrollo de la técnica (1), la cual presenta un total de 44 sustancias que producen o no interferencia en la determinación.

10. El método permite la determinación de tabletas que contienen tiamina y piridoxina con una desviación del 5%.

11. En comparación con el método de precipitación con ácido silico-túngstico en tabletas de tiamina-piridoxina se encontró una desviación igual a la del caso anterior.

12. Se comprueba de esta manera, una vez más la gran utilidad de los métodos por diazotación y por formación del tiocromo, ya que presentan los resultados más satisfactorios para la valoración de tiamina en los diferentes preparados o productos en que se encuentre.

13. El método estudiado en comparación con los descritos anteriormente demuestra que puede ser utilizado en la determinación de tiamina en productos farmacéuticos con una desviación promedio de ± 0.419 .

RESUMEN

Se estudió un método para la determinación de tiamina por colorimetría, utilizando como reactivo una solución acuosa bromopiridina en concentración del 1% de bromo, empleándose un volumen de 10 ml., en lugar de la solución indicada en la bibliografía por obtenerse una mayor absorción y ser ésta más estable.

Se comparó este método con los métodos corrientes para la determinación de tiamina en productos farmacéuticos encontrándose una desviación de ± 0.419 , por lo cual el método puede ser utilizado en trabajos de rutina.

SUMMARY

A method for the colorimetric determination of thiamine was studied. Ten ml. of a water solution of bromide-pyridine reagent with 1% bromide was used instead of the reagent indicated in the literature. This new reagent showed a higher absorption and proved to be more stable than the reagent generally used.

Evaluation of this new method in relation to other analytic methods used for thiamine determination in pharmaceutical products was made. The standard deviation found was ± 0.419 . Therefore this method for thiamine determination may be used in routine work.

R É S U M É

Une variante de la méthode de détermination colorimétrique de la Thiamine par Br_2 en solution dans la pyridine a été mise au point. En utilisant 10 ml. du réactif à 1% en Br_2 , on obtient une plus grande absorption et on augmente la stabilité. Les résultats ne diffèrent en moyenne que de ± 0.41 de ceux obtenus par les procédés courants et par conséquent la méthode est applicable aux analyses de routine.

BIBLIOGRAFIA

1. SHIBASAKI T., YAMAMOTO M., SASAKI T., J. Pharm. Soc. of Japan, **89**, 11, 1571, 1969.
2. *British Pharmacopoeia*, The Pharmaceutical Press, London, England, 51-52, 1963.
3. CALDERÓN E.: *Prácticas de Análisis Químico Aplicado*. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Farmacia.
4. *Analytical Procedures for the Determination of Vitamins in Multivitamin Preparations*, Hoffmann-La Roche & Co. Ltda. Basle, Switzerland. 67-68, 1969.