

Determinación Espectrofotométrica de la Isoniacida con Acido 1,2,4-Aminonaftolsulfónico

Sergio A. GOMEZ

*Instituto de Farmacia, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia,
Universidad Nacional de Tucumán, Ayacucho 491,
(4000) San Miguel de Tucumán, Argentina*

RESUMEN. Se presenta una reacción selectiva para hidracidas aromáticas, basada en la interacción de la isoniacida y el ácido 1,2,4-aminonaftolsulfónico en medio alcalino, produciéndose un compuesto de condensación de color anaranjado cuya absorbancia se mide a 475 nm. La sensibilidad de la reacción es de 2×10^{-5} . La aplicación del método a la valoración de la isoniacida como droga pura permite una recuperación del 99,2% y en el caso de formas farmacéuticas la recuperación es del 97,6%. Las sustancias auxiliares comunes de las fórmulas farmacéuticas no interfieren con la reacción.

SUMMARY. "Spectrophotometric determination of isoniazide with 1,2,4-aminonaftolsulphonic acid". A selective reaction for aromatic hydrazides, based on the interaction of isoniazide and 1,2,4-aminonaphtholsulphonic acid in an alkaline medium with the production of an orange condensation substance of maximum absorbance at 475 nm, is reported. The sensibility of the reaction is 2×10^{-5} . When method is applied to the valuation of isoniazide (pure drug) allows a recovery of 99.2% and when applied to pharmaceutical forms gives a recovery of 97.6%. The common auxiliar substance of pharmaceutical formulations do not interfere with the reaction.

INTRODUCCION

Los métodos espectrofotométricos propuestos para la valoración de la hidracida del ácido isonicotínico (HAI), codificada por las Farmacopeas bajo el nombre de isoniacida, son numerosos. Los más importantes que han sido aplicados a la valoración de la droga como tal y en sus formas farmacéuticas lo hacen en el rango UV y visible. Entre los últimos se encuentran los fluorométricos y los que usan reactivos desencadenantes de color como consecuencia del poder reductor de la función hidracida o de sus productos de hidrólisis, en la presencia del núcleo HAI piridincarboxílico y en la condensación de la molécula de la HAI o de algunos de sus productos de transformación con el reactivo. Entre éstos se encuentra la con-

PALABRAS CLAVE: Espectrofotometría de isoniacida; Hidracida del ácido 4-piridincarboxílico; ácido 1,2,4-aminonaftolsulfónico.

KEY WORDS: Isoniazide spectrophotometry; 4-pyridincarboxylic acid hydrazide; 1,2,4-aminonaphtholsulphonic acid.

densación de la HAI con el ácido 1,2,4-aminonaftolsulfónico (ANS), actuando como reactivo de color en medio alcalino.

En un estudio previo ¹ se realizó la valoración de la HAI mediante esta reacción, la que ahora, simplificada y estudiada más ampliamente, es adaptada a la valoración espectrofotométrica.

MATERIAL Y METODOS

Aparato

El presente estudio ha sido realizado con un espectrofotómetro Metrolab RC 325 junior.

Isoniacida de referencia

Obtenida pura mediante cuatro recristalizaciones en agua destilada de la isoniácida calidad Farmacopea. Se obtienen cristales aciculares, incoloros y de tamaños variables que luego se desecan a 105 °C durante 4 horas, operación que debe repetirse cada vez que se use. Punto de fusión: 172-173 °C.

Reactivo

Acido 1,2,4-aminonaftosulfónico (BDH), purificado según la técnica indicada por Fiske y Subbarow ². Se determinó la solubilidad en agua según la técnica descrita por Jenkins *et al.* ³, que implica la preparación de una solución saturada cuya concentración resultó ser de $0,0392 \pm 0,0022$ g%. En consecuencia la solubilidad del ANS en agua a 25 °C es de 1:2537.

Soluciones

La solución de ANS se prepara agitando vigorosamente en un tubo de ensayo 10 mg de reactivo con 15 ml de agua destilada a 25 °C durante tres minutos. Esta solución debe prepararse momentos antes de su uso. Preparada en las condiciones descritas tiene una concentración de $0,03415 \pm 0,0006$ g%, es límpida y de color débilmente amarillo (1 ml contiene 341 µg de ANS). La solución de hidróxido de sodio (Merck) 0,1 N fue preparada con agua destilada recientemente obtenida.

Se prepararon dos soluciones de isoniácida:

Nº 1: en matraz volumétrico de 100 ml se disuelven 100 mg de HAI de referencia en agua destilada y se enrasa.

Nº 2: se diluyen con agua destilada en matraz volumétrico de 500 ml, 10 ml de solución Nº 1. Cada ml de esta solución contiene 20 µg de HAI.

Sensibilidad de la reacción

De acuerdo a lo propuesto por Bassenheim ⁴ y Llacer ⁵, el límite de concentración de la reacción se expresa:

$$\text{Límite de concentración (L.C.)} = \frac{\text{g de substancia}}{\text{ml de disolvente}}$$

cuya inversa es igual a:

$$1 : \frac{\text{Volumen inicial de la solución (en ml)} \times 10^6}{\text{Límite de identificación (en } \mu\text{g)}}$$

Reemplazando por los valores experimentales y efectuando las operaciones se tiene:

$$1 : \frac{0,025 \times 10^6}{0,5} = 2 \times 10^{-5}$$

Existe una forma práctica para expresar numéricamente el grado de sensibilidad de una reacción, mediante una escala semejante a los valores del pH, calculando el logaritmo negativo de la inversa del resultado, el que se ubica en la siguiente escala:

<i>Clasificación</i>	<i>Límite de concentración</i>	<i>Escala</i>
Poco sensible	> 1 : 1000	> 3,0
Sensible	1 : 1000 a 1 : 100.000	3,0 a 5,0
Muy sensible	< 1 : 100.000	< 5,0

Para nuestro caso: $-\log. 2 \times 10^{-5} = 4,7$

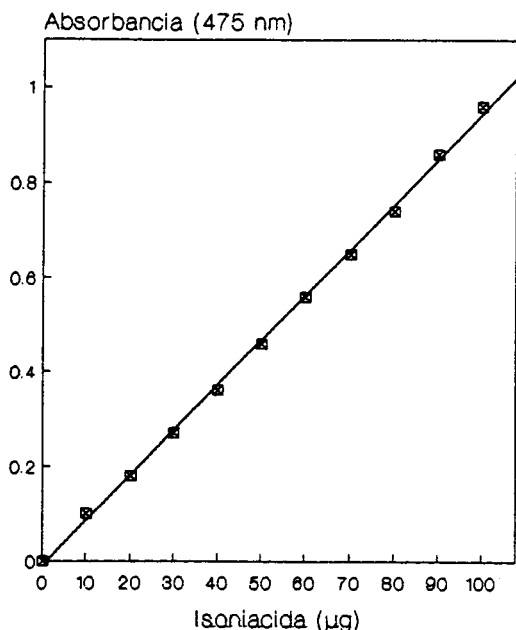
En consecuencia, la reacción de condensación de la HAI con el ANS se clasifica como "sensible".

Recta de calibración

Fue realizada con la solución tipo N° 2 de la isoniacida de referencia agregando al agua destilada el volumen correspondiente de solución N° 2, seguida de 1 ml de solución de ANS y 1 ml de solución 0,1 N de hidróxido de sodio, agitando el tubo después de cada agregado. El producto de color anaranjado, con absorbancia máxima a 475 nm, es estable durante 24 horas, conservado en lugar oscuro.

HAI (μg)	Blanco	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Sol. N° 2 (ml)	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0
Agua dest. (ml)	8,0	7,5	7,0	6,5	6,0	5,5	5,0	4,5	4,0	3,5	3,0
Sol. ANS (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
NaOH 0,1 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Absorb. (475 nm) *	—	0,10	0,18	0,27	0,36	0,46	0,56	0,65	0,74	0,86	0,96

* promedio de al menos 5 determinaciones.



La agrupación de pares de valores presenta un coeficiente de correlación (r) = 0,9993 y la ecuación de la recta es la siguiente:

$$Y = 0,01476 + 0,009596 x$$

Pendiente de la recta =
 $0,009596 \pm 0,000135$

La relación lineal y las magnitudes precedentes indican que la reacción responde a la Ley de Beer y en el ámbito de los valores considerados.

RESULTADOS

Se valoró isoniacida calidad Farmacopea y la contenida en las formas farmacéuticas cuyas fórmulas se especifican en cada caso:

Frasco-ampolla (polvo estéril): Isoniacida 0,500 g

Comprimidos: Isoniacida 0,300 g
 Excipientes c.s.

Grageas: Isoniacida 75 mg
 Rifampicina 150 mg
 Pirazinamida 400 mg
 Excipientes c.s.

Se realizaron también ensayos exploratorios sobre 1-(2-bencilcarbamoil)etil-2-(isonicotinil-hidracida) o "Nialamida", portadora del grupo isonicotinil-hidracida, habiéndose comprobado que se libera un compuesto que produce reacción positiva con los reactivos usados en este trabajo para la isoniacida.

Isoniacida calidad Farmacopea

Previa desecación de la muestra a 105 °C durante 4 horas, se prepara la solución N° 2 y se aplica la técnica descrita, usando 2 ml.

Cálculo: $HAI \text{ mg\%} = DO \times FC \times 0,001 \times 2.500.$

Frasco ampolla

Se puede realizar por dos procedimientos:

a) Se deseca el contenido de un frasco ampolla a 105 °C durante 4 horas y se pesa. Se aplica la misma técnica y cálculo adoptada para isoniacida calidad Farmacopea por tratarse de isoniacida pura.

b) Se pesa el contenido de un frasco ampolla sin desecar y se disuelve en 5 ml de agua destilada. Se mide 1 ml en un matraz volumétrico de 100 ml y se preparan las soluciones N° 1 y 2. Se continúa con la técnica descripta para isoniacida calidad Farmacopea. Se calcula el contenido por unidad y el porcentaje con respecto a la cantidad rotulada.

Comprimidos

a) Pesar 20 comprimidos, calcular el peso promedio de una unidad y pulverizarlos a gran tenuidad. Transferir una cantidad exactamente pesada del polvo equivalente a 100 mg de isoniacida de acuerdo a la cantidad rotulada a un matraz volumétrico de 100 ml, disolver y completar a volumen. Filtrar, descartando las primeras porciones. Si la solución no fuera límpida, centrifugar una porción a 3000 rpm durante 10 minutos. Con esa solución se prepara la disolución N° 2 y se continúa con la técnica indicada en isoniacida calidad Farmacopea.

b) Se puede valorar también la isoniacida de una unidad individualmente siguiendo el procedimiento anterior. En ambos casos se realizan los cálculos indicados en el caso b) de frasco ampolla.

Grageas . Isoniazida asociada a Rifampicina y Pirazinamida

a) Se pesan 10 grageas y se calcula el peso promedio de una gragea. Se pulverizan y pesa exactamente una cantidad de polvo equivalente a 100 mg de isoniazida que se transfiere cuantitativamente a una ampolla de decantación donde se trata con 20 ml de ácido clorhídrico 0,1 N, se agita vigorosamente y luego extrae la materia coloreada con 5 porciones de 15 ml cada una de cloroformo mediante enérgicas agitaciones sucesivas, evitando descargar con el cloroformo la fase emulsionada. Se descartan los extractivos clorofórmicos y se transvasa cuantitativamente la fase acuosa y emulsionada a un matraz volumétrico de 100 ml usando 30 ml de agua destilada. Se agregan 20 ml de hidróxido de sodio 0,1 N llevando la solución a pH débilmente alcalino, se completa a volumen, se homogeneiza y una porción de la solución turbia se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos. Con 5 ml de la solución límpida se prepara la solución N° 2 y se continúa como en el caso a) de comprimidos en cuanto a técnica y cálculos.

b) Se puede valorar la isoniacida en una unidad farmacéutica por el procedimiento anterior.

Los resultados obtenidos se exhiben en las siguientes tablas.

Valoración de HAI sobre droga pura

HAI	%	Desviación standard	Límite de Tolerancia FA
Calidad Farmacopea	99,22 a)	0,6905	No menos de 98%
Frasco Ampolla	99,27 b)	0,6809	—

a) Promedio de 6 determinaciones. b) Promedio de 3 determinaciones.

Valoración de HAI en formas farmacéuticas

<i>Forma</i>	<i>Procedimiento</i>	<i>Peso de la unidad (mg)</i>	<i>HAI dosada por unidad (mg)</i>	<i>%</i>	<i>Peso rotulado (mg)</i>	<i>% sobre peso rotulado</i>	<i>Tolerancia USP XXII %</i>
Frasco	a	481,4	477,4	99,17	500	95,5	No menos de 90 No más de 110
ampolla	b	498,2	494,8	99,32	500	98,9	Idem
Comprimidos	a	374,6	292,6	—	300	97,5	Idem
	b	374,2	289,4	—	300	96,4	Idem
Grageas	a	980,7	71,9	—	75	95,9	Idem
	b	953,3	73,4	—	75	97,9	Idem

Recuperación de HAI en grageas

<i>Una unidad mg</i>		<i>mg</i>			<i>%</i>
<i>Rotulada</i>	<i>Valorada</i>	<i>Agregados</i>	<i>Valorados</i>	<i>Recuperados</i>	<i>Recuperado</i>
75,0	71,8 c) \pm 1,56	25,0	96,2 c) \pm 2,22	24,4 c) \pm 1,56	97,6

c) Promedio de 4 determinaciones

DISCUSION

La reacción propuesta es selectiva para las hidracidas aromáticas y su mecanismo implica la condensación de la molécula completa de la HAI con el reactivo de color ¹. Excluyendo las hidracidas aromáticas, no se han detectado sustancias interferentes en las preparaciones farmacéuticas.

Son pocas las reacciones calificadas por sus respectivos autores como específicas para la HAI, entre las que se encuentran las que usan como reactivos desencadenantes de color al 2,4-dinitroclorobenceno y al catecol. No son reacciones estrictamente específicas. La reacción verdaderamente específica parece ser la propuesta por Hashmi *et al.*⁶, que usa como reactivo al cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio y sulfato de talio, según el mecanismo de la reacción interpretada por el autor.

La sensibilidad y estabilidad de la reacción propuesta en el presente trabajo es equiparable a las más sensibles y estables de otros autores.

Muchos reactivos empleados en la valoración de la HAI son inestables y deben ser renovados semanal o mensualmente. El ANS es inestable en solución, no así al estado sólido; no es un reactivo especial integrando el stock de los laborato-

rios de análisis. En el método que proponemos se debe preparar extemporáneamente la solución de ANS, pero dicha preparación es sencilla e implica el uso de muy pequeña cantidad de reactivo por vez. El método obedece la Ley de Beer, es suficientemente exacto, sencillo, sensible, rápido, de fácil ejecución y la muestra de referencia y los reactivos de fácil conservación.

Los porcentajes de recuperación son satisfactorios y su correspondencia con los límites de tolerancia lo hacen comparable con los métodos oficiales.

CONCLUSIONES

1. El método propuesto puede reemplazar con ventajas al método codificado por la *Farmacopea Argentina*, VI Ed., 1978, para la isoniacida.
2. Puede aplicarse sin inconvenientes a la valoración de formas farmacéuticas como inyectables, comprimidos y grageas.
3. Puede aplicarse también a la valoración de mezclas con coadyuvantes, previa separación de éstos, con rendimientos encuadrados en los límites de tolerancia por los Códigos Oficiales.
4. Es factible la valoración de otros fármacos que por hidrólisis u otros procesos de transformación produzcan hidracidas aromáticas.

Agradecimiento. Agradezco a Laboratorios Lepetit S.A. que suministró la droga y algunas formas farmacéuticas de la misma usadas en estas experiencias.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Gómez, S.A. (1958) *Arch. Bioq., Quím. y Farm. Tuc.*, 8, N° 1: 69-95
2. Fiske, C.H. e Y. Subbarow (1925) *J. Biol. Chem.* **66**: 375-400
3. Jenkins, G.L., A.M. Knevel y F. Digangi (1967) "*Quantitative Pharmaceutical Chemistry*", 6a. Ed., pág. 492. Mc Graw-Hill Book Company, New York
4. Bassenheim, N.W.V. (1954) *Ciencia e Invest.* **10**: 247-53
5. Llacer, A.J. (1952) *An. Dir. Nac. Quím.* 5, N° 9: 21-6
6. Hashmi, M.H., A. Rashid y F. Azam (1965) *Microchim. Acta*, **3**: 513-7