



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTUDIO COMPARATIVO DE METODOS QUIMICOS Y  
MICROBIOLOGICOS PARA LA VALORACION DE VITAMINA B-12 EN  
MEDICAMENTOS**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIATURA**

PRESENTA:

**MARIA ESTHER SARTI MARTINEZ**

ASESOR: MARIO ALFONSO MIRANDA CASTRO

México, D.F.

1973



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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 OFICIALMENTE:**

**Presidente:** Q. F. B. Ramón Ulacia Esteve.  
**Vocal:** Q. F. B. Etelvina Medrano de Jaimes.  
**Secretario:** Q. F. B. Mario Miranda Castro.  
**1er. Suplente:** Q. F. B. M<sup>a</sup>. de los Angeles Rodríguez A.  
**2do. Suplente:** Q. F. B. Raquel Mariel.

**TEMA DESARROLLADO EN LOS LABORATORIOS**

**"UPJOHN S. A. de C. V."**

**SUSTENTANTE:** Srta. Ma. Esther Sarti Martínez.  
**Asesor del Tema:** Prof. Q. F. B. Mario A. Miranda Castro.  
**Supervisor Técnico:** Q. F. B. Etelvina Medrano de Jaimes.

A mis Papacitos con todo cariño.

A mis Hermanos.

A mi Maestro:

Q.F.B. Mario A. Miranda Castro.

Quiero hacer patente mi más sincero agradecimiento a los Laboratorios "Upjohn, S.A. de C.V." por la valiosa ayuda que de -- ellos recibí, y sin la cual hubiera sido imposible la elaboración del -- presente trabajo.

## I N D I C E

	Págs.
CAPITULO I. - INTRODUCCION.	1
CAPITULO II. - GENERALIDADES.	2
CAPITULO III. - METODOS DE ANALISIS.	7
CAPITULO IV. - PARTE EXPERIMENTAL.	31
CAPITULO V. - COMENTARIOS.	46
CAPITULO VI. - CONCLUSIONES.	48
CAPITULO VII. - BIBLIOGRAFIA.	49

## CAPITULO I

### INTRODUCCION

Con el objeto de seleccionar un método que nos facilite la --  
cuantificación de la cianocobalamina en las formas farmacéuticas poli-  
vitamínicas, se desarrolló un estudio de los diferentes métodos publica-  
dos, los cuales pueden agruparse en:

Métodos Fisicoquímicos.

Métodos Microbiológicos.

Métodos Biológicos.

En estos se presentan diferentes técnicas. Algunas se men-  
cionan en la sección III de este trabajo.

Después de una revisión de los diferentes métodos publicados,  
se probaron dos técnicas, una perteneciente al grupo de los Métodos Fi-  
sicoquímicos, comparada con otra agrupada dentro de los Métodos Mi-  
crobiológicos.

Se realizó un análisis estadístico de los resultados obtenidos,  
con el objeto de observar de una forma clara la exactitud de las técni-  
cas, además de las ventajas y desventajas observadas durante la mani-  
pulación.

## CAPITULO II

### GENERALIDADES

La cianocobalamina fué descubierta en 1926 (28), pero hasta 1948 Smith en Inglaterra y Karl Folkers (30) el mismo año en Estados Unidos obtuvieron la vitamina B-12 ó cianocobalamina en forma cristalina a partir de extracto de hígado; también indicaron que la vitamina --- B-12 es un producto de fermentación microbiológica; ya que muchas --- bacterias producían materiales como la vitamina B-12 activa, pero en general las especies del género Mycobacterium smegmatis, Lactobacillus arabinosus, Bacillus subtilis y algunas Streptomyces, especialmente S. roseochromogenus, S. griseus y S. Antibioticus, producían cantidades significativas.

Sinónimos.- Cycobamina, Cobamin, Vitamina B-12, Cianocobalamina, -(5,6-dimetilbenzimidazol) cobamina cianuro.

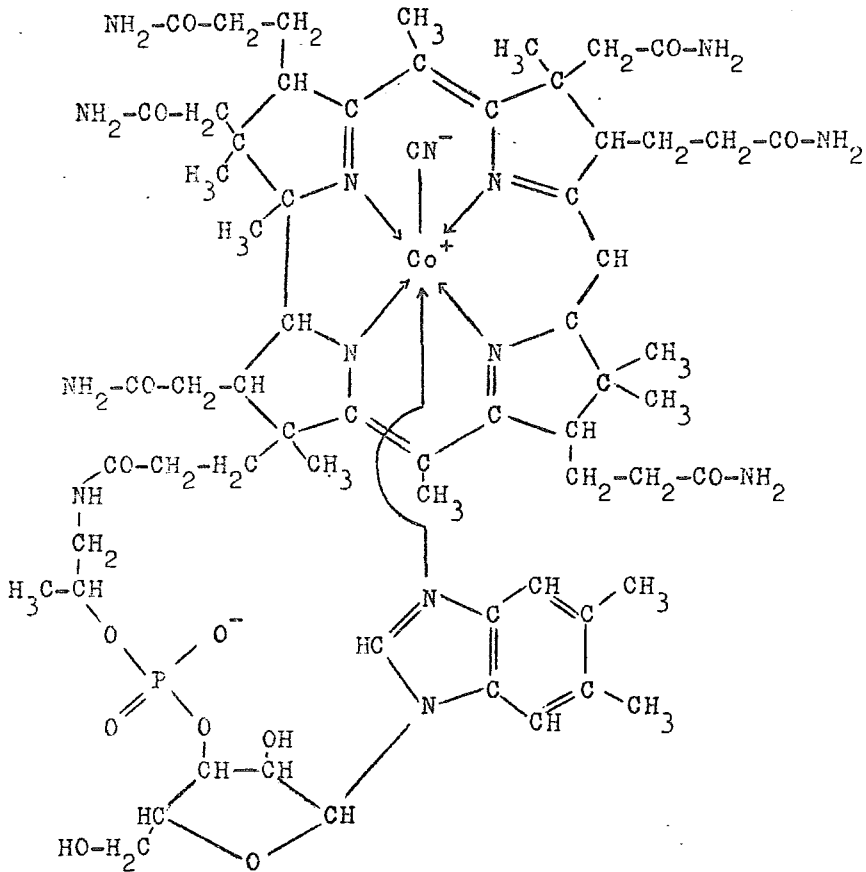
Obtención.- La cianocobalamina es extraída de cultivos de microorganismo, utilizándose para esto diferentes tipos de métodos, entre los principales se encuentran la cromatografía en todas sus formas, las cuales emplean adsorbentes como Carbón vegetal ( 24, 34 ), Bentoni



ta (25), ó resinas carboxílicas de intercambio iónico ( Amberlite ) (40). Otro método consiste en precipitar con cobre o zinc el grupo (CN<sup>-</sup>) de la vitamina B-12 (18).

Propiedades. - La cianocobalamina se obtiene en forma de cristales rojo obscuro, amorfos ó en forma de polvo rojo cristalino. La forma anhidra es muy higroscópica y cuando es expuesta al aire puede absorber cerca del 12% de agua. Es ligeramente soluble en agua, soluble en alcohol, insoluble en acetona, cloroformo y éter. No ha sido definido su punto de fusión. El índice de refracción de los cristales es --- 1.619 ( $\alpha$ ), 1.649 ( $\beta$ ) y 1.659 ( $\gamma$ ) (36). Es ópticamente activa, diamagnética, la absorción espectrofotométrica en solución acuosa se presenta a 278 *m $\mu$* , 361 *m $\mu$* , y 550 *m $\mu$* . (6) esta abosrción no es afectada por pequeños cambios en el pH.

Estructura. - La estructura de la cianocobalamina fué deduci da por una combinación de evidencias químicas y físicas. Una determinación ebulloscópica del peso molecular en metanol da un valor de ---- 1490  $\pm$  150 (6). Considerando un valor de 1360-1575 por datos cristalográficos de rayos X (17). El análisis elemental de la vitamina indica -- una fórmula molecular aproximada de C<sub>63</sub>H<sub>88</sub>CoN<sub>14</sub>O<sub>14</sub>P y corresponde a un peso molecular de 1355. Los cristales contienen de 18 a 25 moléculas de agua de cristalización por molécula de B-12.



### CIANOCOBALAMINA

La carga positiva del Cobalto, es balanceada por las cargas -  
negativas del anillo corrinoide, cianuro y fosfato.

DOROTHY HODKING Premio Nóbel de Química en 1964.

El átomo de cobalto de la molécula ha demostrado ser trivalente (45) y da estabilidad al complejo. Por ejemplo: la acción de agentes precipitantes, hidrólisis ácida e intercambio con cobalto radioactivo; indica que el cobalto es una unión químicamente firme. Posteriormente se demostró por oxidación con permanganato de potasio y por un examen en el espectro de infrarojo que la molécula de vitamina B-12 contiene un grupo ciano ( $CN^-$ ) y que este grupo es directamente un enlace al átomo de cobalto. El grupo ciano puede ser reemplazado por otros iones (5, 20) ó moléculas. El desplazamiento por hidróxilo, da acuocobalamina (vitamina B-12a ó vitamina B-12b), en su estructura incorpora una molécula de agua neutra, así dando una molécula total con propiedades básicas; cuando neutralizamos con ácido clorhídrico el producto es acuocobalamina clorada. El grupo ciano puede también ser reemplazado por nitrilo dando nitrocobalamina ó vitamina B-12c. La cianocobalamina debe ser protegida de la acción de la luz y del aire.

La cianocobalamina por su complejidad estructural da lugar a modificaciones en la molécula que ocasionan modificaciones en la actividad biológica. La modificación más frecuente es la substitución de otros nucleótidos por ribósidos de 5, 6 dimetil benzimidazol.

Farmacología. - La vitamina B-12 es indispensable en el organismo ya que en unión del ácido fólico actúa como factor de maduración de los eritrocitos, favorece la formación y metabolismo de purina

y pirimidinas, interviene en la biosíntesis de nucleoproteínas y en el -- mantenimiento de la hematopéyesis normal, esta actividad es semejante a la del factor antianemia del hígado.

Se encuentra presente en el riñón, tejido muscular y principalmente almacenada en el hígado, además es producida por síntesis -- bacteriana en el colón. Los alimentos en que se encuentra presente principalmente son: la carne, huevos y leche. No obstante se encuentran ca -- sos en que hay deficiencia de vitamina B-12 por ejemplo: Anemia perniciosa con ó sin alteraciones neurológicas, anemia macrocítica nutricional y anemia megaloblástica en infantes.

La cianocobalamina es absorbida desde el tracto gastrointestinal por la presencia de un factor intrínseco que es una mucroproteína -- presente en la mucosa gástrica. Esta absorción es irregular cuando no es administrada en dosis terapéuticas, y en ausencia del factor intrínseco. Unicamente 1.5 a 3.5 mcg. de cianocobalamina pueden ser absorvidos por el factor intrínseco y el 1% de la cantidad dada es absorbida por difusión pasiva. Cuando es administrada en dosis de 100 mcg. ó más es excretada por la orina en 48 horas.

## CAPITULO III

### METODOS DE ANALISIS

A).- Métodos Físicoquímicos. - Los métodos físicoquímicos más importantes para determinar vitamina B-12, están basados en la absorción espectrofotométrica de la vitamina B-12 en soluciones acuosas ó en determinación fotométrica del grupo ciano de la cianocobalamina.

Métodos Espectrofotométricos. - Estos métodos son reproducibles para determinar la pureza de la vitamina B-12 cristalina, y para la estimación de vitamina B-12 en relación a muestras puras. Estos métodos son  $10^5$  a  $10^6$  veces menos sensibles que los métodos microbiológicos, y no están claramente definidos para distinguir entre algunas cobalaminas, las cuáles pueden ser diferenciadas microbiológicamente. - Otras cobalaminas biológicamente activas pueden dar falsos valores cuando son estimadas espectrofotométricamente porque su absorción máxima está a diferentes longitudes de onda del estándar de vitamina B-12. - La acuosa (hidroxi) cobalamina puede constituir del 5 al 10% de cianocobalamina pura.

El método para determinación química de vitamina B-12 estu-

diado por Rudkon Jr. (37), incluye la determinación colorimétrica del ácido cianhídrico liberado de la vitamina por fotólisis; y la determinación de los productos de hidrólisis tales como 5,6 dimetil benzimidazol y el pigmento rojo formado por el tratamiento ácido de la vitamina B-12. Este método no ha sido reproducible para el análisis de B-12 en caldos y extractos crudos de fermentaciones. El método analítico descrito --- aquí, proporciona un rápido, reproducible y acertado procedimiento para determinar vitamina B-12. Basado en diez análisis separados de cada tres muestras, la desviación estándar para este método es del 5%. Una ventaja segura del método químico es la de recuperar la vitamina B-12 cristalina añadida.

Heatcote, J.G. (14) estudió una técnica aplicada a la estimación de cianocobalamina e hidroxicobalamina en mezclas de vitaminas. El método consiste en extraer la vitamina B-12 con alcohol bencílico, de la mezcla de vitaminas que se encuentra en solución acuosa y medir la densidad óptica a 356 m $\mu$ . Obteniéndose el coeficiente de distribución, que es función de la composición de la muestra y puede ser comparado con el calculado del coeficiente de partición de la sustancia pura.

Koneey J., Tolgyssy (23) observaron que la cianocobalamina después de una hora de descomposición por tratamiento con ozono es determinada por el método complejométrico. La muestra es tratada con un ión intercambiador como el Dowes 50W-X2, después se le añade una sustancia quelante como el EDTA 10 M. La diferencia de las activida--

des antes y después del tratamiento con EDTA es proporcional a la cantidad de cianocobalamina.

Berge (3) dosificó la vitamina B-12 en las formas farmacéuticas, disolviendo esta y determinando subsecuentemente el complejo cobáltico por absorción espectrofotométrica. Este método es rápido y sensible dando aplicaciones a control de calidad en formas farmacéuticas.

La vitamina B-12 y sus análogos pueden ser separados por -- cromatografía en placa delgada (31). Los corrinoides son convertidos a su forma diciano formado por adición de cianuro de sodio ó cianuro -- de potasio, los productos son cromatografiados en placa delgada de alúmina seca a 25°, usando isobutanol, isopropanol, agua (1:1:1), este procedimiento separa factor B cianocobalamina, factor B-12 (III), factor A, presudovitamina B-12 y factor V. La separación de hidroxicobalamina de cianocobalamina en soluciones acuosas con un pH ajustado a 8.5 - con hidróxido de amonio, es corrida en la oscuridad con alúmina neutra seca a 20°, usando isobutanol, isopropanol, agua (1.5:1.1:1.25). La cantidad determinada de cianocobalamina es basada en la precipitación de todas las cobalaminas como sus complejos de cianuro de cobre. Primero es añadido sulfato de cobre dando un precipitado rojo oscuro. El precipitado se filtra y es disuelto en agua con acetona conteniendo cianuro de potasio. La solución resultante es cromatografiada en placa delgada con base de alúmina seca a 20°, usando isobutanol, isopropanol, agua

(1.5:1.1:1). Después de la cromatografía se seca al aire, la alúmina - llevando la mancha de cianocobalamina, ésta es diluída con solución re- guladora pH 7 y determinada colorimétricamente a 361  $m\mu$ .

Purificación y valoración de vitamina B-12 (44). - La purifi- cación se efectúa por filtración a través de una resine de intercambio ió- nico. Esta resina es la Amberlita XE-97 que se emplea empacada en -- una columna para filtración. Se utiliza como eluyente dioxano-ácido clor- hídrico ó trahidrofurano-ácido clorhídrico, las impurezas y sustancias - interferentes son previamente lavadas en la columna con varios solven- tes. La muestra debe contener entre 100 - 250 mcg. de cianocobalamina y tener un pH entre 4 - 6. Para que la vitamina B-12 total se convierta - toda a cianocobalamina, se trata con cianuro de potasio. La vitamina -- B-12 aislada es valorada espectrofotométricamente.

Determinación colorimétrica con solución Nitroso R. - El mé todo involucra la oxidación de la muestra con peróxido de hidrógeno y la solución resultante es tratada con solución nitroso R ( 1-nitroso 2-naph- tol 3,6 sulfanato disódico ) a pH estable. El color rojo naranja se lee en el espectro a una longitud de onda máxima de 420  $m\mu$ , obedeciendo la Ley de Lambert y Beer. A una concentración entre 100 y 600 mcg de vitami- na B-12. Originalmente esta determinación fué investigada por Sharif -- (39).

B). - Métodos Microbiológicos. - Los métodos microbiológi



cos pueden ser Turbidimétricos o en cilindro-placa.

Método Turbidimétrico. - Cuando examinamos muestras que contienen Vitamina B-12 en forma libre como cianocobalamina ó acuosa ( hidroxicobalamina ), se prepara una curva de calibración con un estándar, y la muestra es diluída con agua hasta que la concentración de vitamina B-12 esté en la parte media de la curva. Si la vitamina B-12 contenida, es completamente desconocida, se hace una serie de diluciones, extendiendo sobre varias concentraciones, que deben ser preparadas -- primero. Si los experimentos preliminares dan una turbidez que puede ser comparada con la curva, entonces se establecen una serie de experimentos paralelos, subiendo hasta cubrir un rango estrecho de concentraciones en la región apropiada.

Método en Cilindro-placa. - Los métodos en cilindro-placa son más útiles cuando son combinados con cromatografía, estos son usados para la identificación de vitamina B-12 activa en cromatografía en papel, que permite la identificación de compuestos activos que son útiles en cantidades muy pequeñas. Estos ensayos son incómodos e impracticables para rutina en la estimación cuantitativa.

Ochromona malhamensis: Sensibilidad 1 pg ( $= 10^{12}$  g ) ATCC 11532. Esta alga es la más específica en requerimientos para cobalaminas. Únicamente las formas de B-12 biológicamente activas satisfacen -

el factor de crecimiento requerido de este microorganismo. Este factor de crecimiento ha sido referido como "B-12 (111)". La prueba es afectada por la presencia únicamente de grandes cantidades de metionina, la cual puede simular definitivamente la actividad de la vitamina B-12 en el organismo. (21)

Euglena gracilis Z strain: Sensibilidad: 1 pg ( $=10^{-12}$  g) ATCC 12716. Este microorganismo no es tan específico como O. malhamensis pero comparte la propiedad de responder únicamente a cobalaminas. El amplio número de cobalaminas que satisfacen el factor de crecimiento requerido para Euglena gracilis junto con la falta de exceso de estos requerimientos ha hecho que este microorganismo sea escogido para medir "B-12 total". Aún cuando este ensayo requiere de 4 a 7 días de incubación, la utilidad para cuantificar cobalaminas totales es compensada por el tiempo requerido. (21)

Escherichia coli 113-3 ATCC 11105.- Este microorganismo responde al factor B y a una amplia variedad de cobalaminas, y a nucleotidos libres de cobalaminas. La desventaja de la baja especificidad, no obstante se establece contra la ventaja de la simplicidad técnica y el tiempo ahorrado, ya que este microorganismo proporciona un rápido ensayo para cobalaminas totales y factor B de 16 a 24 horas. (21)

Lactobacillus leichmanii ( ATCC 4797 ó 7830 ) Sensibilidad: -

1 pg ( $= 10^{-12}$ g. ). Este microorganismo responde a una amplia variedad de cobalaminas y a dexosiribosa, los cuales exceden a los requerimientos de cobalaminas. Este ensayo debería siempre ser hecho en dos partes: a) para cobalaminas más dexosiribosa y b) para dexosiribosa solamente. Este microorganismo provee un rápido ensayo para cobalaminas totales y dexosiribosa de 24 a 48 horas. (21)

Cromatiobograma. - El método consiste en hacer primero la cromatografía en papel y después las tiras separadas que contienen la mancha son sembradas, dejándose durante el período de incubación. El Rf del material activo es determinado como conclusión del ensayo para la localización de las áreas de crecimiento del microorganismo. La estimación cuantitativa de la concentración de un compuesto es una área activa, puede ser determinada por un método turbidimétrico ó por la medida del Rf del área activa del cromatograma, comparado con un Rf conocido de una muestra que haya sido corrida paralela y bajo las mismas condiciones. No es necesario esterilizar el cromatograma hasta ser usado con el microorganismo de ensayo, el cual crece en un rápido período de 24 horas o menos.

Un estudio microbiológico para comparar la actividad de la vitamina B-12 y B-12a hecho por Hendlin (15) nos indica que ésta depende del microorganismo y técnica empleada. Con el Lactobacillus leichmanii el crecimiento producido por el efecto de la vitamina B-12a es destruído

por calentamiento en autoclave, la vitamina B-12 no es afectada. Esta destrucción es prevenida por la adición de cantidades estables de tioricinato o ácido ascórbico. Muchas muestras de hígado demostraron una comparable pérdida de actividad después del autoclave con el medio de ensayo. L. leichmanii, se manifestó que contenían cantidades apreciables de vitamina B-12 o B-12a o sustancias semejantes. En el caso de Lactobacillus lactis no se manifestó una pérdida en la actividad microbiológica de vitamina B-12 o B-12a durante el calentamiento en autoclave. La actividad de ambas vitaminas fué incrementada por autoclave y la adición de sustancias reductoras, en estas condiciones se induce un crecimiento incrementando en la potencia de la vitamina B-12a y un rechazo en la actividad biológica de la vitamina B-12. Las diferencias no aparentes en la actividad microbiológica fueron observadas entre la vitamina B-12a y una sustancia descrita en la literatura como vitamina B-12b.

Fueron ensayadas algunas muestras de tejido animal por Itagaki Takako (19) siguiendo el método de cilindro placa, usando una variante de *E. coli*; conteniendo todas las muestras cobalaminas. Los resultados obtenidos fueron considerablemente bajos comparados con las determinaciones turbidimétricas. Se repitió la experiencia y los resultados fueron insatisfactorios, ya que la curva de dosis respuestas no fué paralela a la de soluciones de cianocobalamina pura. Evidentemente al-

gunos factores interfirieron en el ensayo de cobalaminas por el método de cilindro placa; uno de ellos fué la presencia de metionina. Este ensayo es satisfactorio para determinar vitamina B-12 en materiales biológicos.

Un método para determinar vitamina B-12 en presencia de metionina, es el estudiado por Mlodecki Henry (29). La vitamina B-12 es separada de la metionina por cromatografía en papel Whatman No. 1 por la técnica descendente; el cromatograma es corrido de 3 a 17 hrs. con Butanol saturado con agua. Bajo estas condiciones la vitamina B-12 quedaba en el punto de salida y la metionina era corrida. Después de la separación, la vitamina B-12 es determinada usando el método propuesto por Harrison E., et al (1951) y Lustigman M. (26), Konecny J. (23). La determinación está basada en la cuantificación de Cobalto liberado en la molécula de vitamina por el efecto del ozono. El tiempo óptimo de ionización es de 1 hora. Los iones de cobalto liberados son marcados por cobalto radioactivo y ellos son atrapados por cationes intercambiadores. La actividad es medida y entonces son recogidos en contactos de una substancia química como el EDTA. El EDTA absorbido es proporcional al Cobalto absorbido por el catión intercambiador, la actividad es medida con ayuda de una curva de calibración.

La diferencia en la respuesta de crecimiento de los microorganismos ensayados con vitamina B-12 fueron significativas. Los microorganismos ensayados por Cook Elizabeth (9) fueron los siguientes: Esche

richia coli (a), Lactobacillus leichmanii (b), Euglena gracilis (c) Ochramona malhamensis (d); las muestras utilizadas en el estudio -- pertenecen a hígado y riñón, tratadas bajo las mismas condiciones que el estándar al que fueron comparadas. El hígado evaluado con E. coli dió un valor alto comparado con los obtenidos con otros microorganismos y generalmente en tejido de riñón. La experiencia se repitió y los resultados no fueron tan significativamente altos como aquellos obtenidos con L. leichmanii, E. gracilis y O. malhamensis, que fueron -- más bajos. Estas diferencias fueron más grandes que las respuestas esperadas y no pudieron ser explicadas por las diferencias de especificaciones y sensibilidad de los ensayos con microorganismo. Este efecto, -- fué explorado en una tentativa para encontrar explicación de las variaciones en el aumento de crecimiento de la respuesta.

Después de haber estudiado diferentes métodos, se eligieron -- los que nos manifestaban mayores ventajas en la determinación de vitamina B-12, en forma polivitamínicas, de estos se eligieron uno que nos permite cuantificar la vitamina B-12, mediante una previa separación; el otro nos permite cuantificar la vitamina B-12 en forma directa. Haciendose al final un análisis estadístico de los resultados obtenidos con el -- fin de observar cual nos propone mayores ventajas.

#### Métodos Propuestos.

##### 1.- Método Fisicoquímico.

Este método se basa en la separación y valoración de la vitamina B-12 en mezclas farmacéuticas complejas; mediante el empleo combinado de las resinas de intercambio iónico y espectrofotometría. -  
(11)

#### Material y Reactivos.

Espectrofotómetro Beckman.

Columna de vidrio con llave 17 x 2 cm.

Resina de Intercambio iónico "Amberlita IRP 64" Resina sintética de intercambio catiónico; esta capacidad deriva de los grupos ácidos carboxílicos presentes. Puede ser utilizada bajo la forma de ácidos libres o convertirla rápidamente a sal sódica por tratamiento con hidróxido de sodio, en esta forma la resina efectúa reacciones de sales de ácidos débiles y bases fuertes. En las dos formas cualquier cation absorbido puede ser desadsorbido fácilmente, tratando con ácidos minerales diluïdos, se obtiene una eficiencia de 100%.

Propiedades físicas y químicas. - El equilibrio de la amberlita es afectado por la acción de altas temperaturas, siendo la temperatura máxima de 100°C., y un incremento en el pH de 10, ó sea tiene un intervalo de pH de 5 a 14. La Amberlita es estable químicamente en presencia de ácidos y bases fuertes; solventes alifáticos y aromáticos; reactivos oxidante y reductores.

Esta resina puede ser regenerada lavándose con ácido clorhídrico.

drico o ácido sulfúrico de 1 al 5%, en forma de flujo inverso, o agitándose fuertemente y dejándose en reposo para que sedimente y eliminar el sobrenadante sucio, estos lavados se repiten hasta que el sobrenadante resulte claro, posteriormente debe lavarse con agua bidestilada para eliminar el exceso de acidez<sup>s</sup> (42).

Dioxano - Acido Clorhídrico ( 60 ml de dioxano + 10 ml. de -- ácido clorhídrico normal + 30 ml. de agua destilada ).

Acetona 85% ( 85 ml de acetona + 15 de agua destilada ).

Solución reguladora de pH 4 ( 65 de citrato de sodio + 60 g de ácido cítrico + agua destilada 1000 ml ).

Cianuro de potasio al 5% ( 5 g de cianuro de potasio G.R. + 95 ml de agua destilada ).

Acido cítrico al 10% ( 10 g de ácido cítrico + 90 ml de agua -- destilada ).

Acido clorhídrico 0.1 N

Hidróxido de sodio 1 N

Preparación de la solución Estándar de referencia de Cianocobalamina USP..- Pesar 10 mg de cianocobalamina pura o el equivalente a 100 microgramos de cianocobalamina estándar de referencia, previamente secada por 4 horas. Llevar la muestra a una matraz aforado de -- 100 ml. y disolver con una mezcla de dioxano - ácido clorhídrico + agua ( 60 - 10 - 30 ml ), ya disuelto se afora el matraz; en esta solución se --



tiene una concentración de 100 mcg. Esta solución debe ser refrigerada y usada con precaución después de 30 días, ya que la potencia puede variar.

Solución del estándar de trabajo. - De la solución estándar de referencia de cianocobalamina USP se deja que tome la temperatura ambiente y se toma una alícuota llevándose a un volumen deseado, según la concentración final que se desee, para llevar al volumen se utiliza la mezcla dioxano ácido clorhídrico - agua, esta es la solución que se utiliza para leer en el espectrofotómetro.

Preparación de la resina. - Cualquier absorbente para su uso debe ser previamente activado. La resina empleada, se activa de la siguiente manera: Se coloca en un matraz Erlenmeyer con tapa 25 g. de la resina; se le agrega agua destilada y se agita durante varios minutos. Dejar reposar una noche. Separar el líquido sobrenadante. Repetir el lavado cada 10 minutos, hasta que el líquido resulte claro. Agregar 100 ml. de solución de Hidróxido de sodio normal y dejar actuar durante 30 min. Se separa la solución alcalina y se lava con agua hasta que el líquido resulte neutro. Agregar 100 ml. de solución amortiguadora de pH 4 y dejar actuar durante 30 min. Introducir la resina dentro de la columna preparada previamente con un poco de algodón de vidrio; este sirve para retener el material sólido de la columna, mientras el líquido eluyente --

circula libremente. Se vierte en el interior de la columna un poco de solución amortiguadora, unos 2 a 4 cm. por encima de la lana de vidrio. La resina suspendida en la solución amortiguadora se vierte en la columna lentamente, lo que permite que se pose por la fuerza de la gravedad hasta alcanzar una altura de 10 cm. Finalmente se abre la llave inferior de la columna para que salga el exceso de disolvente contenido. Agregar nuevamente solución amortiguadora hasta que el eluyente tenga un pH 4. La altura del disolvente no debe exceder más de 2 a 5 mm. sobre el sólido, hasta el momento de introducir la muestra que se desea separar.

Preparación de la muestra. - Se toma un número de tabletas correspondiente a 100 mcg. de cianocobalamina. Las tabletas son molidas y puesto el polvo en un matraz con 25 ml. de solución amortiguadora más 25 ml. de agua. Este volumen puede variar según la cantidad de polvo a disolver. En este caso las grageas eran puestas en el matraz con la cantidad de solución indicada y agitadas mecánicamente por 60 min. ó un poco más hasta disolver completamente las grageas. La suspensión es centrifugada durante 30 min., y el líquido sobre nadante se coloca en la columna previamente preparada, el residuo se añade a la columna. Cuando la vitamina B-12 se encuentra en forma de cobalamina es conveniente tratar con cianuro de potasio al 5% según la técnica de Van Melle (44). Cuando la muestra ya ha sido disuelta y separado el so

brenadante se añade 5 ml de cianuro de potasio al 5%, la mezcla se pone en baño de vapor durante 15 - 20 min. Después la suspensión se enfría y se ajusta el pH entre 4 - 6 con ácido cítrico al 10%, por precaución debe dejarse bajo la campana por 20 min. ya que hay desprendimiento de ácido cianhídrico.

Se coloca la muestra en la columna, pasando el líquido a razón de 50 gotas por minuto. Lavar la columna con solución de ácido clorhídrico 0.1 N, hasta que el eluyente resulte incoloro. Lavar con solución de acetona al 85% hasta que la misma salga incolora (aproximadamente entre 50 - 100 ml.), finalmente lavar con ácido clorhídrico 0.1 N hasta que la acetona haya sido totalmente eliminada.

Elución de la vitamina B-12 y determinación espectro fotométrica. Pasar a través de la columna 20 ml. de la solución formada por la mezcla dioxano - ácido clorhídrico. Recoger en un matraz aforado de 10 ml. y completar el volumen. En esta solución se encuentra toda la vitamina B-12 presente en el problema. La solución obtenida se lee en el espectrofotómetro comparada con la solución estandar de trabajo y usando como blanco de referencia la mezcla dioxano ácido clorhídrico.

Cálculos. - Para determinar la cantidad de microgramos de vitamina B-12 obtenidos por unidad, se utiliza la siguiente formula:

$$C.U. = \frac{A_{\text{probl.}}}{A_{\text{St}}} \times C_{\text{St.}} \times \frac{\text{Dil.}}{M}$$

Donde:

C. U. - Concentración obtenida por Unidad en mcg.

$A_{\text{probl.}}$  = Absorbancia de la solución problema.

$A_{\text{st}}$  = Absorbancia de la solución estandar.

$C_{\text{St}}$  = Concentración de la solución estandar en mcg/ml.

Dil. - = Dilución final de la muestra.

M = Muestra.

Para llevar a cabo el estudio de esta técnica se realizó una - revisión de la solubilidad de los componentes de las muestras en estudio. De esto se preparó un cuadro que está a continuación.

SUBSTANCIAS	Agua	Etanol	Meta - nol	acetona	Cloro- formo	Eter	Dioxo- no	Piridi- na	Glice- rina
Mononitrato de tiamina	c	-	-	-	st	st	-	-	-
Riboflavina	f	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloruro de Piridoxina	c	c	-	e	st	st	-	-	-
Pantetonato de Calcio	c	-	c	-	e	c	c	-	-
Cianocobalamina	c	d	-	-	-	-	-	-	-
Niacinamida	c	c	-	-	e	e	-	-	-
Acetato de vitamina A	e	e	-	-	e	e	-	-	-
Vitamina D2	g	-	-	c	c	c	-	-	-
Sulfato cuprico	c	e	-	-	-	-	-	-	-
Sulfato Manganoso	c	g	-	-	-	-	-	-	-
Sulfato de Magnesio	c	g	-	-	-	-	-	-	-
Ioduro de Potasio	e	c	c	c	-	-	-	-	-
Acido cítrico	c	d	c	-	c	c	-	-	-
Sulfato ferroso	c	g	-	-	-	-	-	-	-
Acido Fólico	d	d	d	g	g	g	-	-	-
Fluoruro de sodio	c	g	-	-	-	-	-	-	-
Fumarato ferroso	c	c	-	-	-	-	-	-	-
Cloruro de Calcio	c	c	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	c	e	-	-	-	-	-	-	-

SOLUBILIDAD DE LOS COMPONENTES DE LAS  
MUESTRAS.

muy soluble	menos de 1	(a)
facilmente soluble	de 1 a 10	(b)
soluble	de 10 a 300	(c)
poco soluble	de 30 a 100	(d)
ligeramente soluble	de 100 a 1000	(e)
muy poco soluble	de 1000 a 10 000	(f)
insoluble	mas de 10 000	(g)
datos no reportados en la literatura.		(-)

II. - La actividad de la vitamina B-12 determinada por el uso de ensayos microbiológicos, generalmente ha sido complicada. Unos es tudios demostraron que la vitamina B-12 producía un desarrollo consi - derable usando la mutante de Escherichia coli, 113-3, que fué aislada por Kocher (22). Se estableció una curva de dosis respuesta, encontrándose una gran sensibilidad de este microorganismos a concentraciones - relativamente bajas de vitamina B-12, comparados con los requerimien tos de metionina para los ensayos específicos de B-12. Davis y Minglio - ni (10) observaron la posibilidad de usar la cepa de Echerichia coli en - ensayos específicos para vitamina B-12, ya que el crecimiento de esta bacteria en ausencia de la vitamina no era satisfactorio.

Medios y Reactivos. -

Agar Mínimo. -	Glucosa purísima	6 g.
	Agar en hilos	20 g.

Se disuelven los componentes en cantidad suficiente de agua, y se llevan finalmente a 1000 ml., se esteriliza a 115° C. durante 20 - min.

Solución salina de Lederberg. -

Cloruro de amonio	20 g.
Nitrato de amonio	4 g.
Sulfato de sodio	8 g.
Fosfato dipotásico	12 g.

Fosfato monopotásico	4 g.
Sulfato de Magnesio	0.4 g.

Se disuelven los ingredientes y se llevan a 1000 ml. con agua destilada, esterilizando a 120° durante 20 min. En el momento de la distribución sobre las placas se mezclan tres partes de Agar mínimo con una parte de solución salina de Lederberg.

Nota. - Este medio existe en el mercado y equivale a la mezcla de Agar mínimo con la solución salina de Lederberg.

Minimal Agar Davis ( Difco 0544 )

Dextrosa	1 g.
Sulfato de Amonio	1 g.
Fosfato dipotásico	7 g.
fosfato monopotásico	2 g.
citrate de sodio	0.5 g.
sulfato de magnesio	0.1 g.
Agar	15.0 g.
pH final	7

Resuspender 26.6 g. del medio en 1000 ml. de agua calentar a ebullición por unos minutos para disolver bien, esterilizar a 121° durante 15 min.

Medio Tripticasa soy agar (Difco)	
Digerido pancreático de la caseina	15 g.
Peptona	5 g.
Cloruro de sodio	5 g.
Agar	15 g.
pH final	7.3

Pesar 4 gramos del medio y disolver en 100 ml. de agua destilada. Calentar a ebullición para disolver completamente, esterilizar en autoclave por 15 min. a 212°

Solución extractiva de metabisulfito de sodio.

fosfato disódico	1.29 g.
Acido cítrico	1.1 g.
metabisulfito	1.0 g.
Agua	100 ml.

Esta solución debe ser preparada cada vez que va a usarse.

Alcohol 3 A. - ( 5 ml. de alcohol metilico + 95 ml. de alcohol etilico ).

Solución salina isotónica. - 0.85 g. de cloruro de sodio disueltos en 100 ml. de agua destilada.

Preparación del Estadar de Cianocobalamina USP. -

Una cantidad de cianocobalamina referencia estandar previamente seca durante 4 horas. Se disuelve en alcohol al 25% (25 ml. de -



de alcohol 3 A + 75 ml. de agua bidestilada ). Cada mililitro de esta solución contiene 1 mcg/ ml. de cianocobalamina pura. Debe ser refrigerada y no usarse después de 60 días de su preparación.

Preparación de la solución estandar de trabajo.

Tomar una alicuota de la solución Estandar de Cianocobalamina, y agregarle el 25% del volumen final de solución extractiva de metabisulfito de sodio. Poner en la autoclave durante 10 min. a 121° para extraer, enfriar y aforar con agua bidestilada para llevar a la concentración deseada.

Preparación del Microorganismo ó Inoculo. -

Microorganismo usado: Escherichia coli 113-3 ATCC 11105.

El germen es conservado y trasplantado sobre un medio rico como Triplicasa Soya Agar, en tubo inclinado.

Partiendo del tubo de mantenimiento se siembran nuevos tubos, que se dejan incubar a 37° C. durante 15 a 18 horas aproximadamente. Se vierte sobre el tubo de cultivo solución salina isotónica, para recoger el germen, esta suspensión es centrifugada durante 10 min., se retira el sobrenadante, y se vuelve a resuspender el germen, la suspensión obtenida se lee a 650<sub>mμ</sub> debe dar el 10% de transmitancia poco más ó menos. Con esta suspensión se inocula al 1% el medio.

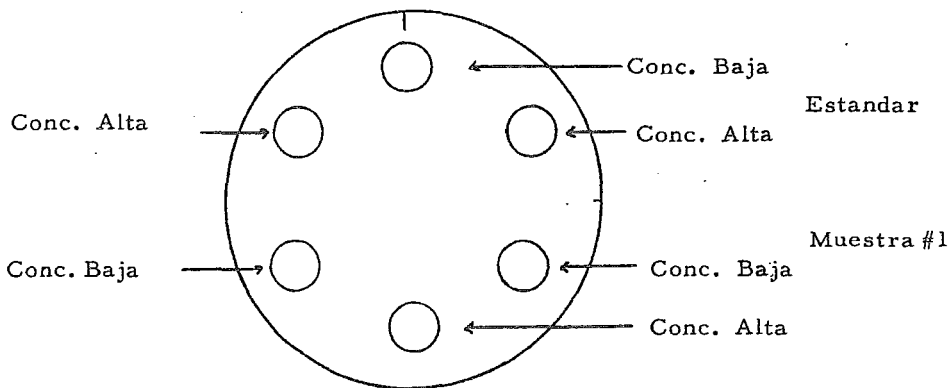
Preparación de las cajas. -

Se utilizan cajas de Petri de 100 X 20 mm., esterilizadas en

estufa a  $160^{\circ}$  . durante 2 horas. Se distribuye sobre las cajas 15 ml. del medio que sirve como base. Se deja enfriar y se le agrega 10 ml. del medio con el inoculo. El medio durante la distribución debe mantenerse en Baño María a  $48 - 50^{\circ}$  . Se dejan las cajas enfriar para poder colocar los cilindros formando un hexagono regular.

Preparación de la Muestra. -

Una cantidad estable de material acertadamente pesado. En este caso, un determinado número de comprimidos es molido con la solución extractiva de metabisulfito de sodio, por cada gramo ó mililitro de muestra se añaden 25 ml. de la solución de metabisulfito. La mezcla obtenida se extrae en autoclave durante 10 min. a  $121^{\circ}$  ., enfriar la muestra y aforar al volumen deseado. Si hay partículas insolubles, la muestra se centrifuga ó filtra. De la solución clara se toma un volumen, llevandose este a un volumen final que contenga la misma concentración que la solución estandar de trabajo. Esta solución se coloca en los cilindros que deben ir distribuidos de la siguiente manera:



SISTEMA ( 2 + 2 ) Dosis

Cálculos.-

Calcular la relación entre las dosis elegidas con la fórmula siguiente:

$$D = \frac{D_2}{D_1}$$

donde:

D = relación de las dosis

D<sub>1</sub> = Dosis menor seleccionada

D<sub>2</sub> = Dosis mayor seleccionada

A continuación aplicar las fórmulas estadísticas normales utilizadas en las pruebas biológicas relacionadas a DOSIS - RESPUESTA, para el método de ( 2 + 2 ) dosis.

Calcular las diferencias de acuerdo con las fórmulas ( 1 ) y ( 2 ).

$$A = ( S_1 + S_2 ) - ( P_1 + P_2 ) \text{ ----- ( 1 )}$$

$$B = ( S_2 + P_2 ) - ( S_1 + P_1 ) \text{ ----- ( 2 )}$$

S<sub>1</sub> = Diámetro promedio de crecimiento correspondiente a la dosis menor seleccionada del estandar.

S<sub>2</sub> = Diámetro promedio de crecimiento correspondiente a la dosis mayor seleccionada del estandar.

P<sub>1</sub> = Diámetro promedio de crecimiento correspondiente a la dosis menor

seleccionada del problema.

$P_2$  = Diámetro promedio de crecimiento correspondiente a la dosis mayor seleccionada del problema.

#### DETERMINACION DE LA RELACION DE ACTIVIDADES ( R )

$$M = \log D \frac{A}{B} \text{ ----- ( 3 )}$$

$$R = \text{antilog } M \text{ ----- ( 4 )}$$

#### CALCULO DE MCG POR COMPRIMIDO:

$$\text{MCG / C} = \frac{\text{R. C. F. PM.}}{M}$$

C = Dosis mayor del estandar ( mcg. )

F = Factor de dilución correspondiente a dosis mayor.

PM = Peso promedio de los comprimidos.

M = Peso de la muestra problema.

Nota: Cuando el problema es menor que el estandar se usa 1/R.

## CAPITULO IV

## PARTE EXPERIMENTAL

I. - Separación Cromatográfica y determinación Espectrofotométrica. - Con el objeto de ajustar el método, se efectuaron varias pruebas tentativas; tomando en consideración, altura de la columna, - procedimiento de preparación de la muestra, concentración final, usando como muestra cianocobalamina en gelatina al 0.1 %, qué se usa como materia prima en la preparación de los productos en estudio.

Comprobación de la Ley de Lambert Beer. - Se prepararon varias muestras de estandar y problema a diferentes concentraciones. Para efectuar esta operación, se tomaron muestras de cianocobalamina en gelatina al 0.1 % preparadas como se describió en la técnica, llevadas a concentraciones que van de 2, 4, 6, 8, 10 mcg.

Las soluciones obtenidas fueron leídas contra un estandar de cianocobalamina USP a  $361_{\text{mg/l}}$ . Los resultados fueron graficados, obteniéndose así la comprobación de la Ley de Lambert Berr para cianocobalamina, como lo muestra la gráfica No. 1

Correlación entre los puntos de la curva de Lambert y Berr.

No.	X = mcg	( X-M)	(X-M) <sup>2</sup>	Y	( Y-M)	(Y-M) <sup>2</sup>	$\frac{(X-M)}{(Y-M)}$
1	1	4.16	17.31	0.031	0.0933	0.0086	0.388
2	2	3.16	9.99	0.058	0.0663	0.0044	0.209
3	4	1.16	1.35	0.085	0.0393	0.0015	0.046
4	6	0.84	0.71	0.140	0.0157	0.0002	0.013
5	8	2.84	8.07	0.198	0.0737	0.0054	0.209
6	10	4.84	23.42	0.234	0.1097	0.0120	0.531
$\Sigma$	31		60.85	0.746		0.0321	1.396
M	5.16			0.1243			

Correlación entre puntos

$$r = \frac{(dx \cdot dy)}{\sqrt{dx^2 \cdot dy^2}} = \frac{1.396}{\sqrt{1.956}} = \frac{1.396}{1.40} = 0.997$$

$r_t$  = para dos variables y 4 grados de libertad ( n - 2 )

$r_t$  ( p 5% ) = 0.811.

$r_t < r_e$   $\therefore$  hay correlación entre los puntos.

Pendiente de la recta

$$b = \frac{(dx \cdot dy)}{dx} = \frac{1.396}{60.85} = 0.022$$

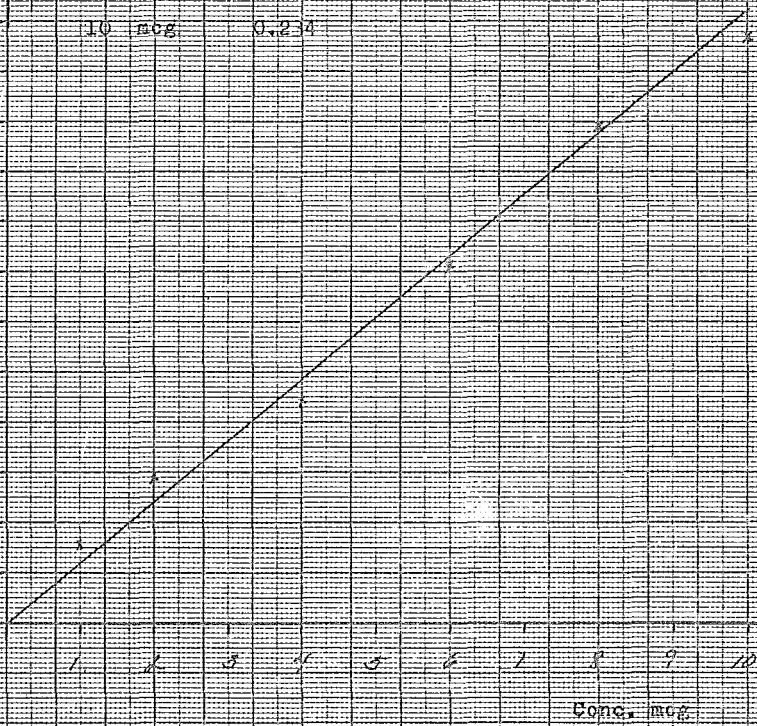
Conclusión. -  $r_e > r_t$  esto significa que los puntos tienden a situarse en línea recta.

COMPROBACION DE LA LEY DE LAMBERT Y BEER

PARA CIANOCOBALAMINA

Ab.	Conc.	Ab.
	1 mcg	0.031
	2 mcg	0.058
	4 mcg	0.085
0.160	6 mcg	0.140
0.190	8 mcg	0.198
0.210	10 mcg	0.234

0.260  
0.240  
0.220  
0.200  
0.180  
0.160  
0.140  
0.120  
0.100  
0.080  
0.060  
0.040  
0.020



Conc. mcg

Muestras en estudio. - Las muestras utilizadas pertenecen a dos grupos de polivitamínicos.

Grageas	Vitaminas con sales minerales ( Fórmula: GVSM )
	Vitaminas con fluoruro de sodio ( Fórmula GVFS )
Comprimidos Pediátricos	Vitaminas ( Fórmula: CV )
Masticables	Vitaminas con fluoruro de sodio (Fórmula CVFS).

Se realizó una revisión de la solubilidad de los componentes de las muestras en estudio, con el objeto de ver si los solventes elegidos eran los adecuados. Esto se comprobó ya que todas las vitaminas se encuentran en forma de sales solubles en agua, excepto la vitamina D-2, que se eliminó con acetona; y los componentes insolubles se eliminaron por centrifugación en las grageas y por filtración con vacío en los comprimidos.

Se probó también que no era necesario el tratamiento con cianuro de potasio, ya que la vitamina B-12 se encontraba en forma de cianocobalamina, y se mantenía la muestra en medio ligeramente ácido (solución amortiguadora pH 4 con agua destilada).

Las determinaciones efectuadas eran comparadas con una sustancia de referencia preparada con cianocobalamina pura Lote 404, pesando 10 mg. y preparado como se indicó en la técnica.



10 mg. ( 10,000 mcg de B-12 )  $\longrightarrow$  100 ml. ( 100 mcg/ml. )  
 10 ml. ( 1000 mcg )  $\longleftarrow$   $\longrightarrow$  100 ml. ( 10 mcg/ml. )

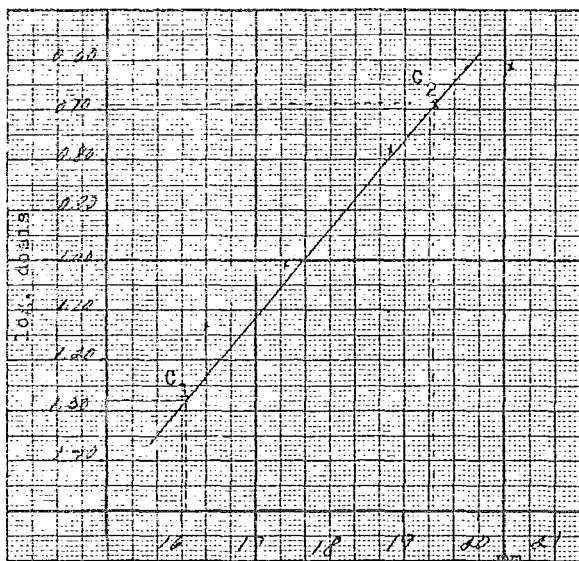
Esta solución estandar final fué utilizada para realizar todas las determinaciones.

11. - Determinación Microbiológica, Método cilindro placa:

Microorganismos Escherichia coli 113-3 ATCC 11105.

Con el objeto de ajustar el método se efectuaron varias pruebas tentativas, tomando en consideración el microorganismo, la vitamina B-12 y el volumen del medio base y de inoculo.

Se realizó una serie de determinaciones a diferentes concentraciones de cianocobalamina, con el objeto de poder seleccionar las concentraciones finales más adecuadas.



Dosis mcg	Zona de crecimiento mm
0.05	16.20 — C <sub>1</sub>
0.08	16.87
0.10	17.25
0.15	18.60
0.20	19.45 — C <sub>2</sub>
0.25	20.47

Las concentraciones fueron elegidas porque la diferencia entre las zonas de crecimiento es significativa; además las dosis en el sistema ( 2 + 2 ) deben seguir una progresión.

Muestras en estudio. - Se utilizaron muestras del mismo lote que para el método Químico, excepto para la fórmula GUSM. Todas las muestras fueron tratadas igual, extrayendose la vitamina B-12 con solución de metabisulfito de sodio y separando las sustancias insolubles por centrifugación.

Se efectuaron 4 determinaciones por día, colocandose en cada caja de Petri el estandar y dos muestras; repitiendose esta operación 3 veces, para obtener 6 datos por determinación. Estandar y muestras se prepararon como se indicó en la técnica.

Pesandose para el estandar 19.53 mg. de cianocobalamina en gelatina USP conteniendo 5.12 mcg/mg de cianocobalamina pura, llevandose a 100 ml. para obtener una concentración de 1 mcg/ml.

Para los dos métodos y cada grupo de muestras se realizó un blanco que contenía todas las vitaminas excepto cianocobalamina, y una serie de determinaciones.

A continuación se exponen los resultados obtenidos con los calculos estadisticos correspondientes.

## METODO QUÍMICO: RESULTADOS EXPERIMENTALES

GRAGEAS POLIVITAMÍNICAS					GRAGEAS POLIVITAMÍNICAS				
Fórmula: GVSM			Límites 4.5 - 5.5		Fórmula: GVFS			Límites 2.3-3.0 mcg	
No.	A <sub>St</sub>	A <sub>P</sub>	$\frac{A_p \times Cst \times Dil}{Ast \times cp \times M}$	%	No.	A <sub>St</sub>	A <sub>P</sub>	$\frac{A_p \times Cst \times Dil}{Ast \times cp \times M}$	%
1	0.253	0.096	4.74 mcg	94.8	1	0.068	0.062	2.52 mcg	91.1
2	0.253	0.097	4.79 mcg	95.8	2	0.068	0.065	2.71 mcg	95.5
3	0.225	0.092	5.11 mcg	102.2	3	0.068	0.066	2.72 mcg	97.0
4	0.225	0.087	4.83 mcg	96.6	4	0.063	0.059	2.65 mcg	93.5
5	0.201	0.083	5.15 mcg	103.0	5	0.063	0.056	2.52 mcg	88.8
6	0.186	0.071	4.77 mcg	95.4	6	0.054	0.048	2.47 mcg	87.3
7	0.186	0.081	5.44 mcg	108.8	7	0.054	0.050	2.62 mcg	92.5
8	0.186	0.079	5.30 mcg	106.1	8	0.054	0.052	2.73 mcg	96.2
9	0.180	0.072	5.00 mcg	100.0	9	0.054	0.051	2.68 mcg	94.2
10	0.180	0.077	5.46 mcg	109.3	10	0.054	0.050	2.62 mcg	92.5
COMPRIMIDOS PEDIÁTRICOS					COMPRIMIDOS PEDIÁTRICOS				
Fórmula: C.V.			Límites 2.4-2.9 mcg		Fórmula: CVFS			Límites 2.4-2.9 mcg	
No.	A <sub>St</sub>	A <sub>P</sub>	$\frac{A_p \times Cst \times Dil}{Ast \times Cp \times M}$	%	No.	A <sub>St</sub>	A <sub>P</sub>	$\frac{A_p \times Cst \times Dil}{Ast \times cp \times M}$	%
1	0.205	0.080	2.43 mcg	97.5	1	0.181	0.080	2.76 mcg	110.4
2	0.205	0.088	2.68 mcg	107.3	2	0.181	0.080	2.76 mcg	110.4
3	0.205	0.086	2.62 mcg	104.8	3	0.181	0.084	2.90 mcg	116.0
4	0.205	0.090	2.74 mcg	109.7	4	0.075	0.072	2.57 mcg	102.8
5	0.196	0.077	2.45 mcg	98.2	5	0.175	0.074	2.64 mcg	105.7
6	0.196	0.080	2.55 mcg	102.0	6	0.175	0.080	2.86 mcg	114.2
7	0.181	0.075	2.58 mcg	103.5	7	0.175	0.080	2.85 mcg	114.2
8	0.181	0.072	2.48 mcg	99.4	8	0.175	0.079	2.82 mcg	112.8
9	0.181	0.083	2.86 mcg	114.6	9	0.175	0.075	2.67 mcg	107.1
10	0.181	0.079	2.72 mcg	109.1	10	0.175	0.071	2.53 mcg	101.4

METODO: Cilindro-placa MICROORGANISMO: Escherichia coli 113-3 ATCC 11105

PRODUCTO: Formula GVFM LOTE: ML 722

POTENCIA TEORICA: 4.5 mcg. MUESTRA: 4 Grageas = 6.1550 g.

DILUCIONES:  $\begin{matrix} 6 \text{ g} \rightarrow 100 \text{ ml} \\ 2.5 \text{ ml} \rightarrow 100 \text{ ml} \end{matrix}$   $\begin{matrix} C_1 = 0.05 \text{ mcg/ml} \\ C_2 = 0.2 \text{ mcg/ml} \end{matrix}$

ESTANDAR: Potencia 1.0 mcg/ml MUESTRA: 19.53 mcg.

DILUCIONES:  $\begin{matrix} 2.5 \text{ ml} \rightarrow 50 \text{ ml} \\ 10 \text{ ml} \rightarrow 50 \text{ ml} \end{matrix}$   $\begin{matrix} C_1 = 0.05 \text{ mcg/ml} \\ C_2 = 0.2 \text{ mcg/ml} \end{matrix}$

Díametro de zona de crecimiento (mm.)								$\Sigma$	M <sub>(0.05)</sub>	M <sub>(0.02)</sub>	X <sub>mcg/G.</sub>
Estandar	C <sub>1</sub>	13.2	13.8	13.2	14.0	13.6	13.2	81.0	13.5		
	C <sub>2</sub>	18.4	19.0	18.4	18.8	18.8	19.0	112.4		18.7	
Muestra 6.1650g.	C <sub>1</sub>	14.0	13.8	13.6	13.8	13.2	13.0	81.4	13.7		
	C <sub>2</sub>	18.2	18.2	18.2	19.4	18.0	18.6	110.6		18.4	4.84
Muestra 6.1050g.	C <sub>1</sub>	13.8	14.0	13.2	13.6	13.2	13.4	80.8	13.5		
	C <sub>2</sub>	18.6	18.8	19.2	18.8	19.4	18.8	113.6		18.9	5.10
Estandar	C <sub>1</sub>	13.0	14.0	13.0	13.2	13.0	13.0	79.2	13.2		
	C <sub>2</sub>	18.6	18.4	18.0	19.0	19.0	19.0	112.0		18.6	
Muestra 6.1550g.	C <sub>1</sub>	13.6	13.2	13.2	13.0	13.6	14.2	80.8	13.5		
	C <sub>2</sub>	18.2	18.4	18.4	19.0	18.6	18.2	110.8		18.5	5.04
Muestra 6.1549g.	C <sub>1</sub>	13.4	14.0	14.0	13.2	13.2	13.4	81.2	13.5		
	C <sub>2</sub>	18.4	18.6	19.0	18.6	18.2	18.0	110.8		18.5	5.04
Estandar	C <sub>1</sub>	14.6	16.0	15.0	15.6	15.4	15.2	91.8	15.30		
	C <sub>2</sub>	19.4	19.0	19.2	19.8	19.2	18.6	115.2		19.2	
Muestra 6.1580g.	C <sub>1</sub>	15.0	15.2	15.6	15.0	15.4	16.2	94.2	15.4		
	C <sub>2</sub>	18.8	18.8	19.2	19.6	19.6	19.0	115.0		19.2	5.05
Muestra 6.1558g.	C <sub>1</sub>	14.8	15.2	15.0	15.4	15.4	15.6	91.4	15.2		
	C <sub>2</sub>	19.2	19.8	19.4	19.0	19.6	19.8	116.8		19.5	5.16
Estandar	C <sub>1</sub>	14.2	14.6	15.0	14.6	15.2	15.0	88.6	14.8		
	C <sub>2</sub>	19.0	18.0	19.2	19.4	19.4	18.8	113.8		19.0	
Muestra 6.1580g.	C <sub>1</sub>	15.0	15.2	14.2	15.4	14.8	15.6	90.2	15.0		
	C <sub>2</sub>	18.6	19.4	19.4	19.2	19.0	19.2	114.8		19.1	5.31
Muestra 6.1520g.	C <sub>1</sub>	15.4	15.8	14.8	15.0	15.6	14.4	91.0	15.2		
	C <sub>2</sub>	18.6	19.0	18.8	19.4	19.0	19.4	114.2		19.0	5.42
Estandar	C <sub>1</sub>	14.6	15.8	15.0	15.8	15.6	15.0	91.8	15.3		
	C <sub>2</sub>	17.6	16.6	17.2	19.0	19.2	19.6	116.2		19.4	
Muestra 6.1550g.	C <sub>1</sub>	15.0	14.8	15.6	15.0	14.8	15.6	90.8	15.1		
	C <sub>2</sub>	19.2	19.2	19.8	19.0	19.8	19.0	116.0		19.3	4.83
Muestra 6.1550g.	C <sub>1</sub>	15.4	14.8	15.0	15.8	14.8	15.6	91.4	15.2		
	C <sub>2</sub>	19.0	18.8	19.2	19.2	19.6	19.4	115.2		19.2	4.80

METODO: Cilindro-placa Microorganismo: Escherichia coli 113-3 ATCC 11105

PRODUCTO: Formula: GUF5 LOTE: ML 249

POTENCIA TEORICA: 2.25 - 3 mcg. MUESTRAS: 7 Grageas. = 9.3160 g.

DILUCIONES:  $\frac{7.6}{20} \rightarrow \frac{100}{100}$  ml  $C_1 = 0.05$  mcg/ml  
 $\frac{20}{20} \rightarrow \frac{100}{100}$  ml  $C_2 = 0.2$  mcg/ml

ESTANDAR: Potencia 1.0 mcg/ml MUESTRA: 19.53 mg.

DILUCIONES:  $\frac{2.5}{10} \rightarrow \frac{50}{50}$  ml  $C_1 = 0.05$  mcg/ml  
 $\frac{10}{10} \rightarrow \frac{50}{50}$  ml  $C_2 = 0.2$  mcg/ml

Diamétero de zona de crecimiento ( mm. )								$\Sigma$	$M_{(0.05)}$	$M_{(0.02)}$	$X_{mcg/G}$
Estandar	$C_1$	12.8	13.0	13.0	12.6	12.7	12.8	76.6	12.7		
	$C_2$	16.0	16.0	16.0	16.8	16.0	17.0	97.8		16.30	
Muestra 9.3120g	$C_1$	12.0	12.8	12.8	13.0	12.8	12.8	76.2	12.7		
	$C_2$	16.6	16.0	17.0	17.0	16.8	16.4	99.8		16.63	3.00
Muestra 9.5105g	$C_1$	12.6	12.4	12.8	12.6	13.0	13.0	76.4	12.7		
	$C_2$	16.4	16.8	16.6	16.8	17.0	16.6	100.2		16.70	2.53
Estandar	$C_1$	13.4	13.6	13.2	13.0	13.2	13.0	79.4	13.2		
	$C_2$	16.2	15.4	16.4	16.8	16.2	16.8	97.8		16.30	
Muestra 9.3060g	$C_1$	13.0	13.0	13.2	13.4	13.2	13.2	79.0	13.2		
	$C_2$	16.4	16.8	16.6	16.4	16.0	16.0	98.2		16.36	2.77
Muestra 9.3500g	$C_1$	13.6	13.8	13.0	13.2	13.4	13.0	80.0	13.3		
	$C_2$	16.4	15.8	16.2	16.6	16.8	16.2	98.0		16.33	2.91
Estandar	$C_1$	16.8	18.2	18.6	18.4	17.4	18.2	107.6	17.9		
	$C_2$	22.0	20.6	20.0	21.6	21.6	21.6	127.4		21.23	
Muestra 9.2980g	$C_1$	17.4	18.0	16.8	18.0	18.8	17.8	106.8	17.8		
	$C_2$	21.2	21.8	21.4	21.6	22.0	20.6	128.6		21.73	2.84
Muestra 9.3045g	$C_1$	17.4	17.2	18.2	18.4	18.2	16.6	106.0	17.6		
	$C_2$	21.4	21.6	21.2	21.8	21.2	21.8	129.0		21.50	2.80
Estandar	$C_1$	16.8	17.6	17.6	17.2	17.8	17.6	104.6	17.4		
	$C_2$	20.2	21.0	20.4	21.4	21.4	22.0	126.0		21.06	
Muestra 9.3120	$C_1$	17.4	17.4	16.8	17.6	17.0	17.0	103.2	17.2		
	$C_2$	20.6	21.6	21.2	22.0	21.6	21.0	128.0		21.30	2.85
Muestra 9.3100	$C_1$	18.0	17.0	17.0	17.4	17.8	17.4	104.6	17.4		
	$C_2$	20.8	21.4	21.8	21.2	21.2	22.4	128.8		21.76	3.00
Estandar	$C_1$	15.0	14.2	14.6	14.8	14.8	14.6	88.0	14.6		
	$C_2$	18.2	18.2	18.0	18.2	17.8	17.6	108.0		18.00	
Muestra 9.3090	$C_1$	14.2	14.0	14.2	14.6	14.8	14.8	86.6	14.4		
	$C_2$	17.8	18.0	18.0	18.4	18.2	17.6	107.8		17.96	2.69
Muestra 9.3050	$C_1$	14.2	14.6	14.2	14.8	14.0	14.6	86.6	14.4		
	$C_2$	18.6	18.6	18.6	18.2	18.2	18.2	109.8		18.30	2.87

METODO: Cilindro-placa MICROORGANISMO: Escherichia coli 113-3 ATCC 11105

PRODUCTO: Formula: C V LOTE: MM 203

POTENCIA TEORICA: 2.4 - 2.9 mcg/C MUESTRA: 8 comprimidos = 4.1500 g.

DILUCIONES:  $8 \text{ C} \rightarrow 100 \text{ ml}$   $C_1 = 0.05 \text{ mcg/ml}$   
 $25 \text{ ml} \rightarrow 100 \text{ ml}$   $C_2 = 0.2 \text{ mcg/ml}$

ESTANDAR: Potencia 1.0 mcg/ml MUESTRA: 19.53 mg.

DILUCIONES:  $2.5 \text{ ml} \rightarrow 50 \text{ ml}$   $C_1 = 0.05 \text{ mcg/ml}$   
 $10 \text{ ml} \rightarrow 50 \text{ ml}$   $C_2 = 0.2 \text{ mcg/ml}$

Diamétero de zona de crecimiento ( mm. )								$\Sigma$	$M_{(0.05)}$	$M_{(0.02)}$	$X_{\text{mcg/C}}$
Estandar	$C_1$	16.0	16.0	15.6	15.4	15.0	15.0	93.0	15.5		
	$C_2$	21.6	20.4	20.0	19.8	19.4	19.2	120.4		20.0	
Muestra 4.1500	$C_1$	15.6	16.2	15.8	15.6	15.4	15.6	94.2	15.7		
	$C_2$	19.2	19.4	20.4	20.2	19.2	19.2	117.6		19.6	2.90
Muestra 4.1540	$C_1$	15.6	15.6	15.6	15.2	15.6	15.4	93.4	15.5		
	$C_2$	19.6	20.0	19.0	20.4	19.8	20.0	118.8		19.8	2.90
Estandar	$C_1$	14.6	15.0	15.2	14.8	15.2	15.2	90.0	15.0		
	$C_2$	19.0	19.6	20.2	20.4	20.0	19.8	118.8		19.8	
Muestra 4.1500	$C_1$	15.0	14.6	14.8	14.6	15.2	15.2	88.2	14.9		
	$C_2$	19.8	20.2	19.6	19.2	18.8	20.0	117.6		19.6	2.90
Muestra 4.1504	$C_1$	15.4	16.0	15.2	15.4	15.4	16.2	94.0	15.6		
	$C_2$	18.8	19.6	19.0	19.4	19.2	19.4	115.4		19.2	2.50
Estandar	$C_1$	21.0	20.6	21.6	21.6	21.8	20.8	127.4	21.2		
	$C_2$	25.4	23.0	22.8	24.6	25.0	25.0	145.8		24.3	
Muestra 4.1480	$C_1$	21.2	21.6	21.2	21.4	20.8	21.2	127.4	21.2		
	$C_2$	24.0	23.0	25.0	25.0	24.8	25.4	147.2		24.5	2.65
Muestra 4.1540	$C_1$	21.2	21.0	21.2	21.4	22.0	22.0	123.8	21.4		
	$C_2$	25.6	25.6	25.4	25.6	25.0	22.8	148.0		24.6	2.87
Estandar	$C_1$	22.8	21.2	21.0	22.8	22.8	22.0	132.6	22.1		
	$C_2$	27.0	27.0	25.0	24.6	26.6	24.2	154.4		25.7	
Muestra 4.1490	$C_1$	22.2	23.6	22.0	23.6	22.2	21.0	134.6	22.4		
	$C_2$	26.2	25.2	26.8	24.6	24.4	25.8	153.0		25.5	2.55
Estandar	$C_1$	18.8	17.6	18.4	17.0	17.2	17.0	106.0	17.6		
	$C_2$	20.2	20.2	19.4	20.8	20.8	23.0	121.4		20.2	
Muestra 4.1530	$C_1$	17.8	19.2	17.4	16.4	17.4	19.0	107.2	17.8		
	$C_2$	20.2	20.0	20.2	20.6	20.0	20.2	121.2		20.4	2.78
Muestra 4.1505	$C_1$	18.6	16.4	16.4	18.4	17.4	17.8	105.0	17.5		
	$C_2$	20.2	20.0	20.2	20.6	20.0	20.2	121.2		20.6	2.63
Muestra 4.1540	$C_1$	22.4	21.6	23.6	20.8	22.2	23.4	134.0	22.3		
	$C_2$	26.2	27.0	26.0	25.6	25.8	25.0	155.6		25.9	2.71

METODO: Cilindro-placa MICROORGANISMO: Escherichia coli 113-3 ATCC 11105

PRODUCTO: Formula CUFS LOTE: MM 234

POTENCIA TEORICA: 2.4 - 2.9 mcg/C. MUESTRA: 8 comprimidos = 4.1500 g.

DILUCIONES:  $\frac{8 \text{ C} \rightarrow 100 \text{ ml}}{20 \text{ ml} \rightarrow 100 \text{ ml}}$   $C_1 = 0.05 \text{ mcg/ml}$   
 $C_2 = 0.2 \text{ mcg/ml}$

ESTANDAR: Potencia 1.0 mcg/ml. MUESTRA: 1953 mg.

DILUCIONES:  $\frac{2.5 \text{ ml} \rightarrow 50 \text{ ml}}{10 \text{ ml} \rightarrow 50 \text{ ml}}$   $C_1 = 0.05 \text{ mcg/ml}$   
 $C_2 = 0.2 \text{ mcg/ml}$

		Diamétero de zona de crecimiento (mm.)						$\Sigma$	M (0.05)	M (0.02)	X mcg/C
Estandar	C <sub>1</sub>	17.0	17.2	16.8	17.0	17.2	16.4	101.6	16.9		
	C <sub>2</sub>	20.4	19.4	20.6	19.0	19.8	20.6	119.8		19.9	
Muestra 4.1500	C <sub>1</sub>	16.6	17.0	16.4	17.2	16.8	17.0	101.0	16.8		
	C <sub>2</sub>	19.4	20.4	20.0	20.6	19.2	20.0	119.6		19.9	2.46
Muestra 4.1500	C <sub>1</sub>	17.2	16.8	17.0	17.4	17.2	17.0	102.6	17.1		
	C <sub>2</sub>	19.6	20.0	19.6	19.2	19.4	19.8	117.6		19.6	2.43
Estandar	C <sub>1</sub>	13.0	13.0	13.8	13.6	13.0	13.0	79.4	13.2		
	C <sub>2</sub>	16.8	17.4	17.2	16.8	16.6	17.4	102.2		17.0	
Muestra 4.1525	C <sub>1</sub>	13.8	13.6	12.8	13.2	13.2	12.8	79.4	13.2		
	C <sub>2</sub>	17.6	11.0	17.8	17.4	17.6	17.0	104.4		17.4	2.66
Muestra 4.1525	C <sub>1</sub>	13.2	13.0	14.0	14.0	12.8	12.8	79.8	13.3		
	C <sub>2</sub>	17.4	17.8	18.0	17.8	17.8	17.6	106.4		17.7	2.83
Estandar	C <sub>1</sub>	13.0	13.4	13.6	13.4	13.2	13.4	80.6	13.4		
	C <sub>2</sub>	16.8	17.4	16.8	16.6	17.2	17.4	102.2		17.0	
Muestra 4.1500	C <sub>1</sub>	13.2	12.4	13.4	13.2	13.4	13.6	79.2	13.2		
	C <sub>2</sub>	17.0	17.6	18.0	17.2	17.6	17.6	105.0		17.5	2.60
Muestra 4.1520	C <sub>1</sub>	12.8	13.8	13.0	13.6	13.6	13.8	80.6	13.4		
	C <sub>2</sub>	17.0	17.4	18.2	17.6	16.2	17.6	104.0		17.3	2.64
Estandar	C <sub>1</sub>	19.8	20.8	22.2	18.6	18.6	19.0	119.0	19.8		
	C <sub>2</sub>	24.0	24.6	24.8	22.0	22.0	24.0	141.4		23.5	
Muestra 4.1510	C <sub>1</sub>	19.8	18.6	21.0	20.0	19.0	20.8	119.2	19.8		
	C <sub>2</sub>	23.6	23.8	23.6	24.2	23.4	24.0	142.6		23.7	2.60
Muestra 4.1480	C <sub>1</sub>	20.0	20.6	19.0	19.6	19.8	19.6	118.6	19.7		
	C <sub>2</sub>	23.6	24.2	22.6	22.2	24.2	23.6	140.4		23.4	2.40
Estandar	C <sub>1</sub>	19.2	19.6	19.0	18.4	19.6	19.8	115.6	19.2		
	C <sub>2</sub>	23.8	24.2	24.6	21.6	22.6	22.4	139.2		23.2	
Muestra 4.1520	C <sub>1</sub>	20.0	19.2	19.6	20.0	19.2	20.0	118.0	19.6		
	C <sub>2</sub>	23.8	22.8	23.0	23.2	23.6	22.8	139.2		23.2	2.69
Muestra 2.1495	C <sub>1</sub>	19.2	19.0	18.8	19.2	19.2	19.0	114.6	19.1		
	C <sub>2</sub>	24.0	23.2	22.8	23.8	23.6	23.8	141.2		23.5	2.59

## ANALISIS ESTADISTICO COMPARATIVO

Producto: F6rmula GVSM				Lote: ML722 L6mites: 4.5-5.5. mcg		
METODO QUIMICO				METODO MICROBIOL6GICO		
No.	X=(mcg/g)	(X-M)	(X-M) <sup>2</sup>	X=(mcg/G)	(X-M)	(X-M) <sup>2</sup>
1	4.74	0.31	0.0961	4.84	0.23	0.0529
2	4.79	0.26	0.0676	5.10	0.03	0.0009
3	5.11	0.06	0.0036	5.04	0.03	0.0009
4	4.83	0.22	0.0484	5.08	0.01	0.0001
5	5.15	0.10	0.0100	5.05	0.02	0.0004
6	4.77	0.28	0.0784	5.16	0.09	0.0081
7	5.44	0.39	0.1521	5.38	0.31	0.0961
8	5.30	0.25	0.0625	5.42	0.35	0.1225
9	5.00	0.05	0.0025	4.83	0.24	0.0576
10	5.46	0.41	0.1680	4.80	0.27	0.0729
$\Sigma$	50.59		0.6892	50.70		0.4124
$\bar{M}$	5.05			5.07		

Desviaci6n Est6ndar

$$s = \sqrt{\frac{dx^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{0.6892}{9}} = 0.276 \quad s = \sqrt{\frac{dx^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{0.4124}{9}} = 0.213$$

Error

$$e = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0.276}{3.161} = 0.087 \quad e = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0.213}{3.161} = 0.067$$

Varianza V =  $s^2 = 0.076$ 

$$V = s^2 = 0.045$$

Prueba de "T"

$$t = \frac{M - M}{\sqrt{e^2 + e^2}} = \frac{5.05 - 5.07}{\sqrt{0.0076 + 0.0045}} = \frac{0.02}{\sqrt{0.01220}} = \frac{0.02}{0.110} = 0.187$$

t(p=5%) = 2.10 . . . diferencia no significativa

Prueba de "F"

$$Vt = \frac{1.102}{18} = 0.061 \quad F = \frac{Vt}{V} = \frac{0.061}{0.0455} = 1.345$$

F (p=5%) = 3.18 . . . diferencia no significativa.



## ANALISIS ESTADISTICO COMPARATIVO

Producto: F6rmula GVFS Lote: ML 249 Limites 2.25-3.0 mcg.						
METODO QUIMICO				METODO MICROBIOLOGICO		
No.	X=(mcg/G)	(X-M)	(X-M) <sup>2</sup>	X=(mcg/g)	(X-M)	(X-M) <sup>2</sup>
1	2.52	0.10	0.100	3.00	0.18	0.0324
2	2.71	0.09	0.0081	2.55	0.27	0.0729
3	2.75	0.13	0.0169	2.77	0.05	0.0025
4	2.65	0.03	0.0009	2.91	0.09	0.0081
5	2.52	0.10	0.0100	2.84	0.02	0.0004
6	2.47	0.15	0.0225	2.80	0.02	0.0004
7	2.62	0.00	0.0000	2.85	0.03	0.0009
8	2.73	0.11	0.0121	3.00	0.18	0.0324
9	2.68	0.06	0.0036	2.69	0.13	0.0169
10	2.62	0.00	0.0000	2.87	0.05	0.0025
$\Sigma$	26.26		0.0841	28.28		0.1694
$\bar{M}$	2.62			2.82		

Desviaci6n Est6ndar

$$s = \sqrt{\frac{dx^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{0.0841}{9}} = 0.096 \quad s = \sqrt{\frac{dx^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{0.1694}{9}} = 0.137$$

Error

$$e = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0.096}{3.161} = 0.0305 \quad e = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0.137}{3.161} = 0.043$$

Varianza  $V = s^2 = 0.0093$ 

$$V = s^2 = 0.019$$

Prueba de "T"

$$t = \frac{\bar{M} - \bar{M}}{\sqrt{e^2 + e^2}} = \frac{2.62 - 2.82}{\sqrt{0.0009 + 0.0018}} = \frac{0.20}{0.052} = -3.84$$

t(=5%) = 2.10 . . . diferencias significativas

$$\text{Prueba de "F"} \quad Vt = \frac{0.253}{18} = 0.014 \quad F = \frac{Vt}{V} = \frac{0.014}{0.0093} = 1.505$$

F (p=5%) = 3.18 . . . diferencias no significativas.

## ANALISIS ESTADISTICO COMPARATIVO

METODO QUIMICO				METODO MICROBIOLOGICO		
No.	X=(mcg/C)	(X- $\bar{M}$ )	(X- $\bar{M}$ ) <sup>2</sup>	X=(mcg/C)	(X- $\bar{M}$ )	(X- $\bar{M}$ ) <sup>2</sup>
1	2.43	0.18	0.0324	2.40	0.18	0.0324
2	2.68	0.07	0.0049	2.40	0.18	0.0324
3	2.62	0.01	0.0001	2.40	0.18	0.0324
4	2.74	0.13	0.0169	2.50	0.08	0.0064
5	2.45	0.16	0.0256	2.71	0.13	0.0169
6	2.55	0.06	0.0036	2.55	0.03	0.0009
7	2.58	0.03	0.0009	2.65	0.07	0.0049
8	2.48	0.13	0.0169	2.82	0.24	0.0576
9	2.86	0.25	0.0625	2.78	0.20	0.0400
10	2.72	0.11	0.0121	2.63	0.05	0.0025
$\Sigma$	26.11		0.1759	25.84		0.2264
$\bar{M}$	2.61			2.58		

Desviación Estándar

$$\sigma = \sqrt{\frac{dx^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{0.1759}{9}} = 0.139 \quad \sigma = \sqrt{\frac{dx^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{0.2264}{9}} = 0.160$$

Error

$$e = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} = \frac{0.139}{3.161} = 0.044 \quad e = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} = \frac{0.1586}{3.161} = 0.050$$

Varianza  $V = \sigma^2 = 0.0195$ 

$$V = \sigma^2 = 0.026$$

Prueba de "T"

$$t = \frac{\bar{M} - \bar{M}}{\sqrt{e^2 - e^2}} = \frac{2.61 - 2.58}{\sqrt{0.00195 - 0.00251}} = \frac{0.03}{0.066} = 0.455$$

t(p=5%) = 2.10 . . . diferencias no significativas

$$\text{Prueba de "F"} \quad Vt = \frac{0.4023}{18} = 0.022 \quad F = \frac{Vt}{V} = \frac{0.022}{0.0195} = 1.128$$

F(p= 5%) = 3.18 . . . diferencias no significativas.

## ANALISIS ESTADISTICO COMPARATIVO

Producto: Fórmula CVFS lote: MM234 Límites: 2.4-2.9 mcg						
METODO QUIMICO				METODO MICRIOBIOLOGICO		
No.	X=(mcg/C)	(X- $\bar{M}$ )	(X- $\bar{M}$ ) <sup>2</sup>	X= (mcg/C)	(X- $\bar{M}$ )	(X- $\bar{M}$ ) <sup>2</sup>
1	2.76	0.03	0.0009	2.46	0.13	0.0160
2	2.76	0.03	0.0009	2.43	0.16	0.0256
3	2.90	0.17	0.0289	2.66	0.07	0.049
4	2.57	0.16	0.0256	2.84	0.25	0.0625
5	2.64	0.09	0.0081	2.60	0.01	0.0001
6	2.86	0.13	0.0169	2.64	0.05	0.0025
7	2.85	0.12	0.0144	2.60	0.01	0.0001
8	2.82	0.09	0.0081	2.40	0.19	0.0361
9	2.67	0.06	0.0036	2.69	0.10	0.0100
10	2.53	0.20	0.0400	2.59	0.00	0.0000
$\Sigma$	27.36		0.1474	25.91		0.1587
$\bar{M}$	2.73			2.59		

Desviación Estándar

$$\sigma = \sqrt{\frac{dx^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{0.1414}{9}} = 0.127 \quad \sigma = \sqrt{\frac{dx^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{0.1587}{9}} = 0.132$$

Error

$$e = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} = \frac{0.1278}{3.161} = 0.040 \quad e = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} = \frac{0.132}{3.161} = 0.042$$

Varianza

$$V = \sigma^2 = 0.0163 \quad V = \sigma^2 = 0.0176$$

Prueba de "T"

$$t = \frac{\bar{M} - \bar{M}}{\sqrt{e^2 + e^2}} = \frac{2.73 - 2.59}{\sqrt{0.00163 + 0.00176}} = \frac{0.14}{0.058} = 2.40$$

t(p=5%) = 2.10 . . la diferencia es significativa

$$\text{Prueba de "F"} \quad Vt = \frac{0.306}{18} = 0.017 \quad F = \frac{Vt}{V} = \frac{0.017}{0.0163} = 1.043$$

F(p=5%) = 3.18 . . diferencia no significativa.

## CAPITULO V

## COMENTARIOS

La separación cromatográfica es efectiva para determinar Vitamina B-12 en formas farmacéuticas complejas, y es aplicable a mezclas que contienen colorantes, pues éstos se eliminan lavando con HCL 0.1 N y las sustancias liposolubles se eliminan lavando con acetona al 85%.

Es recomendable aumentar la altura de la resina a medida que aumenta la complejidad de la muestra, pues la cianocobalamina queda retenida en la parte superior, pero tiende a desplazarse, pudiendo originar pérdida en la fijación cuando se realizan los lavados previos a la elución.

Respecto al método Microbiológico cabe decir que el microorganismo crece en forma abundante con pequeñas concentraciones de vitamina B-12, presentando un halo definido rodeado por otro difuso, esto se debe a que el microorganismo crece en presencia de metionina que se encuentra presente en el medio, sin embargo es fácil diferenciar el halo correspondiente a la muestra.

Respecto al análisis estadístico podemos observar:

1. - Los resultados obtenidos tanto en el método químico, como

en el microbiológico, no presentan diferencias significativas, considerando un  $p = 5\%$ , o sea una probabilidad del 5% de error debido al azar.

2. - En la fórmula CVFS se encontró una pequeña diferencia, - en la prueba de "students"  $t_e = 2.40$   $t_t = 2.10$ , que no llega a considerarse significativa. Esta diferencia puede considerarse como un error de manipulación, que se comprobaría efectuando nuevamente las experimentaciones.

3. - Por otro lado la dispersión de valores para todas las muestras no es significativa considerando la prueba de "Fisher", con una probabilidad del 5% de error debido al azar; esto se comprueba porque las  $F_e < F_t$ .

4. - Por lo tanto los resultados de ambos métodos son comparables, pudiéndose utilizar cualquiera de los dos.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES

Los métodos propuestos para la determinación de vitamina -- B-12 en formas farmacéuticas polivitamínicas son aceptables, pudiendo se extender para cualquier tipo de polivitamínicos.

Como recomendación señalo lo siguiente:

a). - Para pruebas de rutina en el laboratorio debe preferirse el método microbiológico, ya que es reproducible dentro de límites muy pequeños y consume de 15 - 18 horas, representando cuando mucho, 4 - horas químico en la determinación de una o varias muestras, el resto - del tiempo calculado comprende el tiempo de incubación, lo que permite que puedan analizarse mayor número de muestras en el mismo tiempo.

b). - El método químico, como se observó en el estudio estadístico, es también favorable, pero presenta el inconveniente de que el número de muestras para analizar es limitado, por el gran consumo de horas químico necesarias para la elución y valoración. Por otro lado el tiempo en que se obtienen los resultados es grande ya que varía de 10 a 15 horas, de trabajo efectivo según la complejidad de la muestra por -- analizar.

## CAPITULO VII

### BIBLIOGRAFIA

1. - Abbot David and Andrews, R.S. Introducción a la Cromatografía. - 2a. Ed. Editorial Alhambra, S.A. Madrid, 1970.
2. - AMA Drug Evaluations. 1th. Ed. American Medical Association. - Chicago, 1971.
3. - Berge, Douglas G., Pflaum, R. T., Lehman, D.A., Franck C.W. Estudio de la Vitamina B-12 en formas farmacéuticas dosificadas. Anal. Lett., 1968, 1, ( 10 ), 613-18 ( Eng. ) Chem. Abst. 69, 19 ( 1968 ), 69: 80231 p.
4. - Blacow, Norman W. Martindale. The extra Pharmacopeia. 2th. Ed. 1952-3, The Pharmaceutical Press, 1972.
5. - Brink, N.G., Kuehl, F.A. and Folkers, K., Science 112, 354 ---- ( 1950 ).
6. - Brink, N.G., Wolf, D.E. Kaczka, E. Rickes, E.L., Konivzy, F.R. Word, T.R. and Folkers, K. J. Am. Chem. Soc. 71, 1854 --- (1949).
7. - Burkholder, P.R. Determination of vitamin B-12 with a mutant --- strain of Escherichia coli; Science 114, 459 ( 1951 ).
8. - Clarke, E.G.C. - Isolation and Identification of Drug, 16th. Ed. The Pharmaceutical Press, London, 1971.
9. - Cook, E.A., Ellis, L.N. - Variaciones en la respuesta de aumento de crecimiento de cuatro diferentes microorganismo con vitamina B-12, en tejidos y preparaciones estándar. - Appl. Microbiol. 1968, 16, ( 12 ), 1831-40 ( Eng. ) Chem. Abst. 70:35230x.
10. - Davis, B.D. and Minglioni, E.S., J. Bact. 60, 17, ( 1950 ).

11. - Dobrecky, J., Guerello, L.O., Mollinari, A.M. - Separación de vitamina B-12 en asociaciones farmacéuticas mediante el empleo combinado de las resinas de intercambio iónico y Espectrofotometría. Rev. Soc. Quim. Mex., XIV (1), 21-22 (1970)
12. - Dyke, S.F. The Chemistry of the vitamins. 107 - 149. Interscience Publishers, London - N. York, 1965.
13. - Harrison, E. et al (1951).
14. - Heathcote, H.G. A general technique applied to the estimation of cyanocobalamina on hidroxicobalamin in mixtures of the vitamins. Chemistry and Industry, 1203 (1953).
15. - Hendlin D. and Soars M. Comparative Microbiological studies -- with vitamins B-12 y B-12a. J. Biol Chem., 188, 603-10, ---- (1951).
16. - Higuchi and Brochman H., Pharmaceutical Analysis, 671-80, Interscience Publisher. N. York. London (1971).
17. - Hodykin D. Porter, M.W. and Spiller, R.C., Proc. Roy Soc. --- (London) B136, 609 (1949); K.H. Fantes J.E., Page, L. F. J. Parker, and E.L. Smith, Proc. Roy. Soc. (London) B136 592 (1949).
18. - Holland, A.J. (to Merck and Co; Inc.) U.S. Pat. 2,621, 144 ( -- Dec. 9, 1952 ).
19. - Itakaki, T. Tsukahara, et al. - Ensayo de vitamina B-12 por la técnica de placa delgada de agar, usando una variante de Escherichia coli. Bitamin 1968, 37, (5), 461 - 5 (Japan). Chem. Abst 69, I 2329 (1968) 69: 25023x.
20. - Kaczka, E.A. Wulf, D.F. Kuehl, E.A. & Folkers Science 112, -- 354 (1950).
21. - Kavanagh Frederick. - Analytical Microbiology. Vitamin B-12 and congeners, 527 - 550, Academic Press. New York & London -- (1963).
22. - Kocher, V. Laboratory Microbiology, Internationales Zetschrift fur vitamin forschung Vol XXVI fasc. 1956.



23. - Koneey, J. Tolgyssy & Sarynova. Determinación de vitamina B-12 por titulación quelante.
24. - Kuehl, F. Arand Chaiet ( to Merck & Co. Inc. ), U.S. Pat. ----- 2505053 ( April 25, 1950 ).
25. - Kutosh, S. Hughey, G. B. & Malcolmenson, R. ( to Merck & Co. - Inc. ) U.S. Pat. 2,626,888 ( Jan 27, 1953 ).
26. - Lustigman Michel 16185 d.
27. - Merck Index. - 8th Ed. Merck & Co. Inc. 1968.
28. - Minot, G.R. & Murphy, W.P. , J. Am. Med. Assoc. 87, 470 --- ( 1926 ).
29. - Mlodecky H., Jadwiga, Chemielnicka, Hildegarda Dyba ( Poland ) Determinación de vitamina B-12 en presencia de metionina por el método de placa. Chem. Abst. 69: 9867a ( 1968 ).
30. - New Drugs. American Medical Association. Chicago, 1967.
31. - Popava, Ya. G., Popov, Khr., Ilieva, M. Qual. Plant. Mater. - Veg. 1968, 16, ( 1-4 ), 237-43 ( Eng. ) Chem. Abst. 70: 1051-24s ( 1969 ).
32. - Pharmacopeia of the Unites States, XVI, 1960.
33. - Pharmacopeia of the United States, XVIII, 1970.
34. - Rickes; E. L. & Wood, T.R. ( to merck & Co. Inc ) U.S. Pat. -- 2,563,794 ( Aug. 7, 1951 ).
35. - Rickes, E.L. , Brink, N.G. Koniuszy, F.R. Word, T.R. and Folkers, K. , Science 107, 396 ( 1948 ).
36. - Rickes, E.L. , Brinck, N.G. Koniuszy, F.R. Word, T.R. and --- Folkers, K. , Science 108, 644 ( 1948 ).
37. - Rudkin, G.O. Jr. and Taylor R.I. Método Químico para determi- nar vitamina B-12; Analytucal Chemistry 24, 1155-57 9 (1952 ).
38. - Seberll, W.H. Jr., Harris, R.S., The Vitamins ( Chemistry, Phy siology, Pathology ) Vol. I, Academic Press Inc., Publisher -- N. York, 1954.

39. - Sharif, M. A. Estimation of vitamin B-12 for colorimetric determination of cobalt. Pakistan J. Sci. Ind. Res., I, 160 (1958).
40. - Shive, W. ( to Research Corp ) U.S. Pat. ) 2,628 186 ( Feb. 10, 1953 ).
41. - Strobecer Rolf & Henning Heinz, M. Vitamin Assay, pág. 151 -- 172, Verlag Chemie, 1966.
42. - Technical Bulletin "Amberlite IRC-50" Rohm & Hass, Philadelphia, January 1967..
43. - Ulacia, E.R. Control de Medicamentos. Apuntes no publicados. - 1966.
44. - Van Melle, P.J. J. Amer. Pharmac. Assoc. Sci. Ed. 45, 26 --- ( 1956 ).
45. - Wallmann, J. C., Cunningham, B.B. & Calvin, M., Science 113, 55, ( 1951 ); H. Diehl, R.W. Vander Haar, and R. Sealock, J. Am. Chem. Soc. 72, 5312 ( 1950 ); F. Grun and R. Menasse, - Expedientia 6, 263 ( 1950 ).
46. - Winsten, W.A., and E. Eigen, J. Bil. Chem. 181, 109- ( 1949 ).