



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

METODOS COMPARATIVOS EN LA DETERMINACION
DE VITAMINA B₁₂ EN PRESENCIA DE LAS VITAMINAS
B₁ Y B₆ EN PRODUCTOS LIOFILIZADOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:
MA. JOSEFINA PEREZ RUIZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES Y GRADOS

1977



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

TESIS
LAB. _____
ADQ. _____
FECHA 1977
PROG. ml. [REDACTED]

16.4. 327



JURADO

PRESIDENTE : Profr. Ramón Ulacia Esteve
VOCAL : Profr. Alfredo Echegaray A.
SECRETARIO : Profra, Mercedes Irueste A.
1er. SUPLENTE Profr. Jorge Soto S.
2o SUPLENTE Profr. Arturo Pérez Alonso.

Sitio donde se desarrollo el tema :

LAB. PLASMA Y BIOLOGICOS , S.A

SUSTENTANTE ; Ma. Josefina Pérez Ruiz

DIRECTOR DEL TEMA ;

Q.F.B. Mercedes Irueste A.

A mis padres :

Cuyo único objetivo en su vida
fué formar hombres útiles a si
mismos.

A mis hermanos :

A quienes debo grandes momentos
de alegría y de satisfacción.

Q.F.B. Mercedes Irueste A.

A quien agradezco infinitamente su valiosa dedicación y orientación en la dirección de Esta mi tesis.

A la memoria imborrable de ;
Q.F.B. Ramón Guevara Estrada.

Q.F.B. Ramón Ulacia. E.

por su oportuna participación en este trabajo.

RECONOCIMIENTO

*Este trabajo fué realizado en los labs.
PLASMA Y BIOLÓGICOS S.A. , por ello mi
más grande agradecimiento al Gerente Ge-
neral Sr. Gustavo Escribano C.*

A mis compañeros de :

*Departamento de Investigación y Desarrollo de
Cía. Medicinal " La Campana " .*

Ing. Teodoro Ramírez ;

Mi guía en la vida profesional .

CONTENIDO

			<u>Pag:</u>
CAPITULO	I	INTRODUCCION	(1- 4)
CAPITULO	II	GENERALIDADES	(5-21)
CAPITULO	III	METODOS PARA LA DETERMINACION DE VITAMINAS B ₁ , B ₆ , B ₁₂ , COMO MATERIA PRIMA.	(22-37)
CAPITULO	IV	PARTE EXPERIMENTAL, MATERIAL y METODOS.	(38-54)
CAPITULO	V	RESULTADOS OBTENIDOS y, DISCUSION GENERAL	(55-61)
CAPITULO	VI	CONCLUSIONES	(62-64)
CAPITULO	VII	BIBLIOGRAFIA	(65)

C A P I T U L O I

I N T R O D U C C I O N :

En la actualidad existen innumerables medicamentos que contienen todos o algunos de los componentes del complejo B . Nuevas formas farmacéuticas son lanzadas al mercado año tras año creando la necesidad de efectuar los análisis de control correspondientes a éstos productos .

Desde hace tiempo los métodos de análisis utilizados para la determinación de vitaminas del complejo B , han sido complicados , tardados y a pesar de que se idearon algunas técnicas más rápidas , su exactitud deja mucho que desear , por lo tanto es urgente crear o buscar nuevos métodos que nos conduzcan a resultados deseables en cuanto a exactitud y rapidez.

Por otra parte , en el caso de las vitaminas del complejo B , es sabido que cuando se encuentran en forma de materia prima , los métodos espectrofotométricos son los procedimientos recomendables .

En contraste , en el caso de mezclas de vitamínicos existen en la actualidad decenas de métodos mas o menos reproducibles en los que los resultados de muy pocos de ellos son comparables entre sí , en cada uno de ellos existen diferentes parámetros que hacen diferir los resultados.

Además no existe en la Industria Farmacéutica uniformidad de metodología para vitaminas y cada laboratorio sigue un método distinto , en ocasiones desarrollado por ellos mismos o bien tomado de alguno de los libros oficiales y modificado .Existen nuevas técnicas pero no fácilmente un laboratorio de Control de Calidad cambia las que ha manejado durante años.

Entre los componentes del complejo B , el compuesto que presenta mayores problemas en su determinación , cuando está en presencia de otras vitaminas del mismo complejo B, es la vitamina B₁₂ , porque el método oficial para su determinación es el microbiológico y no todos los Laboratorios tienen personal capacitado para realizarlo.

Por otra parte , en ocasiones es necesario conocer rápidamente la cantidad de vitamina B₁₂ para efectuar un control durante la elaboración del producto que se está elaborando , lo cual no es posible hacerlo siguiendo la técnica microbiológica.

El encontrar un procedimiento mas sencillo y exacto para la determinación de la vitamina B₁₂ en mezclas vitamínicas , es el motivo que nos condujo a realizar el presente trabajo de investigación .

Como primer paso del estudio que he realizado se plantea la necesidad de NO imponer un método de análisis de vitamina B₁₂ en especial , sino que se pretende hacer en cambio un análisis objetivo sobre los métodos más utilizados y dejar a elección aquel que se adapte mejor a las posibilidades de trabajo de cada laboratorio , siempre y cuando se establezca como norma para tomar la decisión , aquella técnica que tenga las siguientes características :

- a) Especificidad
- b) Reproducibilidad
- c) Rapidez
- d) Bajo costo

Para efectuar esta investigación comparativa se eligió el análisis de una mezcla vitamínica conteniendo B₁₂, B₁ y B₆ en productos liofilizados , eligiendo una técnica diseñada por nuestro laboratorio , en la que se combinan la Cromatografía y la espectrofotometría.

En este trabajo se exponen los resultados obtenidos, con el --
objeto de comprobar que tan acertada fué la decisión tomada respecto a -
la norma de elección para la técnica pre-establecida en párrafos anteriores.

C A P I T U L O I I

G E N E R A L I D A D E S ;

La vitamina B fué uno de los primeros compuestos que se consideraron esenciales para una buena alimentación .

El término vitamina B soluble en agua fué introducido por Mc Collum y Kennedy en 1916 para describir a este tipo de sustancias como alimenticias. Posteriormente se puso en evidencia que la vitamina B era mas bien un complejo que una entidad única, designándose nueve compuestos principales como miembros del complejo B . Ellos son :

- | | |
|-----------------------------|---------------|
| - Tiamina | - Riboflavina |
| - Acido Nicotínico | - Piridoxina |
| - Acido Pantoténico | - Biotina |
| - Inositol | - Colina |
| - Acido Para-amino-benzoico | |

CONTENIDO

- a) Historia de las vitaminas B₁, B₆ y B₁₂.
- b) Acción farmacológica de las vitaminas B₁, B₆ y B₁₂
- c) Características organolépticas y fisicoquímicas de las vitaminas B₁, B₆ y B₁₂.

VITAMINA B₁ (TIAMINA)

Fue el primero de los miembros del complejo B en ser identificado químicamente. Hechos relacionados con su aislamiento datan del siglo XIX, cuando Takaki dramáticamente redujo la incidencia de Beriberi, en la Armada Japonesa, instituyendo ciertas reformas en la dieta. Poco después - Eijkman un fisiólogo Danés en Java, demostró que individuos que desarrollaron Beriberi, mientras subsistían a base de arroz, se pudieron curar - de su enfermedad, por la adición de cáscara de arroz a su dieta. Más adelante El mismo reprodujo Estos hallazgos clínicos experimentalmente en gallinas.

Tiempo más tarde Funk aisló a partir de cáscara de arroz y de levadura, una sustancia cristalina que era efectiva en la prevención y cura del Beriberi provocado experimentalmente. El compuesto contenía nitrógeno básico y se pensó que era una amina, que como era también esencial para la vida, Funk llamó por consiguiente a la sustancia vitamina, un término ampliamente adoptado para designar sus tancias alimenticias adicionales y conservaron la palabra asignada de "vitamina" cuando ---- hallazgos posteriores revelaron un amplio espectro químico para los compuestos esenciales alimenticios.

En 1926, la vitamina B₁ fué aislada en su forma cristalina por Jansen y Donath y en 1936 Williams determinó su estructura, la cual verificó por síntesis el mismo año. El Consejo de Farmacia y Química adoptó el nombre de Tiamina, para designar a la vitamina B₁ cristalina y éste es ahora su nombre oficial en la USP.

ACCION FARMACOLOGICA

La Tiamina es sintetizada por las plantas y diversos microorganismos, en las primeras parece actuar como hormona; se forma en las hojas y es --- transportada a las raíces donde regula el crecimiento. El organismo animal la puede producir en cantidades pequeñas por medio de la flora intestinal, pero su aporte depende esencialmente de los alimentos vegetales (vitamina B₁ libre) ó de origen animal (cocarboxilasa).

La vitamina es rápidamente reabsorbida en el conducto digestivo y fosforilada en el hígado , posteriormente se -- desfosforila en el riñon y es eliminada como vitamina libre en la orina, gran parte de ella se elimina en forma de compuestos orgánicos de azufre .

Por otro lado la sustitución del anillo pirimídico de la vitamina B₁ da origen a antagonistas de la vitamina. Aunque suele haber sinergia entre las vitaminas B₁ y B₁₂ , parecen mostrar cierto antagonismo en algunos casos. La - tiamina está prácticamente excenta de acciones secundarias indeseables , cuando se suministra en el, rango de dosis terapéutica puede haber ligera vasodilatación y una baja en la presión sanguínea seguida a una rápida inyección intravenosa , pero éstos efectos son transitorios aún a dosis mayores no presentan efectos en el nivel de azúcar en la sangre pese al hecho de que la vitamina está relacionada con el metabolismo intermediario de los carbohidratos.

CARACTERÍSTICAS ORGANOLEPTICAS Y FISICOQUIMICAS

Sustancia cristalina blanca, soluble en alcohol, agua, insoluble en disolventes de grasas, los cristales de clorhidrato que se obtienen de una solución alcohólica tienen punto de fusión de 249 °C, son estables si se conservan en estado seco y tienen olor a levadura. Es estable en solución ácida y se puede calentar sin que se descomponga, pero es inestable en solución neutra o alcalina.

La molécula consta de dos anillos: El de pirimidina y el de tiazol unidos por medio de un grupo metileno; en este punto se efectúa la desintegración de la molécula cuando se calienta en presencia de humedad y con un pH neutro o alcalino. La desintegración de la molécula se efectúa en forma cuantitativa en presencia de iones bisulfito, reacción que sirve para preparar artículos alimenticios que no contengan tiamina y que han de ser utilizados en bioensayos.

La tiamina es oxidada en solución alcalina y convertida a tiocromo, sustancia sin actividad biológica y fluorescente, la vitamina pura no se oxida fácilmente al aire.

VITAMINA B₆ (PIRIDOXINA)

HISTORIA:

En los años 30s varios grupos de investigadores describieron un factor de vitamina B esencial en nutrición animal, el cual se cree ahora es la piridoxina. Sin embargo no fué hasta 1935 que la naturaleza compleja de la vitamina B₆ ha sido suficientemente esclarecida como para permitir a Birch y colaboradores concluir que un tipo particular de dermatitis en ratas era debido a la falta de una vitamina específica en la dieta .

En 1936 Birch y Gyorgy dieron el nombre de vitamina B₆ a la sustancia y presentaron algunos detalles de su estructura química . El compuesto fué después identificado - químicamente por un grupo de investigadores y subsecuentemente sintetizado . El nombre no apropiado de piridoxina fué asignado por el Consejo de Farmacia y Química, en base a su estructura química .

ACCION FARMACOLOGICA

Los tejidos animales contienen vitaminas B₆ principalmente en forma de piridoxal y piridoxamina; los vegetales contienen también piridoxina en gran cantidad. Los tres compuestos (piridoxina, piridoxal y piridoxamina), se interconvierten directamente o por medio de fosfatos, en virtud de un mecanismo enzimático desconocido, los fosfatos son vehículos de la actividad vitamínica.

La especie humana sintetiza vitamina B₆ sobre todo en la flora del intestino grueso pero no se sabe si el organismo utiliza esta fuente de vitaminas ni en que medida. En la primera infancia no existe esta síntesis o está muy restringida.

La piridoxina muestra acciones farmacodinámicas sobresalientes después de su administración ya sea intravenosa u oral. Dosis del rango de 3-4 g/kg de peso produce convulsiones y muerte en animales, pero dosis menores pueden administrarse sin ningún efecto.

CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS Y FISICOQUIMICAS

La piridoxina cristalizada como base libre en forma incolora, funde a 160°C, tiene sabor amargo y es fácilmente soluble en agua, alcohol y acetona. El producto comercial es el clorhidrato cristalizado, el cual es soluble en agua y alcohol y se sublima con facilidad.

La piridoxina es una de las vitaminas más estables y resiste el calentamiento en solución ácida o alcalina. Se destruye calentandola 5 horas en autoclave y en solución diluida se altera algo por la luz, pero en las condiciones de fabricación y conservación de alimentos y preparación de farmacéuticos resiste bien.

VITAMINA B₁₂ (CIANOCOBALAMINA)

HISTORIA

La historia del descubrimiento de la vitamina B₁₂ comienza en la descripción de Addison en 1849 y 1855 con lo que sus contemporáneos reconocieron como anemia perniciosa o quizá antes con el relato de Combe de un caso clínico como " Algún desorden de los - órganos digestivos y asimilativos "

El descubrimiento del valor terapéutico del hígado en la anemia perniciosa por Minot ganador del Premio Nobel en 1926, fué - seguido por la demostración de Castle en 1927 de que en el jugo --- gástrico normal humano contiene un factor intrínseco que se combina con un factor extrínseco contenido en proteína animal, lo que - resulta en la absorción de un principio anti-anemia perniciosa.

En los 30s intentos repetidos para aislar e identificar el factor extrínseco activo químicamente tuvieron como resultado un - incremento en la purificación de extracto de hígado, Wills y Asociados describieron una anemia macrocítica en mujeres Indias en - Bombay, asociada comúnmente con estados de embarazo, que respondían a la terapia con Marmite (una preparación comercial de levadura - autolizada).

Ellos produjeron este mismo tipo de anemia en monos suminis trandoles exclusivamente lo que comían estas mujeres -----

y respondieron al factor de Wills presente en los extractos de hígado crudo, pero no presente en la fracción más pura - efectiva en el tratamiento de la anemia perniciosa. Nosotros ahora sabemos que los extractos de hígado más purificados usados por Wills consistían de una solución falsamente purada vitamina B₁₂ y que el factor Wills no es sino ácido fólico - que fué excluido de los extractos de hígado puros en el proceso de purificación.

En 1948 se prodece el aislamiento de la vitamina - B₁₂ cristalina a partir de concentrados de hígado por Rickes y colaboradores en los EE.UU. y casi simultáneamente por Smith y Parker en la Gran Bretaña, con el aislamiento de la vitamina B₁₂, Berk y asociados demostraron que esta vitamina contenía ambos factores el extrínseco y el principio anti-anemia perniciosa.

ACCION FARMACOLOGICA DE LA VITAMINA B₁₂

Hay pruebas suficientes de que la vitamina B₁₂ es - el factor contra la anemia perniciosa y su eficacia en el -- tratamiento de las anemias macrocíticas es igual a la del - extracto de hígado. Cuando se trata la anemia perniciosa -- con vitamina B₁₂ por vía intramuscular, esta produce máxima- respuesta reticulocítica en un periodo de 4 a 9 días y se nor maliza el cómputo eritrocitario y leucocitario de 4 a 6 sema nas.

Es sorprendente la modificación que experimenta la médula ósea cuyo estado megaloblástico se vuelve normoblástico en pocas horas consecutivas a la inyección de pequeñísimas dosis por ejemplo 1 mcg de la vitamina. Se cree que esta sustancia es el factor extrínseco de Castle, cuya absorción en el intestino es facilitada por el factor intrínseco existente en el jugo gástrico normal. Así pues el defecto bioquímico en los enfermos de anemia perniciosa parece ser falta de elaboración de dicho factor intrínseco. Por esta razón la vitamina B₁₂ administrada por vía bucal es mucho menos eficaz en los enfermos de anemia perniciosa y enteramente ineficaz si hay falta total del factor intrínseco. Si es normal el jugo gástrico la vitamina ingerida es solo un poco menos potente que cuando se inyecta por vía intramuscular. Si hay jugo gástrico normal la dosis ingerida ha de ser entre 30, 50 y aún 100 veces mayor que la dosis intramuscular para producir una respuesta.

La vitamina es eficaz para prevenir las lesiones nerviosas que son comunes en la anemia perniciosa, se ha observado que la administración de vitamina B₁₂ hace desaparecer rápidamente síntomas de secuelas nerviosas de dicha anemia.

Sin embargo parece ser que la curación depende más de la duración del padecimiento que de la magnitud de las lesiones nerviosas, las cuales cuando son inveteradas es menos probable que curen. Se ha observado también que en el esprú tropical y las anemias macrocíticas de la nutrición reaccionan favorablemente hasta curar del todo con esta vitamina, que entonces es eficaz por vía bucal. Hay algunas pruebas de

que en ciertos casos la adición de vitamina B₁₂ a la alimentación modificada favorablemente el crecimiento de los niños pero claro que estas observaciones requieren ulterior verificación.

La vitamina B₁₂ es el principio bioquímico más activo que se conoce, su actividad en las bacterias se mide en milimicrogramos y en el sujeto humano un microgramo al día en el tratamiento de anemia perniciosa equivale poco más o menos a la actividad de una unidad USP de extracto de hígado.

No se conoce a ciencia cierta la manera en que la vitamina B₁₂ estimula la síntesis de los componentes normales celulares de la sangre. En los microorganismos productores de ácido láctico se evita la necesidad de la vitamina cuando se añade timidina, el desoxirribosido de timina al medio basal. Es posible que la vitamina catalice la síntesis de Timidina y quizá de otros componentes celulares. Es evidente que aunque el ácido fólico y la vitamina B₁₂ son eficaces contra la anemia macrocítica, uno de ellos no puede sustituir al otro. La vitamina B₁₂ es el agente nutritivo indispensable de *L. lactis*, *L. leichmanii*, *Euglena gracilis* y de *E. Coli* y quizá de algunos otros microorganismos.

METABOLISMO DE LA VITAMINA B₁₂

Para su absorción la vitamina B₁₂ requiere una glucoproteína que es secretada por la célula parietal de la mucosa gástrica, se trata del factor intrínseco, que tiene un pe

so molecular de aproximadamente 55000

El factor intrínseco se combina con la vitamina B₁₂ y el complejo así formado es captado en presencia de iones-calcio por receptores específicos del borde penicilado de -- las células mucosas del íleo. Dos proteínas plásmaticas -- pueden ligar la vitamina B₁₂, una globulina llamada transcobalamina I y una globulina que es la transcobalamina II. Si se examina el plasma de un individuo sano se comprobará que la vitamina B₁₂, se halla principalmente combinada con la -- globulina . Si por vía oral o parenteral se administra a este individuo B₁₂ esta vitamina suministrada se fija principalmente a la globulina β quizá porque la globulina α ya está casi saturada con la vitamina B₁₂ endógena. La globulina β libera con rapidez la vitamina B₁₂ hacia los tejidos, mientras que la globulina α libera la vitamina con gran lentitud. Esto sugiere que la globulina β actúa como proteína transportadora de la vitamina B₁₂ en tanto que la globulina α es la proteína de almacenamiento de la vitamina B₁₂ circulante.

Si se administra parenteralmente más vitamina B₁₂, que la que estas proteínas plásmaticas pueden fijar, el exceso se excreta por la orina, esto se demuestra con la prueba de Schilling (dosis saturante de B₁₂) *** Ambas proteínas fijadoras son glucoproteínas, la proteína copulante de la globulina es sintetizada en granulocitos. La tasa plasmática normal de la vitamina B₁₂ es de 200 a 900 microgramos δ pidogramas/cm³. Los niveles inferiores a 100 microgammas/cm³

señalan deficit de vitamina B₁₂.

Se encuentran tasas muy altas de vitamina B₁₂ en la leucemia granulocítica crónica, metaplasimieloide y policitemia vera, como reflejo del aumento de producción de proteína copulante de la globulina en los trastornos de granulopoyesis incrementada, tambien se hallan altos niveles en las hepatopatías.

El organismo humano contiene por término medio un total de 5000 gammas (5 mg) de vitamina B₁₂, unas 1500 gammas se encuentran en el hígado y otras 3000 gammas en el músculo, el requerimiento normal diario oscila entre 1 y 2.5 gammas, se necesitan varios años en que falle la absorción de la vitamina B₁₂ para que se produzca un deficit en un individuo antes sano.

CARACTERISITICAS ORGANOLEPTICAS Y FISICOQUIMICAS DE LA VITAMINA B₁₂

La vitamina B₁₂ y específicamente su forma más común la cianocobalamina es inodora e insipeda, existe como un polvo rojo o cristales rojos, muy higroscópicos en su estado anhidro, la humedad puede ser extraída a 105° C bajo presión reducida, la vitamina B₁₂ es soluble en agua -- arriba de 1.25% relativamente soluble en alcoholes bajos y fenoles, pero insoluble en la mayoría de los solventes orgánicos. Los cristales empiezan a oscurecerse a 210-220 °C y funde a 300°C. Aunque la cianocobalamina en la cual el grupo ciano está coordinado al átomo de Co, es la forma más común de la vitamina B₁₂, también existen otras formas de las cuales los iones -OH (hidroxocobalamina), -NO₂ (Nitritocobalamina) -HSO₃ (sulfitocobalamina) sustituyen al grupo ciano .

El color rojo se debe a la presencia de Co la unión Co es más bien covalente que ionica . La cianocobalamina absorbe agua, el producto inicial contiene de un 10 a 12% de humedad absorbida . La actividad es destruida por metales pesados por oxidaciones fuertes o agentes reductores pero no por autoclave en periodos cortos a 121°C . La solución acuosa tiene un pH neutro, aunque su estabilidad máxima es de 4.5 - 5 unidades de pH .

La Coenzima B₁₂ difiere de la cianocobalamina en que en lugar del grupo ciano, tiene unido al Co un grupo 5 deoxiadenosina



Cuadro No. 1

Características organolépticas y fisicoquímicas de las -
 Vitaminas B₁₂, B₁, B₆.

	B ₁₂	B ₁	B ₆
Descripción	Cristales de color rojo oscuro	Polvo cristalino con olor a nueces.	Cristales de color blanco.
Fórmula Condensada	C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P	C ₁₂ H ₁₈ ON ₄ SCl ₂	C ₈ H ₁₁ O ₃ N
Peso molecular	1355.40	337.29	205.64
Punto de Fusión	300 °C	248-250 °C	202-206 °C.
Solubilidad	Agua, Alcohol	Agua, Glicerina	Agua, alcohol
pH	4-5,5	2.7 - 3.4	3.0
Pureza	96-100.5%	98-102%	98-100.5%
	B/S	B/S	B/S.

B/s (resultado en base seca)

Nombre	Nucleótido base	Observaciones
Seudovitamina B ₁₂	Adenina	Principalmente activo para bacterias (E.coli)
Factor A	2-Metiladenina	Activo para ciertas bacterias: inactivo para el pollo. Se reabsorbe mal en el intestino. Administrado por vía prentérica, se acumula principalmente inalterado en el hígado. Escasamente eficaz en la anemia perniciosa.
Factor B	(sin nucleótido)	Porción exenta de nucleótido de B ₁₂ , pseudovitamina B ₁₂ y Factor A. Muy activo para algunas bacterias, inactivo para rata y pollo. Se reabsorbe mal en el intestino. Inactivo en la anemia perniciosa.
Factor C	Guanina (?)	Mezcla de 2 compuestos muy similares C ₁ y C ₂ -- procedente de heces de ternero. De actividad en las bacterias similares a la del Factor B, en el que se convierte poco a poco en solución acuosa.
Factor D	Desconocido	Pigmento ácido rojo, de heces de ternero, sin actividad vitamínica, tal vez sea un metabolito intermediario.
Factor E	Desconocido	Pigmento ácido rojo, de heces de ganado porcino y bovino o de ratas, también se encuentra en productos de fermentación. Actividad para bacterias como la del Factor B.
Factor F	2-Metilmercaptadenina ?	Principal componente con actividad de B ₁₂ en heces de pollo y en la de cerdos.
Factor G	Hipoxantina	Producto de desaminación de pseudovitamina B ₁₂ , en heces de terneros y cerdos, muy activo para E.Coli.
Factor H.....	2-Metilhipoxantina	Producto de desaminación del Factor A, en heces de ternero y cerdos y- activa para E. Coli.
Factor I	5-Hidroxibencimidazol	Idéntico al factor B 12 III de lodos de alcantilla activo para bacterias y polluelos.

CAPITULO III

DESCRIPCION DE LOS METODOS ANALITICOS OPTIMOS EN LA DETERMINACION DE LAS VITAMINA B₁₂, B₆, B₁₂ COMO MATERIA PRIMA.

De una manera general los métodos para la determinación de las vitaminas citadas, se dividen en:

- a) Químicos
- b) Biológicos

Los Métodos Químicos.- Nos indican la presencia del grupo a cuantificar de acuerdo a la técnica, por ejemplo el color, máximo en una gráfica y a una longitud de onda.

Los Biológicos.- Nos determinan la potencia ó actividad de la vitamina a nivel funcional (generalmente se emplean animales).

El uso de uno, de otro, ó de los dos depende del uso a que está destinado el medicamento y obviamente a las condiciones del Laboratorio . Normalmente los biológicos, no se usan debido a que son tardados y dificultosos, además emplean más equipo humano e instrumental que los químicos, los microbiológicos se emplean en la actualidad para medir la actividad de la vitamina frente a alguna cepa de microorga--

nismos específica y de requerimientos nutritivos especiales.

En este trabajo expondremos solamente los métodos-químicos y microbiológicos por considerarlos más empleados en la Industria Farmacéutica.

Podemos dividir los métodos de valoración de vitaminas a saber:

- | | | |
|-----|--------------------------|-------------------------------|
| 1.- | Métodos Químicos | Técnicas espectrofotométricas |
| | | Técnicas Cromatográficas. |
| 2.- | Métodos Microbiológicos. | |

Todos estos métodos están relacionados entre sí, por ejemplo; en el método cromatográfico se hace la separación del activo a cuantear en la placa, columna y/o papel correspondiente, ya separados de acuerdo a su R_f , se se separa la mancha, se eluye y se hace la lectura espectrofotométrica. En el caso del microbiológico se hace la lectura final de -- los resultados por volumetría o bien por turbidimetría.

Describiremos de una manera muy somera los métodos de análisis de las vitaminas B_1 , B_6 , B_{12} dando las principales citas bibliográficas las cuales son una recopilación de las técnicas empleadas por algunos Laboratorios cuyos produc

tos son vitamínicos liofilizados, tales como: Merck México, Carter Wallace, Grupo Rousell.

En la siguiente tabla hacemos el registro sinóptico de los métodos utilizados por estos Laboratorios, las citas bibliográficas y los fundamentos de los métodos mencionados en la tabla y que se describen a continuación, y por último aquellos que fueron utilizados en la parte experimental durante el desarrollo de este trabajo.

PRINCIPALES METODOS EMPLEADOS EN LA VALORACION DE VITAMINAS

M E T O D O S	B ₁	B ₆	B ₁₂
Espectrofotométrico	Fluorométrico	+	
	Visible	+ *	+ *
	U.V.	+	+
Cromatográficos	+	+	+
Microbiológicos	+	+	+ *
Volumétricos	+	+	
Polarográficos	+	+	
Gravimétricos	+		

* Métodos empleados más comunmente, cuyo fundamento se describe en este capítulo.

Métodos para la determinación de la vitamina B₁₂ como materia prima:

1.- Método espectrofotométrico:

- a) *British Pharmacopeia*, 1973, pág. 233.
- b) *Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos*, 1974, 4a Ed. pág. 626-628.
- c) "Farmacos 73" De la Comisión Técnico-Consultiva de la Cámara Nacional de la Industria de los Laboratorios Químico-Farmacéuticos. pág. 175 - 177.
- d) Manzur, Haque, Hashmi. Ed. John Wiley and Sons.- 1973. *Assay of vitamin in Pharmaceutical Preparations*. pág. 243- 246.
- e) Strohecker, heinz M. Henning, Verlag Chemie 1966.- *Vitamin Assay*.
- f) *The United States Pharmacopeia*, 1975. 19a. ed. pág. 110 -111.

F U N D A M E N T O

El método espectrofotométrico para analizar B₁₂ como materia prima, es muy importante y consiste simple y sencillamente en hacer una dilución de la materia prima y efectuar lecturas a diferentes longitudes de onda , para que la materia prima presente los máximos dentro de especificaciones, dadas así:

La vitamina B₁₂ (Cianocobalamina) se lee a:

361 nm (\pm 1 nm), E = 207

278 nm (\pm 1 nm), E = 115

548 nm (\pm 1 nm), E = 63

La vitamina B₁₂ (Hidroxocobalamina) se lee a:

351 nm (\pm 1 nm), E = 188

274 nm (\pm 1 nm), E = 145

522 nm (\pm 3 nm), E = 60

Con esto además de la valoración espectrofotométrica de la vitamina B₁₂, se hace a la vez la identificación de la misma, estableciendo la relación de las absorbancias.

Se recomienda correr una cromatografía en placa fina para observar las impurezas coloridas que pueda contener la materia prima.

En otras técnicas se nos indica hacer la dilución para la vitamina B₁₂ (Acetato de Hidroxocobalamina) en solución buffer de acetatos, leyendo a las mismas longitudes de onda. El objeto de hacer la dilución en buffer y no en aguas: Mantener estable la solución de acetato de hidroxocobalamina.

MÉTODOS CROMATOGRAFICOS:

En sus dos especialidades: Columna y Placa fina.

- a) Manzur, Haque-Hashmi. ed. John Wiley and Sons- 1973. Assay of vitamin in Pharmaceutical Preparations. pág. 265-267.
- b) Strohecker, Heinz M. Henning. Verlag Chemie 1966.- Vitamina Assay. pág. 155-161- 163.

F U N D A M E N T O

El fundamento de los métodos cromatográficos en placa fina y en columna es el mismo con la variedad del soporte.

Y en general el fundamento de la cromatografía es el siguiente:

La cromatografía en todas sus modalidades ha encontrado resonancia en casi todos los Laboratorios Químicos, debido a su fácil ejecución y bajo costo. Muchas de las determinaciones seguidas en la Industria Farmacéutica y en la alimenticia se basan en los métodos cromatográficos.

El Botánico ruso Michael Tswett separó por primera vez en 1903 pigmentos de plantas mediante filtración de sus extractos sobre una columna de carbonato de calcio en un tubo de vidrio, este impresionante trabajo contribuyó posteriormente a una difusión rápida de este método de separación mediante el cual principalmente la química de productos naturales - recibió un enorme impulso.

Cada modalidad de cromatografía representa fenómenos diferentes según las condiciones de trabajo. Lo que tienen en común todos los principios cromatográficos son su forma de aplicación, ya sea cromatografía en columna, Cromatografía en papel, Cromatografía en placa fina o Cromatografía de gases, además de que todos tienen como finalidad la separación de mezclas de sustancias dependiendo de las características moleculares de las mismas.

Las principales técnicas cromatográficas son las de adsorción y de partición.

En la cromatografía de adsorción se lleva a cabo la separación de una mezcla de sustancias dependiendo de las diferentes características polares de ellas o sea de la capacidad de formar enlaces con la superficie activa del sorbente (soporte) en la superficie activa del sorbente existen fuerzas electrostáticas en forma de rejillas dependiendo tanto del tamaño del grano como de la superficie de este, por lo que las sustancias polares o polarizables se unirán electrostáticamente a - este proceso se le llama adsorción.

En una sustancia polar el centro de carga se encuentra en diferente posición espacial que el centro de carga negativo. esto es que la sustancia forma un dipolo, el cual es atraído electrostáticamente por el sorbente.

Una vez unida la superficie del sorbente a la sustancia electrostáticamente, se procede a eluir esta del soporte con líquidos de diferente polaridad, es decir, arrastra la sustancia de donde está unida mediante las fuerzas competitivas del solvente aplicado.

El efecto de elución depende naturalmente de la constante dieléctrica o polaridad del eluyente.

Completamente diferentes son las bases de la Cromatografía de distribución, la cual como el nombre lo indica, se lleva a cabo mediante la separación por distribución en dos fases no miscibles esto es, entre dos líquidos no miscibles. También la cromatografía de distribución tuvo su punto de partida en la columna. Martín y Synge cargaron una columna de tierra sílice con agua como fase estacionaria sobre la cual aplicaron una solución no miscible con agua como fase móvil y durante el transcurso del corrimiento se llevo a cabo una distribución continua del problema entre las dos fases. Las sustancias se separaron en base a su coeficiente de distribución.

Método Microbiológico:

- a.- *Difco laboratories. 9th ed. 1963. Detroit Michigan "Difco Manual" pag. 221-222.*
- b.- *Strohecker, Heinz M. Henning. Verlag Chemie. 1966. " Vitamin Assay ".*
- c.- *The asociation of Vitamin Chemists INC. Intersciencie Publishers. pag. 262-274.*
- d.- *United States Pharmacopea XIX pag. 613.*

Respecto a métodos biológicos para la valoración de la vitamina B₁₂ las cepas de microorganismos que se emplean son :

Ochromonas malhamensis

Euglena gracilis

E. coli

Lactobacillus leichmannii

Existen diferencias considerables en la especificidad de los diversos métodos microbiológicos aplicables al análisis de la vitamina B₁₂.

El método que emplea *Ochromonas* exhibe mayor especificidad, ya que responde a aquellas cobalaminas (Benzoimidazol-Cobalaminas) que poseen efecto terapéutico en la anemia perniciosa. El ensayo se afecta por la presencia de grandes cantidades de metionina, que simulan actividad vitamínica B₁₂ cuando se emplea este microorganismo

Por otra parte la prueba con *Euglena gracilis* es positiva a las adenina-cobalaminas clínicamente inactivas y el *Lactobacillus* muestra respuesta además a otros derivados así mismo clínicamente inactivos (hipoxantinas - cobalaminas y desoxirribosidos).

Por lo cual es el microorganismo de elección para la práctica de esta prueba en la mayoría de los laboratorios.

El ensayo que utiliza *E. coli* (ATCC 9637 mutante UV 113-3) todavía empleada con frecuencia es aún menos específica y presenta reacción no solo a la metionina sino también a las cobalaminas carentes de nucleótidos.

La elección del método depende principalmente de la composición de la muestra, el efecto de las impurezas interferentes puede eliminarse en general por simple dilución de la muestra hasta alcanzar niveles de concentración inactivos.

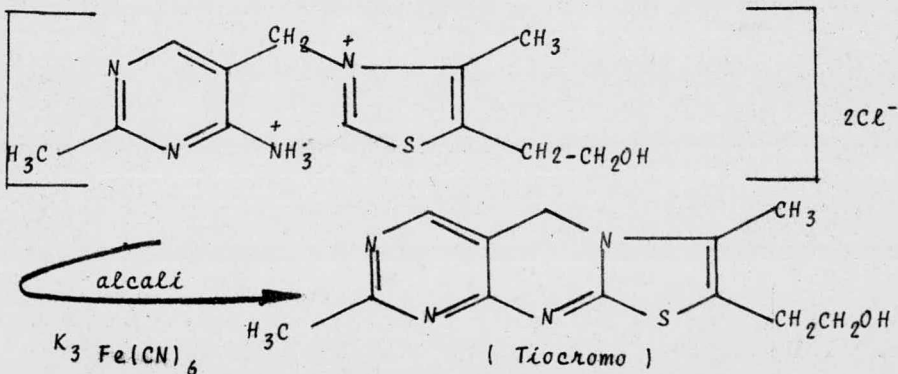
Por ejemplo, los desoxirribósidos son menos activos que la vitamina B₁₂, en un factor proporcional de 10⁴, con frecuencia es aconsejable llevar a cabo una serie de ensayos comparativos empleando distintos microorganismos ó bien el mismo microorganismo pero con distintos métodos para la preparación de la muestra.

MÉTODOS PARA LA DETERMINACION DE VITAMINA B₁ y B₆ COMO MATERIA PRIMA.

- 1.- Fluorométrico:
- i.- Strohecker, Heinz M. Henning. Verlag Chemie. 1966.-
Vitamin Assay, pag. 65-67 y 136-137.
- ii.- USP XIX Pag. 629

FUNDAMENTO:

El método fluorométrico (reacción tiocromo), está basado en la oxidación de la tiamina en solución alcalina a tiocromo, el cual tiene una fluorescencia intensa azul, dependiendo de la concentración de Tiamina en solución. Este es el método más específico y usado para determinación de vitamina B₁ como materia prima y particularmente útil en el análisis de multivitamínicos.



MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE VITAMINAS

B₁ y B₆

- i.- Strohecker, Heinz M. Henning. Verlag Chemie 1966.-
Vitamin Assay. pág. 88-89- y 125-127.

FUNDAMENTO:

La tiamina y la piridoxina exhiben máximos de absorción en la región ultravioleta del espectro que son fuertemente dependientes del pH de la solución, este método puede emplearse en el ensayo cuantitativo de tiamina y piridoxina como materia prima.

Máximos de la vitamina B₁

- i.- En solución de pH = 7 (buffer de fosfatos) a 232-233 nm, con el siguiente coeficiente de extinción E= 345 calculado en base seca.
- ii.- En solución de pH= 2 (ácido clorhídrico) a 246 nm con el siguiente coeficiente de extinción, E= 425.

Máximos de la vitamina B₆

- i.- A pH = 2 en solución de ácido clorhídrico y a 291 nm, su coeficiente de extinción, E= 430.

Métodos cromatográficos, Microbiológicos, Volumétricos, Gravimétricos, para la determinación de vitamina B₁ y B₆ como materia prima.

1.- Strohecker, Heinz M. Henning, Verlag Chemie 1966. Vitamin Assay.

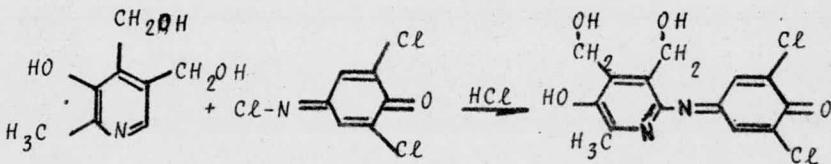
Para la vitamina B₆, el método más empleado en la Industria Farmacéutica es el método colorimétrico con 2,6 dicloroquinona-clorimida.

FUNDAMENTO:

La adición de la 2,6-dicloroquinona-clorimida a piridoxina en condiciones alcalinas y con isopropanol convierte a la vitamina a un compuesto indofenol de color azul.

Esta reacción colorida se aplica para la detección de grupos fenol insustituibles en la posición "para" al grupo hidroxifenólico, esto no es específico para la vitamina B₆.

REACCION:



La especificidad sin embargo puede aumentarse, por la adición de ácido bórico, con el cual se previene la formación de compuestos coloridos azules por la formación de un complejo con los dos grupos adyacentes $-CH_2OH-$. La desventaja de este método es la inestabilidad del compuesto formado.

La medición del color se lleva a cabo con intervalos de tiempo restringidos, resultando óptimas las lecturas que se obtengan a los 80 seg. después de la adición del reactivo de color.

Este método es el que tiene los resultados más aceptables en la determinación de vitaminas B_6 en multivitamínicos.

CAPITULO IV

ANALISIS EXPERIMENTAL

MATERIAL Y METODOS:

Selección de métodos óptimos para la determinación de la Vitamina B₁₂, en presencia de las vitaminas B₁ y B₆ en productos liofilizados.

Al analizar vitamina B₁₂ en un polivitamínico nos encontramos dos casos:

- a).- Productos que contienen B₁₂ en dos formas a la vez cianocobalamina ó bien hidroxocobalamina base .

En el caso de los productos que caen en el, inciso a) el procedimiento general es:

Transformar la hidroxocobalamina en cianocobalamina con solución de cianuro de potasio al 5% y determinar ésta cuantitativamente por cromatografía de columna., con la resina adecuada. por ejemplo: Amberlite CG-50 tipo II, Intercambiador fuertemente ácido (producto de Merck Méx.)

En el caso de los productos del inciso b).- un procedimiento adicional al anterior que se puede aplicar es:

Leer en el espectrofotometro a 525 nm la hidroxocobalamina, esto es:

Aún cuando este producto tenga vitamina B₁ y vitamina B₆, la hidroxocobalamina presenta su máximo a esta longitud de onda (525 nm), el máximo a 351 nm se enmascara ya que a este pH la Tiamina y la Piridoxina presentan máximos a 246 y a 271 nm respectivamente .

Obviamente para obtener un resultado cuantitativo se corre una muestra de referencia que contenga Hidroxocobalamina , Tiamina y Piridoxina en las mismas concentraciones del problema.

Las técnicas más aplicables para la determinación de vitamina B₁₂ son las siguientes :

- i Método espectrofotométrico
- ii Método cromatográfico
- iii Método Microbiológico.

METODO ESPECTROFOTOMETRICO DIRECTO

Es aplicable a compuestos que tengan la siguiente fórmula:

Fórmula x:	g
Hidroxocobalamina acetato	3.23
Tiamina clorhidrato	64.52
Piridoxina Clorhidrato	32.25

METODO:

Valoración de la hidroxocobalamina :

REACTIVOS:

Acido Acético 0.2 N.- Medir 11.6 ml de ácido acético glacial, diluir y aforar con agua a 1000 ml.

Acetato de sodio 0.2 N.- Pesar 16.4 g de acetato de sodio anhidro, disolver y aforar con agua a 1000 ml.

Solución Reguladora de pH.- Mezclar 40 ml de solución ---- 0.2 N de ácido acético y 60 ml de solución 0.2 N de acetato de sodio.

PROCEDIMIENTO:

Pesar aproximadamente 100 mg del polvo y pasarlos cuantitativamente a un matraz aforado de 50 ml, disolver y aforar con solución reguladora de pH.

Leer en el espectrofotómetro a 525 nm, empleando como blanco la solución reguladora.

CALCULOS

$$\frac{A \times 50}{56 \times M} = \text{mg}/100 \text{ mg}$$

A = Absorbencia del problema

M = Peso de la muestra expresado en g.

A) METODO CROMATOGRAFICO PARA DETERMINACION DE
VITAMINA B₁₂

Es aplicable a compuestos que tengan la siguiente
fórmula :

FORMULA "Y"

Hidroxocobalamina	1.90
Cianocobalamina	2.86
Tiamina Clorhidrato	47.62
Piridoxina clorhidrato	47.62

METODO :

Valoración de cianocobalamina

REACTIVOS :

Hidroxido de sodio 1 N

Dioxano- HCl : 60 ml de Dioxano

10 ml de Acido clorhidrico 1N

30 ml de agua

Acido Clorhidrico 0.1N

Acetona 85 % 85 ml de acetona

15 ml de agua

hasta tener una altura de 15 cm. Se deja eluir la solución sobrenadante y se lava con 50 ml de HCl 0.1N, después con 50 ml de Dioxano -HCl y luego 4 veces con 50 ml. de HCl 0.1N. Se deja eluir cada vez hasta que solo algunos mm del líquido queden encima de la resina. Finalmente se agregan 50 ml. de solución --buffer, se agita bien, se deja sedimentar lentamente y luego se deja eluir.

Este procedimiento se repite hasta que el eluente tenga un pH = 4 y que queden unos mm de éste sobre la superficie de la resina, de éste modo la columna está lista para su empleo.

PROCEDIMIENTO:

A la columna recién preparada se le pone la cantidad de la muestra a analizar (equivalente de 250 γ B₁₂), de preferencia la muestra disuelta en solución reguladora pH=4. Se deja eluir y se lava tantas veces sea necesario con HCl 0.1N (10 - 15 ml cada vez) hasta que el eluente quede incoloro. Luego se lava cada vez con 25 ml. de acetona al 85% hasta que el eluente quede nuevamente claro. Se elimina la acetona lavando - con porciones de 20 ml de HCl 0.1N hasta que el eluente quede incoloro y desaparezca el olor de la acetona. La columna intercambiadora debe tener solo la coloración rojiza, característica de 1 la vitamina B₁₂, la que aparece en la parte superior de - la columna.

Cuando el ácido clorhídrico ultimamente agregado a la columna está a solo 1-2 mm de la superficie de la resina se añade 20 ml de Dioxano-ácido clorhídrico a dicha columna. Después de poco tiempo se forma una zona de color rojo precisamente limitada, la cual baja lentamente.

Llegando este anillo al tapón de algodón, se recoge el eluente en un matraz aforado de 10 ml., dicho eluente contiene prácticamente vitamina B₁₂ pura, se lleva a volúmen con la solución de Dioxano-ácido clorhídrico.

DETERMINACION POR ESPECTROFOTOMETRIA

La solución de Dioxano-ácido clorhídrico -vitamina B₁₂ obtenida en el procedimiento del párrafo anterior se lee en el espectrofotómetro a 361 nm, emplando como blanco la solución de Dioxano-ácido clorhídrico.

$$E_{cm}^{1\%} = 207$$

La misma solución se lee, a 550 nm también usando como blanco solución de Dioxano-ácido clorhídrico.

$$E_{cm}^{1\%} = 63$$

CALCULOS :

$$\% \text{ de B}_{12} = \frac{A \times 10\,000}{207 \times m}$$

m = peso de la muestra expresada en mg.

A = absorbancia de la muestra

$$\frac{A \times 10\,000}{63 \times m} = \% \text{ Vitamina } B_{12}$$

Usando intercambiador nuevo se observa ocasionalmente que los valores encontrados con la extinción 361 nm son de masiado altos, en este caso se recomienda una medición a 550 nm. Hay que fijarse bien que los máximos de absorción no va rien notablemente en 361 y 550 nm. Diferencias de ± 2 nm en 361 nm y de 5 - 10 nm a 550 nm.

De los valores estimados de la vitamina B_{12} en la solución se calcula el contenido real del preparado tomando en cuenta la dilución realizada anteriormente.

B) METODO CROMATOGRAFICO PARA DETERMINACION DE VITAMINA B₁₂

Valoración de Cianocobalamina

REACTIVOS:

Son exactamente los mismos que en el método A.

INTERCAMBIADOR:

Resina de intercambio iónico fuertemente ácida Ti -
po I .

MATERIAL:

Espectrofotometro.

Centrífuga

Columna de vidrio de 17 x 2 cm.

PREPARACION DE LA COLUMNA INTERCAMBIADORA:

Se prepara de la misma forma indicada en el método anterior.

PROCEDIMIENTO:

Tomar de las muestras farmacéuticas una cantidad que contenga aproximadamente entre 100 y 200 gammas de vitamina B₁₂

(Cianocobalamina) , agregar 5 ml de solución reguladora de PH e introducirla dentro de la columna. Pasar el líquido a razón de 50 gotas por minuto. Lavar la columna con solución de HCl 0.1 N hasta que el eluyente resulte incoloro. Volver a lavar con solución de acetona al 85%, hasta que la misma salga incolora. Lavar nuevamente con solución de HCl 0.1N hasta que la acetona haya sido totalmente eliminada.

En el caso de que las mezclas farmacéuticas sean comprimidas proceder de la siguiente manera:

Pesar y pulverizar 10 comprimidos, tomar una cantidad de polvo que contenga aproximadamente 200 gammas del principio activo, colocarla en un vaso de precipitado, agregar 10 ml de agua, 5 ml de solución reguladora de ph , mezclar durante 5 min. dejar reposar, decantar, transferir a un tubo de centrifuga y centrifugar durante 5 min.

El líquido sobrenadante pasarlo a través de la columna a razón de 50 gotas por minto. Repetir la extracción anterior tres ocasiones pasando las extractos por la misma columna.

Poner en la columna 20 ml de Dioxano - HCl y recoger en matraz de 10 ml la solución, que será la vitamina B₁₂ libre para determinarse espectrofotométricamente.

DETERMINACION ESPECTROFOTOMETRICA DE LA VITAMINA B₁₂

Preparar una solución tipo de vitamina B₁₂ que contenga 1 mg/100 ml, usando como solvente la mezcla Dioxano-HCl. Leer la solución del problema y la del tipo a 361 nm, usando como blanco la mezcla de Dioxano - HCl - Agua.

$$C_p \% = \frac{A_p}{A_t} \times \frac{C_t}{m} \times 100$$

C_p - Concentración de la solución problema.

C_t - Concentración de la solución tipo en mg/ml.

A_p - Absorbancia del problema.

A_t - Absorbancia del tipo.

m - Peso de la muestra en mg.

METODO MICROBIOLÓGICO

PRINCIPIO:

El ensayo de vitamina B₁₂, se basa en los requerimientos nutricionales de vitamina B₁₂, que tienen ciertos microorganismos. El que normalmente se emplea es el *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830, la respuesta del microorganismo es comparada cuantitativamente con la de una solución st. de vitamina B₁₂. La sensibilidad del método es alrededor de 1 ng.

APARATOS:

Espectrofotometro
Centrifuga
Tubos de ensaye
Matraces erlenmeyer
Autoclave
Pipetas.

REACTIVOS:

1.-	<u>Solución extractiva:</u>		
	Fosfato disódico	-	1.29 g
	Acido cítrico	-	1.10 g
	Metabisulfito de Na		1.00 g
	Agua destilada		100 ml

2.- Solución Stock de vitamina B₁₂

Pesar 37.3 a 38 g de cianocobalamina U.S.P., adicionar 50-60 ml de alcohol etílico al 25%, disolver y cuantitativamente transferir a un matraz de 250 ml. aforado.

Calcular el volumen de solución requerida para dar una solución stock conteniendo 1 mcg de B₁₂ por cada ml.

$$\text{Vol. sol. stock/ml} = \frac{\text{mg de st} \times \text{pureza del st.}}{1.0}$$

Va preparada la solución a utilizar tendrá una concentración de 20 picogramos/ml. Se deberá almacenar en refrigeración y usarse solo durante 60 días.

3.- Medio basal

Difco # 0457-15

Bacto B₁₂ Assay medium U.S.SP.

4.- Cepa de Microorganismo:

Lactobacillus leichmannii ATCC 7830.

PROCEDIMIENTO:

En este método los problemas se hacen por triplicado para tener un mayor número de datos a la hora de hacer las curvas y que haya una menor probabilidad de repetir la prueba.

La preparación de la muestra será:

Se pesa la cantidad calculada para el ensayo, se lleva a un matraz volumétrico, se afora con solución extractiva, se agita, la mezcla así se autoclavea por 10 minutos y si aún quedan partículas insolubles se lleva a cabo una centrifugación. Ya que tenemos una solución totalmente clara de aquí se hacen las diluciones para igualar la concentración del st.

La concentración recomendada es $0.02 \text{ mmg/ml} = 20 \text{ picogramos}$.

CURVA STANDARD

	<u>ml de sol. st.</u>	<u>ml de medio</u>	<u>ml de agua</u>
St ₁	1	5	4
St ₂	2	5	3
St ₃	3	5	2
St ₄	4	5	1
St ₅	5	5	0

Volúmen final = 10 ml.

PROBLEMAS o MUESTRAS:

	<u>ml de problema</u>	<u>ml de medio</u>	<u>ml de agua</u>
P ₁	1	5	4
P ₂	2	5	5
P ₃	3	5	2
P ₄	4	5	1

Volúmen final = 10 ml.

Además de los blancos de agua y de inóculo.

Va teniendo así los tubos, se tapan con algodón u otro sistema de taponar y se esterilizan 5 minutos a 121°C. Al salir del autoclave se pueden enfriar en la llave del agua.

Finalmente en condiciones estériles se inocula cada uno de los tubos con una gota de inóculo de microorganismo tratando de que ésta caiga en el centro del tubo con el medio de cultivo, si no fuera así la cantidad de microorganismo que se queda adherido a la pared del tubo nos falsearía el resultado.

Se incuba a 37°C de 18 a 24 horas dependiendo de la potencia de la cepa, se puede leer el resultado al espectrofotómetro siendo éste el turbidimétrico o bien una titulación acidimétrica, que se basa en la cantidad de ácido láctico producido, el inconveniente es que como se utiliza solución reguladora se debe llevar un blanco.

CONSERVACION DE LA CEPA PARA LA PRUEBA:

La cepa se conserva en un medio selectivo de aquí se hace la resiembra por picadura a un tubo con medio sólido 4 días antes de la prueba, de aquí se pasa a medio de cultivo líquido - para la determinación cuantitativa de la vitamina. La cepa se centrifuga 10 minutos a 2000 rpm hasta observar un precipitado en la parte inferior del tubo de centrifuga y de esta misma forma se le practican una serie de lavados, ya que se centrifugó se remueve el precipitado con con una pipeta ó algo semejante pero Esteril totalmente y así sucesivamente.

Los lavados se practican con el objeto de eliminar restos de vitamina B₁₂ del medio de cultivo, de manera que mientras más bien se lave, mejores resultados obtendremos.

CAPITULO V

RESULTADOS OBTENIDOS Y DISCUSION GENERAL SOBRE LOS
DISTINTOS METODOS .

En el siguiente cuadro se muestran :

a). Resultados obtenidos con muestras que contienen B_{12} en forma de Hidroxocobalamina + B_7 + B_6 . Utilizando el método espectrofotométrico directo comparandolo con el método de columna con resina Amberlite CG-50 tipo II grado cromatográfico .

Método espectrofotométrico
Directo.

Columna Método A

Muestra	%	%
1	98.5	97.8
2	98.9	98.3
3	98.9	99.4
4	99.4	98.8
5	98.5	99.8

En el cuadro siguiente se muestran :

Los resultados obtenidos de B_{12} en productos que contienen B_{12} en sus dos formas Hidroxocobalamina y Cianocobalamina + B_1 + B_6 .

Los métodos que se comparan son los siguientes :
Columna con Amberlite CG-50 tipo II , Columna con Intercambiador iónico fuertemente ácido tipo I y el método microbiológico.

Muestra	Amberlite %	Intercambiador %	Microbiológico %
1	98.46	98.46	95.03
2	99.00	98.47	97.33
3	98.77	98.07	97.15
4	98.39	97.63	96.63
5	98.77	98.38	98.43

Se hicieron cinco determinaciones por cada muestra y por cada método y los resultados reportados en el cuadro son la media de las cinco determinaciones.

Los resultados se reportan comparados con la concentración teórica del marbete y expresados en %.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

1.- Consideraciones previas.

Para llegar a los resultados anteriores fué necesario seleccionar los métodos adecuados para cada fase analítica, por lo que el criterio que debe regir un buen control de la calidad debe ser el siguiente:

- a) El análisis de la materia prima deberá ser minucioso (ver capítulo II).
- b) El control medio del producto en proceso lo considero de suma importancia y recomiendo el uso de un método rápido - como el espectrofotométrico o cualquier otro que sea de -- igual velocidad en su desarrollo, para ahorrar tiempo y ga rantizar la calidad durante la fabricación.
- c) El control del producto terminado deberá ser exhaustivo, - empleando métodos más complejos o sofisticados para la confirmación química, de modo que en este caso la verificación de la actividad de la vitamina B₁₂, debe efectuarse por el método microbiológico, puesto que se cuenta con el tiempo necesario para efectuar el análisis, mientras se efectuan las pruebas de esterilidad del producto.
- d) Y así dar un reporte de la actividad y potencia del pro--- ducto terminado plenamente confiable química y biológicamen te.

Los métodos a emplear por cada Laboratorio, dependerán:

De la capacidad de sus instalaciones, así como de la habilidad de sus químicos para desarrollar y aplicar métodos apropiados y de resultados al tamente confiables, todo ello apegado a las normas en vigor.

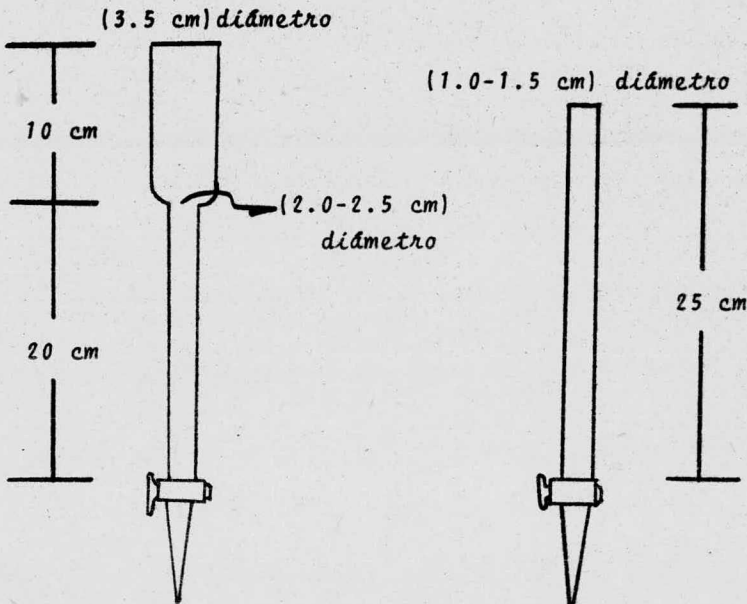
II.- DISCUSIONES SOBRE LOS DIFERENTES METODOS EMPLEADOS:

Como se puede observar en cuanto a resultados no dista mucho un método de otro, pero los factores que el químico debe analizar son los siguientes:

1.- Tener las condiciones apropiadas para desarrollar tal ó cual método. Así por ejemplo darse cuenta de que los métodos cromatográficos expuestos en el capítulo IV, son prácticamente los mismos, pero con la modificación de la resina Intercambiadora.

2.- En cuanto a las resinas utilizadas:

En el caso de la resina es la Amberlite CG-50 tipo II grado cromatografico (Rohn and Has), en el otro caso en un intercambiador iónico fuertemente ácido, tipo I (Merck---México), para cada caso se utilizará un diferente diámetro de columna (ver siguiente figura):



3.- En cuanto al gasto de reactivos: Podemos decir que en el caso del intercambiador fuertemente ácido tipo I, es menor, así como la cantidad de resina que se coloca en la columna, aunque la altura o cantidad de resina depende de la muestra a analizar, así por ejemplo si se analiza un multivitaminico con la mayoría de los miembros del complejo B, la cantidad de resina aumenta por la siguiente razón:

Hay que eliminar la mayor cantidad de compuestos que acompañan a la vitamina B₁₂, obviamente mediante un mayor número de lavados con HCl 0.1N.

4.- Otro factor muy importante es el tiempo de análisis, en el caso del método con Amberlite se emplea un tiempo aproximado de 4-5 horas y en el caso del método con Intercambiador fuertemente ácido es de 2 horas.

5.- Desventajas:

Una desventaja que debe hacerse notar del Intercambiador fuertemente ácido con respecto a la resina Amberlite es la siguiente:

La resina Amberlite es de color blanco, la vitamina B₁₂, es de color rojo (por lo menos en los productos liofilizados en que se realizó la parte experimental). De manera que en cuanto se coloca la muestra sobre la resina ésta se colorea de rosa (no de rojo, ya que la concentración que se emplea es 200 gammas). formando un anillo que primero queda fijo en la parte superior de la columna a pesar de los lavados seriados que se le practican con HCl, acetona, cuando se agrega la mezcla de Dioxano-HCl (este es el reactivo que va a arrastrar la vitamina B₁₂), la muestra se va recorriendo la columna y se recibe ya pura la vitamina B₁₂ al final de recorrido por la columna.

En el caso del Intercambiador fuertemente ácido, este tiene un oscuro color, de manera que se pierde la visibilidad de la localización del anillo de la muestra en la columna y para evitar errores debido a ello, nosotros utilizamos el siguiente procedimiento:

- 1.- Se regula el tiempo de goteo aproximado para la elución total de la muestra de vitamina B₁₂, una vez que ha sido separada tanto de las otras vitaminas como de las sustancias que se utilizan como soporte en el liofilizado.

Nuestro trabajo dió resultados favorables regulando el goteo a 50 gotas por minuto, pero esto es variable y de be calcularse de acuerdo al grosor de la columna que se emplee y a la cantidad de resina que se coloque dentro de la columna.

- 2.- Aunque a la concentración que se utiliza normalmente para determinación de vitamina B₁₂ por este método que es alrededor de 200 gammas la solución ya tiene un color ligeramente rosa fácilmente observable en el momento en que comienza a obtenerse en forma pura. En forma cuantitativa se eluye con una mayor cantidad de Dioxano, para asegurarnos que ya salió realmente toda la vitamina, así si el aforo dice a 10 ml, se hace a 25 ml.

En estas condiciones podemos ya leer en el espectrofotómetro a 361 nm sin dificultad y con la mayor exactitud.

C A P I T U L O VI

CONCLUSIONES:

Al analizar los datos obtenidos en el análisis estadístico -- comparativo de cada uno de los métodos empleados en la determinación de vitamina B₁₂ en multivitamínicos liofilizados, se obtuvieron los siguientes coeficientes de variación:

Determinación de Vitamina B₁₂ (Cianocobalamina) :

Métodos:

Coefficiente Variación:

Cromatográfico con resina
Amberlite

0.873

Cromatográfico con Inter-
cambiador Iónico

0.103 - 103

Microbiológico

0.554

Determinación de Vitamina B₁₂ (Hidroxocobalamina)

Métodos

Coefficiente de Variación

Cromatográfico con Resina
Amberlite

0.284

Espectrofotométrico

0.168

De los resultados anteriores se puede concluir que de los métodos analíticos utilizados:

- 1).- El método Cromatográfico que emplea resina Amberlite, para el análisis de Vitamina B₁₂, en las dos formas (Cianocobalamina e Hidroxocobalamina) es el que se eligió para controlar la potencia durante el proceso de producción por su facilidad de aplicación y por ser el más sensible y exacto.
- 2).- El método empleando el Intercambiador Iónico es el más rápido sin embargo, debido a que el coeficiente de variación obtenido en este método refleja cierto grado de inexactitud, estimamos que requiere de un mayor estudio para complementarse.
- 3).- El método microbiológico, debe emplearse exclusivamente para producto terminado, ya que su utilidad se reduce a probar la actividad biológica del producto, puesto que la potencia se ha ido midiendo durante el proceso, es el método más lento y complicado, lo que aumenta los costos de análisis, además de que no puede utilizarse para verificar la potencia en el transcurso de la producción.

Finalmente sugerimos que el método de análisis que sea seleccionado por cada Laboratorio, sea aquel que se apegue a las condiciones individuales de trabajo, debiendo elegir aquel de mayor exactitud y economía.

CIANOCOBALAMINA

Método con Amberlite

	d	d ²
98.46	0.21	0.0441
99.00	-0.33	0.1089
98.77	-0.10	0.0100
98.39	0.28	0.0784
98.77	0.10	0.0100

$m = 98.67$

$$\sigma = \sqrt{\frac{d^2}{n-1}}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{0.0502}{4}} = \sqrt{0.0125}$$

$\sigma = 0.111$

c.v. = $\frac{\sigma}{m} \times 100$

c.v. $0.111 \times 100 / 98.67 = 0.113$

Método con Intercambiador iónico

	d	d ²
98.46	-0.26	0.0676
98.47	0.27	0.0729
98.07	-0.13	0.0169
97.63	0.57	0.3249
98.38	0.18	0.0324

$m = 98.20$

$$\sigma = \sqrt{\frac{0.1029}{4}} = \sqrt{0.0257}$$

$\sigma = 0.1603$

c.v. = $\frac{0.1603 \times 100}{98.20}$

c.v. = 0.1632

	d	d ²		d	d ²		d	d ²
95.03	1.88	3.53	98.50	0.34	0.1156	98.8	0.22	0.0484
97.33	-0.42	0.1764	98.90	-0.06	0.0036	98.3	0.72	0.5184
97.15	-0.24	0.0576	98.90	-0.06	0.0036	99.4	0.38	0.1444
96.63	0.28	0.0784	99.40	-0.56	0.3136	99.8	0.78	0.6084
98.43	1.52	2.3104	98.50	0.34	0.1156	98.8	0.22	0.0484

$$m = 96.91$$

$$m = 98.84$$

$$m = 99.02$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{1.23}{4}} = \sqrt{0.0376}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{1104}{4}} = \sqrt{0.0276}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{0.2736}{4}} = \sqrt{0.0684}$$

$$\sigma = 0.554$$

$$\sigma = 0.166$$

$$\sigma = 0.261$$

$$c.v. = \frac{.554 \times 100}{96.91}$$

$$c.v. = \frac{0.166 \times 100}{98.84}$$

$$c.v. = \frac{0.264 \times 100}{99.02}$$

$$c.v. = 0.572$$

$$c.v. = 0.168$$

$$c.v. = 0.264$$

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- A.O.A.C. 11th Edition. 784-785 (1970)
- 2.- *British Journal of Nutrition* 8:340 (1954)
- 3.- Cook, E.W. Martin, *Union Tipográfica Editorial Hispano Americana " FARMACIA PRACTICA DE REMINGTON."*
- 4.- De Oliveira Díaz G. *REVISTA LATINOAMERICANA DE MICROBIOLOGIA.* Vol. 18, (43-45) (1976). ←
- 5.- *DIFCO MANUAL.*-Difco Laboratories 9th Edition. Detroit, Michigan. (1963)
- 6.- Goodman, Alfred Gilman. " *PHARMACEUTICAL BASIS OF THERAPEUTICS*" 4th. Edition. The MacMillan Company. (1972) .
- 7.- Kanaragh, Frederick. *ANALYTICAL MICROBIOLOGY.* Academic Press. (1963).
- 8.- Konrad, Diem. *TABLAS CIENTIFICAS.* 6th Edition. Publicación de Cyba Geigy.
- 9.- Lehninger, Albert. *BIOQUIMICA (Las bases moleculares de la Estructura y Función Celular).* Edición Omega. (1972).
- 10.- Manzur, Haque, Hashmi. *ASSAY OF VITAMIN IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS.* Ed. John Wiley and Sons. (1973) .
- 11.- Mazur, Benjamin Harrow. " *BIOQUIMICA BASICA*" 10a. Edición. Editorial Interamericana. (1973)
- 12.- *METHODS OF VITAMIN ASSAY.* The Association of Vitamin Chemists, Inc. 3er. Edition. Interscience Publishers. (1972) .
- 13.- Strohecker, Heinz M. Henning. *VITAMIN ASSAY.* Verlag Chemil.- (1966) .
- 14.- *UNITED STATES PHARMACOPEA XVIII.* (1970) .
- 15.- *UNITED STATES PHARMACOPEA XIX.*

