

29
96



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DE VITAMINA B₁₂ EN UNA SUSPENSION
COLOIDAL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO
IONICO.

T E S I S

Que para obtener el título de
Químico Farmaceutico Biólogo

p r e s e n t a

Antonio Pinal Ibarra



México, D. F.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA:

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

PRESIDENTE : QFB ISAURA LUISA CARRERA GARCIA.

VOCAL : QFB JOSE MANUEL CALEDENAS GUTIERREZ.

SECRETARIO : QFB MA. DE LOURDES GARZON SERRA.

1er. SUPLENTE : QFB JOSE ALEJANDRO BAEZA REYES

2do. SUPLENTE : QFB CONSUELO ARELLANO BORJAS

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: GRUPO ROUSSEL S.A.

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL ASESOR: QFB ISAURA LUISA CARRERA GARCIA

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL SUSPENDENTE: ANTONIO PINAL IBARRA

I N D I C E

	Página
1.0 Introducción	1
2.0 Generalidades	3
2.1 Métodos de Análisis de Vitamina B 12	3
2.2 Métodos Químicos y Físicos	3
2.3 Métodos Biológicos	3
2.4 Métodos de Separación de Mezclas	5
2.5 Cromatografía	6
2.5.1 Proceso de Reparto Multinomial	6
2.5.2 Proceso Continuo de Adsorción	7
2.5.3 Proceso de Intercambio Iónico	9
2.6 Resinas de Intercambio Iónico.	10
2.7 Teoría del Cambio Iónico	15
2.8 Cinética del Cambio Iónico	23
2.9 Tipos de Análisis en Cromatografía de Inter- cambio Iónico	28
2.10 Características Principales de Resinas	31
2.11 Estructura Química de Cianocobalamina.	35
2.12 Acción Farmacológica	40
3.0 Parte Experimental	43
3.1 Separación de Solución Problema	44
3.2 Eliminación de Excipientes Interferentes y Elección de la Resina de Intercambio -- Iónico	47

	Página
3.3 Técnica Analítica	62
3.4 Cálculos	66
4.0 Resultados	67
4.1 Análisis Estadístico de los Resultados - Obtenidos	68
5.0 Conclusiones	69
6.0 Referencias Bibliográficas	70

INTRODUCCION

La vitamina B - 12 (Cianocobalamina) se ha convertido en un producto indispensable en la nutrición humana a partir de que, en 1948 se descubrió que actúa como factor principal para evitar la anemia perniciosa.

Debido a ello es muy común encontrarla tanto en productos nutricionales, así como en tratamientos médicos preventivos y correctivos. Por consiguiente existe una gran variedad de productos que contienen en su formulación esta vitamina; ya sea como único principio activo o en combinación con otras vitaminas, con otros principios activos y/o con proteínas y minerales.

En general, los análisis químicos de aquellas preparaciones farmacéuticas que contienen Cianocobalamina como único principio activo no son problemáticos; pero como un gran porcentaje de medicamentos existentes son mezclas complejas de varias vitaminas y otros principios activos, el análisis de estos productos es más complicado: pues se requieren técnicas analíticas más sofisticadas, mayor tiempo y sobre todo una atención especial a la verificación de los resultados obtenidos.

En el presente trabajo se propone una técnica para cuantificar la vitamina B-12 en una mezcla compleja de vitaminas y excipientes; empleando para ello: Cromatografía de Intercambio Iónico como método de separación.

En el producto estudiado se intentó cuantificar la cianocobalamina por métodos microbiológicos, pero todos fracasaron, pues la baja

concentración de vitamina B-12, la presencia de otras vitaminas y los excipientes empleados impidieron la determinación satisfactoria de la vitamina.

Con la implementación de este método analítico se pretende obtener una técnica mediante la cual se reduzca el tiempo de análisis, sea de bajo costo y cuyos resultados sean reproducibles y confiables.

GENERALIDADES

2.1 Métodos de Análisis de vitamina B-12.

Una gran variedad de métodos se han desarrollado para la determinación de Cianocobalamina; todos ellos basados en las características tanto fisicoquímicas como bioquímicas que posee la vitamina.

A continuación se da un esquema general de los métodos existentes: (1)

2.2 Métodos Químicos y Fisicoquímicos.

2.2.1 Análisis Espectrofotométrico Visible.

2.2.2 Determinación Espectroscópica por Absorción Atómica.

2.2.3 Determinación Colorimétrica con 1-nitroso-2 naftol sulfonato disódico.

2.2.4 Análisis por Trazas Radioactivas

2.2.5 Determinación por Titulación Radiométrica Quelante.

2.2.6 Método de Distribución a Contracorriente.

2.2.7 Determinación por Cromatografía en Papel.

2.2.8 Determinación por Cromatografía en Capa Fina.

2.3 Métodos Biológicos.

2.3.1 Métodos Microbiológicos.

2.3.1.1 Análisis con Lactobacillus leichmanni.

2.3.1.2 Determinación con Lactobacillus lactis. Dorner.

2.3.1.3 Determinación con Ochromonas mallamensis.

2.3.1.4 Determinación con Euzlena gracilis.

Todos ellos varían en complejidad, tiempo y costo de análisis.

Los métodos biológicos requieren más tiempo de análisis y son más costosos; pero una vez estandarizado el método, aportan datos muy importantes sobre la concentración activa de la vitamina B-12.

Los métodos fisicoquímicos son fáciles de desarrollar, muy reproducibles; pero no aportan la información biológica necesaria de la vitamina B-12. La mayoría de ellos se basan en la capacidad de absorción de luz que posee la vitamina B-12.

Las soluciones acuosas de cianocobalamina presentan los siguientes máximos de absorción: (2)

$$\lambda = 278 \text{ nm } (\pm 1 \text{ nm }), \quad E_{1\%}^{1\text{cm}} = 115$$

$$\lambda = 361 \text{ nm } (\pm 1 \text{ nm }), \quad E_{1\%}^{1\text{cm}} = 207$$

$$\lambda = 548 \text{ nm } (\pm 1 \text{ nm }), \quad E_{1\%}^{1\text{cm}} = 63$$

Por el hecho de poseer tres máximos de absorción es absolutamente indispensable la separación previa de la vitamina B-12 de complejos vitamínicos ó de preparaciones polivitamínicas, ya que otras vitaminas y excipientes empleados en su preparación absorben luz en longitudes similares a las anotadas anteriormente.

Debido a que la suspensión problema tratada en el presente trabajo es una mezcla de dos vitaminas (B-12 y B-2) con varios excipientes, es necesaria la separación de la vitamina B-12 de los demás componentes.

Las técnicas de separación que existen, están divididas en tres grandes grupos:

2.4 Métodos de Separación de Mezclas. (3)

2.4.1 Procedimientos Mecánicos: Filtración, Decantación, Centrifugación, Pulverización, Tamizado.

2.4.2 Procedimientos Fisicoquímicos: Separación por dilución, Cristalización, Destilación fraccionada, Arrastre de vapor, Extracción simple, Extracción múltiple, Cromatografía, Electroforesis.

2.4.3 Procedimientos Químicos: Reacciones Químicas Selectivas.

Como la suspensión problema presenta características hidrodinámicas especiales la técnica propuesta más adelante es una conjunción de los procedimientos de separación mecánicos y físicos.

Debido a que la Cromatografía es el método más utilizado para separar cantidades de muestra muy pequeñas; se eligió como técnica de separación, pues la cantidad de vitamina B-12 presente en la suspensión problema, está en el orden de microgramos.

2.5 Cromatografía.

La Cromatografía se define (4) como " el método físicoquímico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales constituye una fase estacionaria y la otra es un fluido que pasa a través ó a lo largo de la fase estacionaria".

La separación se basa en el reparto de los componentes entre dos fases ó en las diferentes velocidades con que se mueven los componentes a través de un medio poroso al ser arrastradas por un disolvente en movimiento; existen tres procedimientos principales para lograr esta separación:

2.5.1 Proceso de Reparto Múltiple.

2.5.2 Proceso Continuo de Adsorción.

2.5.3 Proceso de Intercambio Iónico.

2.5.1 Proceso de Reparto Múltiple.

La separación de una mezcla de sustancias se basa en el reparto que se efectúa entre la fase móvil (eluyente) y la fase estacionaria; esta fase es siempre un líquido, mientras que la fase móvil puede ser un líquido (Cromatografía líquido/líquido), o un gas (Cromatografía gas/líquido).

Las sustancias por separar están en presencia de los disolventes (el eluyente y la fase estacionaria) inmiscibles o poco miscibles.

Cuando una sustancia x se disuelve en dos disolventes y y z ; se disolverá entre ambos de tal manera que cumpla la siguiente relación:

(5)

$$\frac{\text{Concentración de } x \text{ en } y}{\text{Concentración de } x \text{ en } z} = \text{Coeficiente de Reparto}$$

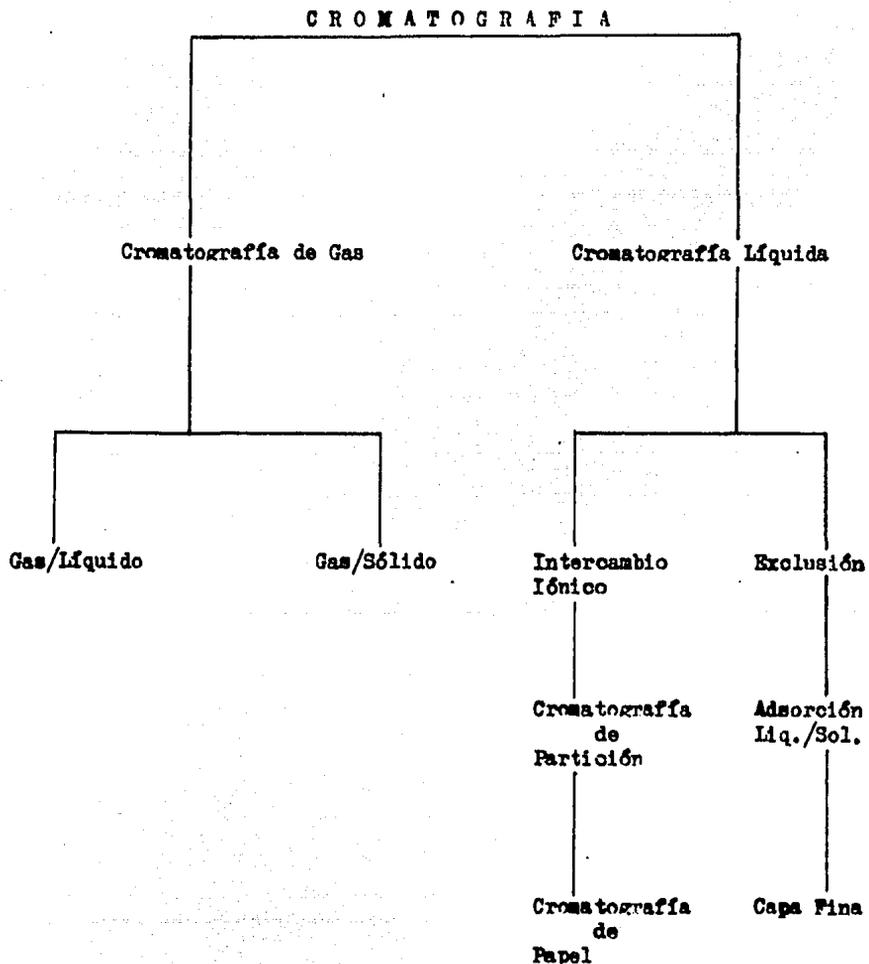
La fórmula anterior se conoce como Ley de Distribución de Nernst o Ley de Reparto.

2.5.2 Proceso Continuo de Adsorción.

La Adsorción es la retención de una especie química por parte de los "puntos activos" de la superficie de un sólido; estos puntos activos son fuerzas moleculares en la superficie de un sólido que se encuentran en estado de insaturación; pues las moléculas o iones no tienen satisfechas todas las fuerzas de unión con otras partículas, por lo que atraen hacia sí, reteniéndolas en su superficie, a las moléculas de los gases o de otras sustancias que se ponen en contacto con ellas.

La separación se realiza por las diferencias de comportamiento en la adsorción de las sustancias a separar. La sustancia atraída hacia la superficie se llama fase adsorbida; y la que se adhiere es el adsorbente; según la fase móvil existe cromatografía de adsorción líquido/sólido y gas/sólido.

La siguiente Tabla No. 1 enmarca los métodos existentes:



Los Geles son partículas esféricas, con una estructura tridimensional de redes de dextrano más o menos uniforme; se fabrican introduciendo un grupo cambiador apropiado en el seno de un gel (como por ejemplo Sephadex).

Las Celulosas de intercambio iónico son derivados de polisacáridos fibrosos.

2.6 Resinas de Intercambio Iónico.

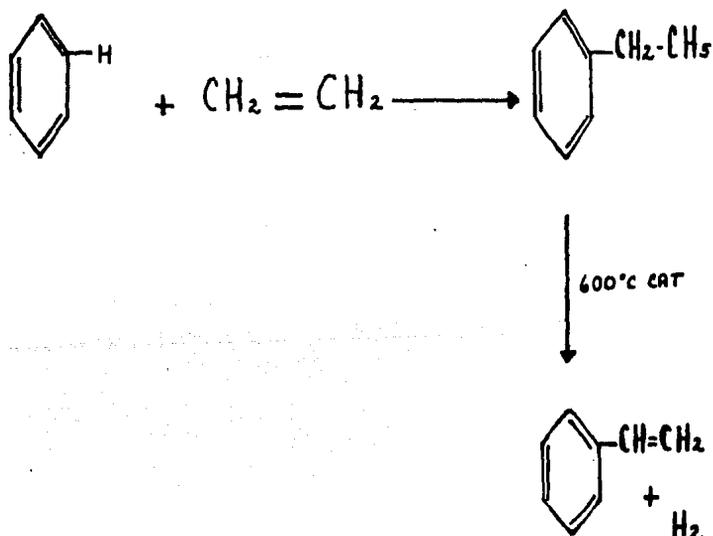
Como ya se anotó anteriormente las resinas son macromoléculas del tipo de polímeros tridimensionales (entrecruzados) que contienen grupos ionizables; son polielectrólitos insolubles que consisten en una parte compleja no difusible con grupos polares y de un ion simple difusible o ion intercambiador; este ion intercambiador está unido a los grupos polares por enlaces electrovalentes o covalencia, constituyendo los grupos activos.

Las resinas que se elaboran por condensación se forman por la mezcla de fenol y formaldehído empleando catalizadores básicos, temperaturas elevadas y una relación adecuada de fenol/formaldehído.

Primero se efectúan reacciones de adición que crean los grupos funcionales en las moléculas del monómero, después se forman moléculas

bi y trifuncionales necesarias para la polimerización; después estos grupos reaccionan entre sí y en este punto existe eliminación repetida de moléculas sencillas de H_2O y de NH_3 dando origen al polímero.

En la polimerización por adición se utiliza divinilbenceno y estireno empleando peróxido de benzoilo como catalizador. El estireno se prepara por la condensación del etileno con el benceno y después de una deshidrogenación se forma la molécula:



La molécula de estireno formada es un producto termoplástico soluble en numerosos disolventes orgánicos; se puede polimerizar por exposición a la luz, al aire y al calentamiento prolongado.

Este polímero es lineal por lo que es necesario agregar un agente reticulante con lo que se obtiene una molécula tridimensional; con dicho fin se utiliza el divinilbenceno.

Al mezclar estireno y divinilbenceno con un estabilizador (alcohol bolivinílico) y un catalizador (peróxido de benzóilo) se forma un copolímero en forma de masa cristalina vítrea, transparente, termoplástica y con dos características primordiales: insoluble y además "hinchable" con muchos disolventes.

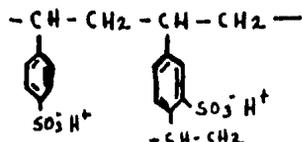
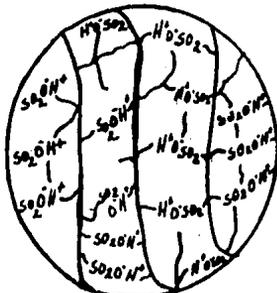
Para integrar al copolímero el grupo iónico se conocen tres métodos; por incorporación a la molécula del monómero antes del proceso de polimerización, por incorporación durante el proceso y por fijación a la estructura del polímero ya formado.

Una resina o intercambiador catiónico se forma al tratar las esferas con ácido sulfúrico, de tal manera que se introducen grupos sulfónicos. (7)

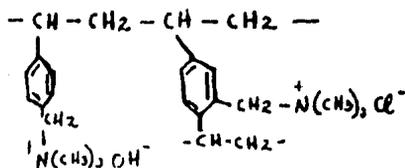
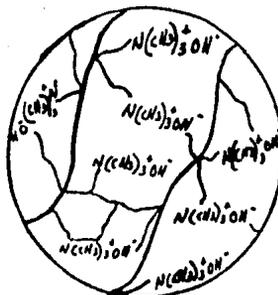
El intercambiador o resina aniónica se produce al agregar éter clorometílico y posteriormente una amina terciaria (por ejemplo trimetilamina) para introducir grupos amino cuaternarios.

La representación clásica de los dos tipos de resina es la siguiente:

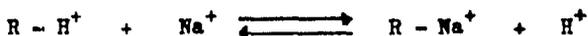
Resina de Intercambio Catiónico



Resina de Intercambio Aniónico



En la resina de intercambio catiónico los iones hidrógeno (H⁺) son los únicos que se pueden intercambiar. La reacción entre esta resina y una solución que contenga sodio sería:



En la resina de intercambio aniónico los iones hidroxilo (OH⁻) son los que pueden intercambiar.



Desde el punto de vista práctico las formas iónicas más empleadas son: en las resinas catiónicas la ácida (H⁺) y la sódica (Na⁺) y en las resinas aniónicas el ion cloruro (Cl⁻) o el hidroxilo (OH⁻).

Se puede convertir una resina de la forma sódica a la forma ácida (y viceversa) dirigiendo el equilibrio de la reacción en la dirección deseada; empleando para ello un gran exceso de solución concentrada que contenga el ion apropiado para dicho fin.

Los requisitos básicos que debe poseer una resina para que "trabaje" con la máxima eficiencia son:

A.- Debe ser completamente insoluble en agua, alcohol, glic-

col u otros disolventes; esta insolubilidad la confiere los enlaces entrecruzados que forman polímeros tridimensionales.

B.- Debe permitir la difusión de los iones a través de su estructura a una velocidad finita y útil; por lo que tiene que ser suficientemente hidrofílica.

En un intercambio iónico suceden dos tipos diferentes de difusión; en película y en gel.

La difusión en película es la primera etapa del intercambio iónico y esta en relación directa a la rapidez del desplazamiento de la solución y al tipo de montaje de la columna intercambiadora; se lleva a efecto en una película inmóvil que se forma alrededor de cualquier grano de resina, el espesor de esta película (llamado "e") es del orden de 10 a 100 micrones.

La difusión en el gel depende de la naturaleza del polímero entrecruzado y del número de mallas en la red.

Este número esta en relación directa con el % de reticulación (cantidad de divinilbenceno) y la regla es que a mayor proporción de divinilbenceno más compacta será la red y menor será su grado de hinchamiento. A un alto grado de reticulación la resina retiene más iones por unidad de volumen, pero los iones se difunden más lentamente y los iones muy grandes pueden ser incapaces de penetrar:

Los iones de radio superior a 4\AA no pueden penetrar en una

resina con un 24 % de divinilbenceno.

La mayoría de las aplicaciones analíticas utilizan resinas con un porcentaje de divinilbenceno del orden del 8 %.

C.- La resina debe poseer un número suficiente de grupos de intercambios activos accesibles que ofrezcan la máxima capacidad de intercambio. Esta capacidad se puede definir como el número de grupos activos por unidad de volumen de la resina hinchada.

Una resina intercambiadora de cationes del tipo de poli-estireno sulfonado con un cruzamiento de 8 % de divinilbenceno retiene cerca de 2 meq de iones por ml de volumen bruto de la columna.

Un intercambiador aniónico formado por una base fuerte de poliestireno con un cruzamiento de enlaces del orden de 8 % retiene un poco más de 1 meq por ml de volumen bruto.

2.7 Teoría del Cambio Iónico.

La teoría del cambio iónico es muy completa, ya que existen un gran número de factores que intervienen en él.

Sin embargo para un mejor entendimiento se acostumbra relacionar los fenómenos efectuados en las resinas con los que ocurren en las soluciones y los coloides.

Para explicar el fenómeno del intercambio iónico se han formulado tres teorías: (8)

2.7.1 Teoría de la red cristalina.- Mediante esta teoría se considera a los constituyentes de la red cristalina de la resina como iones y no como moléculas. Cada ión del cristal está rodeado por un número fijo de iones de carga opuesta (determinado por el número de coordinación del ión) y está sujeto a fuerzas de atracción (que dependen de las cargas relativas de los iones y la distancia de los mismos).

Al colocar este ión en un medio que contenga una constante dieléctrica elevada (como el agua) las fuerzas de atracción que unen el ion al cristal disminuyen de tal forma que se puede efectuar un intercambio de este ion por otro o la reacción con otro ion. Los factores que influyen para que un ion pueda ser reemplazado por otro son:

- a) La naturaleza de las fuerzas que unen al ión al cristal.
- b) La concentración del ión que se intercambia.
- c) La carga del ión que se intercambia.
- d) El tamaño de los iones.
- e) El grado de solubilidad.

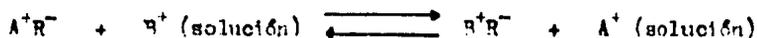
Se considera que este intercambio de iones de la red cristalina y iones de una solución electrolítica es muy similar al intercambio de iones en soluciones electrolíticas.

2.7.2 Teoría de la doble capa eléctrica.- Esta teoría es la menos socorrida ya que propone que los fenómenos del intercambio iónico son idénticos a los fenómenos electrocinéticos de los coloides. Se supone que el intercambio iónico se produce solamente en una doble capa que rodea las partículas de resina.

2.7.3 Teoría de la Membrana de Donnan.- Esta teoría es la que explica en una forma más detallada el fenómeno del intercambio iónico; en ella se simula el cambio iónico como una membrana semipermeable en la que de un lado se encuentra un electrólito; uno de los iones de este electrólito es incapaz de difundirse a través de la membrana. Aunque prácticamente no existe ésta, se considera como una membrana la interfase entre las fases sólida y líquida y la micela coloidal a la cual está unido el ión intercambiador es el ion difusible.

El intercambio iónico es esencialmente un proceso reversible regido por la Ley de Acción de Masas.

El cambio iónico de dos cationes A^+ y B^+ entre una solución y una resina se representa de la siguiente manera:



en donde R^- es la resina y el equilibrio se puede desplazar en cualquier dirección mediante la adición de un exceso de cualquier catión.

Debido primordialmente a la reversibilidad de la reacción se aplica la ley de acción de masas para explicar el equilibrio del intercambio iónico.

$$K = \frac{[\bar{B}] [A^+]}{[\bar{A}] [B^+]}$$

K es la constante de equilibrio y solo depende de la temperatura.

\bar{A} y \bar{B} representan a los iones en fase resina.

Los corchetes representan las actividades termodinámicas de los iones.

Debido a que no existe un método satisfactorio para medir los coeficientes de actividad en la resina y las concentraciones totales de cationes en ambas fases son bajas, se realiza la sustitución de las actividades por las concentraciones, quedando:

$$\frac{(\bar{B}) \cdot (A^+)}{(\bar{A}) \cdot (B^+)} = K_c = (K') \frac{B}{A}$$

K_c se le llama coeficiente de selectividad de la resina ó coeficiente de equilibrio. (9)

No es propiamente una constante ya que cambia con la relación $[B]/[A]$; siendo esta variación más marcada para cationes divalentes que se intercambian con iones hidrógeno; solamente en el caso particular de cambio de iones monovalentes su valor numérico es igual al de factor de separación.

Este factor es más variable cuanto mayor es el grado de reticulación de la resina (% de divinilbenceno).

La constante de intercambio iónico se utiliza para conocer los valores del intercambio y también indica la afinidad relativa de los iones por la resina; la constante depende no sólo de los iones que se intercambian, sino también de la concentración total en la fase resina; la presencia de otros iones en las proximidades del intercambio modifican en gran manera las interacciones electrostáticas entre los iones ligados y sus iones intercambiadores por lo tanto el proceso de intercambio depende de la relación de los iones intercambiables en la fase resina.

Como no es posible dar una escala de afinidad de una resina para iones de valencia diferente, pues depende de la concentración; se puede establecer una escala para iones de la misma valencia pues el factor que influye determinantemente en esta afinidad es el radio iónico hidratado; el cual está en relación directa con la hidratación de los iones.

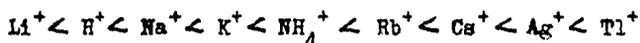
Como regla general el orden de afinidad es en orden decreciente de los radios iónicos hidratados.

En iones de valencia diferente la regla es; la afinidad es mayor en iones de mayor carga; por lo que los iones trivalentes desplazarán a los divalentes y éstos a los monovalentes.

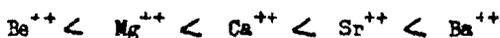
Estas reglas son válidas únicamente en medio acuoso a concentraciones y temperaturas bajas.

En cuanto a afinidad el punto más importante es que las resinas presentan capacidad de diferenciación ó dicho de otra manera muestran preferencia por fijar unos iones con respecto a otros.

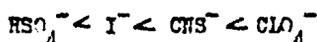
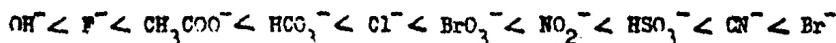
Para las Resinas Polisulfónicas el orden de afinidad creciente para los iones monovalentes es:



En los divalentes es:



Para Resinas Básicas Fuertes :



De lo anterior se concluye que con iones de igual valencia el intercambio aumenta con el número atómico, con el volumen creciente del ion no hidratado o con el radio decreciente del ion hidratado.

Una manera de expresar la afinidad o selectividad para propósitos analíticos; es por medio de un cociente de distribución;

$$f_B = \frac{\text{Concentración de B en el intercambiador}}{\text{Concentración de B en la solución.}}$$

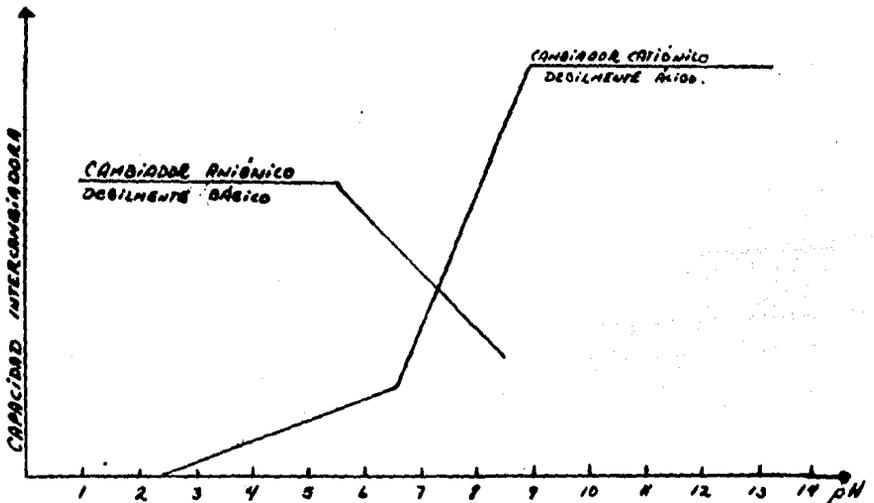
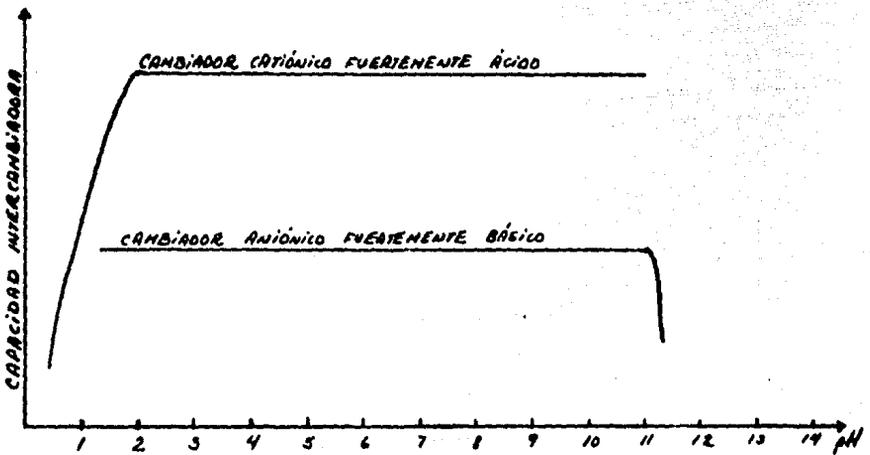
Es un parámetro útil para discutir el comportamiento de la columna ya que es análogo al cociente de distribución de Nernst usado en la extracción con disolventes. Se expresa en las unidades ml de solución x gramo de intercambiador seco.

Este cociente es afectado por el gran número de interacciones entre la resina y la solución iónica.

Entre las interacciones más importantes se tienen las siguientes:

- Factor Estérico.- La red macromolecular de la resina hace el efecto de un tamiz iónico, por donde los iones demasiado grandes no pueden introducirse; es variable de acuerdo al tipo y al grado de reticulación de la resina.

- Influencia del pH .- El pH de la solución es un factor muy importante para lograr el intercambio iónico, ya que puede modificar inmediatamente la ionización del cambiador y por consecuencia disminuir el número de puntos activos de la resina. Para explicar este fenómeno se presentan las gráficas 1 y 2 : (10)



2.8 Cinética del Cambio Iónico.

Debido a que el cambio iónico no es inmediato y requiere tiempo para llevarse a cabo en forma completa, resulta complicado determinar la velocidad del cambio iónico. Con dicho fin se estableció que existen dos tipos de fenómenos en dicho proceso:

- Fenómenos Físicos .- a) Difusión en la película.
b) Difusión en el gel.
(página 14)
- Fenómeno Químico .- Reacción de Cambio.

Resulta de gran utilidad el poder conocer el coeficiente de difusión de los iones en una determinada resina; para tal efecto se utiliza la Ley de Fick:

$$\frac{dC}{dx} = D \frac{d^2C}{dx^2}$$

Donde C son las concentraciones, x y t las variables de espacio y tiempo y D el coeficiente de Difusión; el cual se puede determinar prácticamente en la resina de la siguiente manera:

$$D = \frac{(\text{Solute en intercambiador})}{(\text{Solute en solución libre})} \times \text{Unidad de segmento de columna.}$$

El fenómeno químico o Reacción de cambio ocurre cuando se hace llegar una solución cargada de iones M' a la parte alta de una columna intercambiadora que está bajo la forma RM.

Las primeras capas de resina son invadidas poco a poco por el ion M' y cuando están saturadas se produce la reacción; la que es instantánea.

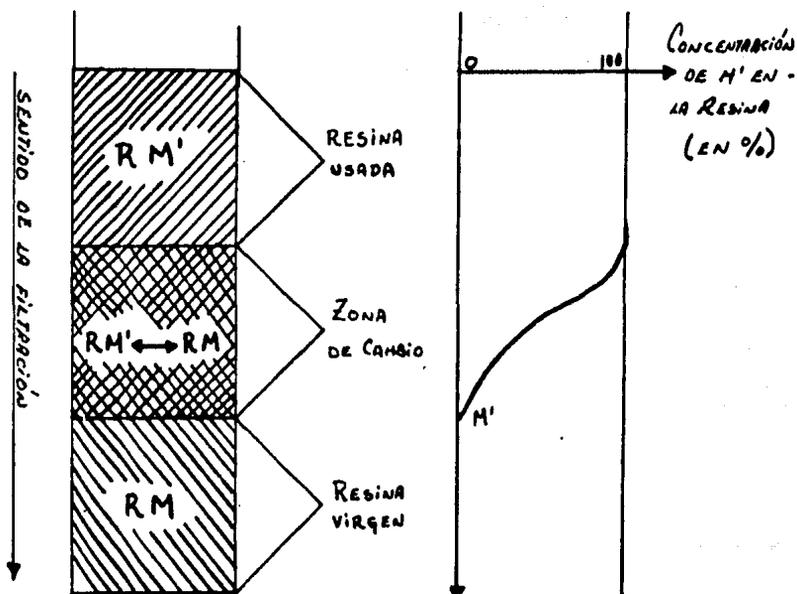
La cantidad de iones M' al reaccionar con los iones de la resina; van disminuyendo, al circular la solución a través de la columna.

La solución al viajar a través de la resina encuentra tres diferentes zonas:

- Zona de Resina Usada.
- Zona de Cambio.
- Zona "Virgen".

El siguiente esquema - Figura 1 - explica los tres tipos de zonas y el proceso efectuado:

Figura No. 1



Los primeros eluatos contendrán únicamente iones M , pero a medida que la zona de cambio se acerque a las últimas capas; las primeras trazas de iones M' saldrán de la columna.

En la zona de cambio existe un nivel estacionario de concentraciones.

La figura anterior es una aproximación al estado real, pues el equilibrio nunca se alcanza debido a que la concentración varía continuamente al descender la solución por la columna.

Si consideramos que la columna esta dividida en varios segmentos imaginarios que se pueden llamar platos teóricos; en cada uno de estos se considera que la solución llega al equilibrio con el intercambiador sólido antes de que se mueva al siguiente plato.

Mientras más angostos sean los platos teóricos más definidas serán las separaciones; los factores que determinan el espesor del plato teórico son:

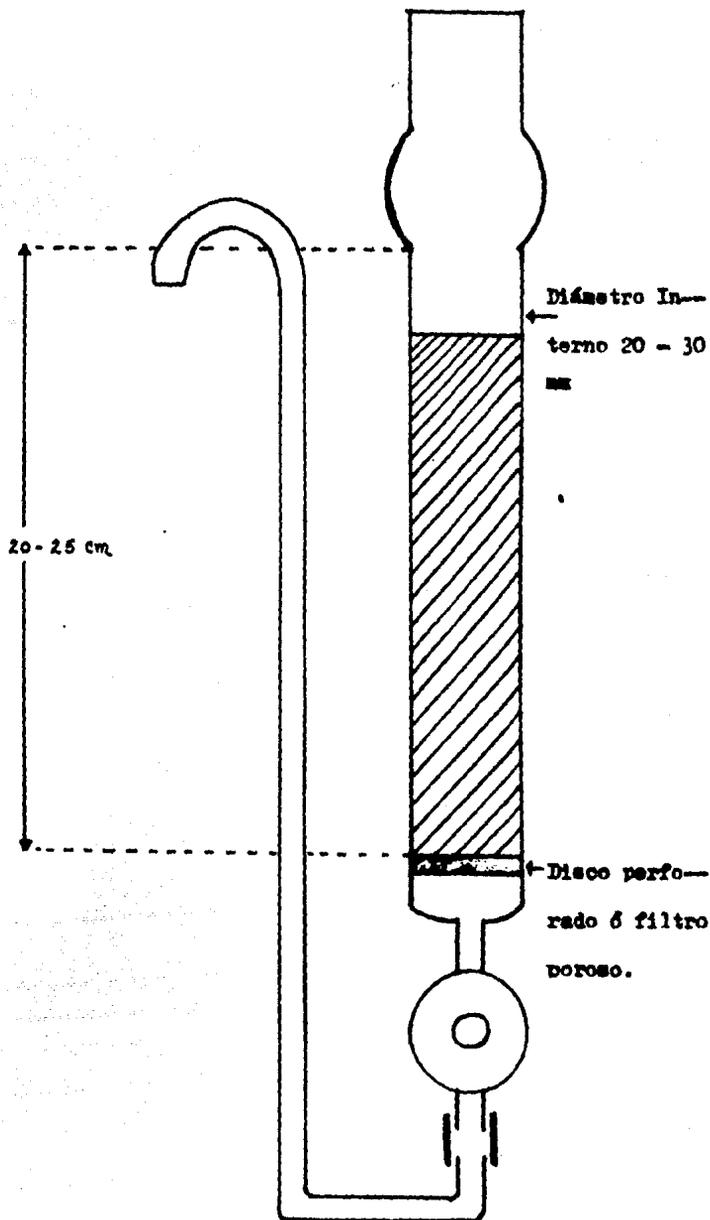
- Tamaño de las partículas del intercambiador.
- Flujo de la solución eluyente (que esta en relación a la velocidad de intercambio iónico y por consiguiente a los tipos de difusión).
- Regularidad del empaçado de la columna.

Para obtener un plato teórico de 1 - 5 mm; se utiliza un tamaño de partículas del orden de 100 a 200 mallas, una velocidad de flujo de 1 ml por cm^2 y un empaçado cuidadoso.

El valor del plato teórico se puede reducir de las siguientes maneras: disminuyendo el flujo, empleando una resina demasiado fina y por último (en caso extremo) elevando la temperatura (va que ello elevará la difusión de la película).

Para obtener una gran eficiencia en Cromatografía de Intercambio Iónico se utiliza la siguiente columna: Figura 2

Figura 2



La columna consiste de una resina contenida en una bureta y soportada sobre un filtro poroso.

El bulbo de la parte superior sirve para: almacenar la solución por analizar, también para recibir la resina, en caso de que se tenga que retrolavar (lavar en forma inversa) para eliminar burbujas de aire indeseables; ya que si existe un gran número de ellas, la cantidad de platos teóricos disminuirá.

La resina nunca debe secarse; con este fin se instala el tubo sifón o cuello de ganso que evitará que esto suceda.

La instalación del tubo depende del tamaño de la resina; para datos prácticos si se utiliza una resina del orden de 100 a 200 mallas sobre una columna de 15 a 20 cms de altura, la tensión superficial provocada evitará que la solución "escurra" hasta secarse.

2.9 Tipos de Análisis en Cromatografía de Intercambio Iónico.

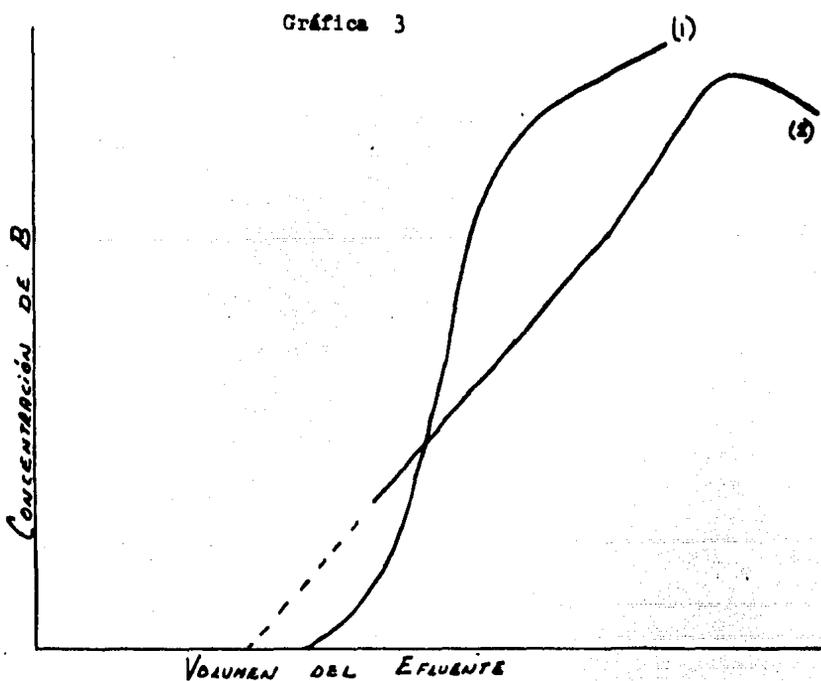
Las columnas de intercambio iónico se utilizan en dos diferentes tipos de análisis :

- Análisis por desplazamiento.
- Análisis por elución.

En los análisis por desplazamiento se hace pasar una solución que contenga iones B a través de una columna que contiene iones sustitubles A.

Los iones B se absorberán totalmente al principio de la columna; pero una vez saturada esta, los iones B pasan adelante.

En los primeros efluentes se encontrarán iones A pero una vez alcanzada la saturación, los primeros eluatos de B saldrán de la columna. La siguiente gráfica 3 muestra una curva de elución para el desplazamiento de iones A por B.



Se obtendrá la curva 1 si la retención (afinidad) de la columna es más grande por los iones B que por los iones A.

La altura o elevación de concentración dependerá del grado de afinidad por la columna; la pendiente se mantendrá en su mismo valor a través del descenso por la columna de la solución.

El grado de la pendiente dependerá del espesor de los platos teóricos.

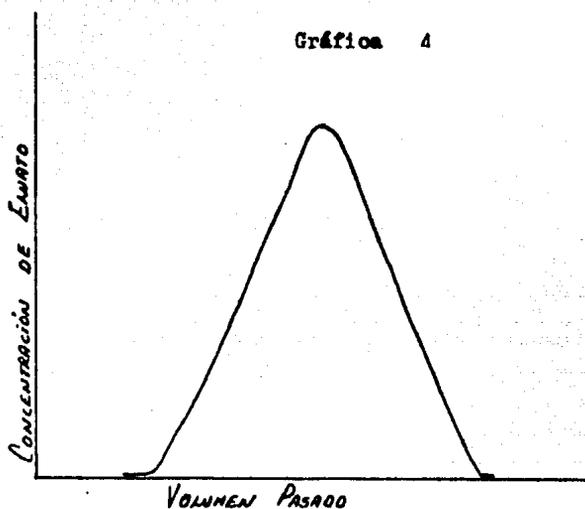
Si la retención es más grande por A se obtiene la curva 2 la cual es difusa.

En los análisis por elución solamente se añade una pequeña cantidad de iones B; los que se desplazarán hacia la salida; haciendo pasar más solución de iones A.

Para que exista una buena separación los iones B deberán retenerse más fuerte que los iones A.

Con este tipo de análisis se pueden separar dos o tres tipos de iones diferentes, ya que, si poseen cocientes de distribución diferentes; descenderán por la columna a diferentes velocidades.

La curva de concentración contra volumen eluido será la siguiente:



La solución de iones A desempeña en este caso el mismo papel que el disolvente puro en los otros métodos cromatográficos; por lo que se puede decir que este tipo de análisis es perfectamente aplicable a la teoría de la elución cromatográfica.

2.10 Características Principales de Resinas.

Las principales características que se deben conocer de una resina intercambiadora son: físicoquímicas y operativas.

Características Físicoquímicas:

- Tipo de intercambiador.

- Estructura polimérica o naturaleza química.
- Forma física.
- Grupo ó estructura funcional.
- Capacidad de cambio.
- Tamaño de las partículas.
- Tamaño del entrecruzamiento (Malla formada).
- Grado de hinchamiento.
- Contenido de humedad.
- Solubilidad.
- Rango de trabajo de pH.

Características de Operación:

- Temperatura máxima de operación.
- Flujo estándar de operación.
- Tipo y concentración del regenerante.
- Cantidad y rapidez de enjuague.

En la siguiente Tabla (No. 2) se resumen las principales características y se establecen las diferentes designaciones comerciales. (11)

Debido a que para el desarrollo del presente trabajo se utilizaron únicamente Resinas Amberlita (Rohm & Haas Philadelphia) la Tabla No. 3 se refiere a sus principales características.

TIPO DE INTERCAMBIO	NATURALEZA QUÍMICA.	FORMA	GRAU FUNCIONAL	DESIGNACIÓN COMERCIAL
CATION	POLIESTIRENO SULFONADO ACIDO FUERTE	ESFERILLAS	$-SO_3H$	AMBERLITA IR-120, DOWEX 50, DUALITA C-20, PERMUTITA Q, ZEOLITA 225
CATION	FENOLICO SULFONADO ACIDO FUERTE	GEL	$-SO_3H$ FENOLICO	DUALITA C-3, ZEOLITA 215, LEONCARB 315, AMBERLITA IR-100 y IR-105, NALCITE HCB
CATION	ACIDO POLIACRILICO ACIDO FUERTE	ESFERILLAS	$-COOH$	AMBERLITA IRC-50, XE-64 y XE-89, ZEOLITA 226 PERMUTITA H-70, DUALITA CS-101
CATION	POLIESTIRENO-FOSFATADO	ESFERILLAS	$-PO_3H_2$	DUALITA C-63, NALCITA X-219
ANION	AMONIO CUATERNARIO TIPO 1 BASE FUERTE	ESFERILLAS	CH_2NH_3OH	AMBERLITA IRA-400, DOWEX 1, DUALITA A-42, DE-ACIDITA-FF, ZEOLITA FF, PERMUTITA S-1, NALCITA SBR
ANION	AMONIO CUATERNARIO TIPO 2 BASE FUERTE PEDO MAS DEBILES QUE TIPO 1	ESFERILLAS	CH_2NR_2OH CH_2CH_2OH	AMBERLITA IRA-410, DOWEX 2, DUALITA I-40, PERMUTITA S-2, NALCITA SAR
ANION	EPOXI POLIAMINA BASE INTERMEDIA	GEL	R_3N y CH_2NR_2OH CH_2H_2OH	DUALITA A-30
ANION	PIRIDINIO BASE FUERTE	GEL	CH_2NH_2	PERMUTITA SK, AMBERLITA IR-48, IR-45
ANION	AMINA PRIMARIA, SECUNDARIA y - TERCIARIA. BASE DEBIL	GEL y ESFERILLAS	CH_2NH_2	DOWEX-3, DUALITA A-7, A-14, ZEOLITA G, NALCITA WBR
FORMADORAS de QUELADOS	ACIDO IMINO DIRECTO	ESFERILLAS	CH_2N $(CH_2COOH)_2$	DOWEX A-1

TABLA 2

NOMBRE	FUNCIONAMIENTO	TAMANO EFECTIVO (MM)	CARGA DE CAMBIO (MG/L)	HINCHAMIENTO %	CONTENIDO DE HUMEDAD	RANGO DE PH	TEMPERATURA MAXIMA DE OPERACION
AMBERLITA IRC-50 ESTRUCTURA DE LA MATRIZ * METACRILATO-DVB-ESFERAS	INTERCAMBIADOR CATIONICO Acido Debil	0.30 - 0.50	3.5	$H^+ \rightarrow Na^+$ 70-100	40-45%	5-14	120°C
AMBERLITA IRC-72 * ACRILICO-DVB-ESFERAS	INTERCAMBIADOR CATIONICO Acido Debil	0.40 - 0.55	2.0	$H^+ \rightarrow Na^+$ 80-85	71-73%	5-14	120°C
AMBERLITA IR-100 * ESTIRENO-DVB GEL	INTERCAMBIADOR CATIONICO Acido Fuerte	0.42 - 0.57	1.5	$Na^+ \rightarrow H^+$ 5-10	56-60%	0-14	120°C
AMBERLITA IR-120 * ESTIRENO-DVB-ESTEROS	INTERCAMBIADOR CATIONICO Acido Fuerte	0.47 - 0.62	1.9	$Na^+ \rightarrow H^+$ 5-7	44-48%	0-14	120°C
AMBERLITA IR-105 * ESTIRENO-DVB-GEL	INTERCAMBIADOR CATIONICO Acido Fuerte	0.42 - 0.57	2.2	$Na^+ \rightarrow H^+$ 5-7	37-41%	0-14	120°C
AMBERLITA IRA-410, 402 * ESTIRENO-DVB-ESFERAS	INTERCAMBIADOR ANIONICO BASE FUERTE	0.40 - 0.50	0.8	$Cl^- \rightarrow OH^-$ 5-10	59-65%	0-14	60°C (OH) 76°C (Cl)
AMBERLITA IRA-410 * ESTIRENO-DVB-ESTEROS	INTERCAMBIADOR ANIONICO BASE FUERTE	0.45 - 0.55	1.0	$Cl^- \rightarrow OH^-$ 16-20	53-64%	0-14	60°C (OH) 76°C (Cl)
AMBERLITA IRA-88 * ESTIRENO-DVB-GEL	INTERCAMBIADOR ANIONICO BASE DEBIL	0.35 - 0.45	1.8	$FB \rightarrow Cl^-$ 16-20	67-83%	0-7	60°C
AMBERLITA IR-45 * ESTIRENO-DVB-GEL	INTERCAMBIADOR ANIONICO BASE DEBIL	0.35 - 0.45	1.8	$FB \rightarrow Cl^-$ 8-12	40-45%	0-7	100°C
AMBERLITA IR-48 * ESTIRENO-DVB-GEL	INTERCAMBIADOR ANIONICO BASE DEBIL	0.30 - 0.45	3.2	$FB \rightarrow Cl^-$ 70-100	40-47%	0-7	60°C

* DVB = DIVINILBENCENO

Tabla 3

2.11 Estructura química de Cianocobalamina (12).

La cianocobalamina se presenta como agujas rojas o polvo cristalino rojo, inodoro e insípido. Aunque posee tres máximos de absorción su cuantificación se realiza utilizando el máximo de absorción a 361 nm.

Pertenece a una serie de sustancias denominadas cobalaminas (13) : cianocobalamina, hidroxocobalamina, aquocobalamina, nitritocobalamina, cobalamida (coenzima B - 12).

Todas ellas poseen cobalto en su molécula en una proporción aproximada del 4%.

Las cobalaminas derivan de una sustancia fundamental, la cobamida que consta de un núcleo central llamado corrina (se da el nombre de corrina al sistema anular macrocíclico de la cianocobalamina sin sus tituyentes periféricos).

La corrina esta formada por 4 anillos pirrólicos con cadenas laterales amídicas unidos al cobalto; éste también se une a través de una cadena de aminopropanol y fosfato a la D-ribosa.

Para que se llegue a formar la vitamina B - 12 , la cobamida se une al dimetilbenzimidazol, como lo muestra la Figura No. 3.

2.12 Acción Farmacologica de la Cianocobalamina.

Para entender mejor esta acción, se deben considerar los siguientes puntos teóricos:

- Se le da el nombre de sistema hematopoiético al conjunto de órganos y tejidos formadores de células sanguíneas. Este sistema esta formado por: médula osea (tejido mieloides), ganglios linfáticos-bazo (tejido linfoide) y sistema reticuloendotelial.

- A la formación de células sanguíneas se le da el nombre de Hematopoesis; ésta se divide en :

Eritropoesis (Formación de Eritrocitos)

Leucopoesis (Formación de Leucocitos)

Trombocitopoesis (Formación de Plaquetas)

Con el fin de explicar detalladamente lo anterior se presenta el cuadro-figura No. 4.

- La cantidad de eritrocitos y de hemoglobina depende de un equilibrio entre su formación y su destrucción.

Los factores que regulan la eritropoesis son de tres tipos:

A) Estimulantes Generales

Anoxia

Eritropoietina.- Glucoproteína que actúa como hormona, cuya función es estimular la formación de eritrocitos.

Factores

Endocrinos.- Secreción tiroidea adrenocortical y los andrógenos.

B) Factores de Formación de la Hemoglobina .- Proteínas y Minerales.

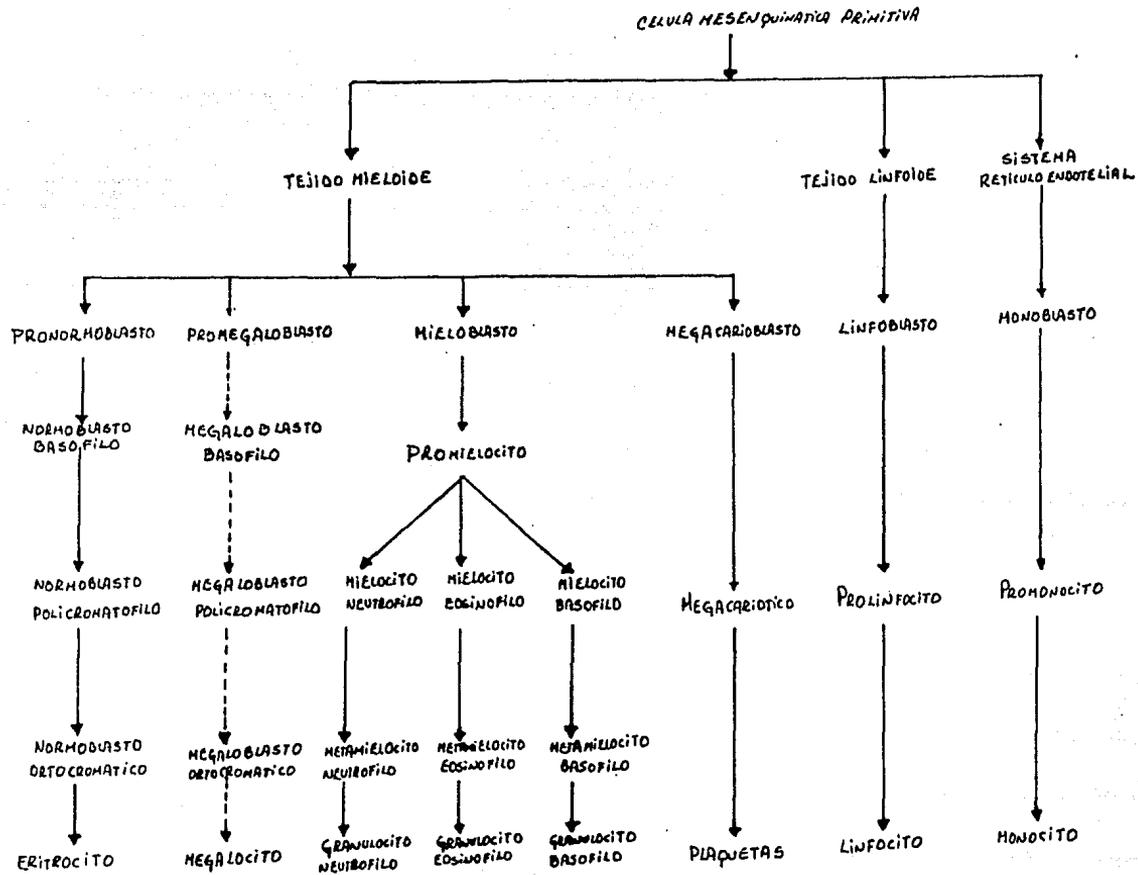


FIGURA No. 4

C) Factores de Maduración.- La presencia de Vitamina B 12 y de ácido fólico producen una adecuada maduración de los eritrocitos.

- Se define Anemia; a la disminución del número de eritrocitos por mm^3 del volumen globular (hematócrito) o de la concentración de hemoglobina en la sangre.

Existen tres tipos de anemia:

A) Macrofítica o Megaloblástica.- Provocada por la deficiencia de vitamina B 12 y ácido fólico.

B) Hipocrómica Microfítica.- Provocada por deficiencia de hierro.

C) Normocítica.- Provocada por la pérdida y destrucción de sangre además por la defectosa formación sanguínea.

La Anemia perniciosa es la forma más común de tipo macrofítica o megaloblástica; por causa de lesiones atroficas de la mucosa gástrica (en la zona de células pépticas) no se forma el factor intrínseco y por tanto no se absorbe ni se aprovecha la vitamina B 12.

El factor o principio antianémico se compone de:

A) Factor Extrínseco.- Vitamina B 12.

B) Factor Intrínseco.- Glucoproteína (P.M. alrededor de 70,000) presente en el jugo gástrico normal. No aparece en enfermos con anemia perniciosa. (14)

Los dos factores se conjugan para dar el principio antianémico.

En la anemia perniciosa la eritropoiesis está desviada, se forman megaloblastos que después dan origen a megalocitos (ver Figura No. 4). Estos eritrocitos anormales son destruidos de manera fácil y rápida por el sistema reticuloendotelial produciendo un aumento de bilirrubina.

Los síntomas de la anemia perniciosa son: mareos, astenia, inapetencia, palpitaciones, disnea, palidez de la piel y mucosas; lesiones nerviosas de tipo degenerativo que afectan los nervios periféricos y sobre todo la médula espinal en los cordones laterales y dorsales dando origen a parálisis, parestesias, hipotonía y pérdida de la sensibilidad.

ACCION FARMACOLOGICA DE VITAMINA B 12.

La presencia de vitamina B 12 o cobalamina produce una ade--

3.0 PORTE EXPERIMENTAL

La suspensión en estudio tiene la siguiente formulación:

Cada 100 ml contienen:

Suspensión Coloidal de Fosfato Tricálcico al 10 %	
(Calcio 0.68 g y Fosfato 0.352 g)	18 ml
Vitamina B 12 (Cianocobalamina)	1000 μ g
Vitamina D ₂ (Ergocalciferol)	6600 U.I.
Vehículo Acuoso Aromatizado c.b.p.	100 ml

El vehículo esta constituido por (en cada 100 ml) :

Ca(OH) ₂	1.8 g
Colorante Rojo No. 2	1.8 mg
Vainillina 100 %	11.466 mg
Aceite Esencial de Limón	3.6 mg
Aceite Esencial de Naranja.	6.8 mg
Alcohol Etilico 96 %	0.6 ml
Acido Sórico	213.0 mg
Carboximetilcelulosa.	760.0 mg
Sacarina Sódica	31.0 mg
Vaselina Líquida	3.04 ml

Esta mezcla compleja provoca que la suspensión problema presente características especiales, tales como: viscosidad de 180 - 220 cps, densidad 1.01 - 1.02 . Estas características provocan que sea casi imposible la percolación directa de la suspensión a través de la resina y por consiguiente la separación de la cianocobalamina.

Durante el desarrollo del análisis se encontraron dos problemas diferentes que fueron los siguientes:

- Separación de la Suspensión Problema.
- Eliminación de excipientes interferentes y elección de la resina de intercambio iónico.

3.1 Separación de la Solución Problema.

Se buscó el medio adecuado para "romper" la suspensión problema la mejor técnica para lograrlo fué agregando disolventes orgánicos.

Se probaron los siguientes disolventes: cloroformo, eter, acetona, acetato de etilo y etanol absoluto; el más eficiente fue etanol absoluto ya que provocó la precipitación total de los agentes suspensores presentes en el vehículo (hidróxido de calcio y carboximetilcelulosa) y se obtuvo una solución sobrenadante conteniendo la totalidad de los principios activos y los excipientes solubles ó miscibles.

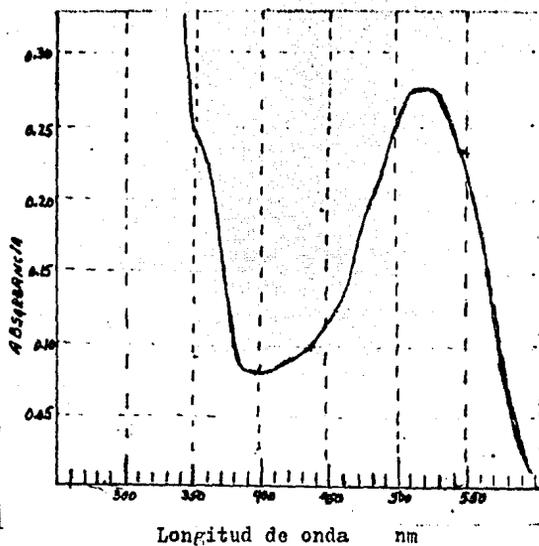
En un principio se intentó separar la vitamina B 12 de la suspensión problema basandose en el método de Van - Melle (15) ; pero debido a que la suspensión en estudio presenta características hidrodinámicas - fisicoquímicas especiales y a la dificultad personal para encontrar Resina Amberlita XE - 97 (según el método de Van - Melle); sólo se aprovecharon algunos puntos prácticos de este método y la gran mayoría de las condiciones se variaron.

Al agregar etanol absoluto a la suspensión (en proporción de 1:1) y agitar suavemente con una varilla de vidrio; se va formando un precipitado blanquecino.

Este precipitado parece ser el resultado de la desnaturalización de la carboximetilcelulosa que "arrastra" al fosfato tricálcico y al hidróxido de calcio.

Una vez separado el precipitado (por simple decantación); la solución resultante se filtró por gravedad a través de un papel filtro Whataman No. 5 y se obtuvo una solución translúcida de color rojo pardizo; a esta solución se le practicó un análisis espectrofotométrico obteniendose la gráfica No. 5.

Gráfica No. 5



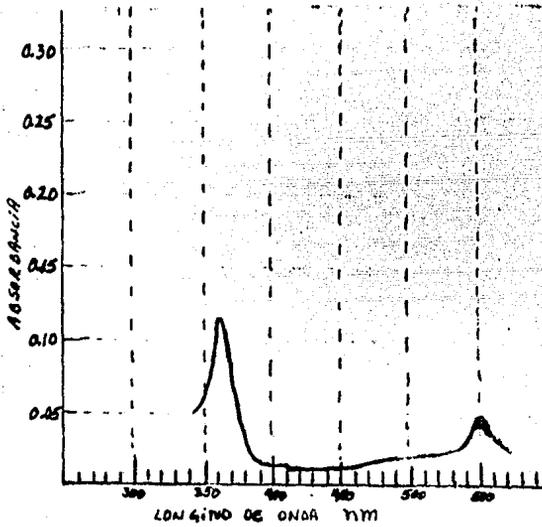
Gráfica de 600 nm. a 260 nm.

Celda de Cuarzo de 1 cm.

Si comparamos la gráfica anterior contra la gráfica espectrofotométrica resultante (gráfica No. 6) de una solución estándar de cianocobalamina (a una concentración de $10 \mu\text{g}/\text{ml}$) leída en las mismas condiciones que la anterior. Se observa que a las longitudes de onda por las cuales se puede identificar a la cianocobalamina, se encuentran tras lapadas y aumentadas; debido posiblemente a los otros excipientes solubles presentes que poseen absorbancias similares o cercanas a la vitamina B12.

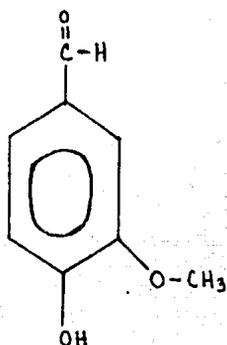
Gráfica No. 6

Espectro de absorción de solución estándar
de Cianocobalamina



3.2 Eliminação de excipientes interferentes y elección de la resina de intercambio iónico.

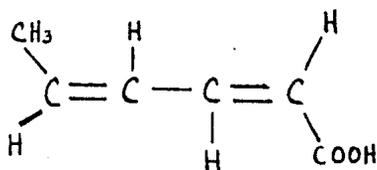
Entre los excipientes que constituyen el vehículo y que en un momento pudiesen interferir en la valoración de la cianocobalamina se tienen los siguientes:

Vainillina

$C_8 H_8 O_5$ P.M. 152.15

Solubilidad.- Soluble en alcohol, cloroformo, eter, soluciones alcalinas y en glicerina.

Absorción Máxima a 308 nm

Acido Sábico

$C_6 H_8 O_2$ P.M. 112.122

Soluble en alcohol y en Eter.

Poco soluble en Agua.

Absorción máxima a 254 ± 2 nm

(en alcohol isopropílico)

Aceite Esencial de Limón

Facilmente soluble en alcohol, miscible en alcohol anhidro soluble en bisulfuro de carbono y en ácido acético glacial.

Absorción Máxima 315 ± 3 nm.

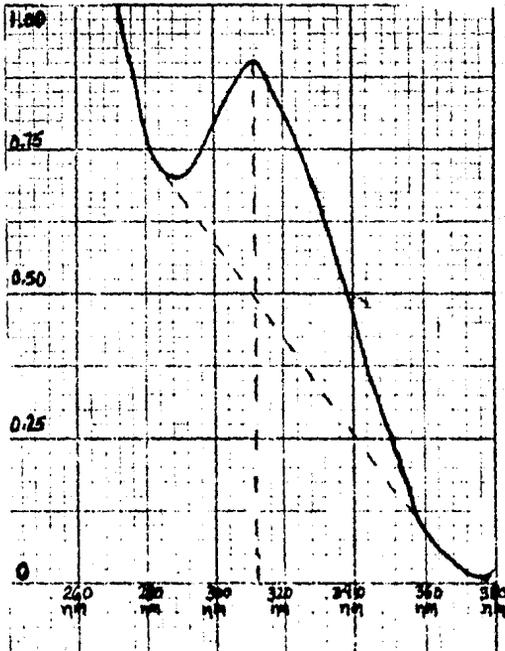
Aceite Esencial de Naranja

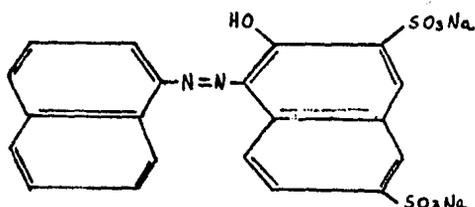
Facilmente soluble en alcohol, miscible en alcohol anhidro soluble en bisulfuro de carbono y en ácido acético glacial.

Absorción Máxima 330 ± 3 nm.

La mezcla de estos aceites esenciales analizada espectrofotométricamente tiene una curva de absorbancia en el rango de 260 a 400 nm, Gráfica No. 7 (16).

Gráfica No. 7





Soluble en Agua, poco soluble en Alcohol.

Absorción máxima 522.5 nm

Como se observará el colorante rojo No. 2 es el único excipiente que pudiese interferir en el rango de 560 nm ya que presenta un máximo de absorción a 522.5 nm .

La absorción máxima de caracterización de la cianocobalamina es 361 nm ; por lo que , los posibles interferentes en este rango son los aceites esenciales de naranja y limón que presentan un máximo de absorción a 315 nm (ver página anterior que muestra la curva espectrofotométrica desarrollada por la mezcla de estos aceites y el máximo obtenido).

El primer excipiente que se trató de eliminar fué el colorante rojo No. 2 ;cuya solubilidad es casi idéntica a la de la cianocobalamina, por lo que no se pudo emplear un disolvente extractante ; debido a ello se recurrió a un método físico de separación.

Con dicho fin se estudiaron cuatro tipos diferentes de Resinas, para tratar de elegir a la que pudiese retener en su totalidad al colorante y permitiese el paso de la cianocobalamina total en sus eluatos.

Las cuatro Resinas estudiadas fueron:

- Amberlita IR - 160 (Aniónica ácido fuerte)
- Amberlita IRA - 402 (Aniónica base fuerte)
- Amberlita IRC - 50 (Catiónica ácido débil)
- Amberlita XD - 96 (Aniónica base débil)

(Estas resinas - sobre todo Amberlitas IRA 402 y IR 160 son menos costosas que la amberlita XE - 97 y se encuentran fácilmente en el mercado ya que son utilizadas en tratamientos de aguas).

Cada una de las resinas se trabajó con cuatro tipos de soluciones:

- Solución de Colorante Rojo ANC No. 2 → Solución A
- Solución de Vitamina B 12 → Solución B
- Solución de Vitamina B 12 y Colorante -
Rojo No. 2 → Solución C
- Solución Problema. → Solución D

En todas estas soluciones se empleó como disolvente una mezcla de etanol:agua en proporción de 1:1 .

El siguiente cuadro-figura No. 5 ilustra la capacidad de separación de los cuatro tipos de resina trabajadas:

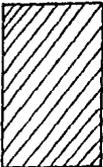
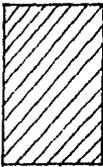
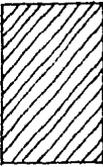
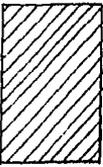
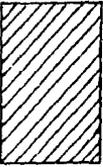
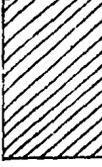
	RESINA ANIONICA ACIDO FUERTE AMBERLITA IR-60	RESINA ANIONICA BASE FUERTE AMBERLITA IRA-402	RESINA CATIONICA ACIDO DEBIL AMBERLITA IRC-50	RESINA ANIONICA BASE INTERMEDIA AMBERLITA XD-96
SOLUCIÓN Ⓐ ↓ COLORANTE ROJO				
SOLUCIÓN Ⓑ ↓ VITAMINA B12				
SOLUCIÓN Ⓒ ↓ VIT. B12 + COLORANTE				
SOLUCIÓN Ⓓ ↓ SQL. PROBLEMA				
CÓDIGO	 NO RETIENE	 SE RETIENE UN COMPONENTE Y SE ELUYE OTRO	 NO RETIENE	 RETIENE TODOS LOS COMPONENTES

Figura No. 5

Como se observará la capacidad de separación difiere en los cuatro tipos de resina.

Las de tipo ácido, tanto débil como fuerte; no retienen ninguno de los componentes de las soluciones eluidas.

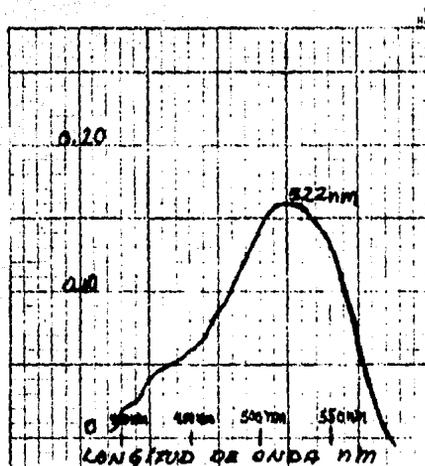
En la resina básica intermedia se realiza una muy buena separación de los componentes; pero no existe una adecuada resolución ya que los compuestos están englobados en una sola banda que no presenta definición alguna.

En la resina aniónica base fuerte ocurren dos fenómenos diferentes: el colorante rojo AMC No. 2 es retenido en su totalidad, pero no así la cianocobalamina, la cual es eluida completamente.

Para comprobar el punto anterior se realizaron varios análisis espectrofotométricos; empleando como resina "separadora" Amberlita IR4 402 (montada sobre una columna de vidrio semejante a la que se ilustra en la figura No. 2).

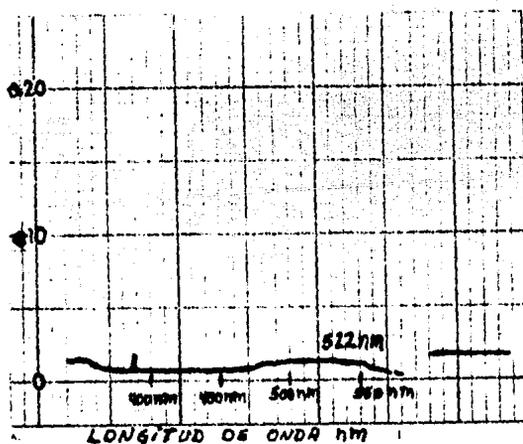
En la gráfica No. 8 se presenta la curva espectrofotométrica desarrollada por una solución de colorante rojo AMC No. 2; leída desde 560 nm a 400 nm, empleando como disolvente una mezcla de agua-etanol (1:1) y a una concentración similar a la presente en la suspensión; pero sin pasar por la columna.

Gráfica No. 8



La grafica No. 9 muestra la curva espectrofotométrica desarrollada por los eluatos resultantes del paso de la solución de colorante rojo a través de la columna de Amberlita IRA - 402.

Gráfica No. 9

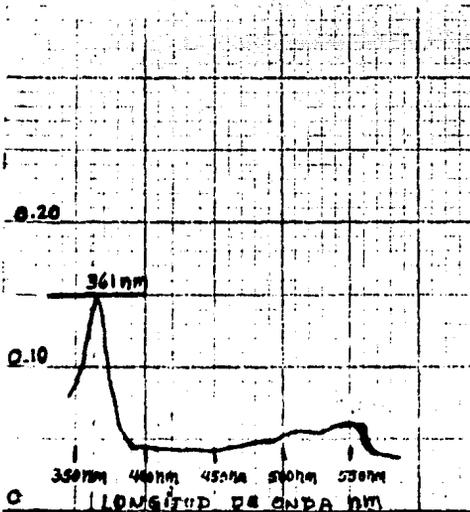


Al analizar las dos gráficas anteriores se confirma que el colorante rojo AMC No. 2 es retenido totalmente por la resina Amberlita IRA - 402.

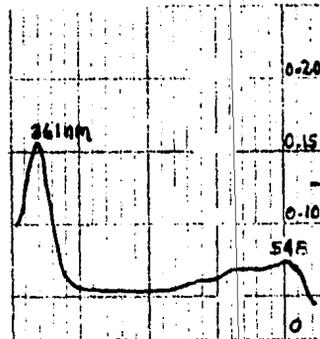
En las gráficas No. 10 y 11 se ilustran las curvas espectrofotométricas obtenidas de una solución patrón de cianocobalamina (1 mg/ml)

Los dos espectrofotogramas están leídos desde 300 nm a 500 nm utilizando agua-etanol (1:1) como disolvente. Con la gran diferencia de que en la gráfica No. 10 la solución de cianocobalamina no fue pasada por la columna y la gráfica No. 11 representa la misma solución pasada por la columna de Amberlita IRA 402.

Gráfica No. 10



Gráfica No. 11



Con el fin de comprobar que la resina seleccionada no retiene nada de cianocobalamina; se procedió a realizar varios análisis espectrofotométricos de soluciones de cianocobalamina.

Las lecturas espectrofotométricas se realizaron antes y después de pasar por la columna que contenía la resina separadora elepida.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

Absorbancia de Sol. Patrón de Vit. B 12 sin pasar por la columna	% recobro	Absorbancia de Sol. Patrón de Vit. B 12 pasada por la columna
0.2126	99.71%	0.2120
0.2020	99.00%	0.2000
0.2000	100.00%	0.2000
0.2120	99.05%	0.2100
0.2000	99.00%	0.1980
0.2000	100.00%	0.2000
0.2200	99.09%	0.2180
0.2053	99.90%	0.2051

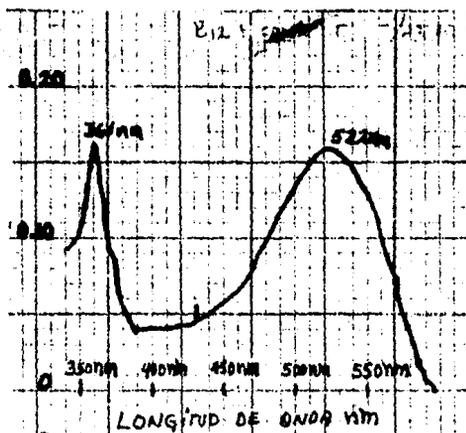
$\% \text{ Recobro o Recuperación} = \frac{\text{Absorbancia de sol. patrón de Vit. B12 pasada/col.}}{\text{Absorbancia de sol. patrón de Vit. B12 sin pasar}}$

$\% \text{ Recuperación Promedio} = 99.46\%$

Con lo anterior se demuestra que la resina seleccionada no retiene cianocobalamina; ya que el $\%$ de recobro cari es el 100%.

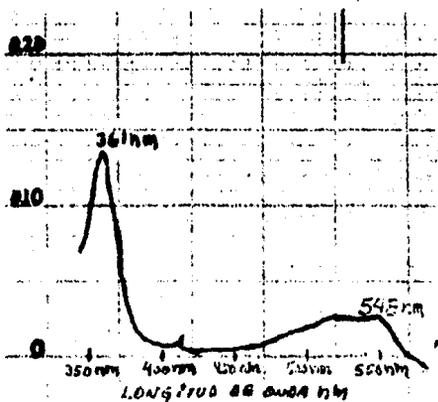
La curva espectrofotométrica desarrollada en la gráfica No. 12 pertenece a una mezcla de colorante rojo No. 2 y cianocobalamina a concentraciones similares a las de la suspensión problema y corrida desde 500 a 300 nm. En ella se observa que la banda más ancha tiene como máximo una lectura de 0.16 a una longitud de onda de 522 nm y la curva de caracterización de la vitamina B 12 a 361 nm tiene un máximo de 0.16.

Gráfica No. 12



La solución anterior fue percolada a través de la columna y - la gráfica No. 13 presenta el análisis espectrofotométrico de sus eluatos.

Gráfica No. 13



Comparando las gráficas Nos. 11 y 13 se distinguen tres puntos importantes:

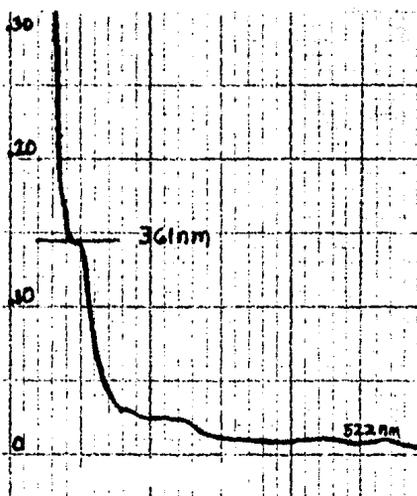
- La banda más amplia ha perdido pronunciamiento y desplazó su máximo de absorción de 522 nm a 560 nm.

- La banda de caracterización de vitamina B 12 a 361 nm ha disminuido su máximo de 0.16 a 0.13.

- Con los dos puntos anteriores se concluye que el colorante rojo AMC No. 2 provoca un traslape de curvas y un aumento de los máximos de absorción.

En la gráfica No. 14 se muestra el espectrofotograma obtenido por la solución problema, después de pasar por la columna y leída en las mismas condiciones que las anteriores.

Gráfica No. 14



Si la gráfica anterior se compara con la gráfica No. 4 ; se notará claramente que el colorante rojo ha sido retenido por la resina ya que no existe absorción alguna a 522 nm.

Sin embargo se observa un hecho importante; la curva de absorción a 361 nm no presenta una resolución definida; esto probablemente se deba a otro excipiente soluble ó miscible en la solución problema que esta interfiriendo y provocando la falta de definición.

Como ya se anotó anteriormente, los posibles excipientes que pudieran interferir, son: los aceites esenciales de limón y naranja; ya que la mezcla de ellos provoca que la curva de caracterización de la cianocobalamina a 361 nm se aumente.

(La gráfica No. 7 muestra la curva espectrofotométrica desarrollada por la mezcla de estos dos aceites).

Lo anterior representó otro punto a resolver, ~~o sea~~, encontrar la forma de eliminar los aceites.

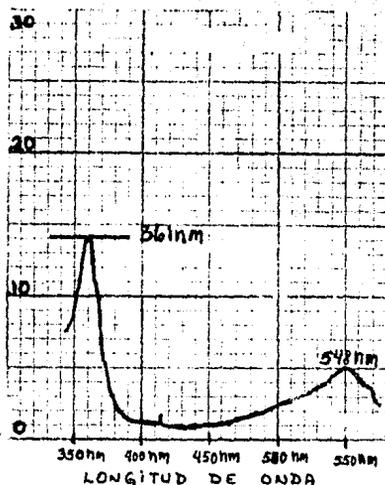
Con dicho fin se buscó un disolvente orgánico que "arrastrara" estos excipientes en una sola extracción y que tuviese las siguientes características; insoluble e inmiscible con la solución problema.

Se probaron tres diferentes disolventes; eter anhidro, cloroforno y acetato de etilo. Todos ellos con las características anotadas arriba y con posibilidad de disolver a los aceites esenciales.

El más eficiente fué eter anhidro pues con una sola extracción de 100 ml logró extraer a los aceites esenciales en una proporción muy aceptable.

La gráfica No. 15 representa la curva espectrofotométrica obtenida por la solución problema después de; ponerla en contacto con 100 ml de eter anhidro en un embudo de separación, separado la porción eterea y por último percolado por la columna de Amberlita IRA - 402.

Gráfica No. 15



Al comparar esta gráfica con las gráficas 6, 10, 11 y 13 (respectivamente) se observa claramente que presentan una gran similitud; por lo que se concluyen los siguientes puntos:

- Las predicciones anotadas para establecer que excipientes estaban interfiriendo resultaron exactas.
- Se pudieron eliminar esos excipientes en forma completa.
- La Resina Amberlita IRA - 402 resultó ser la adecuada para efectuar la separación.
- Al quedar aislada la cianocobalamina se puede cuantificar.

3.3 TECNICA ANALITICA PROMUESTA.

APARATOS

- Columna Cromatográfica de vidrio con filtro poroso: de 30 cm de altura y 2 cm de diámetro; con disco perforado ó filtro poroso.
- Embudo de separación de 250 ml.
- Espectrofotómetro Beckman.

REACTIVOS

- Amberlita IRA - 402 (De Röhm and Haas Philadelphia)
- Solución de NaOH al 1 N.
- Etanol absoluto R.A.
- Eter anhidro R.A.

SOLUCION PROBLEMA

- Suspensión coloidal de "bedoccal".

TECNICA

Preparación de la Columna.

- Pesar aproximadamente 20 g de Resina Amberlita IRA - 402 en un vaso de precipitados y adicionar suficiente agua destilada para suspenderla.
- Dejar reposar aproximadamente 8 horas para lograr el total "hinchamiento" de la resina.
- Colocar la suspensión de Amberlita sobre la columna cromatográfica.
- Lavar la columna con agua destilada; hasta observar que los eluatos obtenidos no presenten turbidez.

(Nota.- Evitar que la columna se seque, procurando que por lo menos exista 0.5 cm de distancia entre el nivel de agua y la superficie de la resina.)

- Adicionar NaOH al 1 N a la columna y dejar reposar por espacio de 1/2 hora.
- Una vez transcurrido ese tiempo; realizar suficientes lavados con agua destilada hasta lograr que los eluatos tengan un pH de 7.
- Logrado el punto anterior, la columna estará activada para efectuar

- el Intercambio Iónico.

ROMPIMIENTO DE LA SUSPENSIÓN Y SEPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN -
PROBLEMA.

- Medir con pipeta volumétrica 100 ml de la suspensión problema y recibir en un vaso de precipitados de 250 ml.
- Adicionar 100 ml de etanol absoluto R.A. y agitar suavemente con una varilla de vidrio, hasta lograr un precipitado oleoso blanquecino.
- Filtrar la solución sobrenadante a través de un filtro Whatman No. 5; primero por gravedad y después por vacío hasta lograr una solución rojiza cristalina.

EXTRACCIÓN DE ACETOS ESENCIALES

- Colocar la solución rojiza en un embudo de separación de 250 ml.
- Adicionar 100 ml de éter anhidro y agitar vigorosamente.
- Dejar reposar y eliminar la fracción éterea.

- Filtrar la solución rojiza obtenida por papel filtro Whatmen No. 5, para lograr una solución transparente. (Sin turbidez que pudiese provocar una lectura espectrofotométrica errónea.)

ELUCION DE LA SOLUCION PROBLEMA

- Percolar la solución rojiza problema a través de la columna cromatográfica, controlando el flujo de salida a razón de 1 ml por minuto.
- Recibir los eluatos en un matraz erlenmeyer.

ANALISIS ESPECTROFOTOMETRICO

- Obtener el máximo de absorción de la solución problema a 361 nm; compararlo contra el máximo de absorción obtenido por una solución patrón de cianocobalamina (previamente pasada por la columna) de concentración 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
(Utilizar como blanco una solución de etanol-agua en proporción de 1:1).

3.4 CALCULOS

- Determinar la concentración de vitamina B 12 en la solución problema de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{A_p}{A_s} \times C_s = C_p$$

- Donde:
- A p = Absorbancia del problema a 361 nm.
 - A s = Absorbancia de la Solución Patrón de Cianocobalamina después de pasar por la columna.
 - C s = Concentración Standar.
 - C p = Concentración de vitamina B 12 en la solución problema.

4.0 RESULTADOS

En la tabla No. 4 se enlistan los resultados obtenidos de 20 determinaciones.

TABLA No. 4

Absorbancia de Solución Patrón de B 12 pasado - por la Columna	Absorbancia del Problema	Concentración del Problema
0.220	0.1955	8.886 $\mu\text{g}/\text{ml}$ = 888.6 $\mu\text{g}/100\text{ml}$
0.202	0.1860	9.207 $\mu\text{g}/\text{ml}$ = 920.7 $\mu\text{g}/100\text{ml}$
0.212	0.1940	9.150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ = 915.0 $\mu\text{g}/100\text{ml}$
0.200	0.1859	9.295 $\mu\text{g}/\text{ml}$ = 929.5 $\mu\text{g}/100\text{ml}$
0.200	0.1900	9.500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ = 950.0 $\mu\text{g}/100\text{ml}$
0.215	0.1880	8.744 $\mu\text{g}/\text{ml}$ = 874.4 $\mu\text{g}/100\text{ml}$
0.210	0.1980	9.428 $\mu\text{g}/\text{ml}$ = 942.8 $\mu\text{g}/100\text{ml}$
0.195	0.1790	9.179 $\mu\text{g}/\text{ml}$ = 917.9 $\mu\text{g}/100\text{ml}$
0.220	0.1890	8.590 $\mu\text{g}/\text{ml}$ = 859.0 $\mu\text{g}/100\text{ml}$
0.200	0.1920	9.600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ = 960.0 $\mu\text{g}/100\text{ml}$
0.205	0.1850	9.024 $\mu\text{g}/\text{ml}$ = 902.4 $\mu\text{g}/100\text{ml}$
0.195	0.1780	9.128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ = 912.8 $\mu\text{g}/100\text{ml}$
0.210	0.1890	9.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ = 900.0 $\mu\text{g}/100\text{ml}$
0.196	0.1750	8.928 $\mu\text{g}/\text{ml}$ = 892.8 $\mu\text{g}/100\text{ml}$
0.192	0.1620	8.437 $\mu\text{g}/\text{ml}$ = 843.7 $\mu\text{g}/100\text{ml}$
0.198	0.1900	9.595 $\mu\text{g}/\text{ml}$ = 959.5 $\mu\text{g}/100\text{ml}$
0.205	0.1850	9.024 $\mu\text{g}/\text{ml}$ = 902.4 $\mu\text{g}/100\text{ml}$
0.210	0.1870	8.904 $\mu\text{g}/\text{ml}$ = 890.4 $\mu\text{g}/100\text{ml}$
0.218	0.1920	9.128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ = 912.8 $\mu\text{g}/100\text{ml}$
0.193	0.1770	9.170 $\mu\text{g}/\text{ml}$ = 917.0 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

4.1 ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

$$\bar{X} = 909.60 \text{ } \mu\text{E}/100 \text{ ml}$$

$$S = 30.60$$

$$S_m = 6.96$$

$$\text{C.V.} = 3.40 \%$$

$$\text{LC } 95 \% = 909.6 \pm 14.71 = (894.84 - 924.32)$$

$$\text{LC } 99 \% = 909.6 \pm 20.13 = (889.47 - 929.73)$$

Al realizar la Prueba Q , tres datos resultaron eliminados (843.7,-
859.0 y 874.4 $\mu\text{E}/100 \text{ ml}$). Por lo tanto el análisis estadístico queda-
ría : (17) y (18)

$$\bar{X} = 918.50 \text{ } \mu\text{E}/100 \text{ ml}$$

$$S = 22.91$$

$$S_m = 5.56$$

$$\text{C.V.} = 2.49 \%$$

$$\text{LC } 95 \% = 918.5 \pm 12.14 = (906.35 - 930.64)$$

$$\text{LC } 99 \% = 918.5 \pm 16.72 = (901.78 - 935.22)$$

5.0 CONCLUSIONES

Comparando los valores estadísticos se observó que en el primer análisis se obtuvo una desviación estandar alta.

Su valor disminuyó notablemente en el segundo análisis, al eliminar los valores marcados por la Prueba Q.

El decremento de la desviación estandar en el segundo análisis provocó también; tanto la disminución del coeficiente de variación así como el aumento de los valores en los límites de confianza.

Con lo anterior se concluye:

- Se obtuvo una buena técnica de cuantificación de la Cianocobalamina. Esta técnica puede llegar a ser bastante confiable y reproducible si se afinan pequeños detalles en la extracción de la -- Cianocobalamina (tales como: una mayor agitación con la varilla, un mejor lavado del precipitado, etc.)
- Se redujo el tiempo de análisis, si se compara contra el utilizado por los ensayos microbiológicos; ya que estos emplean un tiempo mayor tanto en la preparación del equipo así como en la obtención de resultados. Aunque la especificidad es mucho mayor en los ensayos microbiológicos, esta técnica se puede tener como técnica alterna y/o comparativa de aquellos.

- Con el empleo de la Resina Amberlita IRA - 402 se reduce el costo, comparandolo con el uso de Amberlita XE - 97.
Además la misma resina (ya montada en la columna) se puede usar - hasta en cinco determinaciones; por lo que también se abate el costo en relación al material que se tendría que ocupar para cinco ensayos microbiológicos.

- Por otra parte esta resina se puede adquirir fácilmente; ya que es común encontrarla en cualquier industria que opere aparatos desmineralizadores de agua.

- La economía que ofrece esta técnica es considerable pues se pueden realizar varias determinaciones en un solo día.

6.0 Referencias Bibliográficas.

- 1) Kanzur P. : Vitamins
Eds. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa. 1976 pág. 236.
- 2) Strohecker Rolf, Koning Heins W. : Vitamin Assay Tested Methods
1^a Edición New York 1966, pág. 152.
- 3) Abbot Davis, Andrews R.S.: Introducción a la Cromatografía,
Versión Española de Miguel Fernández Braña, 2^a Ed. Alhambra
Madrid 1970, pág. 110.
- 4) Abbot Davis, Andrews R.S.: Introducción a la Cromatografía,
Versión Española de Miguel Fernández Braña, 2^a Ed. Alhambra
Madrid 1970, pág. 115.
- 5) Naron S.F., Prutton C.F. : Fundamentos de Físicoquímica,
Limusa Wiley México 1973 pág. 209.
- 6) Savidan L. : Resinas Intercambiadoras de Iones,
1^a Ed. Española Ed. Alhambra 1967 pág. 1
- 7) Savidan L. : Resinas Intercambiadoras de Iones,
1^a Ed. Española Ed. Alhambra 1967 pág. 3.
- 8) Helman José : Farmacotecnia Teoría y Práctica.

- 1^a Edición Tomo II Cía . Ed. Continental pág. 531.
- 9) Savidan L. : Resinas Interoambiadoras de Iones.
1^a Ed. Española Ed. Alhambra 1967 pág. 34
- 10) Korolkovas Andrejus: Compendio Esencial de Química Farmacéutica
Ed. Reverté S.A. 1978 - 1979 pág. 423.
- 11) Savidan L. : Resinas Intercambiadoras de Iones.
1^a Ed. Española Ed. Alhambra 1967 pág. 78
- 12) Litter Manuel : Farmacología Experimental y Clínica.
Ed. "El Ateneo" Buenos Aires Argentina 5^a Ed. 1975 pág. 1323
- 13) Litter Manuel : Farmacología Experimental y Clínica.
Ed. "el Ateneo" Buenos Aires Argentina 5^a Ed. 1975 pág. 1323
- 14) Litter Manuel : Farmacología Experimental y Clínica.
Ed. "El Ateneo" Buenos Aires Argentina 5^a Ed. 1975 pág 1327
- 15) Van Melle and Al. " A chemical method for Vitamin B 12 concentration in liver injection". J. AM. Pharm. Assoc. Sci.
Ed. 45, 26 (1956).
- 16) The United States Pharmacopeia XXI - Natinal Formulary XVI
Pág. 1277
- 17) Harris C. Daniel : Quantitative Chemical Analysis.
W.H. Freeman and. Company San Francisco USA. 1980.
pág. 57 y 58.
- 18) Dean R.B. and Dixon W.J. : " Simplified Statistics for Small -
Numbers of Observations". Analytical Chemistry 23, 636
(1951).