



13
29

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

F a c u l t a d d e Q u í m i c a

POSIBILIDADES DE APLICACION DE LA RESONANCIA
MAGNETICA NUCLEAR PROTONICA PARA LA DETER-
MINACION CUANTITATIVA DE MEZCLAS DE VITAMI-
NAS "A" Y "D"

T E S I S

Que para obtener el Título de

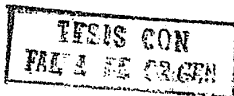
Q U I M I C O

P r e s e n t a

GEORGINA ARTEMISA DUARTE LISCI

México, D. F.

1989





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.

INDICE

	página
INTRODUCCION	1
BASES TEORICAS	4
PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS	11
1).- Vitamina "A"	13
A).- Estudio espectroscópico por RMN de la vitamina "A"-acetato	15
a).- Relación teórica entre la vitamina "A"-acetato y aceite	23
b).- Relación entre la vitamina "A"-acetato y aceite obtenida en la práctica por RMN	24
B).- Estudio espectroscópico por RMN de la vitamina "A"-palmitato	28
a).- Relación teórica entre la vitamina "A"-palmitato y aceite	31
b).- Relación entre la vitamina "A"-palmitato y aceite obtenida en la práctica por RMN	32
2).- Vitamina "D"	35
A).- Estudio espectroscópico por RMN de la vitamina "D ₂ " (Ergocalciferol)	39
B).- Estudio espectroscópico por RMN de la vitamina "D ₃ " (Colecalciferol)	42
C).- Mezcla de vitaminas "D ₂ " y "D ₃ "	46
a).- Relación teórica entre las vitaminas "D ₂ " y "D ₃ " en la mezcla	50

b).- Relación entre las vitaminas "D ₂ " y "D ₃ " obtenida en la práctica por RMN	51
3).- Mezcla de vitaminas "A" y "P"	55
A).- Mezcla de vitamina "A"-acetato y vitamina "D ₂ "	56
a).- Relación teórica en la mezcla "A"-acetato y "D ₂ "	"
b).- Relación entre las vitaminas "A"-acetato y "D ₂ " obtenida en la práctica por RMN	57
B).- Mezcla de vitamina "A"-palmitato y vitamina "D ₂ "	62
a).- Relación teórica en la mezcla "A"-palmitato y "D ₂ "	"
b).- Relación entre las vitaminas "A"-palmitato y "D ₂ " obtenida en la práctica por RMN	64
4).- Aplicación del método en Medicamentos	68
A).- Medicamento I	"
a).- Relación teórica entre la vitamina "A"-palmitato y "D ₂ " en el Medicamento I	72
b).- Relación entre la vitamina "A"-palmitato y "D ₂ " en el Medicamento I obtenida en la práctica por RMN	73
B).- Medicamento II	80
CONCLUSIONES	84
BIBLIOGRAFIA	88

INTRODUCCION

Las vitaminas son compuestos esenciales para el metabolismo de los seres vivos y se encuentran distribuidas ampliamente en los mas diversos productos naturales. El hombre necesita de estos compuestos y los toma directamente de los productos que los contienen o en forma de medicamentos que generalmente son concentrados de un producto natural o compuestos sintéticos.

La investigación sobre métodos analíticos para la determinación de vitaminas es tan abundante como variada. Los primeros estudios tuvieron principalmente una base cualitativa. A partir de observaciones generales se desarrollaron métodos de ensayo, basados en las respuestas animales, para medir la potencia y distribución de las vitaminas. El bioensayo es el procedimiento más antiguo y actualmente se sigue empleando para medir el efecto nutricional, lo cual significa la cantidad del nutriente aprovechable por el animal. También se utiliza como comprobación de otros métodos.

Debido a la necesidad de realizar análisis rutinarios de vitaminas que resultaran más rápidos, económicos y cuyos límites de error fueran reducidos, surgieron los métodos fisicoquímicos con los cuales se logró medir la cantidad total de vitamina presente en una muestra, con resultados reproducibles.

Tanto los métodos biológicos como los fisicoquímicos son válidos dependiendo del fin que se persiga, ya sea la determinación de la actividad biológica o la cuantificación de la vitamina como control de calidad en muestras.

La clasificación general de las vitaminas se basa en su solubilidad, dividiéndose en dos grupos principales: hidrosolubles y liposolubles. Dentro del último grupo se encuentran, entre otras, las vitaminas "A" y "D" que son inestables en presencia de oxígeno y luz, lo que hace que el factor tiempo sea determinante en la eficiencia del método analítico seleccionado para su determinación, y como generalmente el contenido vitamínico en productos naturales es bajo y mayor su tiempo de manipulación, aumentan las probabilidades de error por descomposición de la vitamina.

En medicamentos, los problemas para cuantificar las vitaminas disminuyen porque las concentraciones son mayores y solo hay que eliminar excipientes y antioxidantes.

Los métodos fisicoquímicos empleados para la determinación de vitaminas "A" y "D", y sobre los que más trabajos se han publicado, son: la espectroscopia de Ultravioleta (1), la Cromatografía de gases (2,3) y la Cromatografía en capa fina (1). En la mayoría de estos trabajos la cuantificación se lleva a

cabo separando la vitamina que se desea determinar, de las otras vitaminas, pues su análisis simultáneo causa interferencias en el método.

En este trabajo se emplea la técnica de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN) que desde su aparición en 1945 ha ido ganando cada vez mas importancia, no solo en la determinación de estructuras, sino como arma en el análisis cuantitativo, porque a pesar de que se utiliza mayor cantidad de muestra comparada con otras técnicas, proporciona métodos rápidos, la muestra no se destruye, y en la mayoría de los casos, no se requiere trabajo químico excesivo.

Específicamente, este trabajo se avocó a la determinación cuantitativa y simultánea de vitaminas "A" y "D" en mezclas, lo cual viene a eliminar las desventajas que otros métodos rutinarios presentan.

BASES TEORICAS

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica espectroscópica de gran importancia en la determinación de estructuras moleculares. Los recientes avances en instrumentación y el uso de microceldas y accesorios de computarización han logrado que se extienda su empleo en áreas que requieren una gran exactitud como es el caso del análisis farmacéutico.

La Resonancia Magnética Nuclear es una forma de espectroscopía de absorción. Bajo condiciones apropiadas, una sustancia puede absorber radiación electromagnética en la región de Radiofrecuencia, dependiendo de las características de la muestra.

Las propiedades magnéticas de ciertos núcleos se pueden explicar perfectamente suponiendo que la carga nuclear está girando al derredor de un eje, lo que hace que estos núcleos tengan un momento angular que se representa por el número cuántico de spin, I , al cual se le asignan valores de medio en medio dependiendo del núcleo en particular.

En los núcleos que tienen un número impar de protones o un número impar de neutrones, pero no ambos impares, el número cuántico de spin es fraccionario y depende de este valor el número de orientaciones posibles que puede tener un núcleo frente a un campo magnético. Cada orientación representa un nivel de energía y la Resonancia Magnética Nuclear consiste en detectar las pequeñas canti-

dades de energía emitida o absorbida cuando el núcleo pasa de un nivel energético a otro.

El empleo de la Resonancia Magnética Nuclear depende de la medida e interpretación de cuatro parámetros, estos son:

1).- La posición de la señal o desplazamiento químico:

La posición de la señal sirve para identificar el tipo de protones basándose en su ambiente electrónico circundante y se define como la distancia de una señal de resonancia debido a cierto protón con respecto a una señal de referencia arbitraria. El compuesto de referencia comúnmente empleado es el Tetrametilsilano (TMS: $(CH_3)_4Si$). Este compuesto tiene estructura simétrica y todos los protones son idénticos, por lo que el TMS presenta una sola línea aguda de resonancia en diferente posición a la de las señales originadas por otros compuestos. Además, el TMS es químicamente inerte, relativamente volátil y soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos.

El desplazamiento químico tiene un valor relativo " δ " (Delta) que no tiene unidades específicas pero se da en partes por millón (ppm) y sus valores en Resonancia Magnética Nuclear Protónica van de 0 a 20. Otra forma de expresar el desplazamiento químico es en " τ " (Tau), que equivale a: $10 - \delta$.

2).-Multiplicidad:

La multiplicidad de una banda está determinada por el número de protones "n" magnéticamente equivalentes en átomos vecinos y es igual a: $n + 1$. Si los protones del átomo "B" son afectados por protones de átomos "A" y "C" que no son equivalentes, la multiplicidad de "B" es igual a: $(n_A + 1)(n_C + 1)$ donde n_A y n_C son el número de protones equivalentes de "A" y "C", respectivamente, produciendo una señal múltiple.

3).-Constante de Acoplamiento "J":

La constante de acoplamiento se define como la separación en Hertz entre picos adyacentes en una señal múltiple. El análisis de un espectro de Resonancia Magnética Nuclear Protónica se simplifica considerablemente si la diferencia en el desplazamiento químico de dos grupos que interactúan entre sí respecto a su constante de acoplamiento, es decir, cuando $\Delta\nu / J > 7$, donde " $\Delta\nu$ " es la diferencia de desplazamientos químicos expresada en Hertz. A estos espectros se les llama de primer orden.

4).-Áreas de los picos o Integración:

Uno de los aspectos singulares de los espectros de RMN es la proporcionalidad directa entre las áreas de los picos y el número de núcleos que los producen. Así, si una señal identificable de la muestra no se traslapa con las otras señales de absorción, puede emplearse el área de este pico para establecer el número total de protones del compuesto. Las muestras no necesitan ser com -

pletamente puras. muestras con picos de impurezas no interfieren seriamente con el compuesto analizado si sus absorciones no se sobreponen.

Para la medición directa del área de los picos, los modernos registradores están equipados con integradores electrónicos los cuales alcanzan una exactitud de $\pm 2\%$ lo que los hace útiles para su empleo en análisis cuantitativo. El trazo del integrador se registra sobre el espectro y la altura de los desniveles de la línea de integración nos da la medida del área en unidades arbitrarias. Basada en éste parámetro, la Resonancia Magnética Nuclear se ha utilizado con éxito para el análisis cuantitativo de mezclas; algunos con la adición de un estandar interno el cual debe aparecer como un solo pico fino completamente separado de las señales de los demás componentes con los cuales no debe reaccionar.

Instrumentación:

Un espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear consta de las siguientes partes:

- A).- Un IMAN DE CAMPO INTENSO, estable y homogéneo. El campo debe mantenerse constante en el área de muestras y durante el lapso que dure la determinación.
- B).- Un GENERADOR DE BARRIDO que suministra corriente eléctrica directa variable a un imán secundario, de modo que el campo magnético total aplicado se pueda variar dentro de un margen limitado.
- C).- Un OSCILADOR DE RADIOFRECUENCIA (Transmisor) conectado a una bobina que transmite energía a la muestra en dirección perpendicular al campo magnético.
- D).- Un RECEPTOR DE RADIOFRECUENCIA conectado a una bobina que rodea a la muestra, colocada perpendicularmente respecto al campo magnético.
- E).- Un SISTEMA DE LECTURA que consta de un AMPLIFICADOR y de un REGISTRADOR.
- F).- Un RECIPIENTE PARA MUESTRAS, generalmente un tubo de vidrio.

que se hace girar mediante una turbina accionada con aire, para
homogeneizar el campo magnético sobre la muestra.

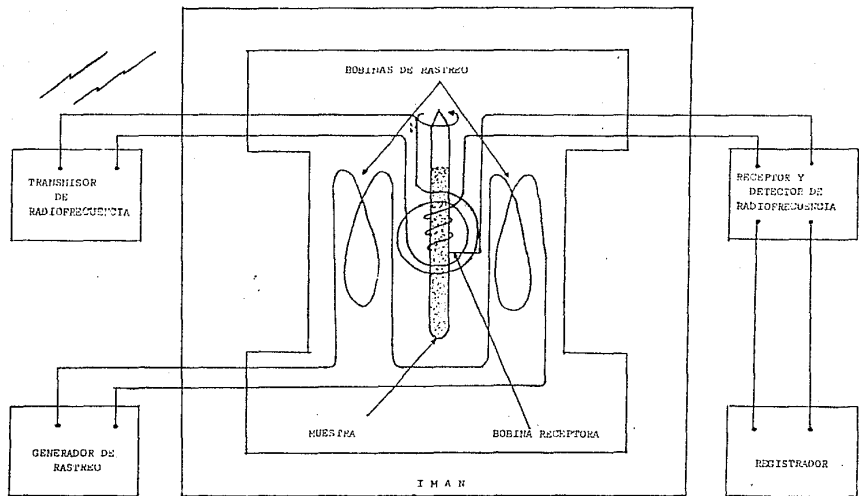


DIAGRAMA ESQUEMATICO DE UN ESPECTROMETRO DE RMN (VARIAN ASSOCIATES)

PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

Patrones y Reactivos utilizados:

- Vitamina "A"-acetato (Retinol-acetato) en aceite.
Merck. Para fines bioquímicos.

- Vitamina "A"-palmitato (Retinol-palmitato).
Merck. Para fines bioquímicos.

- Vitamina "D₂" (Calciferol).
Merck. Para fines comparativos cromatográficos.

- Vitamina "D₃" (Ergocalciferol).
Merck. Para fines comparativos cromatográficos.

- Deuterocloroformo (con y sin Tetrametilsilano).
Merck. Para fines espectroscópicos.

- Tetrametilsilano (TMS).
Merck.

Aparato empleado:

ESPECTROFOTOMETRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

Marca: VARIAN

Modelo: EM-390

Radiofrecuencia: 90 MHZ

Intensidad de campo magnético: 21.140 GAUSS

1.- Vitamina "A"

La vitamina "A" pura es inestable al aire (oxígeno atmosférico), a la luz y a la temperatura. Los ésteres de la vitamina "A", acetato y palmitato, son empleados en preparaciones farmacéuticas por ser más estables, con la ventaja de que conservan las mismas propiedades farmacológicas que la vitamina "A" en forma de alcohol. Para evitar al máximo la posible descomposición de la vitamina "A" se preparan mezclas del éster de la vitamina con aceites, se agregan antioxidantes como pueden ser alfa-tocoferoles, hidroquinona y galato de propilo, entre otros.

La vitamina "A" se ha aislado en forma pura y se elabora por síntesis. Muchos preparados utilizados son concentrados de vitamina "A" de fuentes animales (aceites de peces); por lo tanto, para establecer su actividad deben valorarse estos concentrados en comparación con un preparado patrón.

Como los preparados comerciales vienen valorados en unidades internacionales, debe recordarse que una unidad internacional (U.I.) de acetato de vitamina "A" equivale a 0.344 microgramos de vitamina "A"-alcohol patrón. En cuanto al palmitato de vitamina "A", una unidad internacional equivale a 0.555 microgramos de vitamina "A"-alcohol pura. De modo inverso, un miligramo de vitamina "A"-acetato y palmitato equivalen a 2,900 y 1,800 unidades internacionales de vitamina "A"-alcohol, respectivamente.

En aceites de hígado de peces la concentración de vitamina "A" es de cerca de 600,000 U.I. por gramo. Estos aceites pueden emplearse como tales en forma de concentrados o como materia prima para la obtención de la vitamina "A".

El trabajo experimental desarrollado en esta tesis es el siguiente:

- Estudio espectroscópico por RMN de las vitaminas puras.
- Estudio espectroscópico de mezclas patrón.
- Aplicación del método en medicamentos.

A).- Estudio espectroscópico por RMN de la vitamina "A"-acetato:

Se pesaron 30 mg de vitamina "A"-acetato en aceite de pescado y se disolvieron en 0.3 ml de deuterocloroformo. La muestra se colocó en un tubo de resonancia y se corrió el Espectro No. 1. A continuación se señalan los desplazamientos químicos de los protones de la vitamina (sin tomar en cuenta el aceite) de acuerdo a su estructura molecular (Estructura I):

PROTONES	MULTIPLICIDAD	DESPLAZAMIENTO QUIMICO	
(a)	s	1.0	ppm
(b)	-	1.3-1.7	ppm
(c)	s	2.0	ppm
(d)	-	2.0-2.5	ppm
(e)	d	4.7	ppm
(f)	-	5.6-6.9	ppm

En formas comerciales, el éster de vitamina "A" se disuelve en aceite para evitar al máximo su descomposición. Los aceites en general son mezclas de ésteres de glicerina y ácidos grasos, presentando un espectro tipo. Su estructura general se muestra en la Estructura II.

De acuerdo al Espectro No. 2 (que corresponde a aceite de pescado) podemos señalar los desplazamientos del mismo de la manera siguiente:

PROTONES	MULTIPLICIDAD	DESPLAZAMIENTO QUIMICO	
(A)	-	0.7	ppm
(B)	-	1.3-1.7	ppm
(C)	-	2.0-2.3	ppm
(D)	-	2.8	ppm
(E)	-	4.2	ppm
(F)	-	5.4	ppm

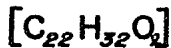
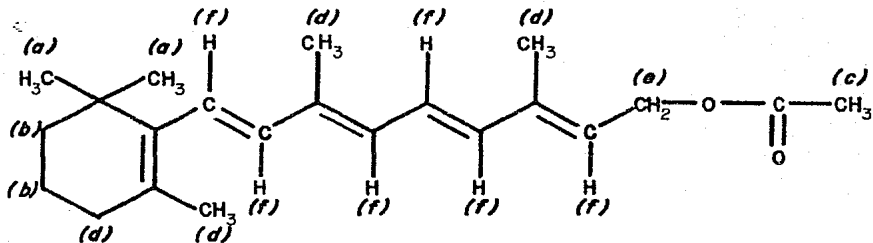
Conociendo ya la interpretación de los desplazamientos químicos relacionados con las estructuras moleculares de la vitamina "A"-acetato y del aceite, analizamos el Espectro No. 3 que corresponde a una muestra de 30 mg de vitamina "A"-acetato en aceite, disuelta en 0.3 ml de deuterocloroformo. Para separar las señales fue corrido este espectro a 5 ppm (con una extensión de campo de 4 ppm más, para registrar todas las señales). A continuación se anotan los desplazamientos químicos correspondientes, utilizando letras mayúsculas para los protones del aceite y minúsculas para los de la vitamina "A"-acetato:

PROTONES	MULTIPLICIDAD	DESPLAZAMIENTO QUIMICO	
(A)	-	0.7	ppm
(a)	s	1.0	ppm
(B)(b)	-	1.3-1.7	ppm
(c)	s	2.0	ppm
(C)	-	2.0-2.3	ppm

(continuación)

PROTONES	MULTIPLICIDAD	DESPLAZAMIENTO QUIMICO
(d)	-	2.0-2.5 ppm
(D)	-	2.8 ppm
(E)	-	4.2 ppm
(e)	d	4.7 ppm
(F)	-	5.4 ppm
(f)	-	5.6-6.9 ppm

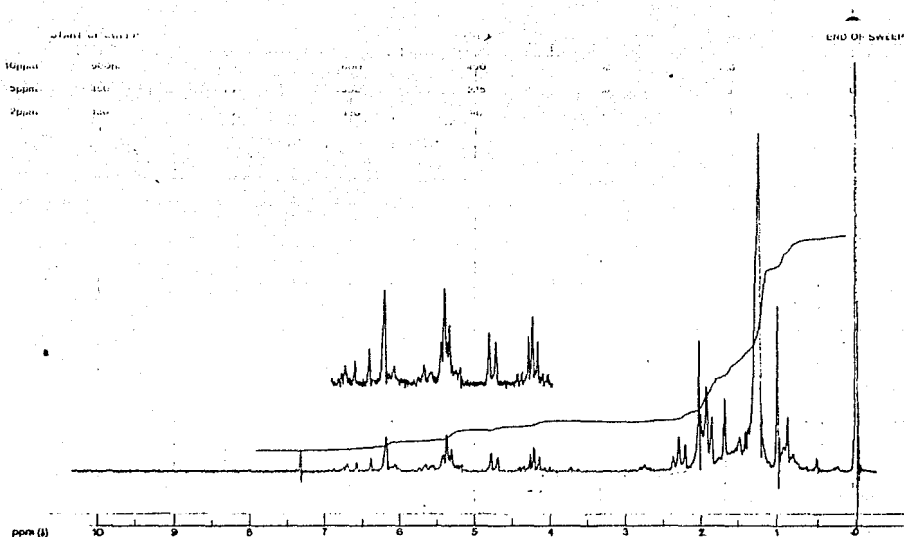
De aquí se pueden elaborar cálculos (como se indica más adelante) para determinar el contenido de vitamina "A"-acetato pura en el aceite, siendo esta técnica el primer aporte de la Resonancia Magnética Nuclear Protónica en la determinación cuantitativa de la vitamina "A".



VITAMINA "A" - ACETATO

ESTRUCTURA I

Varian Instrument Division



ESPECTRO No. 1

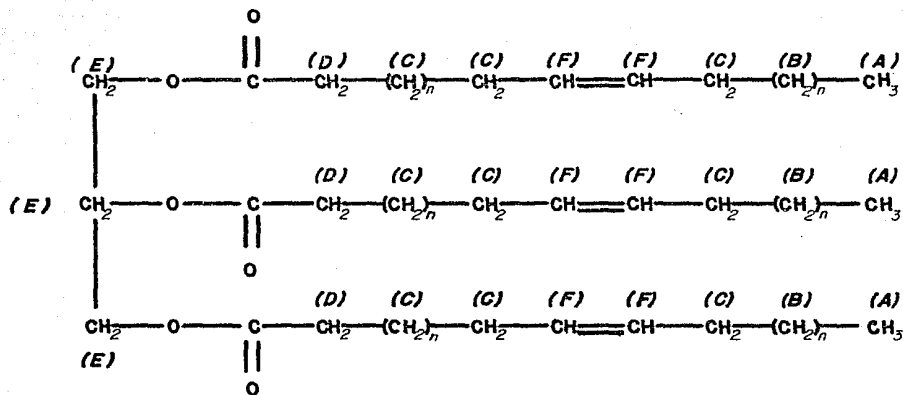
Muestra:

VITAMINA "A"-ACETATO EN ACEITE

Ancho de Barrido: 10 ppm

Referencia: TMS

Disolvente: Deuterocloroformo



ESTRUCTURA GENERAL DE UN ACEITE

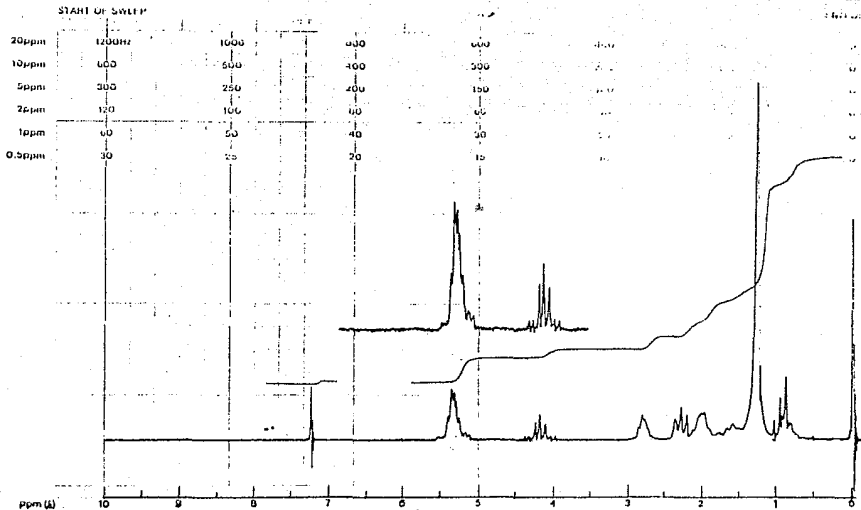
ESTRUCTURA II

PARTE Nº 37

EN 1958 31/12/57

radio elite sistema

varian instruments



ESPECTRO No. 2

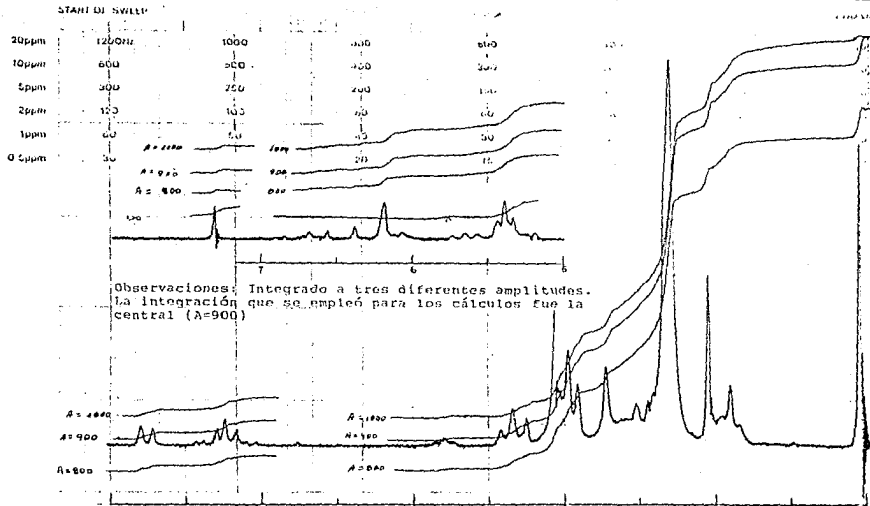
Muestra:

ACEITE DE PESCADO

Ancho de Barrido: 10 ppm

Referencia: TMS

Disolvente: Deuteriocloroformo



ESPECTRO No. 3

Nuestra:

VITAMINA "A"-ACETATO EN ACEITE

Ancho de Barrido: 5 ppm Ext.campo: 4 ppm

Referencia: TMS

Disolvente: Deuterocloroformo

a).- Relación Teórica entre la Vitamina "A"-acetato y aceite:

Patrón empleado: 1 gramo de vitamina "A"-acetato en aceite
(patrón secundario) es igual a 1,000,000 de U.I. de vitamina
"A".

Teóricamente tenemos (4):

1 mg de vitamina "A"-acetato pura	-----	2,900 U.I.
"x" mg	-----	1,000,000 U.I.

"x" = 344.82 mg de vitamina "A"-acetato

Lo que significa que en 1 gramo de muestra patrón (secundario) tenemos:

344.82 mg de vitamina "A"-acetato

655.18 mg de aceite

Relación Aceite/Vitamina:

$$\frac{655.18}{344.82} = \underline{1.90}$$

Esta última relación significa que por cada gramo de vitamina "A"-acetato en el patrón empleado, hay 1.90 gramos de aceite.

En porcentajes:

Vitamina "A"-acetato	-----	34.48%
Aceite	-----	65.51%

b).- Relación entre la vitamina "A"-acetato y aceite obtenida en la práctica por RMN:

Para el estudio cuantitativo de cada una de las vitaminas y mezclas de las mismas, se procedió a estandarizar el equipo de RMN en máximas condiciones de estabilidad y resolución. La integración se optimizó de acuerdo a las reglas de operación. Los espectros se corrieron a un ancho de barrido de 5 y 10 ppm según el caso y una extensión de campo de 4 ppm para el registro de todas las señales en los espectros corridos a 5 ppm. Se integraron a diferentes amplitudes para seleccionar la más adecuada.

Se pesaron exactamente 30 mg de vitamina "A"-acetato en aceite (patrón secundario) y se disolvió en 0.3 ml de deuterocloroformo. Se corrió el Espectro No. 3 y de acuerdo a éste se realizaron los cálculos siguientes:

- El total de la integración medida es de 190 unidades.
- El pico localizado a 1.0 ppm correspondiente a los dos metilos (protones "a" de la vitamina), tiene una integración igual a 12 que dividido entre los 6 hidrógenos da un total de 2 unidades para cada protón de la vitamina. Esta señal se considera para este análisis el "pico de referencia".
- La vitamina "A"-acetato tiene en su estructura 32 hidrógenos, por lo que:
$$32 \times 2 = 64 \text{ unidades (Integración total para la vitamina "A"-acetato sola)}$$

- Por diferencia, la integración total para el aceite es de 126 unidades.

- Para obtener el porcentaje correspondiente a la vitamina, de la integración total, se efectúa la siguiente relación:

190 unidades (de integración) ----- 100%

64 unidades (de integración) ----- "x"%

"x" = 33.68% de la vitamina (en la integración)

- Por lo tanto, concluimos que, de la integración:

Vitamina "A"-acetato: 33.68%

Aceite: 66.32%

- Relación a 1 gramo de vitamina:

$66.32 / 33.68 = 1.96$ (por cada gramo de vitamina hay 1.96 g de aceite)

- Resumiendo los cálculos efectuados en los pasos anteriores:

%Vitamina "A"-acetato = $\frac{\text{Integración "pico ref."} \times 32 \times 100}{\text{Integración total} \times 6}$

o bien,

%Vitamina "A"-acetato = $\frac{\text{Integración "pico ref."}}{\text{Integración total}} \times 533.33$

%Aceite = 100 - %Vitamina "A"-acetato

Se llevó a cabo el procedimiento descrito con 10 muestras de la vitamina "A"-acetato (del mismo patrón secundario) anotando los resultados en la Tabla No. 1, anotando el ejemplo desarrollado como la muestra No.1.

TABLA No. 1

No. de Muestra	Integración Total de cada espectro	Integración "Pico de Referencia" (señal a 1.00 ppm)	Integración de la Vit. "A"-acetato (resultado de los cálculos)	% Vitamina "A" acetato (de la integración)
1	190.0	12.0	64.00	33.68%
2	178.0	11.0	58.66	32.95%
3	190.0	12.0	64.00	33.68%
4	153.0	9.5	50.66	33.11%
5	165.0	10.5	56.00	33.93%
6	197.0	13.0	69.33	35.19%
7	125.5	8.0	42.66	33.99%
8	109.5	7.0	37.33	34.09%
9	138.0	9.0	48.00	34.78%
10	154.0	10.0	53.33	34.63%

PROMEDIO: 34.14%

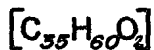
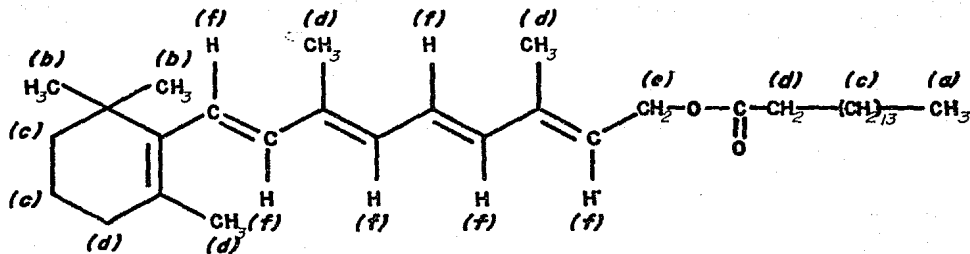
% Vitamina "A" -acetato: 34.48%
(teórico)

B).- Estudio espectroscópico por RMN de la vitamina "A"-palmitato:

El palmitato de vitamina "A" es más estable que la forma acetato y no necesita mezclarse con grandes cantidades de aceite para su conservación.

De acuerdo a la Estructura III, podemos interpretar el Espectro No. 4 de la manera siguiente:

PROTONES	MULTIPLICIDAD	DESPLAZAMIENTO QUIMICO
(a)	t	0.9 ppm
(b)	s	1.0 ppm
(c)	-	1.2-1.7 ppm
(d)	-	1.8-2.5 ppm
(e)	d	4.7 ppm
(f)	-	5.6-6.9 ppm

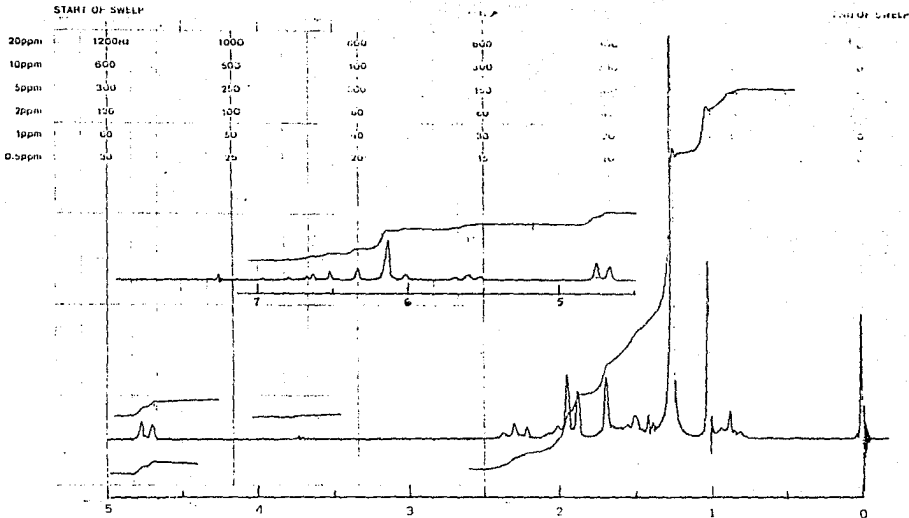


VITAMINA "A" - PALMITATO

ESTRUCTURA III

MODEL 8214
PALO ALTO, CALIFORNIA

varian instruments



ESPECTRO No: 4
Muestra:

VITAMINA "A"-PALMITATO

Ancho de Barrido: 5 ppm Ext.campo: 4 ppm
Referencia: TMS
Disolvente: Deuteriocloroformo

a).- Relación teórica entre la Vitamina "A"-palmitato y aceite:

Patrón empleado: 1 gramo de vitamina "A"-palmitato
(patrón secundario) en aceite es igual a 1'755.000 U.I.
de vitamina "A".

Teóricamente tenemos (4):

1 mg de vitamina "A"-palmitato pura ----- 1.800 U.I.
"x" mg ----- 1'755.000 U.I.

"x" = 975.00 mg de vitamina "A"-palmitato

Lo que significa que en 1 gramo de muestra patrón secundario, tenemos:

975 mg de vitamina "A"-palmitato
25 mg de aceite

Relación Vitamina/Aceite: (*)

975 / 25 = 39

Esta última relación significa que por cada gramo de aceite hay 39 gramos de vitamina "A"-palmitato, en el patrón secundario empleado.

En porcentajes:

Vitamina "A"-palmitato ----- 97.50%
Aceite ----- 2.50%

(*) Se empleó la relación Vitamina/Aceite, inversamente a la utilizada en los cálculos de la vitamina "A"-acetato, simplemente para manejar números enteros. En este patrón la cantidad de aceite es mucho menor que en el de la vitamina "A"-acetato.

b).- Relación entre la vitamina "A"-palmitato y aceite obtenida en la práctica por RMN:

De acuerdo al Espectro No. 4 y tomando como referencia la señal localizada a 1.00 ppm correspondiente a dos metilos (protones "b" de la vitamina "A"), se hizo el estudio por integración para saber el contenido posible de aceite y conservadores en la muestra de vitamina "A"-palmitato (patrón secundario) disolviendo 30 mg de la misma en 0.3 ml de deuterocloroformo, pasándose a un tubo de resonancia y corriendo el espectro con un ancho de barrido de 5 ppm (extendiendo el campo 4 ppm más para registrar todas las señales). Los cálculos son los siguientes:

- La integración total medida en el espectro es igual a 174 unidades.
- La señal situada a 1.0 ppm (protones "b") tiene una integración igual a 17 unidades, que dividido entre los 6 hidrógenos nos da un total de 2.83 unidades para cada hidrógeno de la vitamina.
- La vitamina "A"-palmitato tiene un total de 60 hidrógenos, por lo que:
$$60 \times 2.83 = 169.80 \text{ unidades (Integración total para la vitamina "A"-palmitato sola)}$$
- Restando este último valor a la integración total medida en el espectro, tenemos:
$$174 - 169.80 = 4.20 \text{ unidades (Integración total para el aceite)}$$

- De lo anterior podemos deducir:

174 unidades (Integración total)	-----	100%
4.20 unidades	-----	"x"%

"x" = 2.41% (porcentaje de aceite de la integración)

- Finalmente, los porcentajes de vitamina y aceite, de la integración, corresponden a:

Vitamina "A"-palmitato:	97.58%
Aceite:	2.41%

- Resumiendo los cálculos anteriores, tenemos:

$\%Vit."A"-palmitato = \frac{\text{Integración "pico ref."} \times 0.0100}{\text{Integración total}} \times 100$

o bien,

$\%Aceite = 100 - \% Vitamina "A"-palmitato$

Se efectuaron en total 10 repeticiones del procedimiento descrito con el patrón secundario de la vitamina "A"-palmitato y el resultado de estas experiencias se reportan en la Tabla No.2, en la cual se anotó como la muestra No.1 el ejemplo que fue desarrollado.

TABLA No. 2

No. de Muestra	Integración Total de cada Espectro.	Integración "Pico de Referencia." (señal a 0.9 ppm)	Integración de la Vit. "A"-palmitato (resultado de los cálculos)	% Vitamina "A"-palmitato (de la integración)
1	174.0	17	169.80	97.58%
2	183.0	18	180.00	98.36%
3	163.4	16	159.99	97.85%
4	179.0	17	109.99	94.97%
5	191.0	19	189.99	99.47%
6	187.0	18	180.00	96.25%
7	123.0	12	120.00	97.56%
8	192.0	19	189.99	98.95%
9	174.5	17	169.99	97.42%
10	135.0	13	129.99	96.29%
			PROMEDIO:	<u>97.47%</u>
			% Vitamina "A" - palmitato: (teórico)	<u>97.50%</u>

2).- Vitamina "D"

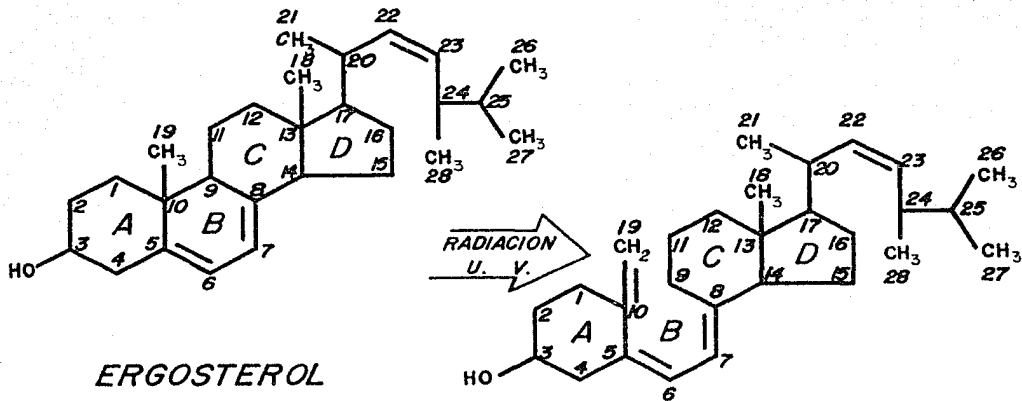
La vitamina "D" se forma a partir de provitaminas por acción de los rayos ultravioleta.

Existen por lo menos diez formas químicas distintas de vitamina "D" y sus correspondientes provitaminas, de ellas sólo son de importancia dos: el Ergosterol y el 7-Dehidrocolesterol y sus productos de irradiación ultravioleta, las vitaminas "D₂" o Ergocalciferol y "D₃" o Colecalciferol, respectivamente.

En la piel humana, la de los mamíferos y aves existe la provitamina 7-Dehidrocolesterol, formada por biosíntesis, que por acción del sol se transforma en vitamina "D₃" o Colecalciferol. En los vegetales, como las levaduras, existe el Ergosterol, que por irradiación ultravioleta se transforma en vitamina "D₂" o Ergocalciferol. En ambos casos, los rayos ultravioleta provocan la apertura del anillo "B" en la posición C₆ y C₁₀, formándose un nuevo doble enlace en las posiciones C₁₀ y C₁₉, adquiriendo con esto las sustancias formadas, propiedades características de la vitamina "D" (ver esquemas I y II).

La deficiencia de vitamina "D" provoca en el hombre y en los animales el raquitismo cuyos trastornos se manifiestan principalmente en alteraciones óseas.

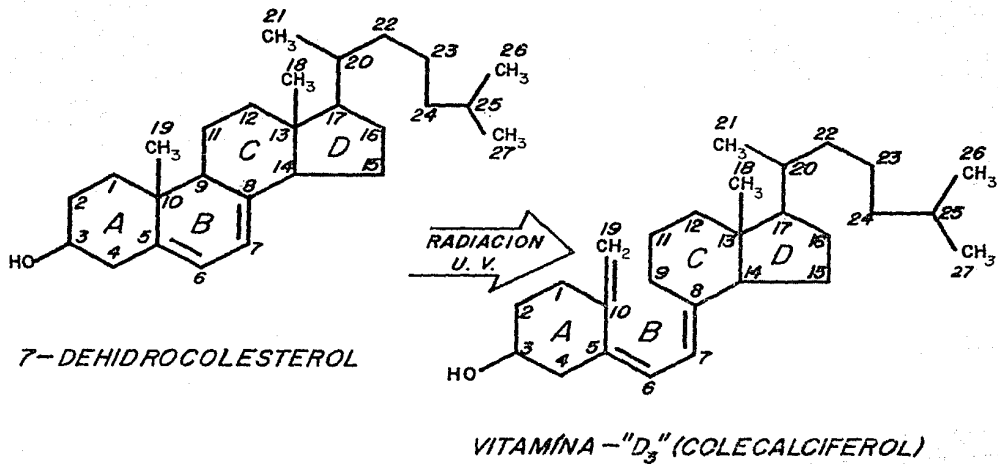
Existen dos tipos de preparados de vitamina "D"; los de fuente natural, como son los aceites de hígado de peces y los sintéticos como son: los multivitamínicos con sales de calcio, los que contienen exclusivamente vitamina "D" y los preparados oleosos o hidrosolubles de vitaminas "A" y "D".



ERGOSTEROL

VITAMINA-"D₂" (ERGOCALCIFEROL)

ESQUEMA I



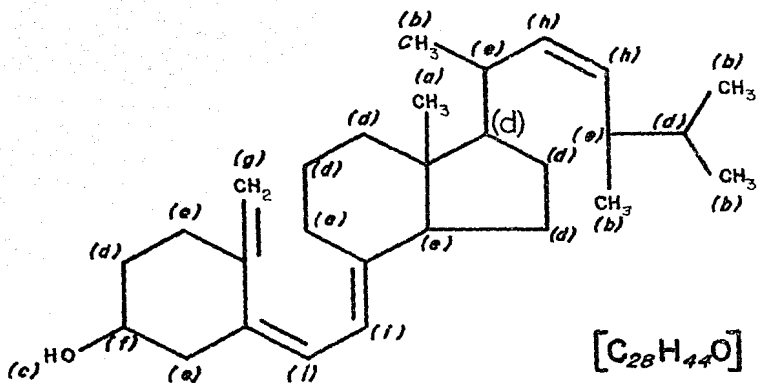
ESQUEMA II

A).- Estudio espectroscópico por RMN de la
vitamina "D₂" (Ergocalciferol):

Para el estudio por Resonancia Magnética Nuclear fueron disueltos en 0.3 ml de deuterocloroformo, 30 mg del patrón secundario de la vitamina "D₂" y se pasó a un tubo de resonancia, corriéndose el espectro. El Espectro No. 5 muestra los desplazamientos químicos de los siguientes protones de acuerdo a la Estructura IV:

PROTONES	MULTIPLICIDAD	DESPLAZAMIENTO QUIMICO	
(a)	s	0.55	ppm
(b)	-	0.8-1.1	ppm
(c)	s	1.5	ppm
(d)	-	1.1-2.0	ppm
(e)	-	2.0-3.0	ppm
(f)	-	3.9	ppm
(g)	-	4.8-5.0	ppm
(h)	-	5.2	ppm
(i)	-	5.9-6.3	ppm

El desplazamiento químico expuesto para los protones (i) y (h) fueron perfectamente verificados de acuerdo al trabajo de Berman, E. (5).



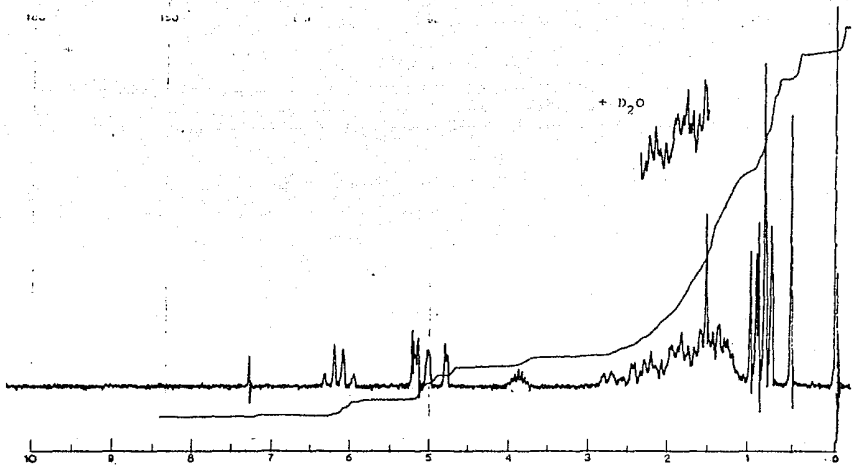
VITAMINA "D₂" (ERGOCALCIFEROL)

ESTRUCTURA IV

START OF SWEEP

END OF SWEEP

10ppm	5000	750	10	150
5ppm	4000	175	70	150
2ppm	1600	150	100	150



ESPECTRO No. 5

Muestra:

VITAMINA "D₂"

Ancho de Barrido:

10 ppm

Referencia:

TMS

Disolvente:

Deuterocloroformo

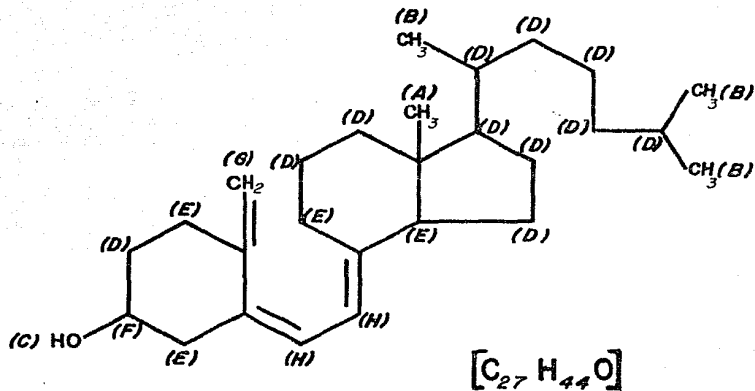
B).- Estudio espectroscópico por RMN de la
vitamina "D₁" (Colecalciferol):

Se disolvieron 30 mg de vitamina "D₁" patrón secundario en 0.3 ml de deuterocloroformo, se pasó a un tubo de resonancia y se corrió el Espectro No. 6. De acuerdo a éste y a la Estructura V, se anotan a continuación los desplazamientos químicos de los protones:

PROTONES	MULTIPLICIDAD	DESPLAZAMIENTO QUIMICO
(A)	s	0.55 ppm
(B)	-	0.8-1.1 ppm
(C)	s	1.5 ppm
(D)	-	1.1-2.0 ppm
(E)	-	2.0-3.0 ppm
(F)	-	3.9 ppm
(G)	-	4.8-5.0 ppm
(H)	-	5.9-6.3 ppm

Para verificar el desplazamiento químico del protón del grupo oxhidrilo en las dos vitaminas ("D₂" y "D₃"), se le adicionó a cada muestra agua deuterada y se corrió nuevamente el espectro, con lo cual, la señal que se encontraba a 1.5 ppm desapareció (ver Espectros 5 y 6).

Los protones (i) de la vitamina "D₂" y (H) de la vitamina "D₃" son equivalentes, presentando señales idénticas entre 5.9 y 6.3 ppm. En la tabla de desplazamientos químicos de la vitamina "D₂" (pág.39) se identifican como (h) a los protones de la doble ligadura (carbonos C₂₂ y C₂₃) por aparecer esta señal a 5.2 ppm y mantener así un orden creciente en los desplazamientos químicos.



VITAMINA "D₃" (COLECALCIFEROL)

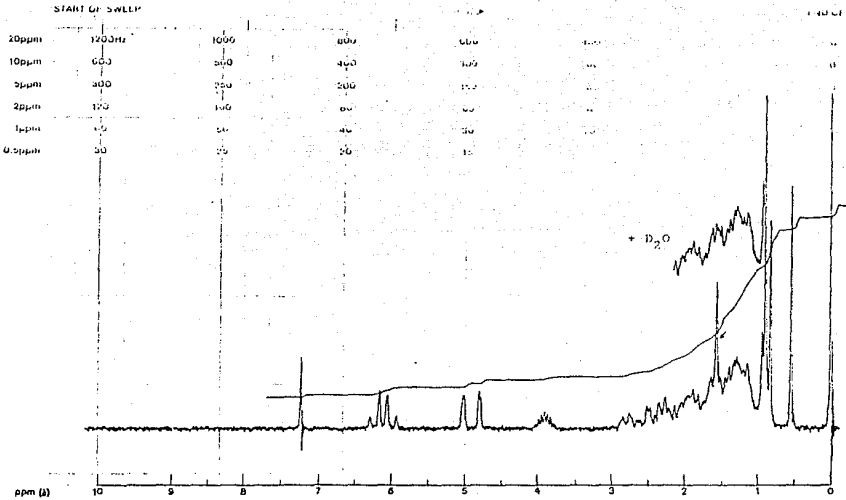
ESTRUCTURA V

10-11-54

10-11-54



Varian Instruments
Palo Alto, California



ESPECTRO No. 6
Muestra: VITANINA "D3"

Ancho de Barrido: 10 ppm
Referencia: TMS
Disolvente: Deuteriocloroformo

C).- Mezcla de Vitaminas "D₂" y "D₃":

Debido a la estrecha analogía estructural existente entre las vitaminas "D₂" y "D₃", sus propiedades y acción farmacológica resultan similares y no existe prácticamente diferencia alguna en su comportamiento frente a adsorbentes (cromatografía en capa fina y en columna), y a reacciones coloridas (por ejemplo: solución de trichloruro de antimonio-cloruro de acetilo); en cuanto la absorción en el Ultravioleta, ambas vitaminas tienen su máximo a 250 nm. En el Infrarrojo, la curva de absorción para la vitamina "D₂" presenta un máximo de absorción a 10.4 y la vitamina "D₃" a 10.3. Todo esto hace imposible el empleo de estas técnicas para su diferenciación.

Existen sólo dos diferencias estructurales entre las vitaminas "D₂" y "D₃": la vitamina "D₂" presenta una doble ligadura entre los carbonos C₁₁ y C₁₂, así como un metilo en C₁₃ (ver Estructuras IV y V). Al utilizar la espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear Protónica pudimos comparar los espectros de ambas vitaminas (Espectros 5 y 6), localizando una señal adicional en el Espectro No. 5 a 8.2 ppm la cual, en efecto, corresponde a los protones (a) de la doble ligadura entre C₁₁ y C₁₂ de la vitamina "D₂". Algo muy significativo es que esta señal no se encuentra con otras y puede servir cualitativamente para identificar con precisión el análogo de vitamina "D" con el cual se está trabajando, o si existe una mezcla de ambas vitaminas ("D₂" y "D₃"). Por otro lado, si se desea cuantear una de ellas, bastará con adicionar una cantidad conocida de la otra, lo que hace factible la determinación, como se

demuestra a continuación:

Se mezclaron cantidades iguales de vitaminas "D₂" y "D₃" (patrones secundarios). 30 mg de cada una, se disolvieron en 0.3 ml de deuterocloroformo, se pasó a un tubo de resonancia y se corrió el espectro con un ancho de barrido de 5 ppm y una extensión de campo de 4 ppm para separar y registrar todas las señales.

La base de los cálculos efectuados fueron los dos protones (h) de la vitamina "D₂" (ver Estructura IV) los cuales representan la única diferencia entre los Espectros 5 y 6. De esta forma se realizó la determinación cuantitativa de los dos isómeros de la vitamina "D" en forma simultánea.

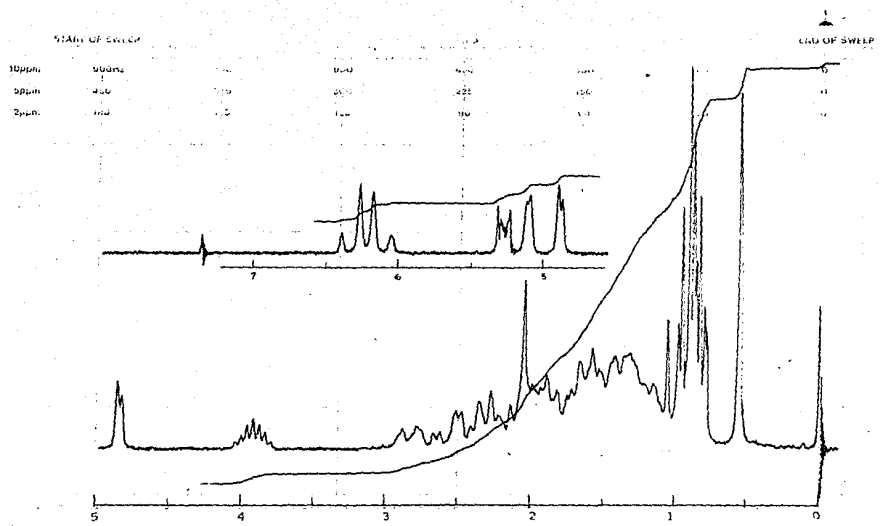
En el Espectro No. 7 se muestran las señales obtenidas de la mezcla de las vitaminas "D₂" y "D₃" y a continuación se señalan los desplazamientos químicos de los protones de acuerdo a las Estructuras IV y V:

PROTONES	DESPLAZAMIENTO QUIMICO
(A)(a)	0.55 ppm
(B)(b)	0.8-1.1 ppm
(C)(c)	1.5 ppm
(d)	1.1-2.0 ppm
(D)	1.0-3.0
(E)(e)	2.0-3.0 ppm

(Continuación)

PROTONES	DESPLAZAMIENTO QUIMICO	
(F)(f)	3.9	ppm
(G)(g)	4.8-5.2	ppm
(h)	5.4	ppm
(H)(1)	6.0-6.5	ppm

Resolución por división - 100000



ESPECTRO No. 7
Muestra:

MEZCLA DE VITAMINAS D₂ y D₃

Ancho de Barrido: 5 ppm Ext. campo: 4 ppm
Referencia: TMS
Disolvente: Deuterioclorofono

a).- Relación teórica entre las vitaminas "D₂" y "D₃" en la mezcla:

Se pesaron exactamente 30.94 mg de vitamina "D₃" (patrón secundario) y 30.45 mg de vitamina "D₂" (patrón secundario).

Si relacionamos los pesos de "D₃" en "D₂", tenemos:

$$\text{"D}_3\text{" / "D}_2\text{" = 30.94 / 30.45 = 1.01}$$

Se eligió esta relación de pesos, ya que si la concentración de una de las vitaminas es mucho mayor que la otra, al ajustar el amplificador del aparato para graficar al máximo las señales de la vitamina con mayor concentración, las señales de la otra vitamina serían muy pequeñas, así como sus integraciones, dificultando la precisión del método que deseábamos aplicar en la mezcla.

La mezcla de vitaminas "D₂" y "D₃" se disolvió en 0.3 ml de deuterocloroformo, se pasó a un tubo de resonancia y se corrió el Espectro No. 7 con un ancho de barrido de 5 ppm y una extensión de campo de 4 ppm para separar y registrar todas las señales.

b).- Relación entre las vitaminas "D₂" y "D₃" obtenida en la práctica por RMN:

En base al Espectro No. 7 se efectuaron los cálculos siguientes:

- Los dos protones (h) de la vitamina "D₂" localizados en 5.4 ppm tienen una integración de 4, que dividido entre 2, resultan 2 unidades para cada protón de la vitamina "D₂".
- El número total de hidrógenos de la vitamina "D₂" es igual a 44 que multiplicados por 2 unidades, correspondientes a cada uno de ellos en la integración, tenemos:
 $44 \times 2 = 88$ unidades (Integración total para la vitamina "D₂")
- La integración total en el espectro de la mezcla "D₂" y "D₃" es igual a 185 unidades. Si restamos a este número la integración total de la vitamina "D₂" obtenida en los cálculos anteriores, resulta:
 $185 - 88 = 97$ unidades (Integración total para la vitamina "D₃")
- La estructura química de la vitamina "D₃" tiene 44 protones también, por lo que, si dividimos la integración total de la vitamina "D₃" obtenida anteriormente entre el número de protones, obtendremos cuántas unidades

equivalen a cada hidrógeno de la vitamina "D₃":

$$97 / 44 = 2.2 \text{ unidades (para cada protón de "D}_3\text{")}$$

- Los pesos moleculares de las dos vitaminas son:

$$\text{Vitamina "D}_2\text{" : } 396.66$$

$$\text{Vitamina "D}_3\text{" : } 384.65$$

- Multiplicamos estos pesos moleculares por las unidades de integración equivalentes a cada protón de "D₂" y "D₃", resultando las siguientes relaciones molares:

$$\text{Vitamina "D}_2\text{" : } 396.66 \times 2.0 = 793.32$$

$$\text{Vitamina "D}_3\text{" : } 384.65 \times 2.2 = 846.23$$

- Relacionando "D₃" en "D₂", obtenemos:

$$\text{"D}_3\text{" / "D}_2\text{" = } 846.23 / 793.32 = \underline{1.06}$$

- Resumiendo los cálculos anteriores:

$$\text{Vitamina "D}_2\text{" = } \frac{\text{Integración "pico de ref."} \times 396.66}{2}$$

o bien,

$$\text{Vitamina "D}_2\text{" = } \text{Integración "pico de ref."} \times 198.33$$

$$\frac{[\text{Int.Total} - (\text{Int."pico ref"} \times 44)] \times 384.65}{2}$$

$$\text{Vitamina "D}_3\text{" = } \frac{\text{Integración "pico de ref."} \times 384.65}{2}$$

44

o bien,

$$\text{Vitamina "D}_3\text{" = } [\text{Int.Total} - (\text{Int."pico ref"} \times 22)] \times 8.742$$

En la Table No. 3 se aportan las experiencias obtenidas en 10 mezclas de vitaminas "D₂" y "D₃" utilizando el procedimiento antes descrito. El ejemplo desarrollado se anexa a la misma Tabla como la muestra No. 1.

TABLA No. 3

No. de Muestra	Integración Total de cada Espectro	Integración "Pico de Referencia" (señal a 5.1 ppm)	Relación Experimental D ₅ /D ₂ por R M N	Relación Teórica D ₅ /D ₂
1	185.0	4.0	1.06	1.01
2	180.0	4.0	1.01	0.98
3	167.0	3.5	1.13	1.15
4	166.5	3.5	1.12	1.08
5	145.0	3.0	1.16	1.18
6	188.0	4.0	1.10	1.11
7	197.0	4.5	0.95	1.01
8	190.0	4.0	1.12	1.12
9	200.0	4.5	0.98	0.99
10	185.0	4.0	1.06	1.04

3).- Mezcla de Vitaminas "A" y "D"

En medicamentos es frecuente encontrar preparados de vitaminas "A" y "D₂". En este trabajo se realizaron varias mezclas con los patrones secundarios de vitamina "A" (en forma de acetato y palmitato) y vitamina "D₂" logrando su determinación cuantitativa por el método de Resonancia Magnética Nuclear Protónica empleando como base de los cálculos la integración del metilo angular de la vitamina "D₂" localizado en el espectro de la mezcla a 0.55 ppm.

A).- Mezcla de vitamina "A"-acetato (en aceite) y vitamina "D₂":

a).- Relación teórica en la mezcla "A"-acetato y "D₂":

Se hicieron diferentes mezclas de las vitaminas "A"-acetato en aceite y "D₂" (variando sus proporciones en peso) buscando que las integraciones obtenidas de sus espectros fueran lo suficientemente medibles. Se tomó como ejemplo el siguiente:

Se mezclaron exactamente las cantidades de cada vitamina (patrones secundarios), anotadas a continuación:

Vitamina "A"-acetato en aceite	-----	145 mg
Vitamina "D ₂ "	-----	87.5 mg

Como el patrón secundario de la vitamina "A"-acetato empleado contiene 34.48% de vitamina y el resto es el aceite que se utiliza como conservador, la cantidad pesada tiene exactamente, de vitamina "A"-acetato:

145 mg	-----	100%
"x" mg	-----	34.48%

"x" = 50 mg de vitamina "A"-acetato pura

Por lo tanto, la relación real "D₂"/"A" es igual a:

$$\text{"D}_2\text{"} / \text{"A"} = 87.5 / 50 = \underline{1.75}$$

b).- Relación entre las vitaminas "A"-acetato y "D₂"
obtenida en la práctica por EMN:

Las cantidades mencionadas de vitamina "A"-acetato en aceite y vitamina "D₂", se disolvieron y mezclaron con 0.3 ml de deuterocloroformo, se pasó a un tubo de resonancia y se corrió el Espectro No. 8 con un ancho de barrido de 5 ppm y una extensión de campo de 4 ppm para separar y registrar todas las señales.

Los cálculos de acuerdo al Espectro No. 8 son los siguientes:

-La señal que aparece a 0.55 ppm y que llamaremos "pico de referencia", por ser la base de los cálculos, tiene una integración igual a 5, que dividido entre los 3 protones del metilo de la vitamina "D₂" que representa, resulta que 1 hidrógeno de la vitamina "D₂" equivale a 1.66 unidades de la integración.

-La Integración Total correspondiente a la vitamina "D₂" será el resultado de multiplicar 1.66 por el número de hidrógenos que contiene su estructura molecular:

$$1.66 \times 44 = 73.04 \text{ (Integración para la vitamina "D}_2\text{")}$$

-La Integración Total medida en el espectro es de 195 unidades. Restando lo correspondiente a la vitamina "D₂", obtendremos la integración para la vitamina "A" más el aceite:

$$195 - 73.04 = 121.96 \text{ (Integración para la vitamina "A" y el aceite)}$$

- Como el porcentaje de integración de la vitamina "A"-acetato que se empleó en la mezcla fue de 31.6% y el resto es aceite (antes de efectuar la mezcla se corrió un espectro del patrón secundario de la vitamina "A"-acetato para calcular el porcentaje de la integración entre vitamina y aceite de acuerdo al método explicado en la página 24), obtenemos la integración para la vitamina "A"-acetato de la siguiente manera:

121.96 unidades ----- 100%

"x" unidades ----- 31.6%

"x" = 38.54 unidades (Integración para la
vitamina "A"-acetato sola)

- Dividiendo este último resultado entre el número total de hidrógenos de la vitamina "A"-acetato que es igual a 32, tenemos:

$38.54 / 32 = 1.20$ unidades (para cada protón de "A")

- Multiplicando respectivamente el equivalente a un protón en unidades de integración por el peso molecular de cada vitamina, obtendremos las siguientes relaciones molares:

Vitamina "A"-acetato: $316.45 \times 1.20 = 379.74$

Vitamina "D₂": $396.66 \times 1.66 = 658.45$

- Relacionando "D₂" / "A", resulta:

$$658.45 / 379.74 = \underline{1.73}$$

Esto significa que por cada gramo de vitamina "A"-acetato hay 1.73 gramos de vitamina "D₂".

- Resumiendo los cálculos anteriores, tenemos:

$$\text{Vitamina "D}_2\text{"} = \frac{\text{Integración "pico de ref."} \times 396.66}{3}$$

3

o bien,

$$\text{Vitamina "D}_2\text{"} = \text{Integración "pico de ref."} \times 132.22$$

$$\frac{[\text{Int.Total} - (\frac{\text{Int. "pico ref."} \times 44)}{3}] \times \text{Int. "A"} \times 316.45}{3}$$

$$\text{Vit. "A"-acet.} = \frac{\text{-----}}{100 \times 32}$$

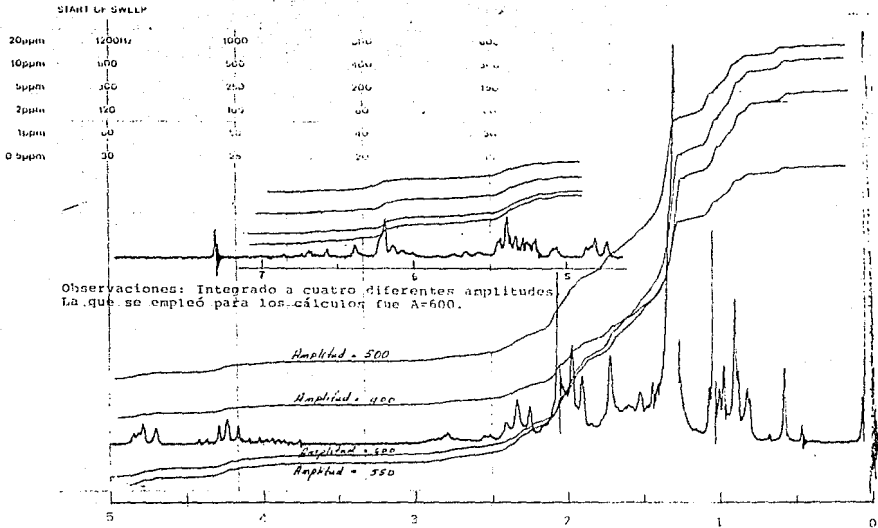
o bien,

$$\text{Vit. "A"-acet.} = [\text{Int.Total} - (\text{Int. "pico ref."} \times 14.66)] \times \text{Int. "A"} \times 0.09889$$

En la Tabla No. 4 se resumen los resultados obtenidos en 10 mezclas diferentes de vitaminas "A"-acetato y "D₂". El ejemplo desarrollado anteriormente se anota como la muestra No. 1 en el mismo resumen.

patio alta calificación

Varian instruments



ESPECTRO No. B

Muestra:

MEZCLA DE VITAMINAS "A"-ACETATO Y VITAMINA "D₂"

Ancho de Barrido: 5 ppm
Ext. de campo: 4 ppm
Referencia: TMS
Disolvente: Deuteriocloroformo

TABLA No. 4

No. de Muestra	Integración Total de cada Espectro.	Integración "Pico de Referencia" (señal a 1.0 ppm)	Integración "D2" (resultado de los cálculos) por el Peso Molecular (396.66)	Integración "A"-acetato (resultado de los cálculos) por el Peso Molecular (316.45)	Relación experimental D2/A-acetato por R M N	Relación Teórica D2/A-acetato
1	195	5.0	658.45	379.74	1.73	1.75
2	192	4.5	594.99	393.74	1.51	1.54
3	200	5.0	661.10	395.83	1.67	1.65
4	197	5.0	661.10	386.45	1.71	1.73
5	199	5.5	727.21	369.79	1.96	1.97
6	184	5.0	661.10	345.83	1.91	1.91
7	180	4.5	594.99	356.25	1.67	1.70
8	186	5.0	661.10	352.08	1.87	1.85
9	196	5.5	727.21	360.41	2.01	1.99
10	197	5.5	727.21	363.54	2.00	2.01

B).- Mezcla de vitamina "A"-palmitato y vitamina "D₂":

a).- Relación teórica en la mezcla "A"-palmitato y "D₂":

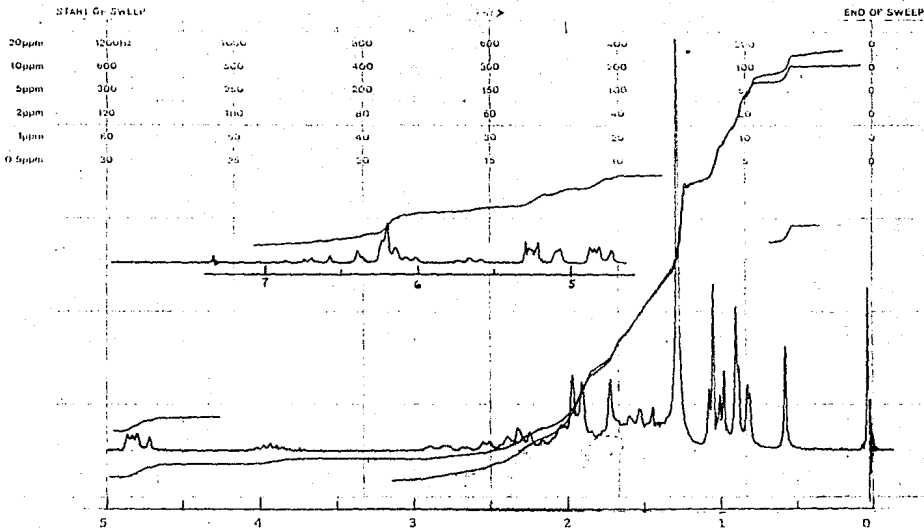
Después de la experiencia obtenida en el ejemplo de la vitamina "A"-acetato y "D₂" (pag. 56), se mezclaron cantidades en relación aproximada uno a uno de "A"-palmitato y "D₂" para obtener integraciones medibles y señales proporcionadas. Así logramos, en base a la integración, elaborar los cálculos para la cuantificación de cada una de las vitaminas en la mezcla. Más adelante proponemos un procedimiento específico para ajustar esta técnica de acuerdo a las cantidades usuales en fármacos.

En esta parte del estudio, se mezclaron exactamente las siguientes cantidades de las dos vitaminas (patrones secundarios):

Vitamina "A"-palmitato -----	67.8 mg
Vitamina "D ₂ " -----	73.8 mg

La vitamina "A"-palmitato empleada tiene una concentración de 97.5%, por lo que en realidad tenemos 66.10 mg. La relación "D₂" / "A" es igual a $73.8 / 66.10 = 1.11$

La mezcla se disolvió en 0.3 ml de deuterocloroformo, se pasó a un tubo de resonancia y se corrió el Espectro No. 9, con un ancho de barrido de 5 ppm y una extensión de campo de 4 ppm para registrar y separar todas las señales.



ESPECTRO No. 9

Muestra:

MEZCLA DE VITAMINA "A"-PALMITATO Y VIT. "D₂"

Ancho de Barrido: 5 ppm
 Ext. de campo: 4 ppm
 Referencia: TMS
 Disolvente: Deuteriocloroformo

b).- Relación entre las vitaminas "A"-palmitato y "D₂"
obtenida en la práctica por RMN:

De acuerdo al Espectro No. 9 se realizaron los siguientes cálculos:

- La integración del "pico de referencia" correspondiente al metilo angular de la vitamina "D₂" localizado a 0.55 ppm es igual a 6 unidades que divididas entre los 3 hidrógenos resultan 2.0 unidades de la integración para cada protón de la vitamina "D₂".
- Multiplicando 2 (unidades de la integración para cada protón de "D₂") por el número total de hidrógenos en la estructura molecular de la vitamina "D₂", tendremos el total de la integración para la vitamina "D₂":

$$(6 / 3) \times 44 = 88 \text{ unidades (de la integración)}$$

- La Integración Total medida en el espectro es de 178 unidades. Si restamos lo correspondiente a la vitamina "D₂", obtenemos:

$$178 - 88 = 90 \text{ unidades (integración para la vit. "A"-palmitato y aceite)}$$

- El porcentaje de vitamina "A"-palmitato que se empleó para la mezcla fue de 97.5 %, por lo que:

90 unidades ----- 100 %
"x" unidades ----- 97.5 %

"x" = 87.75 unidades (Integración total
para la vitamina "A"-palmitato sola)

- Ahora dividimos la integración total para la vitamina "A"-palmitato obtenida arriba entre el número de hidrógenos que contiene la estructura molecular de este compuesto:

$87.75 / 60 = 1.46$ unidades (para cada protón de
la vitamina "A"-palmitato)

- Multiplicando respectivamente los pesos moleculares de las dos vitaminas por el equivalente a un protón en la integración, tenemos las siguientes relaciones molares:

Vitamina "A"-palmitato: $496.86 \times 1.46 = 726.65$

Vitamina "D₂": $396.66 \times 2.00 = 793.32$

- Relacionando "D₂" / "A", resulta:

"D₂" / "A" = $793.32 / 726.65 = 1.09$

- Resumiendo los cálculos anteriores, tenemos:

$$\text{Vitamina "D}_2\text{"} = \frac{\text{Integración "pico de ref."} \times 396.66}{3}$$

o bien,

$$\text{Vitamina "D}_2\text{"} = \text{Integración "pico de ref."} \times 132.22$$

$$\text{Vit. "A"-palm.} = \frac{[\text{Int. Tot.} - (\text{Int. "pico ref."} \times 44)] \times \text{"A"} \times 496.86}{3}$$

$$100 \times 60$$

o bien,

$$\text{Vit. "A"-palm.} = [\text{Int. tol.} - (\text{Int. pico ref.} \times 4.666)] \times \text{"A"} \times 0.08281$$

Siguiendo el procedimiento anterior, en la Tabla No. 5 se conjuntan los resultados obtenidos en 10 mezclas de vitaminas "A"-palmitato y "D₂". El ejemplo desarrollado se anexa en la misma tabla como la muestra No. 1.

TABLA No. 5

No. de Muestra	Integración Total de cada Espectro	Integración "Pico de Referencia" (señal a 1.0 ppm)	Integración "D2" (resultado de los cálculos por el Peso Molecular (396.66)	Integración "A"-palmitato (resultado de los cálculos) por el Peso Molecular (496.86)	Relación experimental D2/A-palmitato por R M N	Relación teórica D2/ A-palmitato
1	178.0	6.0	793.32	726.65	1.09	1.11
2	148.5	5.0	661.10	606.92	1.08	1.10
3	195.0	6.5	859.43	804.74	1.06	1.08
4	165.5	5.5	727.21	684.97	1.06	1.07
5	150.0	5.0	661.10	619.03	1.06	1.07
6	175.5	6.0	793.32	706.52	1.12	1.10
7	187.0	6.0	793.32	799.35	0.99	1.03
8	193.0	6.5	859.43	788.59	1.08	1.11
9	180.0	6.0	793.32	742.83	1.06	1.09
10	157.5	5.5	727.21	620.37	1.17	1.18

4).- Aplicación del método en medicamentos:

La metodología explicada anteriormente se aplicó a preparados farmacéuticos comerciales de los cuales se logró eliminar el excipiente. Los resultados fueron comparados con la cantidad establecida en el marbete.

A).- Medicamento I:

Datos:

Granulado

Contenido neto por ampollita: 2 gramos

Marbete:

Vitamina "A"-palmitato: 400,000 U.I.

Vitamina "D₂": 600,000 U.I.

Excipiente c.b.p.: 2 g

Si sabemos que 1 mg de vitamina "A"-palmitato corresponde a 1,800 U.I., tenemos que:

1 mg ----- 1,800 U.I.

"x" mg -----400,000 U.I.

"x" = 222.2 mg de vitamina "A"-palmitato
en 2 g del Medicamento I.

En cuanto a la vitamina "D₂", 40,000 U.I. equivalen a 1 mg. por lo tanto:

1 mg	-----	40,000 U.I.
"x" mg	-----	600,000 U.I.

"x" = 15 mg de vitamina "D₂"
(en 2 g del Medicamento I)

De aquí que, en 2 gramos del Medicamento I, tenemos:

Vitamina "D ₂ "	15.0 mg
Vitamina "A"-palmitato	222.2 mg
Excipiente c. b. p.	2.0 g

Separación del excipiente:

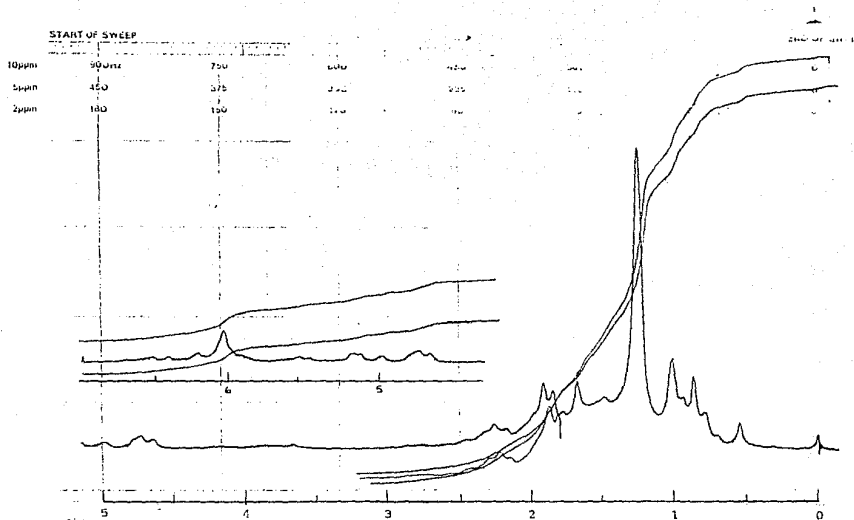
Conociendo de antemano que el excipiente empleado en este medicamento era sacarosa, la separación se realizó de la manera siguiente:

- Se pesó el contenido de una ampolleta del medicamento, obteniéndose un peso de 1.9459 g.
- Se disolvió la muestra en la mínima cantidad de cloroformo.

- Se filtró cuantitativamente, obteniéndose en el filtrado la mezcla de las dos vitaminas y como parte insoluble el excipiente.
- El filtrado se evaporó al mínimo en un evaporador rotatorio (rotavapor) con baño de agua para concentrar el contenido de vitaminas "A"-palmitato y "D₂".
- La solución se colocó en un tubo para RMN, se agregó TMS (Tetrametilsilano) y se corrió el Espectro No. 10 con un ancho de barrido de 5 ppm y una amplitud de campo de 4 ppm.

NOTA: Durante el procedimiento de separación descrito anteriormente se tuvieron los cuidados necesarios para evitar descomposición de la muestra por acción de la luz y del aire.

verian instrument division - palo alto, californi



ESPECTRO No. 10
Muestra:

MEDICAMENTO I

Ancho de Barrido: 5 ppm Ext. campo: 4 ppm
Referencia: TMS
Disolvente: neutrocicloroformo

a).- Relación teórica entre la vitamina "A"-palmitato y la vitamina "D₂" en el Medicamento I:

De acuerdo al marbete del Medicamento I, 2 gramos de muestra contienen 222.2 mg de vitamina "A"-palmitato y 15.0 mg de vitamina "D₂". En 0.9729 gramos que se pesaron del Medicamento I, tenemos:

Vitamina "A"-palmitato	108.1 mg
Vitamina "D ₂ "	7.3 mg

Relacionando "A" / "D₂", tenemos:

$$\text{"A" / "D}_2\text{"} = 108.1 / 7.3 = \underline{14.81}$$

b).- Relación entre la vitamina "A"-palmitato y la vitamina "D₂" en el Medicamento I obtenida en la práctica por RMN:

De acuerdo al Espectro No. 10, se realizaron los siguientes cálculos:

- La integración del "pico de referencia" localizado a 0.55 ppm es igual a 1 unidad, que dividida entre los 3 hidrógenos correspondientes al metilo angular de la vitamina "D₂", resulta 0.33 para cada protón de la misma vitamina en la mezcla.
- La integración total en el espectro es igual a 169 unidades, si restamos a ésta lo correspondiente a la vitamina "D₂" que son 14.66 unidades (obtenido de multiplicar 0.33 por los 44 hidrógenos de la vitamina "D₂"), obtenemos:

$$169 - (0.33 \times 44) = 169 - 14.66 = 154.33 \text{ unidades (integración de la vit. "A")}$$

- El número total de hidrógenos de la vitamina "A"-palmitato es igual a 60. Si dividimos la integración correspondiente a la vitamina "A" entre el número de protones de su estructura molecular, tenemos:

$$154.33 / 60 = 2.57 \text{ unidades (para cada hidrógeno de la vitamina "A" en la mezcla)}$$

- Multiplicando los pesos moleculares de cada vitamina por las unidades en la integración correspondientes, resulta:

Vitamina "A"-palmitato: $496.86 \times 2.57 = 1,278.03$

Vitamina "D₂": $396.66 \times 0.33 = 130.89$

- Relacionando "A" / "D₂" , tenemos:

$$\text{"A" / "D}_2\text{"} = 1278.03 / 130.89 = \underline{9.76}$$

Se repitió el análisis en 3 muestras más del Medicamento I y realizando los mismos cálculos descritos anteriormente, obtuvimos finalmente los siguientes valores de la relación "A"/"D₂":

9.90, 8.97, 9.63

Debido a que el contenido de vitamina "D₂" en el Medicamento I es muy bajo con respecto a la vitamina "A"-palmitato (6.32% de "D₂" contra 93.67% de "A"), la integración de la señal a 0.55 ppm. base de nuestros cálculos, resulta apenas medible. Si se aumenta la amplitud, las señales de la vitamina "A"-palmitato salen del espectro y no pueden integrarse. Para disminuir el error obtenido en los resultados anteriores, se corrió el espectro de una cantidad conocida de vitamina "D₂" (patrón secundario) la cual se utilizó como "refuerzo" en la mezcla de vitaminas del Medicamento I.

El procedimiento o técnica de "refuerzo" se llevó a cabo de la manera siguiente:

- Se disolvieron exactamente 60 mg de vitamina "D₂" (patrón secundario) en 0.3 ml de deuterocloroformo y se corrió el Espectro No. 11 fijando las condiciones de integración.
- A 0.95 gramos del Medicamento I se le extrajo la mezcla de vitaminas "A"-palmitato y "D₂" por la técnica ya mencionada (pag. 70) y se le adicionaron exactamente 60 mg de vitamina "D₂" (patrón secundario). Se corrió el Espectro No. 12 en las mismas condiciones de integración que el Espectro 11.
- La integración del "pico de referencia" localizado a 0.55 ppm del Espectro No. 11 es igual a 2 unidades, las cuales fueron restadas a las 3 unidades obtenidas de la misma señal en el Espectro No. 12. El resultado de esta diferencia se divide entre los 3 hidrógenos del metilo angular de la vitamina "D₂", obteniéndose:

$$(3 - 2) / 3 = 0.33 \text{ unidades (para cada protón de la vitamina "D}_2\text{" en la mezcla restando el "refuerzo")}$$

- Para poder obtener la integración de la vitamina "A"-palmitato en la mezcla, se necesita restar la integración de la vitamina "D₂" incluyendo el "refuerzo", por lo tanto, la integración del "pico de referencia" a 0.55 ppm en el Espectro No. 12, que es de 3 unidades, se divide entre los 3 hidrógenos correspondientes a esta señal resultando 1 unidad para cada protón de la vitamina "D₂" presente, en la mezcla reforzada.

- Multiplicando la unidad resultante por el número de hidrógenos de la vitamina "D₂", obtenemos:

$$1 \times 44 = 44 \text{ unidades (Integración total para la vitamina "D}_2\text{")}$$

- La Integración Total medida en el Espectro No. 12 es de 275 unidades. Restando lo correspondiente a la vitamina "D₂", resulta:

$$275 - 44 = 231 \text{ unidades (Integración total para la vit. "A"-palmitato)}$$

- Dividiendo este último resultado entre el número de hidrógenos de la vitamina "A"-palmitato, que es igual a 60, tenemos:

$$231 / 60 = 3.85 \text{ unidades (para cada protón de la vitamina "A"-palmitato)}$$

- Multiplicando respectivamente el peso molecular de cada vitamina por el equivalente a un protón en la integración:

$$\text{Vitamina "A"-palmitato: } 496.86 \times 3.85 = 1.912.91$$

$$\text{Vitamina "D}_2\text{": } 396.66 \times 0.33 = 130.89$$

- Relacionando "A" / "D₂". resulta:

$$\text{"A" / "D}_2\text{"} = 1.912.91 / 130.89 = \underline{14.61}$$

Los resultados de 5 experiencias más, utilizando el método o técnica de "refuerzo", fueron:

Relación "A"/"D₂": 14.25, 14.92, 14.78, 11.90 y 12.83. En estos dos últimos resultados, suponemos que hubo pérdidas por descomposición al manipular las muestras.

COMENTARIOS:

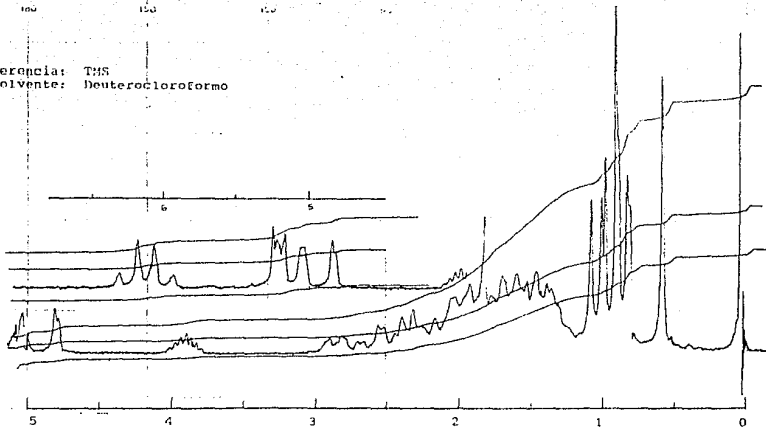
Se obtuvieron espectros con buena resolución. Los resultados obtenidos confirman la eficacia del método de "refuerzo" empleado para resolver el problema de la baja proporción en concentración de la vitamina "D₂" con respecto a la vitamina "A"-palmitato en los preparados farmacéuticos.

El trabajo de análisis de mezclas de vitaminas "A" y "D₂" por el método de Resonancia Magnética Nuclear Protónica quedó suspendido en este punto, en las conclusiones se propone un programa para afinar la técnica que servirá para posteriores investigaciones.

STANT Or SWEEP.

10ppm	10000	700	100	100
5ppm	450	300	50	50
2ppm	100	150	10	10

Referencia: TMS
Disolvente: Deuteriocloroformo

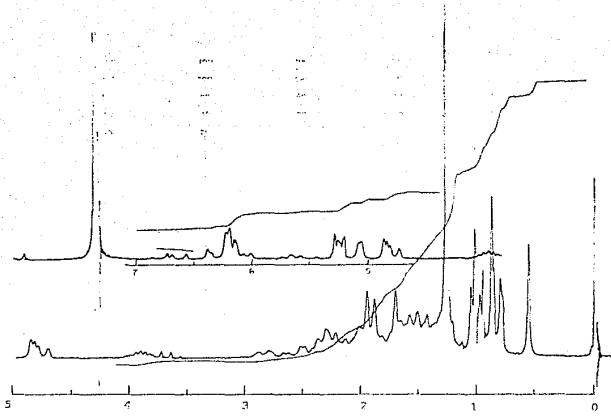


ESPECTRO No. 11
Muestra:

"VITAMINA B₂" (PATRON SECUNDARIO)

Ancho de Barrido: 5 ppm
Ext. de campo: 4 ppm

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA
BIBLIOTECA



ESPECTRO No. 12
Muestra: MEDICAMENTO I "REFORZADO" CON VIT. "D₂"--PATRON SEC.
Ancho de Barrido: 5 ppm
Ext. de campo: 1 ppm
Referencia: TMS
Disolvente: Deuteriocloroformo

B).- Medicamento II:

Datos:

Granulado

Contenido neto por ampollota: 1 gramo

Marbete:

Vitamina "D₂": 600.000 U.I.

excipiente c.b.p.: 1 g

Si sabemos que 1 mg de vitamina "D₂" equivale a 40.000 U.I.,
tenemos que:

1 mg	-----	40.000 U.I.
"x" mg	-----	600.000 U.I.

"x" = 15 mg de vitamina "D₂"

De aquí que, en 1 gramo del Medicamento II, tenemos:

Vitamina "D₂": 15 mg

excipiente c.b.p.: 1 g

Separación del excipiente:

- Se pesó el contenido de dos ampollotas del Medicamento II, obteniéndose 1.9985 gramos.

- Se disolvió la muestra en la mínima cantidad de deuterocloroformo y se filtró, quedando la vitamina en el filtrado.
- Se evaporó al mínimo el filtrado en un rotavapor con baño de agua para concentrar el contenido de vitamina "D₂".
- Se colocó en un tubo de RMN y se le adicionó TMS (Tetrametilsilano). Se corrió el espectro No. 13 con un ancho de barrido de 5 ppm y una amplitud de campo de 4 ppm para separar y registrar todas las señales.

NOTA: Durante todo el procedimiento de separación de la vitamina, se tuvieron los cuidados necesarios para evitar que la muestra sufriera descomposición por acción de la luz y del aire.

COMENTARIOS:

Se obtuvo un espectro con buena resolución y las integraciones son perfectamente medibles; no se encontraron impurezas. Para obtener la concentración de la vitamina "D₂" por el método de RMN protónica se requiere la presencia de otro compuesto (como podría ser la vitamina "D₃") para calcular, por diferencia y en base a las integraciones, la relación entre las dos vitaminas (de acuerdo a los cálculos explicados en la pag. 51).

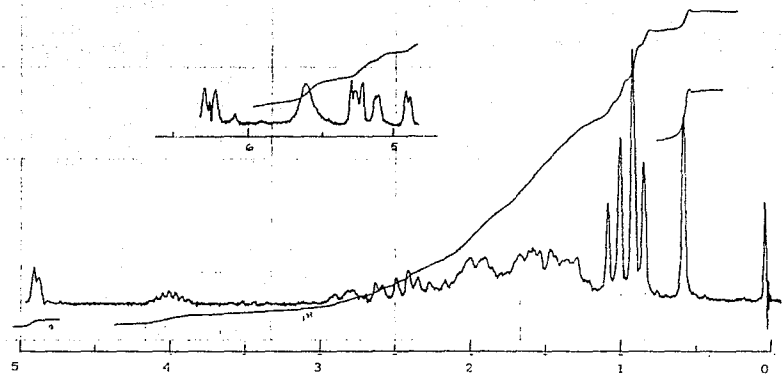
En las conclusiones finales se propone un programa para la continuación de esta investigación de acuerdo a las experiencias obtenidas en este trabajo.

verien instrument division

START OF SWEEP

END OF SWEEP

10ppm	900Hz	1.5	600	450
5ppm	450	0.75	300	225
2ppm	180	0.3	120	90



ESPECTRO No. 13
Muestra:

MEDICAMENTO II

Ancho de Barrido: 5 ppm
Ext. de campo: 4 ppm
Referencia: TMS
Disolvente: Deuteriocloroformo

CONCLUSIONES

Consideramos este trabajo como un ensayo introductorio en la implantación del método analítico por Resonancia Magnética Nuclear Protónica para la determinación cuantitativa de vitaminas "A" y "D" en forma simultánea. Aún queda mucho por hacer, pues aunque el resultado en mezclas previamente preparadas en el laboratorio es satisfactorio, no se llegó a aplicar en el número de medicamentos deseado. Proponemos continuar esta investigación bajo el siguiente programa:

- a).- Realizar una curva de calibración: amplitud de la integración de la señal contra miligramos de vitamina "D₂", manteniendo el aparato en condiciones fijas en lo que a amplitud de la integración se refiere para demostrar la linealidad que haría factible aplicar el método que aquí se propone.
- b).- Preparar mezclas patrón de vitaminas "A" y "D₂" y determinar por el método USP la vitamina "A". Conociendo la cantidad de esta vitamina en la mezcla podemos, utilizando la integración total del espectro, conocer la concentración de vitamina "D₂". Con esto podría hacerse una comparación más realista acerca de la exactitud del método.

- c).- Adicionar a la mezcla un compuesto cuyas señales de absorción no interfirieran con las de las vitaminas "A" y "D", del cual se conocerá la concentración exacta y su masa molecular, haciendo factible la determinación cuantitativa de las dos vitaminas.
- d).- Tratar una muestra patrón con la técnica de extracción propuesta, teniendo cuidado de monitorear la señal del hidroxilo para detectar cualquier cambio (oxidación) que pudiera ocurrir.

Actualmente, la presencia de las vitaminas "A" y "D" en medicamentos se encuentra muy generalizada en diferentes dosificaciones pero en todos los casos, el porcentaje de vitamina "A" es más alto que el de vitamina "D". El método U.S.P. (4) utilizado en el control de calidad para la vitamina "A" en preparados multivitamínicos requiere de numerosos pasos tales como la preparación de reactivos específicos, hidrólisis, saponificación, extracciones, preparación de curvas de calibración, ajuste de espectrofotómetro, etc., lo cual trae como consecuencia considerables pérdidas y un alto porcentaje de error.

En cuanto a la vitamina "D", el método U.S.P. (4) para su determinación en mezclas incluye manipulaciones laboriosas como son tres separaciones cromatográficas para el aislamiento de la vitamina "A", ya que se considera como la principal interferencia en la

cuantificación de la vitamina "D". Esto influye en la eficiencia del método debido al alto porcentaje de vitamina "A" en los medicamentos que contienen esta mezcla.

La única publicación existente en la bibliografía específica para la determinación simultánea de vitaminas "A" y "D" es el de Santoro, M. I. y colaboradores (8) en la cual se emplea la Cromatografía Líquida de alta presión, con un 10% de diferencia entre los resultados teórico-prácticos. Presenta la desventaja de ser un método laborioso ya que requiere de la preparación de columnas especiales y la saponificación de la mezcla vitamínica.

En cuanto a las vitaminas "D₂" y "D₃", como señalamos anteriormente, debido a su gran similitud estructural, su comportamiento en reacciones coloridas y adsorbentes es muy parecida; así como sus absorciones en el ultravioleta e infrarrojo. Todo esto imposibilita su diferenciación y determinación. En este trabajo proponemos la técnica de RMN protónica como un método efectivo para la identificación rápida de ambas vitaminas, lo cual puede aplicarse al control cualitativo de la materia prima que se va a emplear en fármacos. En base también al método para el análisis simultáneo por RMN de la mezcla "D₂"-"D₃" (pag. 47) puede llevarse a cabo la determinación de cualquiera de ellas adicionando una cantidad conocida de la otra (patrón secundario).

El método analítico por Resonancia Magnética Nuclear Protónica que en este trabajo se propone, además de presentar la ventaja de la determinación simultánea de vitaminas "A"- D_2 " o "A"- D_3 " y " D_2 "- D_3 " no requiere de un excesivo trabajo químico previo, es un método sumamente rápido, pues una vez excluido el excipiente, no requiere mas de 20 minutos para realizarse.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Strohecker, R. y Henning, H. m.
"Análisis de Vitaminas"
Ed. Paz Montalvo
Madrid, España (1967)

- 2.- Edlund, D. O.
"Gas- Liquid Chromatographic Determination of
Vitamin D in Multiple Vitamin Tablets and Their
Raw Materials"
Methods Enzimol. 67 : 343-46 (1980)

- 3.- Kobayashi, T.
"Gas-Liquid Chromatographic Determination of Vitamin D"
Methods Enzimol. 67 : 347-55 (1980)

- 4.- United States Pharmacopela (USP-XXI)
The National Formulary
Ed. U.S. Pharmacopelial Convention, Inc.
(1985). p. 1118, 1215

- 5.- Berman, E.; Luz, Z.; Mazur, Y. & Sheves, M.
"Conformational Analysis of Vitamin D and analogues,
¹³C and ¹H Nuclear Magnetic Resonance Study"
The Journal of Organic Chemistry, 42 (21): 3325-30 (1977)

- 6.- De Vries, E. J.; Zeeman, J.; Esser, R. J.; Borsje, B. & Mulder, F. J.
"High Performance Liquid Chromatographic Assay for Vitamin D in Vitamin D₃ and Multivitamin Preparations"
Journal Assoc. Off. Anal. Chem., 62 (6): 1285-91 (1979)
- 7.- De Vries, E. J.; Mulder, F. J. & Borsje, B.
"High Performance Liquid Chromatographic Determination of Vitamin D in Multivitamin Preparations: Colaborative Study"
Journal Assoc. Off. Anal. Chem., 64 (1): 61-70 (1981)
- 8.- Santoro, M. I.; Magalhaes, J. F. & Hackmann, E. R.
"Simultaneous Determination of Vitamins A and D in Dosage Forms by High Pressure Liquid Chromatography"
Journal Assoc. Off. Anal. Chem., 65 (3): 519-22 (1982)
- 9.- Manzur, H.
"Assay of Vitamins in Pharmaceutical Preparations"
Ed. John Willey and Sons
USA (1973)
- 10.- Pecsok, R. L. y Shields, L. D.
"Métodos Modernos de Análisis Químicos"
Ed. Limusa
México (1973)

- 11.- Silverstein, R. M.; Cayton, B. G. y Morrill, T. C.
"Identificación Espectrométrica de Compuestos Orgánicos"
Ed. Diana
México (1980)
- 12.- The Association of Vitamin Chemists (USA)
"Métodos de Análisis de Vitaminas"
Ed. Academia
Madrid, España (1969)
- 13.- Standard Spectra NMR
Sadtler Research Laboratories, Inc
Espectros: 8653, 8654
Philadelphia (1974)
- 14.- Official Method of Analysis of the Association of Official
Analytical Chemists
Edited by Sidney Williams
Arlington, Virginia (1985)
p. 43-082, 43-109, 43-232, 43-167, 43-234