

G. N. E. A. Biblioteca	
ARCHIVO PUBLICACIONES	
NO. 1	AÑO 1977

## UN METODO COLORIMETRICO RAPIDO Y SENCILLO DE VALORACION DE ISONIACIDA

Por PEDRO J. MORANDO y MIGUEL A. BLESA

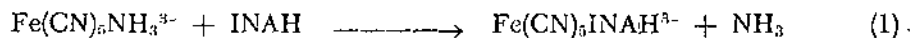
*Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, Buenos Aires.*

### SUMMARY

A colorimetric method of isoniazid determination, based in the formation of  $\text{Fe}(\text{CN})_5$  (isoniazid) $^{3-}$  in water is described. The complex anion shows an intense absorption centered at 437 nm,  $\epsilon = 3.460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  in the range of concentration studied ( $2 \times 10^{-5}$  to  $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ), which follows closely Lambert-Beer's law. The method is fast and sensitive, and inespecific reductants do not interfere, although in the presence of commonly used excipients the results are 5 % too high. Typical procedure and comparison with official method are presented.

La isoniácida (isonicotinóil hidrácida, INAH) es una droga de difundido uso por sus notables propiedades bacteriostáticas frente al *M. tuberculosis*.

El método oficial de valoración de isoniácida se basa en la iodometría en medio bicarbonato de sodio<sup>1</sup>. El procedimiento requiere bastante tiempo (dado que la oxidación del grupo  $-\text{NH}-\text{NH}_2$  es lenta) y la presencia de otros reductores interfiere. Se han desarrollado varios otros métodos ya sea basados en la oxidación de la hidrazida con diversos oxidantes<sup>2</sup>, como diversos métodos colorimétricos<sup>3,4</sup>. La búsqueda de nuevos métodos sigue siendo de interés, dado que cada método particular presenta ventajas y desventajas en rapidez, sencillez, exactitud, interferencia por reductores, interferencia por excipientes, reproducibilidad, sensibilidad, etc. El método que nosotros proponemos se basa en la formación de un complejo fuertemente coloreado por reacción entre la isoniácida y  $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}^5$ , según la reacción (1).



En comparación con otros métodos<sup>1-4</sup>, el presente reúne las ventajas de ser rápido, usar drogas fácilmente accesibles y bastante estables, ser altamente sensible y no presentar interferencias por reductores inespecíficos.

#### PARTE EXPERIMENTAL

*Isoniacida:* Fue donada gentilmente por el Prof. Dr. S. LAMDAN, de Laboratorios Gerardo Ramón, y por el Bioquímico R. ALTSCHUL, de Lepetit S.A. Fue cristalizada dos veces desde etanol 96 % y secada al vacío durante 24 horas.

$\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ : Fue preparado según técnica de la literatura,<sup>6</sup> disolviendo lentamente y con agitación 3 g de nitroprusiato de sodio dihidrato en 12 ml de amoníaco concentrado, que contenía 1g de acetato de sodio trihidrato. Se dejó en heladera hasta el día siguiente, se decantó y se filtró, lavándose el precipitado amarillo con etanol y éter y secándolo bajo  $\text{CaCl}_2$  durante 48 hs. Si las aguas madres son oscuras se puede mejorar el rendimiento precipitando con etanol, previo agregado de un exceso de acetato de sodio (aprox. 0,5 g) y repitiendo la separación anterior.

El sólido es estable por lo menos durante un mes en heladera; su descomposición va acompañada de cambio de color del amarillo al amarillo verdoso.

*Otros reactivos:* Se usaron en todos los casos drogas p.a. de la mejor calidad disponible. Se empleó agua destilada.

*Instrumental:* Se empleó un espectrofotómetro Hitachi-Perkin Elmer 139 con celdas rectangulares de vidrio Pyrex de 1 cm y de 10 cm de camino óptico.

*Construcción de la curva de calibración:* Se pesan 13,7 mg de isoniácida recristalizada y se disuelven en solución de bicarbonato de sodio a  $\text{pH} = 8$  llevándose a volumen con un matraz aforado de 100 ml de manera de obtener una solución  $10^{-3}\text{M}$  de isoniácida (solución A). Una dilución 1:10 de ésta permite obtener la solución stock B ( $10^{-4}\text{M}$ ).

Se prepara la solución C pesando 130,4 mg de  $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  y disolviendo en solución de bicarbonato de sodio a  $\text{pH} = 8$  hasta un volumen de 200 ml.

La solución D es  $\text{NaCO}_3\text{H}$  0,1 N llevado a  $\text{pH} = 8$  con HCl.

A partir de las soluciones A, B, C y D se preparan nueve patrones según se detalla en la Tabla 1. Se lee la absorbancia a 437 nm usando como blanco la solución N° 9, y se construye un gráfico de absorbancia en función de concentración.

*Procedimiento recomendado:* Pesar exactamente una cantidad de muestra que contenga alrededor de 15 mg de isoniácida y llevar a 100 ml con solución de  $\text{NaCO}_3\text{H}$  a  $\text{pH} = 8$ . Se toman 5 ml de la solución anterior y se le agregan 15 ml de solución de  $\text{NaCO}_3\text{H}$  a  $\text{pH} = 8$  y 20 ml de solución  $2 \times 10^{-3}\text{M}$  de  $\text{Na}_3\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3$ .

Si el tenor de INAH es bajo y resulta adecuado pesar cantidades de muestra que contengan alrededor de 2 mg de isoniácida, se puede llevar directamente a volumen en matraz de 100 ml con 50 ml de solución de  $\text{Na}_3\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3$   $2 \times 10^{-3}\text{M}$  y cantidad suficiente de solución de  $\text{NaCO}_3\text{H}$  a  $\text{pH} = 8$ .

Medir la absorbancia a 437 nm usando como blanco una solución preparada con 20 ml de solución de  $\text{NaCO}_3\text{H}$  a  $\text{pH} = 8$  y 20 ml de solución de  $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3]$   $2 \times 10^{-3}\text{M}$ .

El tenor de isoniácida en la muestra se calcula mediante la fórmula:

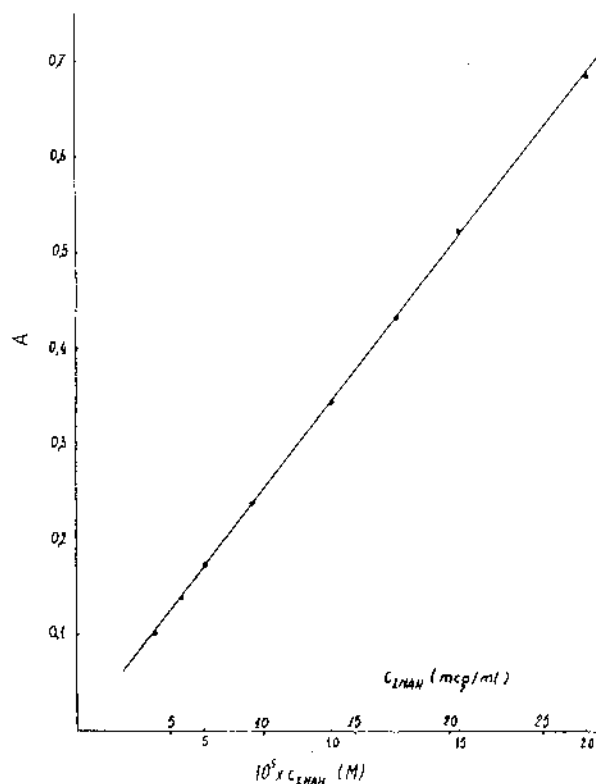
$$\% \text{ isoniácida} \approx 109,72 (C/W)$$

donde C es la concentración molar de la curva y W la masa de muestra en gramos.

## RESULTADOS Y DISCUSION

El complejo formado, de color anaranjado, presenta una intensa banda de absorción centrada en 437 nm.

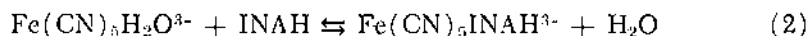
En el rango de concentración de 2 a 20 x 10<sup>-5</sup> M obedece estrictamente la ley de Lambert-Beer tal como se muestra en la Fig. 1, con una absorptividad molar  $\epsilon = 3460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . De esta forma, una concentración de isoniácida de 3,96 mcg/ml cuando forma el complejo, produce una absorbancia de 0,100 en celdas de 1 cm de camino óptico.



La forma y la intensidad de la banda de absorción no se altera dentro del rango  $4 < \text{pH} < 9,5$ . Sin embargo, conviene realizar la determinación en medio de  $\text{NaCO}_3\text{H}$  a  $\text{pH} = 8$  a fin de evitar posibles oxidaciones por el aire de pequeñas cantidades de isoniácida y de minimizar la oxidación del Fe (II). Esta última oxidación puede tener lugar en pequeñas cantidades, pero no interfiere a menos que sea muy extensa y vaya acompañada de la aparición de colores espúreos.

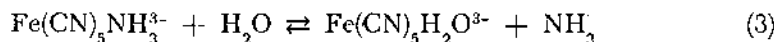
La transición electrónica responsable de la coloración es una transferencia de carga desde el hierro (II) hacia la isoniácida, ( $t_{2g} \rightarrow \pi^*$ )<sup>6</sup> y dicha banda se altera únicamente por desprotonación de la isoniácida ( $pK_a = 10,4$ )<sup>7</sup> o por protonación del cianuro ( $pK_a \approx 3$ )<sup>7</sup>, sufriendo en ambos casos corrimientos hipsocrómicos. En medio alcalino fuerte el máximo está en 392 nm y en medio fuertemente ácido en 412 nm, las intensidades son también distintas<sup>7</sup>.

La constante de estabilidad del complejo formado (ver ecuación [2]) es  $K_e = 4,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1.5}$



por lo que es necesario asegurar un gran exceso de  $\text{Fe}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}^{3-}$  en la solución.

Este ión es generado a partir del complejo amoniacal según la ecuación (3).



en cantidad adecuada para desplazar la reacción (2) completamente hacia la derecha cuando se disuelvan  $10^{-5}$  moles por litro de  $\text{Na}_3[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NH}_3] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ . La constante de equilibrio de la reacción (3) es aproximadamente igual a  $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ .

TABLA I

*Soluciones patrón para la recta de calibración*

Patrón N°	Volumen de A/ml	Volumen de B/ml	Volumen de D/ml	Volumen de C/ml	Concentración de INAH en la mezcla/M
1	—	12	8	20	$3 \times 10^{-5}$
2	—	16	4	20	$4 \times 10^{-5}$
3	2	—	18	20	$5 \times 10^{-5}$
4	3	—	17	20	$7,5 \times 10^{-5}$
5	4	—	16	20	$10 \times 10^{-5}$
6	5	—	15	20	$12,5 \times 10^{-5}$
7	6	—	14	20	$15 \times 10^{-5}$
8	8	—	12	20	$20 \times 10^{-5}$
9	—	—	20	20	—

La coordinación entre hierro e isoniácida tiene lugar a través del nitrógeno piridínico<sup>8</sup> y una reacción similar tiene lugar con otros derivados de la piridina, que dan lugar también a productos coloreados, aunque el máximo de absorción se encuentra desplazado. Así, por ejemplo, el máximo de absorción del complejo del isonicotinato.

TABLA 3

*Reproducibilidad del método colorimétrico*

Ensayo N°	Cantidad de INAH (por pesada)/mg	Cantidad recu- perada/mg
1a	13,0	13,0
1b	13,0	12,8
1c	13,0	13,0
1d	13,0	13,1
2a	15,0	14,9
2b	15,0	15,2
2c	15,0	14,9
2d	15,0	15,1
3a	18,0	18,0
3b	18,0	17,5
3c	18,0	18,2
3d	18,0	17,9

en presencia de polímeros cargados<sup>11</sup>. Esto limita la aplicabilidad del método que sin embargo por su facilidad puede ser de utilidad en la valoración de la droga, especialmente en casos donde pueda sospecharse de adulteración con reductores, donde el método oficial falla.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 *US Pharmacopoeia*, 18th Revision, Mack Pub. Co, Easton 1970, p. 349; *Farmacopea Argentina*, 5ª edición, 1966, pág. 475.
- 2 Véase p. ej. E. Kuhni, N. Jacob y H. Grossglauser, *Pharm. Acta Helv.*, 29, 233 (1954).
- 3 Véase p. ej. H. Erlenmeyer y S. Fallab, *Experientia*, 8, 298 (1952).
- 4 H. S. I. Tan, *J. Pharm. Sci.*, 62, 993 (1973).
- 5 M. A. Blesa, I. A. Funai, P. J. Morando, J. A. Olabe, P. J. Aymonino y G. Ellenrieder, *J. Chem. Soc. (Dalton)*, 845 (1977).
- 6 J. B. Gallini, J. D. Kenney y T. P. Flynn, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 20, 75 (1961).
- 7 I. Funai, M. A. Blesa, J. A. Olabe, *XII Congreso Latinoamericano de Química*, Quito, Ecuador, 1976.
- 8 M. A. Blesa, J. A. Olabe y P. J. Aymonino, *J. Chem. Soc. (Dalton)*, 1196 (1976).
- 9 "Heterocyclic compounds", Vol. XIV, Ed. E. Klingsberg, Interscience, New York, 1960, pág. 75.
- 10 M. C. Geldstein y M. A. Blesa, *J. inorg. nucl. Chem.*, 39, 1641 (1977).
- 11 M. A. Blesa y J. A. Olabe, en preparación.

Recibido: Noviembre 1976.