

720567



Universidad Nacional Autónoma de México

---

FACULTAD DE QUIMICA

SEPARACION Y VALORACION DE IMPUREZAS  
COLORIDAS DEL ACETATO DE HIDROXOCOBALAMINA  
POR CROMATOGRAFIA  
EN CAPA FINA

QUE PRESENTA  
MARIA DEL PILAR DE LA ROSA BAYON  
PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1978

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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 1978  
N.º. ~~385~~ 380  
FECHA \_\_\_\_\_  
N.º. \_\_\_\_\_  
\$ \_\_\_\_\_



A GERARDO

A MIS PADRES

Mi más sincero agradecimiento a PROQUIFIN, S.A.  
y al personal de esta empresa, que con su ayuda  
hizo posible la realización del presente trabajo

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE

PRESIDENTE	<u>ETELVINA MEDRANO DE JAIMES</u>
VOCAL	<u>RAFAEL ZENDEJAS GUIZAR</u>
SECRETARIO	<u>IGNACIO HUERTA BERDEJA</u>
1er. SUPLENTE	<u>ANTONIO GUZMAN DURAN</u>
2do. SUPLENTE	<u>TRINIDAD R. CONTRERAS REYES</u>

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: PROQUIFIN, S.A.

SUSTENTANTE: MA. DEL PILAR DE LA ROSA BAYON

ASESOR : IGNACIO HUERTA BERDEJA

## I N D I C E

- I RESUMEN DEL TRABAJO
- II INTRODUCCION
- III OBJETIVOS
- IV PARTE TEORICA
- V PARTE EXPERIMENTAL
  - 1.- Material y Equipo
  - 2.- Desarrollo
- VI ANALISIS ESTADISTICO
  - 1.- Fórmulas y Abreviaturas
  - 2.- Análisis y Resultados
- VII CONCLUSIONES
- VIII BIBLIOGRAFIA

## RESUMEN DEL TRABAJO

Dada la importancia que representa para la Industria Farmacéutica Mexicana, la determinación de las impurezas coloridas del Acetato de Hidroxocobalamina, para controlar su calidad y evitar la degradación de la misma; el presente trabajo tiene como objetivos, el proponer un método para la determinación de éstas, que sea confiable y reproducible, además de presentar las ventajas de un gasto menor de tiempo y costo al ya reportado en la literatura.

Para lograr lo anterior, se vieron diferentes formas para separar y valorar estas impurezas, entre las cuales se seleccionó el método de separación por cromatografía en capa fina, para lo cual se probaron diferentes fases estacionarias, y se vio que la más apropiada era la Sílica Gel, se usaron diferentes sistemas de eluyentes para su desarrollo. El sistema de eluyentes que dio resultados satisfactorios para la separación de las impurezas coloridas, fue el de Metanol/Agua 93:8. Para valorar estas impurezas, se revisaron diferentes métodos que podrían servir para este fin, y se consideró que el más conveniente, era el utilizado en el método reportado en la literatura (cromatografía en papel), por ser la técnica más sencilla y confiable.

Además, se presenta el método encontrado en la literatura (cromatografía en papel) y el desarrollado en el presente trabajo



(cromatografía en capa fina), se presenta un análisis estadístico donde se compara la reproducibilidad y confiabilidad del método propuesto con respecto al método reportado.

## INTRODUCCION

Algunos de los principales problemas que se presentan en la Industria Farmacéutica Mexicana, consisten en la obtención de productos que reúnan las especificaciones establecidas por la literatura oficial (Farmacopeas), el desarrollo de nuevas formas de purificación que garanticen su estabilidad y la aplicación de técnicas analíticas que permitan la valoración cualitativa y cuantitativa de dichos productos. Sin embargo, aunque la tecnología relacionada con éstos campos ha avanzado considerablemente, en la actualidad existen productos de importancia que no han sido totalmente dominados; como es el caso de la Vitamina B<sub>12</sub>, que aunque en su purificación es obtenida de gran pureza, se descompone con facilidad por los efectos que sobre ella ejercen la luz, la temperatura y la presencia de algunas impurezas coloridas (ácidos rojos y otras).

Existen varias sales de la Vitamina B<sub>12</sub> (1,2,3,4,5) entre las cuales, la que presenta mayor retención en el organismo, es el Acetato de Hidroxocobalamina<sup>(5)</sup>. Se ha observado experimentalmente que esta sal de Vitamina B<sub>12</sub> es de las que más fácilmente se degradan y a la vez, es de las más afectadas por la presencia de las impurezas ya mencionadas, por lo que fué seleccionada para el presente trabajo.

La presencia de dichas impurezas coloridas, puede deberse al paso de la Cianocobalamina (otra forma de Vitamina B<sub>12</sub>), al

Acetato de Hidroxocobalamina, o bien pueden estar presentes desde la Cianocobalamina de que se parti6.

## OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

1.- La aplicación de la Cromatografía en Capa Fina, para la separación de las impurezas coloridas presentes en el Acetato de Hidroxocobalamina (y otras sales de Vitamina B<sub>12</sub>), como un método confiable y reproducible, con un mínimo de tiempo y costo.

2.- La elución y cuantificación de las impurezas coloridas, por los métodos más convenientes, ya sea que se encuentran reportados en la literatura o se definan por experimentación.

3.- La evaluación de la confiabilidad y reproducibilidad - del método de separación y cuantificación que se esta proponiendo en relación al método ya reportado.

## PARTE TEORICA

En los últimos años, la separación de impurezas coloridas del Acetato de Hidroxocobalamina, ha sido desarrollada por métodos cromatográficos en papel. El método consta de una cromatografía descendente en papel, y se presenta a continuación.

SEPARACION Y VALORACION DE IMPUREZAS COLORIDAS POR CROMATOGRAFIA EN PAPEL (2,3,8)

A) DESCRIPCION DEL METODO.- Las impurezas coloridas del Acetato de Hidroxocobalamina, se considera que son ácidos rojos y otras cobalaminas, las cuales son resultado de la transformación de Cianocobalamina a Hidroxocobalamina, aunque se ha encontrado que dichas impurezas también pueden estar presentes en la Cianocobalamina de la que se partió para la transformación. El método consta de una cromatografía descendente en papel, seguida de una elución y valoración espectrofotométrica de las bandas de impurezas coloridas que presentan mayor o menor polaridad que la banda principal.

B) PREPARACION DEL PAPEL CROMATOGRAFICO.- Usar papel cromatográfico Whatman No. 1 de 19 cm. de ancho por 55 cm. de largo, dibujar con lápiz una línea tenue que sirva de guía para aplicar una banda a 8.5 cm. del origen, dejando 1.5 cm. de cada

lado. Marcar otra línea igual a la anterior a 36.6 cm. del origen (2 terceras partes de la longitud de la hoja) que servira como límite a donde deberá llegar la banda principal del cromatograma.

C) PREPARACION DE LOS ELUYENTES CROMATOGRAFICOS.- (Fase móvil y fase estacionaria) mezclar por agitación durante 10 min., 500 ml. de agua destilada y deionizada con 500 ml. de alcohol sec-butílico; dejar reposar 15 horas a temperatura ambiente y la solución resultante, utilizarla de la manera siguiente:

a) La fase inferior (acuosa) adicionada de 1% (v/v) - de Acido Acético Glacial y 5 ml. de solución acuosa de KCN al 10%, se usa como fase estacionaria vertiéndola en la cuba cromatográfica.

b) La fase superior (sec-butanol) adicionada de un 1% (v/v) de sec-butanol, se usa como fase móvil vertiéndola en las na ves cromatográficas.

D) PREPARACION DE LA RESINA DE INTERCAMBIO IONICO.- (debilmente ácida) La resina a utilizarse es la IRC-50 forma ácida o bien su equivalente de la casa Merck que es el cambiador de cationes debilmente ácido (cambiador de iones IV).

Pesar 1 g. de la resina, pasarla a un vaso de precipitado de 10 ml. y agregar aproximadamente 10 ml. de agua destilada y deionizada; agitar con una espátula hasta que la resina se deposite en el fondo del vaso, dejarla activar en el agua un mínimo de 8

horas; pasar la resina a una pequeña columna cromatográfica o a una bureta y lavar con agua destilada y deionizada hasta que la solución eluyente tenga un pH neutro, pasar la resina a un vaso de 10 ml. decantar el agua y secar lo mejor posible con papel filtro, agregar 5 ml. de solución de KCN al 1% en agua, dejar en contacto durante 5 min. ( no más de los 5 min.). Para asegurarse que la transformación de KCN a HNC ha sido completa, decantar la solución pasándola a un vaso de 5ml. y guardarla para la transformación de Hidroxocobalamina a Cianocobalamina o de ésta a Dicianocobalamina.

E) PREPARACION DE LA MUESTRA POR ANALIZAR.- Pesar 50 mg. de la muestra (Acetato de Hidroxocobalamina) y pasarlos a un matraz aforado de 5 ml.; disolver con 4 ml. de agua destilada y deionizada, agregar 1 ml. de solución de HCN recientemente preparada ( no deberá usarse solución de más de 6 horas, dada la inestabilidad del HCN) dicha solución es la obtenida, mediante la resina de intercambio iónico; una vez aforada la solución a 5 ml. se deja reposar durante 15 min., agitando de vez en vez y pasando éste tiempo tomar una o dos gotas de la solución problema, diluyéndolas con agua destilada y deionizada, ver al espectrofotómetro si presenta esta solución un  $\lambda$  max. a 361 nm. usando como blanco agua destilada y deionizada, - para asegurarse que la transformación a Cianocobalamina sea completa. En caso de no presentar un  $\lambda$  máx. a 361nm., significa que al - gún paso previo no estuvo bien hecho y se tendrá que comenzar de nuevo.

F) APLICACION DE LA MUESTRA.- Aplicar una banda de la solución problema, valiéndose de una microjeringa de 50  $\mu$ l., 500  $\mu$ l. equivalentes a 0.005 g. del producto; iniciar con tres aplicaciones sucesivas, dejando secar para evitar que la banda sea demasiado gruesa, hacer otras tres aplicaciones de 50  $\mu$ l. cada una, dejar secar y efectuar tres aplicaciones más y antes de que seque por completo hacer la décima y última aplicación, dejar secar completamente y hacer un doblez a todo lo ancho del papel cromatográfico y exactamente a la mitad del origen del cromatograma y la banda de aplicación (4.25 cm.), meter a saturar el cromatograma con los vapores de la fase estacionaria, un mínimo de 4 horas al cabo de los cuales se vierte la fase móvil en las naves cromatográficas, y se introduce el extremo superior del cromatograma en la fase móvil, pisando el papel con una varilla de vidrio para evitar que caiga con el peso del solvente; se deja correr el cromatograma hasta que la banda principal haya alcanzado 2/3 partes de la longitud de la hoja, (esto tarda aproximadamente 72 horas dependiendo del tiempo de saturación) sacar el cromatograma de la cuba, secar a temperatura ambiente y proceder a valorar las impurezas coloridas.

G) ELUCION DE LAS BANDAS DE IMPUREZAS COLORIDAS.- Cortar con tijeras las bandas coloreadas que se encuentren hacia arriba o hacia abajo de la banda principal. Colocar los extremos de las bandas cortadas sobre una caja Petri que contenga un papel circular (papel filtro) embebido en agua; combinar los eluidos, aforar a 25 ml. con



agua y leer a una  $\lambda$  de 361 nm. la absorbancia de la muestra usando agua como blanco.

CALCULOS:

$$\% \text{ de impurezas coloridas} = \frac{A}{E} \frac{X}{X} \frac{25}{P} \frac{X}{(100-h)}$$

DONDE:

A = Absorbancia de las impurezas coloridas leídas a 361 nm.

25 = Aforo

E = 207 (  $E_{1 \text{ cm}}^{1\%}$  de Cianocobalamina)

P = Peso de la muestra aplicada en el cromatograma (0.005) expresada en gramos.

(100-h) = Pureza del producto analizado menos la humedad.

$$\text{Ejem. } h = 12\% \qquad 100-h = 88$$

El método mencionado anteriormente, da resultados aceptables, pero presenta varias desventajas, entre las que se encuentran: el emplear mucho tiempo y el ser poco económico; por lo que se buscó un método de separación de las impurezas mencionadas que fuera tan confiable, reproducible y más práctico y económico al ya existente.

Entre los métodos de separación a escoger se vieron los siguientes:

A) Cromatografía de Gases.- Método muy exacto pero de costos muy elevados, por no contar con un cromatógrafo de gases en todos los laboratorios.

B) Cromatografía en Columna.- El método de cromatografía en columna, es empleado en la producción del Acetato de Hidroxocobalamina, en el momento de ser purificada, pero algunas impurezas no son retenidas por la columna, lo que se ha visto experimentalmente, y se penso que este método no sería el más conveniente.

C) Cromatografía en Capa Fina<sup>(5,9)</sup>.- El método de cromatografía en capa fina presenta varias ventajas, por ser de fácil manejo y usar un equipo sencillo que puede ser obtenido con facilidad.

D) Distribución y contracorriente<sup>(5)</sup>.- Este método da la separación de cobalaminas de otras moléculas que no lo sean, por lo que se considera que los resultados obtenidos no serían satisfactorios, debido a que las impurezas a las que nos referimos, presentan el color característico de las cobalaminas, y por lo tanto estas deben seguir siendo cobalaminas.

De los métodos anteriormente citados, se puede ver que el más conveniente para nuestros fines es el de cromatografía en capa fina, por lo que se uso en el presente trabajo.

Para la evaluación de las impurezas coloridas del Acetato de Hidroxocobalamina ya separadas, se seleccionó el método reportado en la separación de impurezas coloridas por cromatografía en papel, o sea el método espectrofotométrico,<sup>(1,2,3,5,6,7,8)</sup> pero también se puede escoger, algunos de los siguientes métodos:

1.- Determinación Espectrofotométrica de Hidroxocobalamina.-<sup>(10)</sup> Este método se basa en la determinación de la absorbancia que presenta una solución del producto a un  $\lambda$  máx. de 351nm. y calculando su  $E_{1\text{cm.}}^{1\%}$ , para el Acetato de Hidroxocobalamina el valor reportado de  $E_{1\text{cm.}}^{1\%}$  es de 187, y para el Clorhidrato de Hidroxocobalamina el  $E_{1\text{cm.}}^{1\%}$  es de 190 (estas sales de Hidroxocobalamina son las más comunes y leen a una misma longitud de onda). La muestra problema se purifica por cromatografía cuando hay impurezas presentes. La curva de absorbancia obtenida por este tipo de valoración o determinación se puede observar en la figura 1

2.- Determinación Espectrofotométrica en forma de Cianocobalamina.-<sup>(11)</sup> La Hidroxocobalamina es transformada a Cianocobalamina mediante un tratamiento con KCN y se determina su absorbancia a un  $\lambda$  máx. de 361nm., se tiene un  $E_{1\text{cm.}}^{1\%}$  de 207 para la Cianocobalamina.

3.- Análisis Espectrofotométrico Diciánico.-<sup>(12)</sup> Este método está basado en la diferencia que hay entre el espectro visible de la Vitamina  $B_{12}$ , y el espectro de los complejos diciánicos formados en solución en exceso de ion cianuro a un  $\lambda$  máx. de 582nm. El complejo vitamínico  $B_{12}$  diciánico se extrae con alcohol bencílico, el cual elimina más del 90% de absorbancias extrañas y solo extrae un octavo de la concentración de Vitamina  $B_{12}$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1.- Determinación Espectrofotométrica de Hidroxocobalamina.-<sup>(10)</sup> Este método se basa en la determinación de la absorbancia que presenta una solución del producto a un  $\lambda$  máx. de 351nm. y calculando su  $E_{1\text{cm.}}^{1\%}$ , para el Acetato de Hidroxocobalamina el valor reportado de  $E_{1\text{cm.}}^{1\%}$  es de 187, y para el Clorhidrato de Hidroxocobalamina el  $E_{1\text{cm.}}^{1\%}$  es de 190 (estas sales de Hidroxocobalamina son las más comunes y leen a una misma longitud de onda). La muestra problema se purifica por cromatografía cuando hay impurezas presentes. La curva de absorbancia obtenida por este tipo de valoración o determinación se puede observar en la figura 1

2.- Determinación Espectrofotométrica en forma de Cianocobalamina.-<sup>(11)</sup> La Hidroxocobalamina es transformada a Cianocobalamina mediante un tratamiento con KCN y se determina su absorbancia a un  $\lambda$  máx. de 361nm., se tiene un  $E_{1\text{cm.}}^{1\%}$  de 207 para la Cianocobalamina.

3.- Análisis Espectrofotométrico Dicianico.-<sup>(12)</sup> Este método está basado en la diferencia que hay entre el espectro visible de la Vitamina  $B_{12}$ , y el espectro de los complejos dicianicos formados en solución en exceso de ion cianuro a un  $\lambda$  máx. de 582nm. El complejo vitamínico  $B_{12}$  dicianico se extrae con alcohol bencílico, el cual elimina más del 90% de absorbancias extrañas y solo extrae un octavo de la concentración de Vitamina  $B_{12}$ .

4.- Determinación Colorimétrica con Sal de Nitroso R.- (13,

14) El método implica la oxidación del producto a analizar con Peróxido de Hidrógeno, y la solución resultante es tratada con Sal de Nitroso-R (1-Nitroso-2-Naftol 3:6 Sulfato Disódico) a un pH conveniente. El color rojo naranja que se obtiene presenta un  $\lambda$  máx. a 420nm. y sigue la Ley de Beer, a una concentración de 100 a 600  $\mu$ g/ml. de Vitamina B<sub>12</sub>.

5.- Determinación por Espectroscopía de Absorción Atómica

(15) El método consiste en la disolución del Acetato de Hidroxocobalamina, y la subsecuente determinación del cobalto acomplejado mediante espectroscopía de absorción atómica; este método tiene el inconveniente de requerir de un equipo muy complejo y de alto costo que no en todos los laboratorios se encuentra.

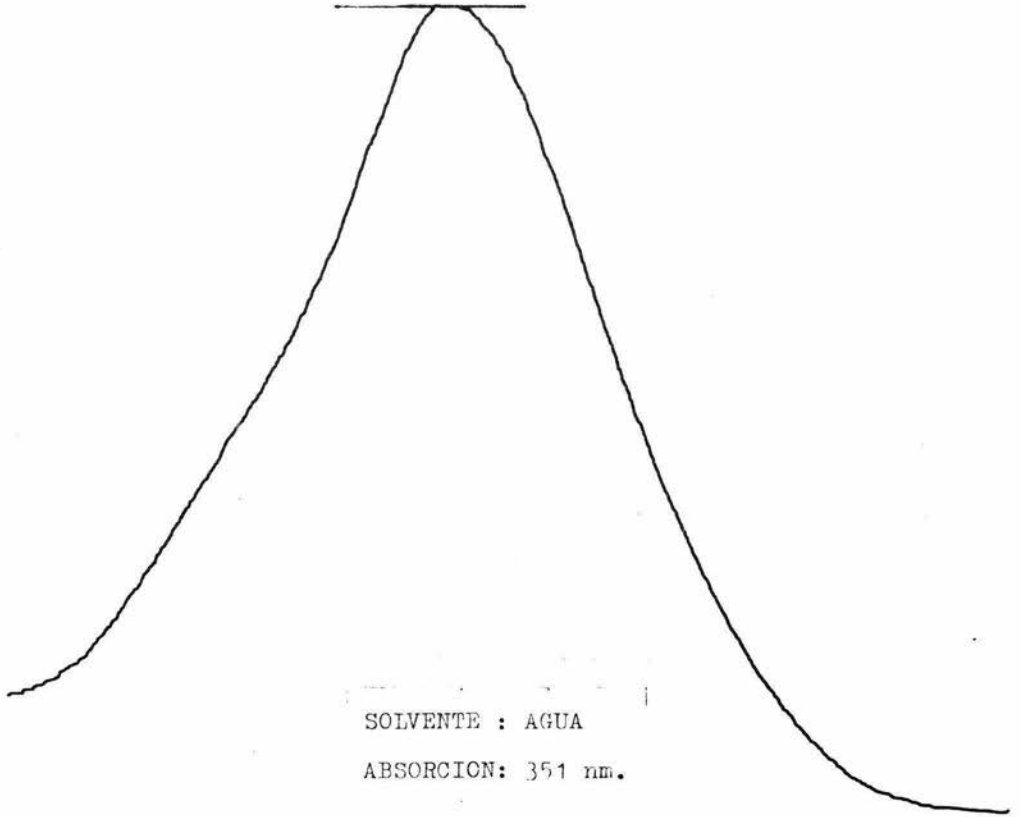
6.- Análisis de trazas radioactivas.- (16)

Este método consiste en el uso de una muestra de Acetato de Hidroxocobalamina marcada con cobalto radioactivo, para la determinación en mezclas complejas y cápsulas del Acetato de Hidroxocobalamina.

7.- Determinación mediante titulación radiométrica acomplejante.- (17,18)

El cobalto del Acetato de Hidroxocobalamina es liberado mediante la descomposición con oxono (O<sub>3</sub>), el tiempo óptimo de ozonólisis es de una hora, los iones de cobalto 3+ liberados son marcados con <sup>60</sup>Co y atrapados por un intercambiador de cationes, su actividad es medida y son puestos en contacto con una cantidad equi

Figura 1



valente de solución de E.D.T.A., la cual acompleja con cantidad -  
proporcional de Co absorbido en el intercambio de cationes. La ac-  
tividad intercambiadora de cationes o catiónica es medida nuevamente  
te, de la diferencia obtenida de los valores de actividad de interca  
cambio iónico, se prepara una curva de calibración, la cual debe -  
ser lineal y obedecer la ecuación general de la línea recta  $y = a$   
 $+ bx$ .

## PARTE EXPERIMENTAL

1.- MATERIAL Y EQUIPOMATERIAL1.1) Reactivos:

Acetato de Hidroxocobalamina, Productos Químicos Finos, S.A.  
Lote Hxo Ac 1/77.

Resina intercambiadora de iones IV debilmente ácida, Merck  
artículo 4835.

Sílica gel HF<sub>254</sub> (tipo 60) para cromatografía en capa fina,  
Merck artículo 7739.

Acido acético glacial, Baker artículo 9507.

Acetato de sodio, cristales, Baker artículo 3460.

Cianuro de Potasio, Productos Químicos Monterrey, catálogo  
1984, lote 4071.

1.2) Material de Laboratorio:

## a) De Vidrio

Microjeringa de 50  $\mu$ l., Hamilton

Cubas para cromatografía en papel y en capa fina.

Placas de vidrio poroso, Pyrex No. 36060 poro 10-15  $\mu$   
y poro 40-60  $\mu$

Material de vidrio para uso común de laboratorio, como  
son: matraces aforado, erlenmeyer y Kitasato, pipetas



graduadas y aforadas, vasos de precipitado, etc.

b) Otros Materiales

Cromatoplasmas de Silica Gel 60/tierras Sílica f<sub>254</sub>  
para cromatografía en capa fina 20 x 20 cms. con espesor de 0.2mm.

Prefiltros de membrana, Sartorius.

Papel Cromatográfico, Whatman No. 1

1.3) Solventes

Metanol absoluto bajo en acetona 99.8% de pureza, Baker  
Artículo 9070,

Agua bidestilada y deionizada.

EQUIPO

Estufa de Vacío, Thelco Modelo 19

Espectrofotómetro Beckman DB-GT con graficador Beckman  
Parrilla con agitación, Type 1000 Thermolyne

Balanza analítica, Sauter modelo 414

Lámpara universal de luz ultravioleta, Camag.

Aplicador de sílica gel en placas de vidrio, Camag.

2.- DESARROLLO

Los primeros estudios que se hicieron para la separación de las impurezas coloridas del Acetato de Hidroxocobalamina por cromatografía en capa fina, fueron realizados en placas de microcelulosa, para las que se emplearon diferentes sistemas de eluyentes, pe-

ro ninguno de estos dió resultados satisfactorios, y el Acetato de Hidroxocobalamina transformado a Cianocobalamina no presentó separación de impurezas en ningun caso, (la transformación del Acetato de Hidroxocobalamina a Cianocobalamina, es efectuada, ya que el Acetato de Hidroxocobalamina sin transformar no se separa en ningun momento de sus impurezas por difundirse en exceso en la cromatografía, ya sea en papel o en placa fina) solo se obtuvo una gran mancha extendida por toda la cromatoplaca. Los resultados anteriores hicieron pensar en otro tipo de fase estacionaria, por lo que fué seleccionada la sílica gel HF<sub>254</sub> para llevar a cabo la separación de impurezas coloridas.

Antes de hacer en el Laboratorio placas de sílica gel, la solución problema fué aplicada en cromatoplacas ya preparadas, con un espesor de 0.2mm. para probar los diferentes sistemas de eluyentes; el primer sistema empleado, fué el de agua saturada con sec-butanol y un 1% de ácido acético glacial (sistema de cromatografía en papel) pero no hubo separación de impurezas coloridas. La experiencia anterior sirvió para buscar los eluyentes apropiados a esta cromatografía, se encontró reportado el sistema de metanol/agua 95:5 para la separación de Hidroxocobalamina y Cianocobalamina,<sup>(9)</sup> y se uso para ver resultados, este sistema dió una satisfactoria separación de impurezas coloridas en las placas ya preparadas, pero debido a que estas placas son delgadas y dificiles de eluir, se procedió a hacer placas de sílica gel más gruesas y de fácil elución. Las placas anteriormente desarrolladas se observaron

bajo luz ultravioleta, a las longitudes de onda de 254 y 366nm. para observar si existía otro tipo de impurezas en el Acetato de Hidroxocobalamina, observación que resulto negativa.

Para hacer las placas de sílica gel en el laboratorio, se probaron diferentes espesores, el de 0.3mm. y el de 0.5mm. con el sistema antes citado, el que mejores resultados dió, fué el de 0.5mm., pero no se lograba una separación completamente satisfactoria, por lo que se analizó una variante del sistema, la cual fué: metanol/agua 93:7, obteniéndose una separación de impurezas aceptable, con el inconveniente de tener una gran retención de la muestra en el origen de la placa, se pensó en un sistema ligeramente más polar, adicionando un mililitro más de agua a la variante anterior, quedando metanol/ agua 93:8, lo cual solucionó el problema dando una buena separación de las impurezas coloridas.

Ya obtenida la separación de las impurezas coloridas del Acetato de Hidroxocobalamina, se vió que la elución de estas impurezas de la sílica gel, no era muy buena con agua, debido a que la sílica gel las retiene fuertemente, por lo tanto se buscó un eluyente, para lo que se vieron algunas características generales del Acetato de Hidroxocobalamina, que son: Fórmula condensada:

$C_{62}H_{89}O_{15}N_{13}PCo:CH_3COOH$ , peso molecular 1406, polvo cristalino rojo obscuro, inodoro e higroscópico, sensible al calor y a la luz solar, estable en soluciones ácidas e inestable en soluciones alcalinas.

El hecho de ser estable en soluciones ácidas, hizo pensar en una solución amortiguadora de pH ácido, encontrándose la solución amortiguadora de acetatos cuyo pH es de 4.5, se probó la elución de impurezas con esta solución y los resultados fueron completamente satisfactorios, por lo que fué usada como eluyente, y también en la valoración de las impurezas coloridas, por no presentar ninguna alteración en la absorbancia de las mismas.

A continuación presentamos el método de separación de impurezas coloridas del Acetato de Hidroxocobalamina que está en estudio en el presente trabajo.

SEPARACION Y VALORACION DE IMPUREZAS COLORIDAS DEL  
ACETATO DE HIDROXOCOBALAMINA POR  
CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

A) PREPARACION DE LAS PLACAS CROMATOGRAFICAS.- Usar sílica gel HF<sub>254</sub> (tipo 60) para cromatografía en capa fina. Para 5 placas; pesar 50 g. de sílica gel y agregar 115 ml. de agua bidestilada y deionizada, agitar hasta que la suspensión sea homogénea, colocar la suspensión en un aplicador de sílica gel, al cual previamente se le han colocado vidrios de 20 x 20 cms., los cuales deben estar perfectamente limpios y desengrasados. Las placas se deben hacer de 0.5mm. de espesor. Ya hechas las placas de sílica gel, se introducen en una estufa a aproximadamente 200°C de 2 a 4 horas con el fin de -

activar la sílica, pasado el tiempo de activación, las placas se sacan para ser empleadas en el momento o posteriormente. Ya frías las placas se pueden guardar por un tiempo aproximado de tres meses al abrigo del aire, para evitar que se hidrate la sílica gel.

B) PREPARACION DE LAS CUBAS CROMATOGRAFICAS.- Para el mejor desarrollo de las cromatoplasmas, se recomienda poner el sistema a emplear (metanol/agua 93:8) en las cubas cromatográficas, aproximadamente media hora antes de ser introducidas las cromatoplasmas anteriormente aplicadas y secas para efectos de ser desarrolladas. Lo anterior es con el objeto de saturar de vapores el interior de la cuba.

C) PREPARACION DE LA RESINA DE INTERCAMBIO IONICO.- Usar resina intercambiadora de iones IV debilmente ácida. Poner un gramo de resina en un vaso de precipitado de 10 ó 15 ml. y agregarle 10ml de agua bidestilada y deionizada, agitando con una espátula hasta que la resina se deposite en el fondo del vaso; dejar activar la resina un mínimo de 8 horas; pasarla a una pequeña columna cromatográfica o a una bureta y lavar con agua bidestilada y deionizada hasta que la solución efluente tenga un pH de 7, pasar la resina a un vaso de precipitado de 10 ó 15 ml., decantar el agua y secar la resina lo mejor posible con papel filtro; agregar 5 ml. de KCN al 1% en solución acuosa, dejar en contacto durante 5 min. (no más de los 5 min.), filtrar o decantar la solución a un vaso de precipitado o

a un tubo de ensaye, guardarla para ser usada más adelante.

D) PREPARACION DE LA MUESTRA POR ANALIZAR.- Pesar 50 mg. de la muestra (Acetato de Hidroxocobalamina) y pasarlos a un matraz aforado de 5ml. disolver con 4ml. de agua bidestilada y deionizada y agregar 1ml. de la solución de HCN, que se preparó anteriormente con la resina de intercambio iónico (ésta solución no debe usarse con más de 6 horas de preparada, por la inestabilidad del HCN). Una vez aforada la muestra a 5ml., dejar reposar de 15 a 30 min. agitando de vez en vez; después de este tiempo tomar una gota de la solución y pasarla a una celda del espectrofotómetro, diluyendo con aproximadamente 3ml. de agua destilada y deionizada, ver si presenta un  $\lambda$  max. a 361nm. en el espectrofotómetros, para asegurar que la transformación a Cianocobalamina ha sido completa. En el caso de no presentar la muestra un  $\lambda$  max. a 361nm. indica que algún paso previo no estuvo bien hecho y se debe empezar de nuevo.

E) APLICACION DE LA MUESTRA.- Con una microjeringa de 50  $\mu$ l., aplicar en banda y por goteo, un volúmen de 500  $\mu$ l., equivalente a 0.005 g. del producto. La aplicación debe ser a 3 cm. de uno de los lados de la cromatoplaaca y guiándose sólo por marcas puestas a las orillas de la placa; la sílica gel no debe marcarse por ser muy delicada y se puede desprender muy facilmente del vidrio. Ya aplicada la muestra, se deja secar completamente, y se introduce la cromatoplaaca a la cuba cromatográfica previamente saturada; se deja desa-

rollar la cromatoplaaca hasta que los solventes lleguen al final de ésta, la cual se saca de la cuba cromatográfica dejándola secar a temperatura ambiente, y se procede a valorar las impurezas.

F) ELUCION Y VALORACION DE LAS IMPUREZAS COLORIDAS. - Raspar las bandas coloridas que se encuentren hacia arriba o hacia abajo de la banda principal, colocar la sílica raspada en un vaso de precipitado de aproximadamente 30 ml. y adicional 10 ml. de solución amortiguadora de pH 4.5 (a 600 ml. de ácido acético 0.2N agregar 400 ml. de solución 0.2N de acetato de sodio). Esta solución es usada para lograr una elución de impurezas coloridas más completa, ya que la sílica gel retiene fuertemente el producto impidiendo su total elución con agua; a continuación el vaso se pone en agitación con leve calentamiento (no más de 40°C) por aproximadamente 30 min., al cabo de los cuales se pasa por un filtro de vidrio poroso con poro de 10-15 ó 40-60  $\mu$ . usando prefiltros de membrana, en el caso del poro 10-15  $\mu$ . para evitar que el poro se tape con la sílica gel y en el caso del poro 40-60  $\mu$ . es usado para que la sílica gel no pase a través del filtro; si la sílica no ha quedado blanca se regresa al vaso y se adiciona 5ml. más de solución amortiguadora de pH 4.5, se agita nuevamente calentando por otros 30 min., se vuelve a filtrar, la sílica se puede volver a lavar otras dos veces si no ha quedado blanca; ya blanca la sílica se reúnen todos los filtrados y se depositan en un matraz aforado de 25 ml., se afora con solución amortiguadora de pH 4.5 y esta solución se lleva al espectrofotóme -

tro, se lee la absorbancia a una  $\lambda$  de 361 nm. usando como blanco la misma solución amortiguadora.

CALCULOS:

$$\% \text{ de impurezas coloridas} = \frac{A}{E} \frac{X}{X} \frac{25}{P} \frac{X}{(100-h)} \frac{100}{1}$$

Donde:

A = Absorbancia de la impurezas coloridas leídas a 361 nm.

25 = Aforo

E = 207 ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  de Cianocobalamina)

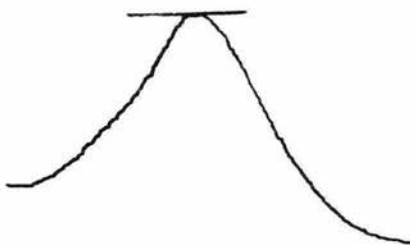
P = Peso de la muestra aplicada, expresada en gramos

100-h = Pureza del producto analizado menos su humedad

El tipo de gráfica obtenido en esta valoración es el siguiente:

(Figura 2)

Figura 2





## ANALISIS ESTADISTICO

1.- FORMULAS Y ABREVIATURASFORMULAS:

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n}$$

$$V = \frac{\sum (\bar{X} - X)^2}{n - 1}$$

$$S = \pm \sqrt{\frac{\sum (\bar{X} - X)^2}{n - 1}}$$

$$e = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

ABREVIATURAS:

X = Muestra

n = Número de muestras

$\bar{X}$  = Media

n - 1 = Número de grados de libertad


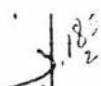

V = Varianza

S = Desviación estándar

e = Error estándar

## 2.- ANALISIS Y RESULTADOS

Teniendo en cuenta que el método que se propone en este trabajo debe ser confiable y reproducible, se realizó un estudio estadístico, el que se llevo a cabo de la siguiente manera: se tomó una muestra del lote del producto a analizar (Acetato de Hidroxocobalamina) con una humedad de 11.57% y una pureza de 95.22% (este lote se encuentra abajo del límite de aceptación que permiten las Farmacopeas, que es de un mínimo de 96% de pureza en base seca, pero fue elegido para el presente trabajo por tener un alto contenido de impurezas coloridas, lo cual nos permitira observar más claramente la variación del método, así como su reproducibilidad y confiabilidad), se realizó el análisis un mínimo de 20 ocasiones, en donde los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- 1.- 
- $$\frac{0.182 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 5.50\%$$
- 2.- 
- $$\frac{0.185 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 5.59\%$$
- 3.- 
- $$\frac{0.152 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 4.59\%$$

4.-



$$\frac{0.161 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 4.86\%$$

5.-



$$\frac{0.160 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 4.83\%$$

6.-



$$\frac{0.180 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 5.44\%$$

7.-



$$\frac{0.150 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 4.53\%$$

8.-



$$\frac{0.162 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 4.89\%$$

9.-



$$\frac{0.185 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 5.59\%$$

10.-












$$\frac{0.195 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 5.89\%$$

11.-



$$\frac{0.168 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 5.07\%$$

- 12.-  
$$\frac{0.170 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 5.14\%$$
- 13.-  
$$\frac{0.175 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 5.29\%$$
- 14.-  
$$\frac{0.165 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 4.98\%$$
- 15.-  
$$\frac{0.150 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 4.53\%$$
- 16.-  
$$\frac{0.180 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 5.44\%$$
- 17.-  
$$\frac{0.198 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 5.98\%$$
- 18.-  
$$\frac{0.160 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 4.83\%$$
- 19.-  
$$\frac{0.185 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 5.65\%$$
- 20.-  
$$\frac{0.200 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 6.04\%$$


En donde:


$$\bar{X} = 5.23$$


$$V = 0.2264$$


$$S = \pm 0.4758$$

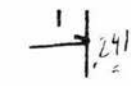
Considerando que ya existe otro método reportado para la separación y valoración de impurezas coloridas de Vitamina B<sub>12</sub> (Acetato de Hidroxocobalamina), se hizo un estudio comparativo de reproducibilidad entre ambos métodos, para lo que se analiza la misma muestra con el método en estudio y el ya reportado o sea por cromatografía en papel, en cuyo caso también se hizo en 20 ocasiones, donde los resultados obtenidos fueron:


1.-  
$$\frac{0.253 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 7.64\%$$

2.-  
$$\frac{0.240 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 7.25\%$$

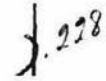
3.-  
$$\frac{0.230 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 6.95\%$$

4.-  
$$\frac{0.240 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 7.25\%$$


5.-  
$$\frac{0.241 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 7.28\%$$

6.- 


$$\frac{0.222 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 6.71\%$$

7.- 


$$\frac{0.228 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 6.98\%$$

8.- 


$$\frac{0.255 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 7.71\%$$

9.- 


$$\frac{0.204 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 6.16\%$$

10.- 


$$\frac{0.240 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 7.25\%$$

11.- 


$$\frac{0.238 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 7.19\%$$

12.- 


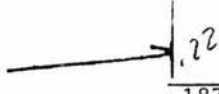




$$\frac{0.212 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 6.41\%$$

13.- 

$$\frac{0.258 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 7.80\%$$

14.- 

$$\frac{0.215 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 6.50\%$$

- 15.-  
$$\frac{0.210 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 6.34\%$$
- 16.-  
$$\frac{0.220 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 6.65\%$$
- 17.-  
$$\frac{0.248 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 7.49\%$$
- 18.-  
$$\frac{0.255 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 7.71\%$$
- 19.-  
$$\frac{0.225 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 6.80\%$$
- 20.-  
$$\frac{0.240 \times 25 \times 100}{187 \times 0.005 \times (100-11.57)} = 7.25\%$$

En donde:

$$\bar{X} = 7.06$$

$$V = 0.2414$$

$$S = \pm 0.4913$$

## RESUMIENDO:

<u>CAPA FINA</u>		<u>PAPEL</u>	
Abs	% de impurezas	Abs	% de impurezas
0.182	5.50	0.253	7.64
0.185	5.59	0.240	7.25
0.152	4.59	0.230	6.95
0.161	4.86	0.240	7.25
0.160	4.83	0.241	7.28
0.180	5.44	0.222	6.71
0.150	4.53	0.228	6.89
0.162	4.89	0.255	7.71
0.185	5.59	0.204	6.16
0.195	5.89	0.240	7.25
0.168	5.07	0.238	7.19
0.170	5.14	0.212	6.41
0.175	5.29	0.258	7.80
0.165	4.98	0.215	6.50
0.150	4.53	0.210	6.34
0.180	5.44	0.220	6.65
0.198	5.98	0.248	7.49
0.160	4.83	0.255	7.71
0.185	5.65	0.225	6.80
0.200	6.04	0.240	7.25
$\bar{X} = 5.23$		$\bar{X} = 7.06$	
$V = 0.2264$		$V = 0.2414$	
$S = \pm 0.4758$		$S = \pm 0.4913$	



Para llevar a cabo un estudio comparativo de reproducibilidad entre dos métodos, es necesario tener la relación existente entre las varianzas ( $V$ ) de ambos métodos, y de acuerdo al resultado obtenido se puede decir si la reproducibilidad de ambos métodos es similar. El estudio de la relación entre varianzas, se encuentra reportado en la literatura de las siguientes maneras: La llamada prueba de  $F^{(19)}$  o el teorema para encontrar la razón entre dos varianzas  $(20)$ , en ambos casos:

$$F = \frac{V_1}{V_2}, \text{ o mejor representado}$$

$$F_{(n_1-1) (n_2-1)} = \frac{V_1}{V_2}$$

En donde  $n_1-1$  es el número de grados de libertad de la muestra número 1 y  $n_2-1$  es el número de grados de libertad de la muestra número 2, que como se puede ver en el presente caso, los grados de libertad de las muestras 1 y 2, serán de 19, debido a que se cuenta con 20 análisis en cada caso.

Los resultados obtenidos para la prueba de  $F$  son:

$$F_{(19,19)} = \frac{V \text{ en Papel}}{V \text{ en Capa Fina}} = \frac{0.2424}{0.2264} = 1.0662$$

$$F = 1.0662$$

La probabilidad de encontrar el valor de  $F = 1.0662$  con 19 grados de libertad por casualidad es mayor del 10%, por lo que la diferencia observada entre las varianzas de ambos métodos, no es estadísticamente significativa, y por lo tanto ambos métodos son igualmente reproducibles.

Para saber si el método reportado para la separación de las impurezas estudiadas, y el método que se propone en el presente trabajo, son igualmente confiables, se debe calcular el valor del error estándar de ambos métodos, donde el error estándar es igual a la desviación estándar sobre la raíz cuadrada del número de ocasiones en que se verificó el análisis; los resultados obtenidos para ambos métodos fueron los siguientes:

Capa Fina

$$e = \frac{0.4758}{\sqrt{20}} = 0.1063$$

Papel

$$e = \frac{0.4913}{\sqrt{20}} = 0.1098$$

Por los resultados obtenidos, podemos ver que ambos métodos contienen un error estándar similares, por lo tanto podemos decir, que ambos métodos son similares en cuanto a su confiabilidad.

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos observar las diferencias existentes entre el método propuesto y el reportado en la literatura indicada, siendo básicamente el tipo de cromatografía que se emplea en cada caso, debido a que la muestra es preparada de igual manera, y que la valoración de impurezas coloridas es similar en ambos métodos.

Así mismo, podemos ver que las ventajas que presenta la cromatografía en capa fina, son:

- 1.- La ganancia en tiempo al efectuar el análisis.
- 2.- El requerimiento de un equipo de fácil manejo.
- 3.- El ser un método económico.

Con lo que se cumplen algunos objetivos del presente trabajo.

Si se toman en cuenta los resultados obtenidos en el análisis estadístico presentado en este trabajo, se puede ver que el método que se propone es tan confiable y reproducible como el método reportado en la literatura oficial.

El ahorro en tiempo y lo práctico del método presentado, al igual que el haber comprobado su reproducibilidad y confiabilidad con respecto al método ya reportado, nos lleva a la conclusión de ser

conveniente su uso, en los laboratorios que así lo requieran.

NOTA:

En el presente trabajo, se recomienda, a las personas que trabajen continuamente con sales de Vitamina B<sub>12</sub>, que las mantengan de preferencia en envases ambar y perfectamente cerrados, al igual - que si es posible a bajas temperaturas para evitar su más rápida degradación; tambien es recomendable el valorar el contenido de impurezas coloridas, periódicamente para ver en que tan buenas condiciones se esta almacenando la misma.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Farmacopea de los Estados Unidos XVIII,  
Marck Printing Co., Easton Pa., 1970
- 2) Farmacopea Oficial de la República Italiana  
Octava Edición, Volumen II  
Instituto Poligrafo del Estado  
Roma 1972
- 3) Farmacopea Británica  
Publicada por el Concilio Médico General  
London W.C.1.  
Londres 1968
- 4) Arthur F. Wagner. Ph. D. y Karl Folkers, Ph, D. Sc.  
Vitaminas y Coenzimas  
Capítulo X  
Publicaciones Intercientíficas. (1964)
- 5) Manzur-ul-Haquehashmi.  
John Wiley y Sans  
Ensayo de Vitaminas y Preparaciones Farmacéuticas  
1971
- 6) Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos  
Secretaría de Salubridad y Asistencia  
Dirección General de Control de Alimentos, Bebidas  
y Medicamentos.  
Cuarta Edición, México 1974

- 7) H. Cords and O.T. Ratycz,  
"La determinación cuantitativa de Cianocobalamina"  
Drug Standards, 27, 132 (1959)
- 8) Juan de Jesús Orduño León (tesis)  
Anteproyecto de Norma Oficial Mexicana para: Hidroxo  
cobalamina (base), Acetato de Hidroxocobalamina,  
Clorhidrato de Hidroxocobalamina, Yodoclorohidroxí -  
quinoleína y Diyodohidroxoquinoleína.  
México 1977
- 9) An Laboratory Handbook  
Thin-Layer, Cromatography  
Second Edition, 1969
- 10) E.L. Smith, J.L. Martin, R.J. Gregory and W.H.C.  
Shaw.  
"Standarización de Hidroxocobalamina"  
Analyst, 87, 183 (1962)
- 11) J.L. Martin and W.H.C. Shaw.  
"Hidroxocobalamina: su exámen y determinación en  
soluciones inyectables parenterales por cromatografía  
en papel".  
Analyst, 88, 292 (1963)
- 12) G.O. Rudkin and R.J. Taylor  
" Métodos químicos para determinación de Vitamina B<sub>12</sub>"  
Anal. Chem. 24, 1155 (1952)

- 13) R.K. Mitra, P.C. Bose, G.K. Ray and B. Mukerji  
"Un método colorimétrico para la determinación de  
Vitamina B<sub>12</sub> en preparaciones farmacéuticas"  
Indian J. Pharm., 24, 152 (1962)
- 14) D. Monnier and Y. Ghaliounghi.  
"Mediciones de trazas de Vitamina B<sub>12</sub>"  
Chimia (Switz), 16, 340 (1962)
- 15) D.G. Berge, R.T. Pflaum, D.A. Lehman and C.W. Frank,  
" Determinación indirecta de compuestos orgánicos  
por espectroscopia de absorción atómica. El estudio  
de Vitamina B<sub>12</sub> en dosis farmacéuticas"  
Anal. Letters, 1, 613 (1968)
- 16) F.A. Bacher, A.E. Boley and C.E. Shonk  
"Ensayo con trazas radioactivas para Vitamina B<sub>12</sub>  
y otras cobalaminas en compuestos mixtos"  
Anal., Chem., 26, 1146 (1964)
- 17) J. KONECNY, J. Tolgyessy and M. Sarsunova  
"Determinación Radiocomplejométrica de Cianocobalamina"  
Z. Anal. Chem., 232, 343 (1967)
- 18) J. Konecny and J. Tolgyessy  
" Determinación de Vitamina B<sub>12</sub> por titulación radio-  
métrica"  
Radiochem. Conf., Abstr. Papers Bratislava, 36 (1966)
- 19) Alvin E. Lewis  
Bioestadística  
Compañía Editorial Continental, S.A.  
México, 1969

- 20) Irwin Miller y John E. Freud  
Probabilidad y estadística para Ingenieros  
Editorial Reverté Mexicana, S.A.  
México, 1972