

086447

UES BIBLIOTECA CENTRAL



INVENTARIO: 10120486

T  
547.73  
M189e  
1976  
F.C.C.QQ

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Facultad de Química y Farmacia

“ESTUDIO DE METODOS DE ANALISIS PARA  
LA DETERMINACION CUANTITATIVA  
DE ESTEROIDES”

TESIS PRESENTADA POR

ANA JULIA MAGAÑA DE IBARRA

PREVIA A LA OPCION DEL TITULO DE

Licenciada en Química y Farmacia



JUNIO DE 1976

---

SAN SALVADOR,

EL SALVADOR,

CENTRO AMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

Dr. Carlos Alfaro Castillo

SECRETARIO GENERAL

Dr. Manuel Atilio Hasbún

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

Dr. Amílcar Avendaño y Ortiz

SECRETARIA

Dra. María Gladis de Mena Guerrero

JURADO DE TESIS

Dra. Silvia Ruth Martínez

Dra. Bertha Alicia P. de Bellegarrige

Dra. Elizabeth Banegas de Salazar

## A G R A D E C I M I E N T O

Mis sinceros agradecimientos a la Dra. Elizabeth Banegas de Salazar por la dirección y atención prestada en el desarrollo del presente trabajo.

DEDICATORIA

A LA MEMORIA DE MI PADRE

A MI MADRE

A MI ESOSO

A MIS HIJOS

A MIS HERMANOS, PROFESORES,  
COMPAÑEROS Y AMIGOS,

## I N D I C E

	Página
I.- Introducción . . . . .	I
Objetivo . . . . .	1
Generalidades . . . . .	3
II.- Parte Experimental . . . . .	11
Equipo . . . . .	12
1.- Métodos Aplicados para la determinación de Acetato de Hidrocortisona en Suspensión Acuosa Estéril . . . . .	13
2.- Métodos aplicados para la determinación de Progesterona en Solución Oleosa Inyectable . .	19
3.- Métodos aplicados para la determinación de Testosterona en Solución Oleosa Inyectable . .	23
III.- Resultados . . . . .	26
IV.- Discusión . . . . .	33
V.- Conclusiones . . . . .	37
VI.- Bibliografía . . . . .	39
VII.- Apéndice . . . . .	41

INTRODUCCION

## OBJETIVO

En el desarrollo del presente trabajo, se persigue encontrar un método cuantitativo de análisis para los siguientes Esteroides: Acetato de Hidrocortisona, Progesterona y Testosterona en diferentes formas farmacéuticas; que reuniendo los requisitos de economía, simplicidad y eficiencia, le puede facilitar a la Industria Farmacéutica Nacional, el llevar a cabo un eficiente control de calidad que garantice la efectividad de dichos productos.

Debido al uso clínico que presentan los Esteroides, por su amplia y efectiva actividad terapéutica y a la avanzada Tecnología Farmacéutica, ha permitido que estos compuestos se presenten en diversas formas farmacéuticas: Ungüentos, cremas, lociones, inyectables, suspensiones, tabletas, pomadas, etc.

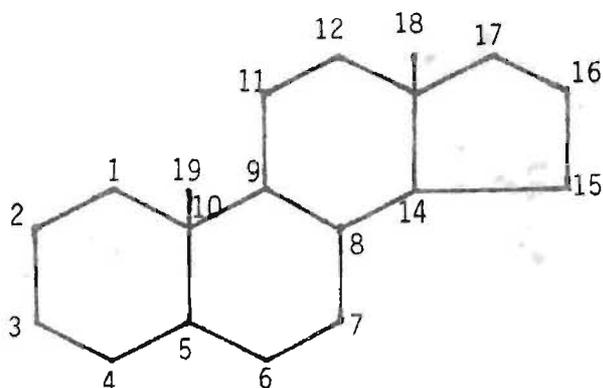
En El Salvador, la Industria Farmacéutica Nacional elabora estos productos en algunas de esas formas farmacéuticas, por ello se consideró la importancia de elaborar un trabajo para poder efectuar el análisis de esos productos, tomando en cuenta las condiciones de los laboratorios de Control de Calidad, que operan en la Industria Farmacéutica Nacional, elaboradora de Especialidades Esteroidales.

Se estudian cuatro métodos de análisis diferentes para el Acetato de Hidrocortisona y tres métodos de análisis, para la solución Oleosa Inyectable de Progesterona y Solución Oleosa Inyectable de Testosterona, efectuándoles a los resultados un tratamiento estadístico. En base a ello,

se obtienen conclusiones de cual de los métodos estudiados, es el recomen  
dado para aplicarse en los Laboratorios del país, en el correspondiente  
control de su producto elaborado.

### GENERALIDADES SOBRE LOS ESTEROIDES

El grupo característico de los Esteroides es el núcleo CICLOPENTANPERHIDROFENANTRENO; pudiendo tener además uno o más grupos funcionales en las moléculas



Las hormonas secretadas por la corteza suprarrenal de las glándulas suprarrenales son Esteroides, los cuales por su acción biológica y su estructura química se clasifican en cuatro grupos principales que son:

- 1- ESTROGENOS: ..... Poseen 18 átomos de Carbono
- 2- ANDROGENOS: ..... Poseen 19 átomos de Carbono
- 3- PROGESTERONA: ..... Poseen 21 átomos de Carbono
- 4- CORTICOSTEROIDES: ..... Poseen 21 átomos de Carbonos y son las hormonas corticosuprarrenales características (1)

#### METODOS GENERALES EN ANALISIS DE ESTEROIDES.-

Los métodos de análisis de Esteroides pueden agruparse en dos grupos.

- A- Procedimientos Biológicos: son los que se basan en la medida de las acciones biológicas observables en animales suprarrenalectomizados (2)

---

(1) Harper Harold A. Manual de Química Fisiológica. 3a. Ed., 1971.

(2) Cantarrow Abraham-Schepartz Bernard "Bioquímica". 4a. Ed., 1969.

B- Procedimientos Físico-Químicos: éstos se basan en las reacciones propias del grupo funcional característico que posean y pueden ser:

#### I.- REACCIONES DEL GRUPO $\alpha$ -CETOL

Entre las reacciones características del Grupo  $\alpha$  -Cetólico se encuentran las siguientes:

##### DETERMINACIONES ESPECTROFOTOMETRICAS:

- a) Reacción con las sales de Tetrazolium: a la correspondiente sal de Formazán con la producción de diferentes cromógenos que absorben a distintas longitudes de onda, según sea la sal de Tetrazolium empleada (3) (4)
- b) Reducción de Acido Fosfomolibdico: por un grupo  $\alpha$  -Cetólico Primario y Secundario; no así por Terciario o por un agrupamiento  $\alpha, \beta$  - insaturado del grupo esteroidal.
- c) Producción de Formaldehido: estos esteroides reaccionan con el ácido Peryódico, ocurriendo un desprendimiento de Formaldehído el cual puede ser estimado cuantitativamente, por el desarrollo de un cromógeno de absorbancia máxima a 660  $m\mu$ .  
Recientemente se ha empleado como oxidante específico en vez de Acido Peryódico, Bismutato de Sodio, el cual produce una reacción idéntica que el primero y ofrece mayores ventajas.
- d) Reducción de Cobre: la reducción del reactivo de Arsenomolibdato de cobre por este tipo de esteroides puede medirse espectrofotométricamente a 660  $m\mu$

(3) Higuchi T., and Brochmann-Hansen E. "Pharmaceutical Analysis" New York, Interscience Publishers, 1961.

(4) The Pharmacopeia of the United States of America, U.S.P. XVIII, 1970.

Además de las determinaciones espectrofotométricas basadas en reacciones coloreadas de los esteroides  $\alpha$ -cetólicos, éstos pueden ser también determinados directamente en soluciones alcohólicas en un espectrofotómetro adecuado a una longitud de onda característica.

## II.- REACCIONES DEL GRUPO 17, 21 DIHIDROXI-20-CETO

- a) Reacciones Colorimétricas: Reacción con Fenilhidracina en Acido Sulfúrico diluido. La reacción de los esteroides pertenecientes a este grupo con la Fenilhidracina no es característica únicamente para estos esteroides; sino que también pueden darla los que tienen la función 3  $\alpha$ -ceto. Esta reacción produce un cromógeno amarillo cuyo máximo se presenta a 410 m $\mu$ ; en gran parte la coloración se debe a una deshidratación del grupo hidroxilo terciario.
- b) También pueden ser aplicados a este tipo de esteroides las reacciones del Acido Fosfomolibdico, Arsenomolibdato de cobre y la Producción de Formaldehido; teniendo en cuenta de llevar a cabo el método en la misma condición que para los  $\alpha$ -Cetólicos y empleando el standard adecuado (5)
- c) Los 17 - Cetoesteroides pueden ser determinados por la Reacción de Zimmermann, bajo ciertas condiciones de temperaturas según fue comprobado en el Departamento de Biología de la Universidad Nacional del Sur de Argentina por Selles J. y García J.R.A.R. y usando como intermediario una sal de Amonio cuaternaria llamada Comercialmente Hyamine\* (6)

(5) Higuchi T., and Brochmann-Hansen E. "Pharmaceutical Analysis" New York, Interscience Publisher, 1961.

(6) García J.R.A.R. y Selles J., Revista de la Asociación Bioquímica Argentina, Enero-marzo 1975.

\* Sal cuaternaria de Amonio: Cloruro de di-isobutil-fenoxietil-Dimetilbencil amonio.

### III.- REACCIONES CARACTERISTICAS DE LOS ESTEROIDES DEL GRUPO CON INSATURACIONES EN EL ANILLO

Los métodos que presentan mayor sensibilidad en la determinación de los esteroides de este grupo son los basados en determinaciones espectrofotométricas; ya que la presencia del doble enlace produce un cromóforo coloreado que tiene máxima absorción a una longitud de onda determinada para cada esteroide (7)

### IV.- OTROS METODOS

Además de los métodos mencionados anteriormente que son específicos; pueden efectuarse otros métodos cuantitativos que son más generales y éstos pueden ser:

- a) Métodos Espectrofotométricos: Que se basan en la producción de compuestos coloreados de una máxima absorción a una longitud de onda determinada como sucede al reaccionar los esteroides estudiados en este trabajo con solución de Isoniacida (Hidracida del ácido nicotínico) dando un cromógeno a 380 m $\mu$  (8) (9) (10)
- b) Métodos al Espectro Infrarrojo: Los esteroides adrenocorticales y sus ésteres son solubles en Sulfuro de Carbono basándose en esta

---

(7) Higuchi T., and Brochmann-Hansen E. "Pharmaceutical Analysis" New York, Interscience Publishers, 1961.

(8) Higuchi T., and Brochmann-Hansen E. "Pharmaceutical Analysis" New York, Interscience Publishers, 1961.

(9) A.O.A.C., 12a. Edición, 1975

(10) British Pharmacopeia, 1973

propiedad es que las deteminaciones de este tipo se hacen en soluciones de Esteroides en Sulfuro de Carbono o también en solventes como Cloroformo, Metanol; luego de haber sido extraído el esteroide convenientemente de la preparación farmacéutica (11) (12)

- c) Métodos Gravimétricos: Estos métodos se basan en la formación de ciertos compuestos al reaccionar los esteroides con ciertas sustancias, como el caso de la Progesterona que al reaccionar con la 2, 4 dinitrofenilhidracina forma la hidrazona correspondiente que puede ser valorada de esta manera.

También tratándose de la Testosterona puede valorarse gravimétricamente la semicarbazona formada al reaccionar con el Clorhidrato de Semicarbacida. Pueden llevarse a cabo valoraciones gravimétricas del principio activo; luego de ser extraído convenientemente de la Preparación Farmacéutica que se investiga por medio de solventes adecuados (13) (14)

- d) Método Titrimétrico: También puede llevarse a cabo la determinación cuantitativa de los esteroides por medio de valoraciones Titrimétricas, las cuales se llevan a cabo generalmente por Técnicas Difásicas de Valoración. Estas se basan en valorar los compuestos

---

(11) Kunze M. Frieda and Carol, of Pharmac. Science, 51 (7), 1962

(12) Higuchi T., and Brochmann-Hansen E. "Pharmaceutical Analysis  
New York, Interscience Publishers, 1961.

(13) The Pharmacopeia of the United States of America, U.S.P. XVIII

(14) Higuchi T., and Brochmann-Hansen E, "Pharmaceutical Analysis",  
New York, Interscience Publishers, 1961.

formados después de reaccionar los esteroides con una sustancia determinada; como en el caso de la Progesterona y Testosterona que pueden ser valoradas a través de las Oximas, Hidrazonas y Semicarbazonas, formadas por ellos, las que se valoran con solución 0.01N de ácido Perclórico, usando como indicadores Rojos de Quinaldina, Negro Eriocromo T, Azul de Oracetz mezclado con amarillo de Dimetilo (15)

#### MEZCLA DE ESTEROIDES:

Muchas veces los esteroides se encuentran mezclados, ya sea con otros esteroides o con otras sustancias; lo que puede constituir una interferencia en la cuantificación individual de ellos.

Debido a esto en los últimos años se han estudiado métodos adecuados de separación, y así poder llevar a cabo una fácil y exacta cuantificación del esteroide individual.

Los métodos que mejores resultados han proporcionado para este fin han sido los diferentes tipos de cromatografía ya sea:

- a) Cromatografía de Partición: Entre los métodos más usados para la separación de mezclas esteroidales está la cromatografía por columna para las preparaciones farmacéuticas. Se emplean columnas de Acido Silícico con un gradiente de elución adecuada.
- b) Cromatografía de Capa Fina: Los esteroides pueden cromatografiarse sobre capas de sílica-gel y óxido de aluminio.

---

(15) Journal of Pharmaceutical Sciences of the United Arab Republic, Vol. IX, 1968.

Este tipo de cromatografía ha sido muy usado debido a la poca solubilidad de los esteroides en agua, el poco tiempo que se necesita para llevarla a cabo y además que por medio de ella pueden analizarse mezclas muy complejas usando procedimientos bidimensionales. Generalmente se usa como solvente desarrollador una mezcla de solventes. Entre las sustancias usadas como reveladores para los diferentes esteroides se encuentran:

- 1.- Tricloruro de Antimonio
- 2.- Pentacloruro de Antimonio
- 3.- Acido Fosfórico
- 4.- Acido Anísico-Acido Sulfúrico
- 5.- Vainillina-Acido Fosfórico o Vainillina-Acido Sulfúrico
- 6.- Acido Perclórico
- 7.- Morina
- 8.- Cloruro de 2, 3, 5 Trifeniltetrazolium
- 9.- Acido Sulfúrico concentrado o Acido Sulfúrico concentrado-Metanol
- 10.- Acido Fosfomolibdico
- 11.- Reacción de Zimmermann para 3 y 17 Cetoesteroides

La progesterona se presenta muchas veces asociada con el Benzoato de Estradiol para ser aplicado en solución oleosa inyectable y esta mezcla puede ser separada por Cromatografía de Capa Fina obteniéndose muy buenos resultados. Se usa como revelador solución de Tricloruro de Antimo-

nio (16) (17) (18)

c) Cromatografía Gas-Líquido

Si se necesita especificidad y sensibilidad en el método que va a desarrollarse, es mejor efectuar una Cromatografía Gas-Líquido ya que son pocos los sistemas de análisis que tienen el mismo poder de separación y sensibilidad que goza este método

Con los avances obtenidos en la actualidad sobre este sistema se ha desarrollado la Cromatografía Gas-Líquido de alta Resolución; la que ya trae adaptados sistemas computadores que reducen al mínimo la duración del análisis y además de una vez dan los cálculos matemáticos necesarios; lo que aumenta grandemente el poder sensitivo del análisis.

(19) (20) (21)

- 
- (16) Erich Heftmann "Modern Methods of Steroid Analysis", Academic Press New York and London, 1973.
- (17) Randerath, K. "Cromatografía de Capa Fina" 2a. Ed., Bilbao, Ediciones URMO.
- (18) Sthal, E. "Thin-Layer Chromatography"., A. Laboratory Handbook, 2nd Ed. Springer-Verlag, Berlín Heidelberg, New York, 1969.
- (19) The Pharmacopeia of the United States of America, U.S.P. XIX, 1975.
- (20) Erich Heftmann "Modern Methods of Steroid Analysis", Academic Press New York and London, 1973.
- (21) Rutten G.A.F.M. and Luyten J. A. of Journal of Chromatography, Vol. 74, N° 2, Dic. 20, 1972.

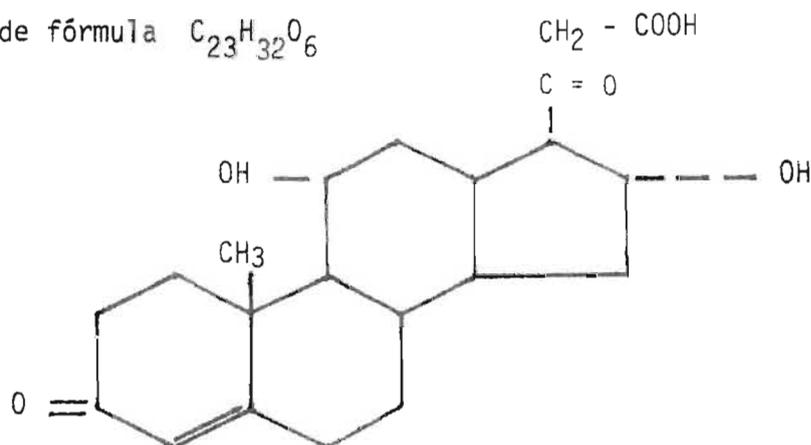
PARTE EXPERIMENTAL

E Q U I P O

- Espectrofotómetro Perkin Elmer 124 UV-Visible, doble haz
- Balanza analítica Mettler B-5
- Estufa Thelco, Modelo 16
- Estufa de Vacío Thelco, Modelo 19
- Equipo cromatográfico Desaga
- Centrífuga IEC, Modelo CL
- Cristalería en general

ACETATO DE HIDROCORTIZONA

El acetato de hidrocortisona ó 17-Hidroxicorticosterona, llamado también Pabracort de fórmula  $C_{23}H_{32}O_6$



Es usado como anti-inflamatorio en forma tópica local y puede presentarse en las siguientes formas farmacéuticas:

- 1.- Ungüento Tópico
- 2.- Suspensión Acuosa Estéril para uso tópico y en forma de inyectables
- 3.- Unguento Oftálmico
- 4.- Unguento Intra-articular

En el presente trabajo se estudia la Suspensión Acuosa Estéril de Acetato de Hidrocortisona y se llevan a cabo las siguientes valoraciones:

I.- METODO COLORIMETRICO CON SOLUCION DE TRIFENILTETRAZOLIUM,  
PREVIA SEPARACION POR CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Preparar una solución de Acetato de Hidrocortisona Referencia standard, a una concentración de 2 mg/ml; a partir de standard previamente secado por 3 horas a 105°C; disuelto en iguales volúmenes de Cloroformo y Alcol.

- 2.- Evaporar 25 ml. de la muestra a sequedad en un baño de vapor y disolver el residuo en 1 ml. de Cloroformo.
- 3.- Sobre una placa cromatográfica de sílica-gel GF<sub>254</sub> de 20 x 20 cm. previamente activada a 105°C por una hora. Aplicar 0.2 ml. (200µl) de cada una de las preparaciones standard y muestra.
- 4.- Introducir la placa en una cámara que se ha saturado previamente en un tiempo de 30 minutos, usando como solvente desarrollador una mezcla de Cloroformo y acetona 4 : 1.
- 5.- Localizar las bandas correspondientes a la Preparación Standard, muestra por medio de una lámpara de luz U.V. de onda corta (254 mµ) y enmarcarlas por medio del punzón. Tomar una cantidad de Sílica equivalente a la cantidad de muestra que servirá como blanco.
- 6.- Remover la Sílica-Gel, correspondiente al Standard, Blanco y Ensayo, de las placas y transferirlas cuantitativamente a un tubo de centrífuga.
- 7.- Agregar a cada uno de los tubos 25.0 ml. de alcohol y mezclar fuertemente por no menos de 2 minutos y centrifugar luego por 5 minutos.
- 8.- Pipetear 20.0 ml. de líquido sobrenadante de cada tubo a un erlenmeyer provisto de tapón y agregarle 2.0 ml. de solución de Cloruro de 2, 3, 5 Trifeniltetrazolium en metanol y mezclar.
- 9.- Agregar luego a cada frasco 2.0 ml. de una mezcla de un volumen de Hidróxido de Tetrametilamonio T.S. y nueve volúmenes de metanol y mezclar.
- 10.- Dejar en reposo en la obscuridad por 90 minutos y determinar las absorbancias de la Preparación Standard y Muestra a 490 mµ en un Espectrofotómetro adecuado y usando el Blanco para calibrar el aparato.

Cálculos:

$$5 \left( \frac{C}{V} \right) \left( \frac{A_m}{A_s} \right) = \text{mg. de muestra por ml.}$$

Donde:

V = Volumen de Suspensión tomada

A<sub>m</sub> = Absorbancia de la muestra

A<sub>s</sub> = Absorbancia del Standard

5 = Factor de dilución

C = Concentración del standard

Factor de Dilución

El Factor de Dilución resulta de multiplicar los volúmenes de las diluciones hechas, dividiendo este producto entre el resultado obtenido de multiplicar los mililitros o alícuotas utilizadas de cada dilución por mil para convertir los microgramos a miligramos.

$$\text{F.D (mg/ml)} = \frac{1a. \text{ Dil.} \times 2a. \text{ Dil.} \times 3a. \text{ Dil.} \times \dots}{1a. \text{ Alícuota} \times 2a. \text{ Alícuota} \times 3a. \text{ Alícuota} \times \dots \times 10^3}$$

II.- METODO ESPECTROFOTOMETRICO CON SOLUCION DE TRIFENILTETRAZOLIUM

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Diluir cuantitativamente en alcohol, una cantidad de Acetato de Hidrocortisona Referencia Standard previamente secada por 3 horas a 105°C de tal manera que se tenga una solución de una concentración de 10 mg/ml.
- 2.- Transferir a un embudo separador un volumen exactamente medido de Muestra equivalente a 50 mg. de Acetato de Hidrocortisona.
- 3.- Diluir luego con agua el contenido del embudo hasta más o menos 15 ml. y extraer con cuatro porciones de 25 ml. de cloroformo; filtrando cada

porción a través de un algodón lavado con Cloroformo en un frasco volumétrico de 250 ml.

- 4.- Agregar Cloroformo a volumen y mezclar; luego pipetear 10.0 ml. de esta solución resultante a un erlenmeyer provisto de tapón y evaporar el Cloroformo a sequedad en un baño de vapor; enfriar y disolver el residuo en 20.0 ml. de alcohol.
- 5.- Proseguir según la técnica anterior descrita para el Acetato de Hidrocortisona en suspensión acuosa estéril con solución de Trifeniltetrazolium previa separación por Cromatografía de Capa Fina a partir del numeral 8 pág. 14.

Cálculos:

$$C_p = 5 \left( \frac{C}{V} \right) \left( \frac{A_m}{A_s} \right)$$

Donde: 5 = factor de dilución

C = Concentración del St

A<sub>m</sub> = Absorbancia de la muestra

A<sub>s</sub> = Absorbancia del Standard

III.- METODO GRAVIMETRICO

PROCEDIMIENTO:

- 1) Colocar en un embudo de separación una cantidad exactamente medida de muestra que se ensaya equivalente a 75 mg.
- 2) Extraer el Acetato de Hidrocortisona contenido en la muestra con 25 ml. de Cloroformo y filtrar a través de un algodón lavado con Cloroformo.

- 3) Lavar el contenido del embudo de separación con 4 porciones de 25 ml. de Cloroformo cada una y evaporar el extracto y los lavados en un baño de vapor a sequedad. Finalmente secar en la Estufa a 105°C hasta peso constante.

Cálculo: mg. de muestra = peso final del residuo.

#### IV.- METODO ESPECTROFOTOMETRICO CON SOLUCION DE FENILHIDRACINA EN ACIDO SULFURICO DILUIDO

##### PROCEDIMIENTO:

- 1.- Disolver 10 mg. de acetato de hidrocortisona referencia Standard, previamente secada en un desecador de vacío por 3 horas, en suficiente alcohol absoluto para hacer 100 ml. de solución y mezclar fuertemente.
- 2.- Tomar un volumen exactamente medido de la Suspensión Acuosa Estéril de Acetato de Hidrocortisona que se ensaya equivalente a 25 mg. del principio activo y transferirlo a un frasco volumétrico de 100 ml. y llevar a volumen con alcohol absoluto. La mezcla es agitada fuertemente y dejada en reposo por varios minutos. En caso de que la solución no sea clara, filtrar a través de un algodón lavado previamente con alcohol absoluto.
- 3.- Rechazar los primeros 10 ó 15 ml. de filtrado. El tamaño de la muestra debe ser ajustado de manera que tenga una concentración de más o menos 10 mg. del esteroide por 100 ml. de solución.
- 4.- Tomar 1.0 ml. de la solución anterior y 1.0 ml. de solución Standard y colocarlos en un tubo de ensayo de vidrio tapados; en otro tubo colocar también 1.0 ml. de alcohol que servirán como Blanco.
- 5.- Hacer una segunda serie de tubos que contengan igual cantidad que los anteriores de Muestra, Standard y Blanco.

6.- Agregar a la primera serie de tubos, 8 ml. de Reactivos de Fenilhidracina en Acido Sulfúrico diluido. Y a la segunda serie de tubos agregar 8 ml. ácido sulfúrico diluido a cada tubo. Luego colocar las dos series de tubos en un baño de agua a 60°C. por 20 minutos y luego enfriarlos rápidamente.

7.- Medir las absorbancias de cada uno de los tubos de las dos series en un Espectrofotómetro adecuado a 410 mμ . usando el Blanco para clibrar el aparato.

Cálculos:

$$C_p = 100 \times C_s \left( \frac{A_{1m} - A_{2m}}{A_{1s} - A_{2s}} \right)$$

Donde:  $C_s$  = Concentración de la solución Standard (mg/ml)

$A_{1m}$  = Absorbancia de la muestra con Fenilhidracina

$A_{2m}$  = Absorbancia de la muestra con ácido diluido

$A_{1s}$  = Absorbancia del Standard con Fenilhidracina

$A_{2s}$  = Absorbancia del Standard con ácido diluido

#### V.- METODO ESPECTROFOTOMETRICO CON SOLUCION DE ISONIACIDA

PROCEDIMIENTO:

- 1) Medir exactamente una alícuota de muestra equivalente a 50 mg. de Acetato de Hidrocortisona y llevar a volumen con Cloroformo en un frasco volumétrico de 100 ml.
- 2) Diluir 3.0 ml. de la solución anterior con Cloroformo hasta 50.0 ml. en un frasco volumétrico. Y agregar a 5.0 ml. de esta última solución colocada en un Erlenmeyer 10.0 ml. de solución de Isoniacida en metanol y

suficiente alcohol metílico para hacer 20.0 ml.

- 3) Dejar en reposo por 45 minutos y medir la extinción de la solución resultante a una longitud de onda de 380 mμ usando como Blanco 5.0 ml. de Cloroformo tratados de igual manera.
- 4) Preparar una Solución Standard de Acetato de Hidrocortisona Referencia Standard, previamente secada por 3 horas 105°C con una concentración 0.03 mg/ml en cloroformo siendo también el volumen tomado para el ensayo 5.0 ml. y tratarlos de igual forma que la Preparación Muestra.

Cálculos:

$$C_p = \frac{C}{V} \times \left( \frac{A_m}{A_s} \right)$$

Donde: C = Concentración del Standard (mg/ml)

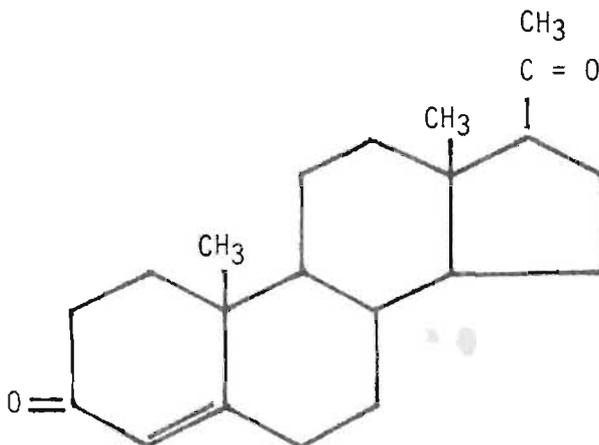
V = Volumen tomado

A<sub>m</sub> = Absorbancia de la Muestra

A<sub>s</sub> = Absorbancia del Standard

PROGESTERONA

La Progesterona que tiene por fórmula



Es la hormona elaborada por los ovarios, placenta, corteza suprarrenal y testículos; y es excretada por el cuerpo amarillo durante el período menstrual. Se presenta en solución oleosa en forma de inyectables.

PRINCIPIO ACTIVO:                    PROGESTERONA

FORMA FARMACEUTICA:            SOLUCION OLEOSA INYECTABLE

I.- METODO GRAVIMETRICO CON 2, 4 DINITROFENILHIDRACINA

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Colocar en un embudo separador de 125 ml. una alícuota de la solución oleosa que se ensaya que contenga aproximadamente 20 mg. del Esteroides y agregar 40 ml. de una mezcla de Eter de Petróleo-Alcohol y agitar fuertemente.
- 2.- La solución resultante es extraída ahora con 5 porciones de 20 ml. de alcohol-eter de petróleo.
- 3.- Los extractos combinados son evaporados a sequedad de un baño de vapor con la ayuda de una corriente de aire y al residuo se le adiciona 75 mg. de 2,4 dinitrofenilhidracina y 30 ml. de alcohol; el frasco conteniendo esta mezcla es adaptado a un condensador y es refluja por 15 minutos.
- 4.- Al final de los 15 minutos se agregan 1 ml. de Acido Clorhídrico concentrado y la mezcla es nuevamente refluja por 15 minutos más, la mezcla es enfriada y el precipitado formado es transferido cuantitativamente a un filtro poroso adecuado previamente tarado con la ayuda de pequeñas porciones de alcohol. El precipitado es lavado con 5 porciones de 10 ml. de alcohol, con 5 porciones de 10 ml. de éter de petróleo, con varias porciones de 5 ml. de alcohol y finalmente con solución 0.5 N de ácido clorhídrico hasta que el filtrado aparezca libre de color.

5.- El precipitado después del tratamiento anterior es secado hasta peso constante en una estufa a 105°C.

Cálculos:

El peso de Progesterona (mg) en la muestra tomada es obtenido al multiplicar el peso del precipitado por 0.466.

II.- METODO GRAVIMETRICO

PROCEDIMIENTO:

- 1) Colocar una alícuota de la solución Oleosa de Progesterona equivalente a 50 mg. del esteroide en un embudo separador de 125 ml. y extraer según técnica anterior para el método Gravimétrico con 2, 4, Dinitrofenilhidracina (paso 1 y 2 pág. 20).
- 2) Los extractos combinados son evaporados a sequedad en un baño de vapor y el residuo obtenido en la evaporación es secado en la estufa a 105°C hasta peso constante.

III.- METODO ESPECTROFOTOMETRICO CON SOLUCION DE ISONIACIDA

Se lleva a cabo la técnica descrita para la determinación del Acetato de Hidrocortisona en Suspensión Acuosa Estéril por el Método Espectrofotométrico con solución de Isoniacida que se encuentra en la página 17, siendo la concentración de la Solución Standard empleada de 0.03 mg/ml. y la alícuota de la muestra tomada equivalente a 50 mg. de Progesterona.

MEZCLAS:

La Progesterona se encuentra en forma de solución oleosa inyectable generalmente asociada con el Benzoato de Estradiol de la que, la progesterona pue-

de ser separada por cromatografía de capa fina y luego ser valorada por cualquiera de los métodos cuantitativos anteriores.

PRINCIPIO ACTIVO:                    PROGESTERONA Y BENZOATO DE ESTRADIOL

FORMA FARMACEUTICA:            SOLUCION OLEOSA INYECTABLE

SEPARACION DE PROGESTERONA POR CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA

PROCEDIMIENTO:

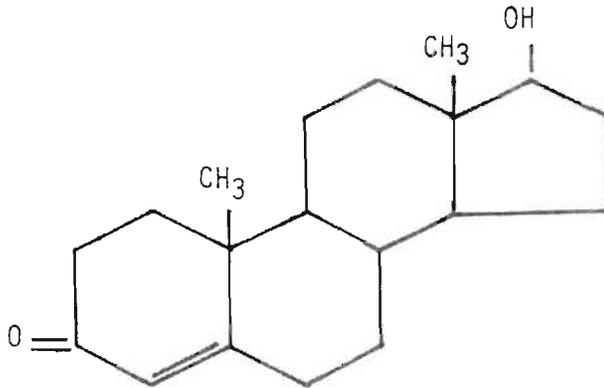
- 1.- Diluir una alícuota de la Solución Oleosa equivalente a más o menos 2 mg/ml. de Benzoato de Estradiol y 10 mg/ml. de Progesterona con alcohol absoluto en proporción de 1 : 10.
- 2.- Aplicar 10  $\mu$ l de esta preparación en una placa activada de Sílica Gel H.
- 3.- Introducir la placa en una cámara previamente saturada y usando como solvente desarrollador una mezcla de Tetracloruro de Carbono y Metanol en proporción de 95 : 5; agitar esta mezcla con 1 ml. de amoníaco al 25 % y tomar la base orgánica como solvente.
- 4.- Luego que se ha corrido la placa, observar las manchas correspondientes al Standard y muestras de Progesterona y Benzoato de Estradiol a la luz ultravioleta y marcarlos convenientemente.
- 5.- Llevar a cabo luego el ensayo para la Progesterona en Solución Oleosa Inyectable por el método Espectrofotométrico con Solución de Isoniacida descrito en la Pág. 21

## T E S T O S T E R O N A

La testosterona es la hormona producida en los testículos y la que bioquímicamente se transforma en Androsterona que es la forma como se encuentra en la orina.

Es la responsable del desarrollo y mantenimiento de las características sexuales masculinas.

Tiene por fórmula química la siguiente:



Generalmente se encuentra en solución oleosa inyectable ya sea en forma de Propionato o Ciclopentil Propionato de Testosterona.

Entre los métodos empleados para la valoración cuantitativa de la solución oleosa inyectable de Ciclopentilpropionato de Testosterona se encuentran los siguientes:

### I.- METODO GRAVIMETRICO CON SOLUCION DE ACETATO DE SEMICARBACIDA

#### PROCEDIMIENTO:

- 1.- Transferir un volumen exactamente medido, equivalente a 50 mg. de Ciclopentilpropionato de Testosterona que se ensaya a un embudo Separador de

125 ml. y extraer el principio activo con 8 porciones de 20 ml. de una mezcla de alcohol-Bencina de Petróleo (P.E. 40-60°C) Evaporar los extractos combinados a sequedad en un baño de vapor.

- 2.- Agregar al residuo de la evaporación, 3 ml. de Solución de Acetato de Semicarbacida y reflujar vigorosamente por 2 horas. Dejar enfriar y agregar 10 ml. de Bencina de Petróleo y mezclar.
- 3.- Transferir agitando el contenido a un beaker conteniendo 75 ml. de agua helada y lavar el frasco con 2 porciones de 5 ml. de éter de petróleo y adicionar los lavados al beaker y si permaneciera algún residuo en la parte externa del frasco, lavarlo dentro del agua con 2 porciones de 2 ml. de alcohol metílico.
- 4.- Mezclar el beaker fuertemente y dejar reposar en refrigeración por 3 horas, luego filtrar el precipitado en un filtro poroso gooch adecuado y lavarlo, sin llegar a sequedad con varias porciones de 10 ml. de bencina de petróleo y transferir al embudo cualquier resto de cristales con ayuda de bencina de petróleo.
- 5.- Lavar los cristales por succión con 4 a 6 porciones de 5 ml. de agua, luego secar el embudo y contenido a 105°C, hasta peso constante.

#### Cálculos:

El peso del precipitado equivalente a la Semicarbazona formada, multiplicado por 0.8579 representa la cantidad de Testosterona en el volumen tomado de la inyección.

#### II.- TITULACION EN SOLVENTE NO ACUOSO

##### PROCEDIMIENTO:

- 1.- Tomar una alícuota de muestra equivalente a 10 mg. del Esteroide y di-

solverla en alcohol de 95 % (30 ml.).

- 2.- Reflujar con 3 ml. de solución de Acetato de Semicarbacida por hora y media y pasar esta solución a un beaker conteniendo 5 gramos de hielo picado y guardarla en refrigeración por 3 horas.
- 3.- Extraer con Cloroformo y remover luego el Cloroformo por evaporación en un baño de vapor, luego secar el residuo a 80°C. por una hora.
- 4.- Disolver la semicarbazona seca en 40 ml. de una mezcla de cloroformo-Acido Acético 1:1 y titular con Acido Perclórico 0.01 N, usando rojo de Quinaldina como indicador.

### III.- DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA CON SOLUCION DE ISONIACIDA

Llevar a cabo el ensayo para el Acetato de Hidrocortisona en suspensión Acuosa Estéril con Solución de Isoniacida, usando un volumen equivalente a 0.1 gr. de Ciclopentilpropionato de Testosterona. Calcular el contenido del principio activo por la medida de la Extinción usando una solución Standard de Ciclopentilpropionato de Testosterona de 0.06 mg/ml. en Cloroformo como medio de comparación.

El ensayo se inicia a partir del literal (a) de la página N° 18.

RESULTADOS

T A B L A I

ACETATO DE HIDROCORTISONA EN PRESENCIA DE AGENTE ANTIMICROBIAL  
(SULFATO DE NEOMICINA) EN SUSPENSION ACUOSA ESTERIL

METODO EMPLEADO	Cantidad de muestra ensayada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	% de Recobro	Desviación Estandar
1. Espectrofotométrico con Trifeniltetrazolium, previa separación por Cromatografía de Capa Fina.	375	354.35	94.49	0.077
2. Espectrofotométrico con Trifeniltetrazolium *	75	73.32	97.76	0.073
3. Gravimétrico Directo	75	73.07	97.42	0.073
4. Espectrofotométrico con solución de Isoniacida.	60	58.39	97.32	0.71
5. Espectrofotométrico con Fenilhidracina	30	29.15	97.17	0.23

\* OFICIAL USP XVIII

T A B L A II

ACETATO DE HIDROCORTISONA EN AUSENCIA DE AGENTE  
ANTIMICROBIAL EN SUSPENSION ACUOSA ESTERIL

METODO EMPLEADO	Cantidad de Muestra Ensayada (mg)	Cantidad Recuperada (mg)	% de Recobro	Desviación Standard
1. Espectrofotométrico con Trifenilte trazolium	75	72.75	97.00	0.36
2. Espectrofotométrico con solución de Isoniacida	60	58.56	97.60	0.022
3. Espectrofotométrico con Fenilhidracina	30	29.06	96.89	0.56

T A B L A III

PROGESTERONA EN SOLUCION OLEOSA INYECTABLE

M E T O D O	Cantidad de muestra ensayada (mg)	Cantidad Recuperada (mg)	% de Recobro	Desviación Standard
1. Gravimétrico con 2,4 Dinitrofenil hidracina *	50	49.85	99.71	0.14
2. Gravimétrico	50	48.28	96.56	0.0021
3. Espectrofotométrico con Solución de Isoniacida **	50	49.37	98.74	0.15

\* Oficial U.S.P. XVI

\*\* Oficial British Pharmacopeia 1973

T A B L A IV

CICLO PENTILPROPIONATO DE TESTOSTERONA EN SOLUCION OLEOSA INYECTABLE

METODO EMPLEADO	Cantidad ensayada (mg)	Cantidad Recuperada (mg)	% de Re <u>co</u> bro	Desviación Standard
1. Método gravimétrico con Acetato de Semi <u>carb</u> acida	50	48.36	96.72	0.018
2. Espectrofotométrico con solución de Iso <u>ni</u> acida **	100	96.27	96.27	0.12
3. Titulación en Sol <u>ven</u> te no Acuoso	10	9.25	92.54	0.95

\*\* Oficial U.S.P. XVIII

\*\* Oficial British Pharmacopeia 1973

T A B L A V

ACETATO DE HIDROCORTISONA EN SUSPENSION ACUOSA ESTERIL

M E T O D O	Costo del Ensayo	Tiempo Em <u>ple</u> ado	Desviación Standard
1. Espectrofotométrico con Tri <u>fen</u> iltetrazolium previa se <u>pa</u> ración por C.F.	Ø 3.33	5h. 37'	0.077
2. Espectrofotométrico con Tri <u>fen</u> iltetrazolium	Ø 2.35	1h. 48'	0.073
3. Espectrofotométrico con Fe <u>ni</u> lhidracina	Ø 1.75	4h. 00'	0.23
4. Espectrofotométrico con solu <u>ci</u> ón de Isoniacida	Ø 1.45	2h. 45'	0.71
5. Gravimétrico	Ø 3.25	4h. 30'	0.24

T A B L A VI

PROGESTERONA EN SOLUCION OLEOSA INYECTABLE

M E T O D O	Costo del Ensayo	Tiempo Empleado	Desviación Standard
1. Gravimétrico con 2,4 Dinitrofenilhidracina	∅ 4.50	5h. 20'	0.14
2. Gravimétrico	∅ 3.00	6h. 00'	0.0021
3. Espectrofotométrico con solución de Isoniacida	∅ 3.00	1h. 30'	0.15

T A B L A VII

CICLOPENTILPROPIONATO DE TESTOSTERONA EN SOLUCION OLEOSA INYECTABLE

M E T O D O	Costo del Ensayo	Tiempo Empleado	Desviación Standard
1. Gravimétrico con Acetato de Semicarbaci <sup>-</sup> da	∅ 5.44	8h. 00'	0.018
2. Espectrofotométrico con solución de Isoniacida	∅ 4.05	1h. 30'	0.12
3. Titulación en Solven <sup>te</sup> no acuoso	∅ 4.90	8h. 20'	0.95

Los resultados mostrados en las siete tablas anteriores fueron obtenidos luego de haber efectuado cinco ensayos para cada método.

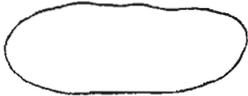
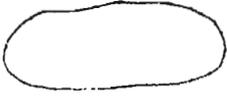
ACETATO DE HIDRO-CORTISONA (MUESTRA)	BLANCO	ACETATO DE HIDRO-CORTISONA ST.
		

FIG. I: Separación por Cromatografía en capa fina del Acetato de Hidrocortisona de los demás constituyentes de la Suspensión Estéril. Rf. 0.80

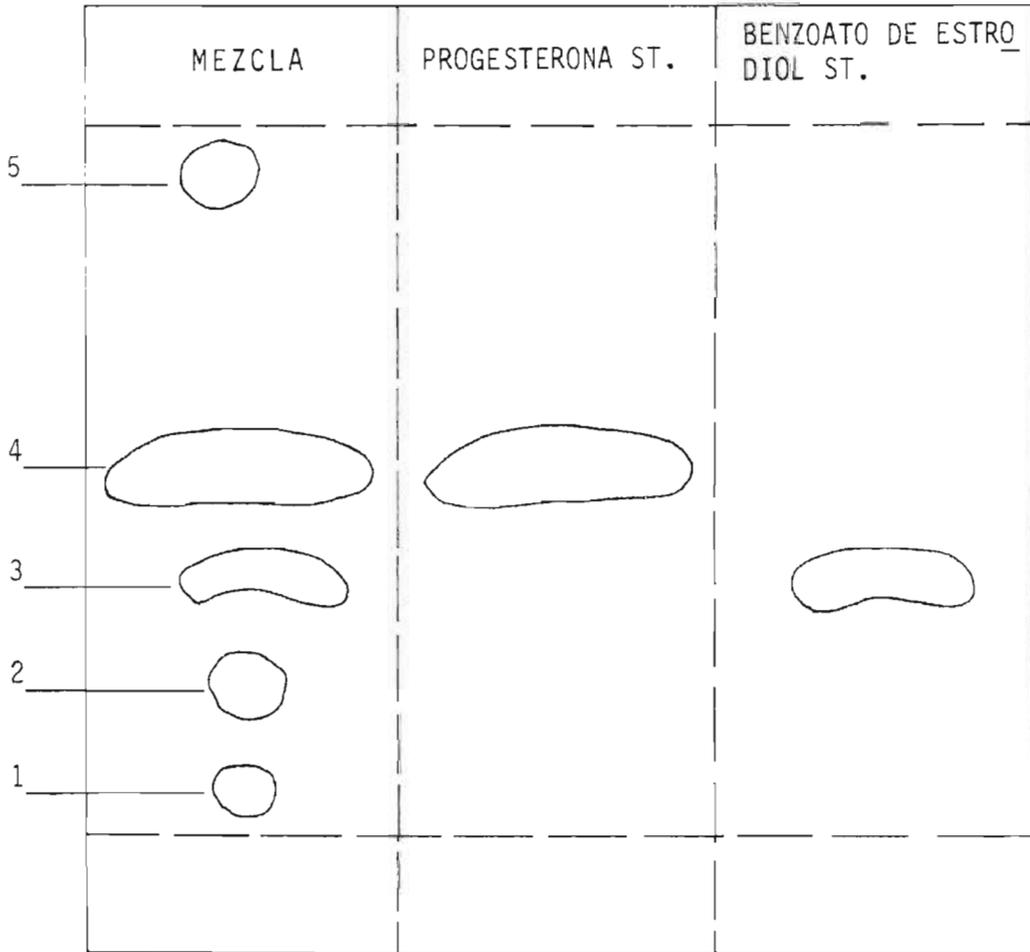


Fig. II: Separación por Cromatografía en Capa Fina de Progesterona y Benzoato de Estradiol; usando como solvente desarrollador Tetracloruro de Carbono y Metanol (95;5);  $R_{Fp} = 0.62$ ;  $R_{F3} = 0.52$  Benzoato de Estradiol (3); Progesterona (4); Solvente Oleoso: (1) (2) (5)

D I S C U S S I O N

La valoración cuantitativa del Acetato de Hidrocortisona en suspensión Acuosa Estéril, puede llevarse a cabo en presencia de un agente antimicrobial como el Sulfato de Neomicina, sin que éste presente ninguna interferencia en el análisis, como puede verse en los resultados obtenidos en las Tablas I y II, de la pág. 27 y 28 donde no se observa diferencia en los resultados entre sí. De acuerdo a los resultados obtenidos en la Tabla I, pág. 27 no se observa una variación marcada entre una separación previa del esteroide por Cromatografía en Capa Fina de los demás constituyentes de la fórmula y el Método Directo; lo que indica que dicha separación cromatográfica no es necesaria en la Cuantificación del Acetato de Hidrocortisona en Suspensión Acuosa Estéril.

El método de Análisis que mayores ventajas ofrece en la valoración de este producto, es el METODO ESPECTROFOTOMETRICO CON SOLUCION DE CLORURO 2, 3, 5 TRIFENILTETRAZOLIUM ya que ofrece la ventaja que puede ser aplicado directamente y además según puede verse en las Tablas I y V de la pág. 27 la sensibilidad que ofrece este método es excelente, el tiempo empleado en llevarlo a cabo es muy corto y su costo es bajo, Tabla V pág. N° 19, comparado con los otros métodos que aunque son bastante sensitivos tienen desventajas en cuanto al costo y tiempo de análisis. Además este método espectrofotométrico tiene la ventaja de la facilidad de manejo, no así el método espectrofotométrico con Fenilhidracina en el que se dificulta su manejo al usar ácido sulfúrico (77.5%) como solvente.

El método que mayores ventajas ofrece en cuanto a tiempo, costo y sensibilidad en la valoración de la Progesterona en Solución Oleosa Inyectable es el METODO ESPECTROFOTOMETRICO CON SOLUCION DE ISONIACIDA, ya que presenta la ventaja de que no es necesario llevar a cabo una extracción del

esteroide con solventes adecuados, lo que disminuye grandemente el tiempo y los costos en el desarrollo del método, como puede verse en las tablas IV y V de la pág. 29.

Además, es un método de muy fácil manejo y muy sensitivo, ya que en los Métodos Gravimétricos: Directo y con 2,4, dinotrofenilhidracina, la sensibilidad depende de la destreza que se tenga para eliminar completamente los restos de solvente oleoso presentes en la muestra; esto se logra al extraer el principio activo de la solución oleosa con una mezcla de alcohol-Eter de Petróleo, usando el éter de Petróleo (P.E.95°) para lavar el precipitado formado. El eter de petróleo puede sustituirse por n-Hexano.

Cuándo se trata de mezclas de Progesterona y Benzoato de Estradiol en Solución Oleosa Inyectable, es necesario llevar a cabo la separación de ambos constituyentes para valorar la progesterona, ya que el benzoato de Estradiol presenta interferencias en dicho análisis. La separación se lleva a cabo por Cromatografía en Capa Fina con muy buenos resultados.

Inicialmente se emplearon mezclas de solventes desarrolladores tales como: Cloroformo-Acetona (3:2); variando las cantidades de cada uno sin obtener una separación satisfactoria; luego se probaron mezclas más polares como Cloroformo-Eter (9:1) y Cloroformo-Metanol (99:1) sin haber obtenido en ninguno de los casos una separación adecuada.

El solvente desarrollador que resultó ser el de mejor poder separador fue la mezcla de TetraCloruro de Carbono-Metanol (95:5) por agitación posterior con 1 ml. de Amoníaco\*; la capa Orgánica es la que se emplea como sol

---

\* Stahl, Egon; Thin-Layer Chromatography, A Laboratory Handbook Springer Verlag-Berlín-Heidelberg. New York, 1969, pág. 555.

vente desarrollador. Los resultados obtenidos en cuanto a la separación con este solvente pueden verse en la Fig. I de la pág. 31.

Una vez separada la Progesterona puede ser cuantificada individualmente por el METODO ESPECTROFOTOMETRICO con solución de Isoniacida, obteniéndose un porcentaje de recobro de 96.85%.

EL METODO ESPECTROFOTOMETRICO CON SOLUCION DE ISONIACIDA en la valoración del ciclopentilpropionato de Testosterona, presente en la muestra Oleosa, es el método que presenta mayores ventajas de los tres estudiados, ya que el tiempo empleado en desarrollarlo según Tabla VII de la pág. 30; es únicamente de 1 hora con 30 minutos mientras que el método gravimétrico con Acetato de Semicarbida y el método de titulación en solvente no Acuoso con Acido Perclórico 0.01 N se emplean tiempos de 8 horas y 8 horas con 20 minutos respectivamente. Además la ventaja en cuanto a tiempo hace que el costo sea más bajo, su sensibilidad mayor en comparación con los otros dos métodos según Tabla VII de la pág. 30.

El método Gravimétrico y Titrimétrico tiene el inconveniente de la eliminación total de la grasa presente en la muestra, trazas de la cual presentan gran interferencia en las valoraciones, disminuyendo la sensibilidad de ambos métodos. En estos dos métodos fue usado también como en el caso de la Progesterona (pág. 35), el n-Hexano para eliminar la grasa del precipitado formado; así también para extracciones de la solución Oleosa y lavados; obteniéndose en este caso resultados muy satisfactorios. El Método Titrimétrico presenta la dificultad en cuánto a observar el punto final de la titulación ya que el viraje del indicador se aieja demasiado del punto de equivalencia y por consiguiente es necesario llevar a cabo varias titulaciones para acostumbrar el ojo al cambio adecuado.

## C O N C L U S I O N E S

El Método Espectrofotométrico con Solución de Cloruro de 2,3,5 Trifenil tetrazolium, aplicado directamente a la muestra de Acetato de Hidrocortisona en Suspensión acuosa Estéril es el método que mejores ventajas presenta en cuanto a rapidez, bajo costo y sensibilidad.

La Progesterona en Solución Oleosa Inyectable puede ser cuantificada con muy buenos resultados por el Método Espectrofotométrico con Solución de Isoniacida.

Este método no tiene el inconveniente de llevar a cabo extracciones del esteroide con solventes, bajando ésto grandemente los costos y el tiempo empleado en desarrollarlo.

Cuando se trata de mezclas de Progesterona y Benzoato de Estradiol; para la valoración cuantitativa de la Progesterona es necesario llevar a cabo antes del análisis la separación por Cromatografía en Capa Fina de los dos constituyentes. El solvente desarrollador para lograr una mejor separación es una mezcla de Tetracloruro de Carbono-Metanol (95:5) agitada previamente con Amoníaco.

Una vez separados ambos esteroides se valora fácilmente la Progesterona por el Método Espectrofotométrico con Solución de Isoniacida.

En la valoración del Ciclopentilpropionato de Testosterona, el método que cumplió los requisitos en cuanto a eficiencia, bajo costo, exactitud y rapidez, fue el método Espectrofotométrico con Solución de Isoniacida, ya que no presenta el inconveniente de eliminar los restos de solvente oleoso de la muestra, empleando por lo tanto menor tiempo en llevarlo a cabo.

Por otra parte, no presenta el inconveniente del Método Titrimétrico en cuanto a la dificultad de determinar punto final en la titulación. El Método Titrimétrico con solvente no acuoso puede ser empleado siempre que se determine el punto final potenciométricamente.

BIBLIOGRAFIA

- Association of Official Analytical, Chemist, 12a. Ed., 1975.
- Higuchi, T. and Brochmann-Hansen E., Pharmaceutical Analysis, New York, Interscience Publishers, 1961.
- Heftmann Erich , "Modern Methods of Steroides Analysis", Academic Press, New York and London, 1973.
- Journal of Pharmaceutical Sciences of the United Arab Republic, Vol. IX , 1968.
- Kunze M. Frieda Jonas & Carol, Journal of Pharm. Sciences, Vol. 51(7), Jul. 1962.
- Randerath K., "Cromatografía de Capa Fina", 2a. Ed., Bilbao, Ediciones URMO, 1970.
- Stahl, E. "Thin-Layer Chromatography", a Laboratory Handbook, 2a. Ed., Springer-Verlag, Berlín-Heidelberg-New York, 1969.
- The Pharmacopoeia of the United States of America, USP XVIII, 1970.
- The Pharmacopoeia of United States of America, USP XIX, 1975.
- British Pharmacopoeia 1973, London Her Majestys Stationery Office, 1973.
- Journal of Chromatography, Vo. 74(2), Dic. 20, 1972.
- Cantarrow Abraham-Shepartz Bernard. "Bioquímica", 4a. Ed., Editorial Interamericana, 1969.
- García J.R.A.R. y Selles J., "Revista de la Asociación Bioquímica Argentina", Enero-Marzo, 1975.
- Harper Harold A. "Manual de Química Fisiológica", 3a. Ed., México, 1971.

A P E N D I C E

LISTA DE REACTIVOS EMPLEADOS

1.- SOLUCION DE CLORURO DE 2, 3, 5 TRIFENILTETRAZOLIUM EN METANOL

Disolver 500 mg. de Cloruro de 2, 3, 5 trifeniltetrazolium en 100 ml. de alcohol. Esta solución debe ser preparada recientemente y debe ser protegida de la luz.

2.- SOLUCION DE HIDROXIDO DE TETRAMETILAMONIO

Diluir 10 ml. de solución acuosa del reactivo al 10 % a 100 ml. con alcohol.

3.- SOLUCION DE FENILHIDRACINA EN ACIDO SULFURICO

Prepararla disolviendo 65 mg. de Clorohidrato de Fenilhidracina, previamente recristalizada en alcohol y secada sobre cloruro de Calcio en 100 ml. de Acido sulfúrico diluido. Este reactivo debe ser preparado recientemente.

4.- SOLUCION DE ISONIACIDA

Disolver 0.1 gr. de Isoniacida en 150 ml. de alcohol metílico y agregarle 0.12 ml. de ácido clorhídrico concentrado y suficiente alcohol metílico para hacer 200 ml.

5.- ALCOHOL-ETER DE PETROLEO; ETER DE PETROLEO-ALCOHOL

Mezclar iguales volúmenes de alcohol y éter de petróleo en un embudo separador, agitar por 10 a 15 minutos y dejar que separen las capas. Delimitar las dos capas contenidas en el embudo, designando así: "Capa Inferior" alcohol-eter de petróleo; "Capa Superior" eter de petróleo-alcohol.

6.- SOLUCION DE ACETATO DE SEMICARBACIDA

Preparar una mezcla de 2.5 gr. de Clorhidrato de Semicarbacida, 2.5 gr. de Acetato de Sodio anhidro y 30 ml. de metanol; y reflujar esta mezcla por 2 horas. Después de enfriarla y el cloruro de sodio que se formó es extraído, por filtración. El filtrado es diluido a 100 ml. con metanol y la mezcla es guardada en refrigeración. Si la solución está amarilla al momento de usarla, debe prepararse una nueva solución.

7.- INDICADOR DE ROJO DE QUINALDINA

Disolver 100 mg. de Rojo de Quinaldina en 100 ml. de ácido acético glacial. Cambio de color Incoloro a Rojo.

8.- ACIDO SULFURICO DILUIDO

Mezclar 310 ml. de ácido sulfúrico concentrado con 190 ml. de agua destilada.