

DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA POR INJEÇÃO EM FLUXO DE VITAMINA B₆ (PIRIDOXINA) EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

Clezio Aniceto e Orlando Fatibello-Filho*

Departamento de Química - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia - Universidade Federal de São Carlos - CP 676 - 13.560-970 - São Carlos - SP

Recebido em 28/10/98; aceito em 9/3/99

FLOW INJECTION SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF VITAMIN B₆ (PYRIDOXINE) IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS. A flow injection (FI) spectrophotometric procedure is proposed for the determination of vitamin B₆ (pyridoxine hydrochloride) in pharmaceutical preparations. Powdered samples containing from 2.5 to 4.5 mg, were previously dissolved in 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer solution (pH 7.0) and a volume of 500 µL was injected directly into a carrier stream consisting of this same phosphate buffer solution, flowing at 4.4 mL min⁻¹. The stable blue indophenol dye produced in the oxidation of pyridoxine hydrochloride by potassium hexacyanoferrate(III) and N,N-diethyl-p-phenylenediamine solution was directly measured at 684 nm. Vitamin B₆ was determined in five pharmaceutical preparations in the 0.5 to 6.0 mg L⁻¹ concentration range (calibration graph: $A = -0.00499 + 0.11963 C$; $r = 0.9991$, where A is the absorbance and C is the vitamin B₆ concentration in mg L⁻¹), with a detection limit of 0.02 mg L⁻¹ (3 S_{blank}/slope). The recovery of this vitamin from three samples ranged from 97.5 to 103.3 %. The analytical frequency was 62 h⁻¹ and r.s.d. were less than 2% for solutions containing 1.0 and 3.0 mg L⁻¹ vitamin B₆ (n= 10). The results obtained for the determination of vitamin B₆ in commercial formulations were in good agreement with those obtained by a spectrophotometric procedure (r=0.9997) and also with the label values (r= 0.9998).

Keywords: vitamin B₆; flow injection spectrophotometry; pharmaceutical preparations.

INTRODUÇÃO

Vitamina B₆ (cloridrato de piridoxina) é um pó cristalino branco, inodoro e relativamente estável ao ar e à luz. Suas soluções aquosas são mais estáveis em valores de pH menores que 5, tornando-se menos estáveis em valores de pH maiores que 7, especialmente quando irradiadas com luz na região do UV-Visível¹.

Vitamina B₆ está amplamente distribuída na natureza, sendo as fontes de sua obtenção o fígado, farelo de cereais, levedura, melão bruto de cana e germe de trigo. Essa vitamina consiste de uma mistura de piridoxina, piridoxal e piridoxamina (Figura 1), que são normalmente interconvertidas no organismo. Desse composto, a piridoxina é a mais estável sendo normalmente usada nas preparações farmacêuticas na forma de sais como cloridrato (Adermina), ascorbato, aspartato e piridofilina. São também utilizados vários derivados análogos da piridoxina, tais como: (a) iodometilato de piridoxina, usado por via oral ou parenteral; (b) piritinol (Encefabol), desprovido de atividade neurotrófica; (c) 3-lauroil-4,5-diacetilpiridoxina, indicada para o tratamento de dermatoses e (d) piridoxilato, um precursor da piridoxina. No organismo a piridoxina converte-se em fosfato de piridoxal, que atua como coenzima de cerca de 60 enzimas, a maioria relacionada com o metabolismo de proteínas e aminoácidos. Essa vitamina desempenha importante papel na síntese de neurotransmissores como a noradrenalina, dopamina, serotonina e histamina. Participa também de reações de degradação de aminoácidos, em que um dos produtos finais é a acetil-coenzima A, necessária à produção de energia e à síntese de proteínas, lipídios e acetilcolina^{1,2}.

O fosfato de piridoxal atua como coenzima na primeira etapa da síntese de esfingosina, substância que ocupa posição chave no metabolismo dos esfingolipídios, componentes essenciais nas membranas celulares das bainhas de mielina. Uma

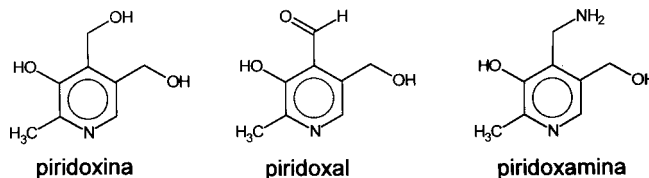


Figura 1. Formas da vitamina B₆ mais comuns encontradas².

vez que os esfingolipídios têm renovação metabólica muito rápida, a preservação da integridade estrutural e funcional do sistema nervoso requer a síntese constante de esfingosina, dependente de vitamina B₆^{1,2}.

A carência de piridoxina determina alterações na pele e mucosas, lesões seborréicas da face, glossite, estomatite; no sistema nervoso central e periférico, convulsões, depressão, neuropatia; na hematopoese, anemia microcítica hipocrômica, com reserva normal ou aumentada de ferro (anemia sideroblástica)^{1,2}.

Existem vários procedimentos para a determinação de vitamina B₆ descritos na literatura³⁻²³, destacando-se os bioanalíticos, microbiológicos e químicos. Os procedimentos bioanalíticos e microbiológicos são trabalhosos e consomem longos tempos de análise^{3,4}, enquanto que os métodos químicos apresentam maior precisão e menor tempo de execução^{5,6}. Os procedimentos químicos mais empregados incluem a cromatografia gasosa⁷, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)⁸⁻¹¹, espectrofotometria no UV-visível¹²⁻¹⁴, potenciometria^{15,16}, espectrofluorimetria^{17,18}, espectrofotometria em sistema por injeção em fluxo^{19,20} e volumetria²¹. A AOAC²² recomenda o método microbiológico como método de análise desta vitamina. A Farmacopéia Americana (USP-23)²³, recomenda a CLAE como método para determinação de vitamina B₆ na forma de cloridrato de piridoxina em drágeas, comprimidos e injetáveis.

Recentemente nosso grupo de pesquisa desenvolveu dois

e-mail: bello@dq.ufscar.br

procedimentos em sistemas por injeção em fluxo para determinação de vitamina B₁ em formulações farmacêuticas com detecção espectrofotométrica²⁴ e turbidimétrica²⁵.

Em continuidade a esses estudos, um procedimento em fluxo com detecção espectrofotométrica é proposto para a determinação direta de vitamina B₆ (cloridrato de piridoxina) em formulações farmacêuticas, sem a necessidade prévia de separar essa vitamina por extração por solventes ou outro procedimento de separação. O produto da reação de oxidação do cloridrato de piridoxina com N,N-dietil-p-fenilenediamina e hexacianoferrato (III) de potássio²⁶ foi diretamente medido em 684 nm (Figura 2) e os sinais transientes obtidos relacionados com sua concentração em diversas amostras.

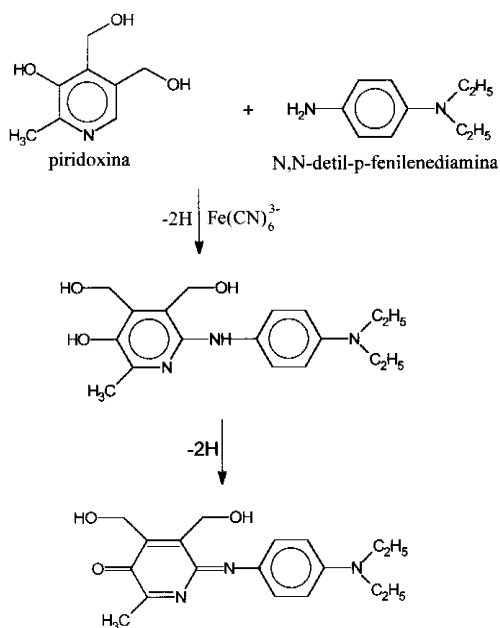


Figura 2. Reação do cloridrato de piridoxina com o N,N-dietil-p-fenilenediamina e hexacianoferrato(III) de potássio produzindo um composto indofenólico de coloração azul intenso com absorção molecular máxima em 684 nm.

PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentação

Todas as medidas espectrofotométricas foram feitas em um espectrofotômetro da Femto, Modelo 435 com uma célula de quartzo (caminho óptico de 1,0 cm) conectado a um registrador da Cole Parmer (Niles, IL, USA), modelo 12020000 de dois canais. O efeito da temperatura sobre a reação de oxidação da piridoxina foi estudado usando-se um banho termostático da Tecnal, modelo TE 184. Para propulsão das soluções das amostras e reagentes utilizou-se uma bomba peristáltica da Ismatec (Zurique, Suíça), modelo 7618-40. O sistema empregado foi construído empregando-se tubos de Tygon de 0,8 mm de diâmetro interno. As amostras e soluções de referência foram introduzidas no sistema FIA, utilizando-se um comutador automático da Micronal, modelo B352 e tubos de silicone e conectores de acrílico foram utilizados na montagem de todo o sistema de injeção em fluxo (Figura 3).

Reagentes e soluções

Cloridrato de tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂), cloridrato de piridoxina (vitamina B₆), cianocobalamina (vitamina B₁₂) e vitamina E de grau bioquímico foram utilizados na

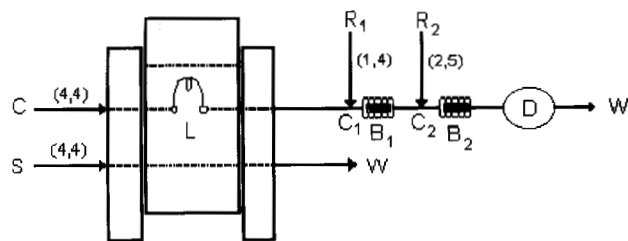


Figura 3. Diagrama do sistema de injeção em fluxo usado na determinação espectrofotométrica de vitamina B₆, onde S, soluções de referência ou amostra; L, alça de amostragem (100 cm, 500 µL); C, solução transportadora (tampão fosfato pH 7,0); R₁, hexacianoferrato (III) de potássio 0,5% m/v; R₂, N,N-dietil-p-fenilenediamina 0,1% m/v; D, espectrofotômetro (λ=684 nm); B₁ e B₂, reatores reacionais (100 cm); W, descarte.

preparação de soluções de referência e interferentes. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico e água de um sistema Milli-Q da Millipore (Redford, MA, USA), Modelo UV Plus Ultra-baixo teor de solventes orgânicos dissolvidos foi usada na preparação das soluções. Ácido ascórbico, ácido cítrico, amido, glicose, lactose, sacarina, sacarose, sulfatos de cobre(I), ferro(II), magnésio(II), manganês(II) e zinco(II) foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Solução estoque de cloridrato de piridoxina 50 mg L⁻¹ foi preparada em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). Soluções de referência de vitamina B₆ de 0,5 a 6,0 mg L⁻¹ foram preparadas diariamente em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) por diluição da solução estoque. As soluções de cloridrato de piridoxina preparadas foram protegidas da luz, sendo assim acondicionadas em frascos de cor âmbar. Essas soluções são estáveis por aproximadamente 36 horas. Prepararam-se diariamente soluções de hexacianoferrato (III) de potássio 0,5% m/v e N,N-dietil-p-fenilenediamina 0,1% m/v pela dissolução de 1,0 g e 0,2 g desses reagentes, respectivamente em dois béqueres distintos de 100 mL contendo em cada um 50 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0), sendo a seguir transferidos para balões de 200 mL, completando-se os volumes com a mesma solução tampão.

Preparação das amostras

Vitamina B₆ foi determinada em amostras de formulações farmacêuticas em drágeas e injetável adquiridas em farmácias locais e comercializadas como Citoneurim (Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, RJ), Complexo B (Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP), Complexo B (Roche Químicos e Farmacêuticos S.A., Rio de Janeiro, RJ) e Doxal (A Nova Química Laboratório S.A., São Bernardo do Campo, SP).

a) Amostras sólidas (drágeas)

Dez comprimidos de cada amostra foram masserados e uma massa acuradamente medida entre 25-100 mg foi transferida para um béquer de 100 mL contendo 25 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) e agitados a seguir até completa dissolução das amostras. As soluções foram filtradas em papel de filtro Whatman nº 1, o filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0).

b) Amostras líquidas (injetáveis)

Um volume de 2 mL de amostra contido em uma ampola (solução injetável), foi pipetado e transferido para um balão de 50 mL e o volume completado a seguir com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0).

Sistema de injeção de fluxo

A Figura 3 apresenta o esquema do sistema de injeção em fluxo utilizado com detecção espectrofotométrica na posição de análise. A solução de vitamina B₆ foi introduzida no fluxo transportador através de uma alça de amostragem de 100 cm (L, 500 µL). As soluções de hexacianoferrato(III) de potássio 0,5% m/v a uma vazão de 1,4 mL min⁻¹ e de N,N-dietil-p-fenilenediamina 0,1% m/v a uma vazão de 2,5 mL min⁻¹ foram introduzidas no fluxo transportador através das respectivas confluências C₁ e C₂, reagem com a vitamina B₆ (cloridrato de piridoxina) produzindo um composto indofenólico de coloração azul intenso com absorção máxima em 684 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito da concentração de N,N-dietil-p-fenilenediamina

Estudou-se o efeito da concentração de N,N-dietil-p-fenilenediamina, nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,1; 0,25 e 0,5% m/v em hexacianoferrato(III) de potássio 0,5% m/v sobre o sinal analítico, nas condições experimentais descritas na legenda da Figura 3. A maior sensibilidade e melhor estabilidade da linha base foram obtidas em solução de N,N-dietil-p-fenilenediamina 0,1% m/v. Assim, em todo esse trabalho utilizou-se esse reagente nessa concentração.

Efeito da concentração de K₃Fe(CN)₆

Estudou-se também o efeito da concentração de hexacianoferrato (III) de potássio nas concentrações de 0,001; 0,01; 0,05; 0,1 e 0,5% m/v, mantendo-se constante a concentração de N,N-dietil-p-fenilenediamina em 0,1% m/v. O melhor sinal analítico encontrado sem a interferência dessa solução foi obtido em solução de hexacianoferrato(III) de potássio 0,5% m/v. Conseqüentemente, usou-se esta concentração em todo o desenvolvimento deste trabalho.

Efeito do comprimento da alça de amostragem

Estudou-se o efeito do comprimento da alça de amostragem de 25 a 150 cm (volumes de 125 a 750 µL) para soluções padrão de vitamina B₆ 0,5; 2,0 e 5,0 mg L⁻¹ e vazão de 4,4 mL min⁻¹. Observou-se que o sinal analítico aumenta até a alça de 100 cm (500 µL), permanecendo constante com as alças de maior volume. Assim, adotou-se uma alça de amostragem de 100 cm (500 µL) para o desenvolvimento desse trabalho.

Efeito das vazões

Estudou-se inicialmente o efeito da vazão de 1,4; 2,5; 3,6 e 4,4 mL min⁻¹ da solução transportadora (tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0)), fixando-se as vazões dos reagentes N,N-dietil-p-fenilenediamina 0,1% m/v e hexacianoferrato(III) de potássio 0,5% m/v em 2,5 mL min⁻¹. Observou-se um aumento significativo do sinal analítico até a vazão de 4,4 mL min⁻¹ da solução transportadora. Sendo assim optou-se em trabalhar com essa vazão.

O efeito da vazão de 1,0; 1,4; 2,5; 3,6 e 4,4 mL min⁻¹ da solução de hexacianoferrato(III) de potássio 0,5% m/v sobre o sinal analítico para uma vazão do reagente N,N-dietil-p-fenilenediamina 0,1% m/v de 2,5 mL min⁻¹ e da solução transportadora em 4,4 mL min⁻¹, foi também investigado. O maior sinal analítico foi alcançado em uma vazão de 1,4 mL min⁻¹, sendo então selecionado.

Finalmente foi investigado o efeito da vazão de 1,4; 2,5; 3,6 e 4,4 mL min⁻¹ do reagente N,N-dietil-p-fenilenediamina 0,1% m/v sobre o sinal analítico. Nesse estudo fixou-se a vazão do reagente hexacianoferrato(III) de potássio 0,5% m/v em

1,4 mL min⁻¹ e da solução transportadora (tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7)) em 4,4 mL min⁻¹. Houve um aumento do sinal analítico até uma vazão de 2,5 mL min⁻¹, diminuindo em vazões superiores. Desta maneira utilizou-se a vazão de 2,5 mL min⁻¹ para a solução de N,N-dietil-p-fenilenediamina 0,1% m/v em todo este trabalho.

Efeito dos comprimentos das bobinas reacionais

Estudou-se o efeito dos comprimentos das bobinas reacionais (bobinas B₁ e B₂) de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 cm (volumes de 250 a 1500 µL), sobre o sinal analítico obtido. Observou-se que para os comprimentos de 50, 150, 200, 250 e 300 cm os sinais transientes obtidos foram inferiores aos sinais obtidos com as bobinas reacionais de 100 cm. Assim, selecionou-se bobinas de 100 cm (500 µL) de comprimento.

Curva analítica

A curva analítica foi obtida por injeções sucessivas em triplicata de volumes de soluções de referência de cloridrato de piridoxina nas concentrações variando de 0,5 a 6,0 mg L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0), vazões de 4,4; 1,4 e 2,5 mL min⁻¹ para a solução transportadora (tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0)), solução de hexacianoferrato(III) de potássio 0,5% m/v e N,N-dietil-p-fenilenediamina 0,1% m/v, respectivamente, alça de amostragem de 100 cm e bobinas reacionais de 100 cm. Observou-se que o método apresentou boa linearidade, naquele intervalo de concentração de cloridrato de piridoxina estudado, com um limite de detecção de 0,02 mg L⁻¹ (três vezes o sinal do branco/inclinação da curva analítica), limite de determinação de 0,5 mg L⁻¹ e frequência analítica de 62 h⁻¹. Os sinais transientes obtidos para aquelas soluções de referência de cloridrato de piridoxina e soluções de amostras são apresentados na Figura 4.

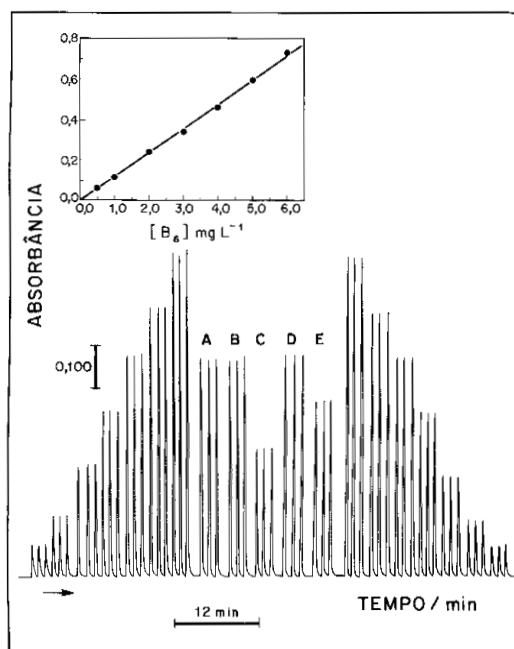


Figura 4. Sinais transientes obtidos em triplicata. Soluções de referência de cloridrato de piridoxina nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; e 6,0 mg L⁻¹, soluções de amostras em triplicata (A, Cristália injetável; B, Cristália em pó; C, Complexo B da Roche; D, Citoneurim e E, Doxal) e soluções de referência em triplicata. As condições do sistema de injeção em fluxo são as mesmas especificadas na legenda da figura 3.

Tabela 1. Resultados de adição e recuperação de vitamina B₆ (Cloridrato de Piridoxina) em três concentrações padrão diferentes.

Amostra	Cloridrato de Piridoxina (mg L ⁻¹)		
	Adicionado	Recuperado	Recuperação(%)
Complexo B (Cristália-injetável)	2,0	2,0	100,0
	4,0	3,9	97,5
	6,0	5,9	98,3
Complexo B (Cristália -pó)	2,0	2,0	100,0
	4,0	4,1	102,5
	6,0	6,2	103,3
Complexo B(Roche)	2,0	2,0	100,0
	4,0	4,1	102,5
	6,0	6,1	101,7
Citoneurim	2,0	2,0	100,0
	4,0	3,9	97,5
	6,0	5,9	98,3
Doxal	2,0	2,0	100,0
	4,0	4,0	100,0
	6,0	6,1	101,7

n=5

Tabela 2. Determinação de cloridrato de piridoxina em formulações farmacêuticas usando o método espectrofotométrico e espectrofotométrico por injeção em fluxo.

Amostra	Cloridrato de Piridoxina (mg/drágea) ou (mg/mL)*			Erro Relativo(%)		CV (%)
	Rotulado	Espectrofotométrico	FIA*	E ₁	E ₂	
Complexo B Cristália (injetável)	50	49,8±1,4	50,2±1,1	+0,4	+0,8	0,5
Complexo B Cristália(pó)	2	2,1±0,5	2,1±0,2	+5,0	0,0	0,2
Complexo B Roche	2	2,1±0,2	2,1±0,3	+5,0	0,0	0,3
Citoneurim	200	201,6±1,2	198,7±1,3	-0,7	-1,5	0,2
Doxal	80	79,9±0,2	80,4±0,3	+0,5	+0,6	0,8

*n=3, nível de confiança 95%

E₁ = erro relativo entre o método FIA e o valor rotuladoE₂ = erro relativo entre os métodos FIA e espectrofotométrico

Estudos de seletividade e de adição e recuperação

Estudou-se o efeito de algumas substâncias geralmente presentes nas amostras comerciais como cloridrato de tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂), cianocobalamina (vitamina B₁₂), vitamina E, ácido ascórbico, ácido cítrico, amido, glicose, lactose, sacarina, sacarose e sulfatos de cobre(I), ferro(II), magnésio(II), manganês(II) e zinco(II) sobre o sinal analítico. Desses compostos investigados, somente as soluções de vitamina B₁₂ e vitamina E causaram alguma interferência positiva no procedimento FIA desenvolvido quando inseridas em concentrações dez vezes superior a concentração de vitamina B₆. No entanto, essas vitaminas estão presentes nos formulações farmacêuticas em concentrações muito menores (aproximadamente 10 vezes menores) que a do analito de interesse, não causando assim qualquer interferência no procedimento FIA proposto.

A Tabela 1 apresenta os resultados encontrados de adição de padrões de vitamina B₆ em formulações farmacêuticas para três concentrações (2,0; 4,0 e 6,0 mg L⁻¹) de soluções de referência desta vitamina. A recuperação de vitamina B₆ variou de 97,5 a 103,3, indicando assim ausência de interferências das matrizes dessas amostras ensaiadas.

Aplicação

A Tabela 2 apresenta os teores de vitamina B₆ encontrados em cinco formulações farmacêuticas comerciais empregando-se um método oficial²³, o procedimento em fluxo proposto e também os valores rotulados.

Os resultados encontrados utilizando-se o procedimento espectrofotométrico em FIA estão em boa concordância com aqueles resultados encontrados usando-se o método da farmacopéia americana²³ (r=0,9997) ou teor declarado pelo fabricante (r=0,9998) e dentro de um intervalo de erro aceitável, mostrando adequabilidade do procedimento desenvolvido, que pode ser adaptado em laboratórios de análise de rotina.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro recebido do CNPq, CNPq/PADCT, FAPESP, FINEP, bem como bolsa de doutorado do CNPq do aluno CA.

REFERÊNCIAS

1. Korolkovas, A.; Burckhalter, J. H.; *Química Farmacêutica*;

- 1^aed.; Guanabara Dois, Rio de Janeiro, R. J., 1982, pp.655, 664-666.
2. Augustin, J.; *Vitamin Analysis*, in: Introduction to the Chemical Analysis of Foods, Nielsen S. S., Ed., Jones and Bartlett Publ., Boston, 1994, pp. 251-260.
 3. Endo, H.; Kamata, A.; Hoshi, M.; Hayashi, T.; Watanabe, E.; *J. Food Sci.* **1995**, *60*, 554.
 4. Leinert, J.; Simon, I.; Hoetzel, D.; *J. Vitam. Nutr. Res.* **1983**, *53*, 156.
 5. Zhao, Y. F.; Zhang, S. Y.; *Lihua Jiyan, Huaxue Fence* **1996**, *32*; Apud A. A 100, 5807F00252, 1997.
 6. Novokhatskii, N. K.; *Gig. Sanit* **1987**, *8*, 47; Apud A. A 5002F00009, 1987.
 7. Leyland, D. M.; Evershed, R. P.; Edwards, R. T. H.; Beynon, R. J.; *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* **1992**, *119*, 179.
 8. Morrison, L. A.; Driskell, J. A.; *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* **1985**, *38*, 249.
 9. Tsuge, H.; Oda, T.; Miyata, H.; *Biochem. Soc. Trans.* **1986**, *14*, 195.
 10. Bitsch, R.; Moeller, J.; *J. Chromatogr.* **1989**, *463*, 207.
 11. Bergaentzle, M.; Arella, F.; Bourguignon, J. B.; Hasselmann, C.; *Food Chem.* **1995**, *52*, 81.
 12. Morelli, B.; *Anal. Lett.* **1994**, *27*, 2751.
 13. Iskra, M.; Mielcarz, G.; *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* **1983**, *34*, 161, Apud A. A. 4608, 1984.
 13. Iskra, M.; Mielcarz, G.; *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* **1983**, *34*, 161; Apud A. A. 4608F00036 (1984).
 14. Sane, R. T.; Doshi, V. J.; Joshi, S. K.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1983**, *66*, 158.
 15. Dai, Z.; *Yaouxue Tongbao* **1986**, *21*, 77; Apud A. A. 4811J00147, 1986.
 16. Zhang, Z.; Li, Y.; Mao, D.; Cosofret, V. V.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1990**, *8*, 385.
 17. Gong, X. F.; Huang, J. F.; Ni, Y. N.; *Fenxi Huaxue* **1994**, *22*, 935; Apud A. A. 5703G00134, 1994.
 18. Li, Y.; Huang, X.; Xu, J.; Chen, J.; *Fenxi Huaxue* **1991**, *19*, 538; Apud A. A. 5406G00121, 1991.
 19. Lima, J. L. F. C.; Montenegro, M. C. B. S. M.; Silva, A. M. R.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1991**, *9*, 1041.
 20. Liu, W. Z.; Wang, C. D.; Chen, H.; *Yaowu Fenxi Zazhi* **1994**, *14*, 14; Apud A.A. 5612G00108, 1994.
 21. Jayaram, B.; Gowda, N. M. M.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1986**, *69*, 47.
 22. Official Methods of Analysis; 40^a ed.; 1984, p. 664.
 23. The United States Pharmacopeia - The National Formulary - USP-23, NF-18; 1995, pp. 1347,1348.
 24. Costa-Neto, C. O.; Pereira, A. V.; Aniceto, C.; Fatibello-Filho, O.; *Talanta* **1999**, *48*, 659
 25. Aniceto, C.; Pereira, A. V.; Costa-Neto, C. O., Fatibello-Filho, O.; *Laboratory Robotics and Automation* **1999**, *11*, 45.
 26. Strohecker, R.; Henning, H. M.; *Analisis de Vitaminas*; Trad. Mayor, F., Ed. Paz Montalvo; Madrid, 1967; pp. 151-184.
 27. Manousek, O.; Zuman, P.; *J. Electroanal. Chem.* **1960**, *324*, 165.