

UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA
Incorporada a la U.N.A.M.
ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

24

SEPARACION Y VALORACION CROMATOGRAFICA
DE VITAMINA B EN UNA SOLUCION INYECTABLE
12b

TESIS PARA OPTAR POR
EL TITULO DE
QUIMICO

MANUEL JESUS GARRIDO TOLEDO
México, 1965.

13304



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.

SEPARACION Y VALORACION CROMATOGRAFICA
DE VITAMINA B_{12b} EN UNA SOLUCION INYECTABLE.

MANUEL JESUS GARRIDO TOLEDO.

A mis padres Ing. Manuel J. Garrido C.
y Sofia Toledo de Garrido, con todo cariño,
respeto y agradecimiento.

A mis Hermanos.

Al Dr. Fernando Orozco D. por haberme dado la oportunidad de hacer esta Tesis en los Laboratorios Grossman.

A la Sra. Q.F.B. Araceli Sánchez de Corral por su ayuda, - de valor inapreciable ya que bajo su dirección se hizo posible la elaboración de esta Tesis.

A las Sritas.

Q.F.B. Guadalupe Acevedo E.
Q.F.B. Luz María Balderas V.
Q.F.B. Martha Enríquez .
Q.F.B. Rita Lavat.
Q.F.B. Angela Sotelo

Por haberme brindado su cooperación y ayuda durante el desarrollo de esta Tesis.

Capítulo I. - Historia, ocurrencia de la vitamina B₁₂, fuentes de producción, propiedades físico-químicas, -- usos clínicos, mecanismo de acción.

Capítulo II. - Métodos.

Capítulo III - Método propuesto

Capítulo IV. - Resultados

Capítulo V. - Conclusiones

Capítulo VI. - Bibliografía.

CAPITULO I

Un siglo de estudios clínicos y más de 25 años de investigaciones químicas y bioquímicas fueron necesarias para revelar los secretos de la vitamina B₁₂. A consecuencia de una conferencia dada el 15 de Marzo de 1849 -- ante la Sociedad Médica de Londres Sur (South London Medical Society) y titulada "Sobre la Enfermedad Anemia de las glándulas Suprarrenales" (On Anaemia Disease of the suprarenal capsules), ADDISON (1) adquirió la reputación de haber sido el primero en describir dos tipos de anemia: La enfermedad de Addison y la anemia de Addison. De todas formas, el término "Anemia Perniciosa" no fué introducido sino hasta el 6 de Noviembre de 1871 en ocasión de una conferencia dada por ANTON BIERMER, (1) director de la clínica de medicina interna de la Universidad de Zurich.

El 4 de Mayo de 1926, MINOT y MURPHY (1) anunciaron que la ingestión de preparados a base de hígado es eficaz en el tratamiento de la anemia perniciosa.

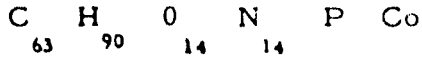
En el mismo tiempo, el químico COHN (1), miembro del grupo de investigación de la Universidad de Harvard, se interesó en este producto antianémico. Este en colaboración con el químico MINOT, se esforzaron en -- aislar del hígado el compuesto activo en el tratamiento de la anemia perniciososa. De 1927 data su primer reporte sobre un "Extracto de hígado activo".

A principios de 1948, con pocos días de intervalo, FOLKERS (1) y su equipo de Merck and Co. en los Estados Unidos y SMITH (i) de los Laboratorios Glaxo en Inglaterra, anunciaron que eran capaces de aislar en los extractos de hígado, una substancia roja dotada de una gran actividad en el tratamiento de la anemia perniciososa.

Fué así como el producto aislado de FOLKERS provocó una transformación espectacular sobre el estado de tres enfermedades provocadas por anemia perniciososa, con dosis únicas respectivamente de 150 gammas (150 -

milésimas de miligramo ó microgramos) 6 y 3 gammas .

La vitamina B₁₂ presenta una fórmula empírica:



La susceptibilidad magnética y el estudio polarográfico han demostrado que el ión cobalto está en forma trivalente.

No se encuentra en las plantas superiores, a la inversa de las otras vitaminas del complejo B; la vitamina B₁₂ solo es sintetizada por los microorganismos; los hongos inferiores principalmente. En el organismo humano -- por ejemplo, la vitamina B₁₂ es elaborada normalmente por la flora microbiana del intestino grueso .

La farmacopea de los Estados Unidos en su XVI revisión (1960) pág.186 da como fórmula empírica de la Cianocobalamina

$$\begin{array}{cccccc} \text{C} & \text{H} & \text{O} & \text{N} & \text{P} & \text{Co} \\ 63 & 88 & 14 & 14 & & \end{array}$$

El hígado y la sangre constituyen las principales reservas de vitamina B₁₂ en el hombre . Su aislamiento a partir del hígado es muy difícil: por tratamiento de 4 toneladas de hígado de res, extracción y cromatografía en sílice,

sólo se obtiene 1.0 gr. de vitamina B₁₂. Los investigadores de los Laboratorios Merck en los Estados Unidos, han anunciado que se puede aislar la vitamina B₁₂ a partir de caldos de cultivo de *Streptomyces griseus* (1) fuente utilizada en la producción de Streptomycin. Otros caldos de cultivo de antibióticos son igualmente utilizados para el fin expresado.

La fermentación constituye actualmente la fuente principal de esta vitamina y esto confirma la hipótesis de su origen microbiológico.

Para HARTMAN (1) la leche, la leche en polvo y el queso constituyen las fuentes normales de vitamina B₁₂; él declara igualmente que los productos tales como los granos, el aceite y la levadura pueden ser un suplemento de esta vitamina en caso de carencia. La vitamina B₁₂ está en forma de cristales de color rojo oscuro e hidratados:

ennegrece cerca de los 200°C y funde arriba de los 300°C; -
tiene un peso molecular de 1358 con un contenido aproxima-
do de 4.5% de cobalto. Esta molécula tiene una actividad -
óptica.

$$[\alpha]_D^{25} = -59 \frac{+}{-} 9$$

La titulación potenciométrica de la vita-
mina B₁₂ en solución de ácido acético glacial indica que se -
trata de una base débil. El espectro de absorción en ultra-
violeta da tres máximos:

$$\begin{aligned} \lambda_{\text{MAX}} 278 \text{ m}\mu & \quad E_{1\text{cm}}^{1\%} = .115 \\ \lambda_{\text{MAX}} 361 \text{ m}\mu & \quad E_{1\text{cm}}^{1\%} = .204 \\ \lambda_{\text{MAX}} 550 \text{ m}\mu & \quad E_{1\text{cm}}^{1\%} = .063 \end{aligned}$$

Este espectro no cambia sino débilmen-
te con las modificaciones de pH. En medio ácido se observa
en efecto hipocrómico aproximado del 10% para la λ 361.-
m μ

El espectro infrarojo da un número de -
bandas:

1275 cm.⁻¹ que es atribuido a una unión P-O

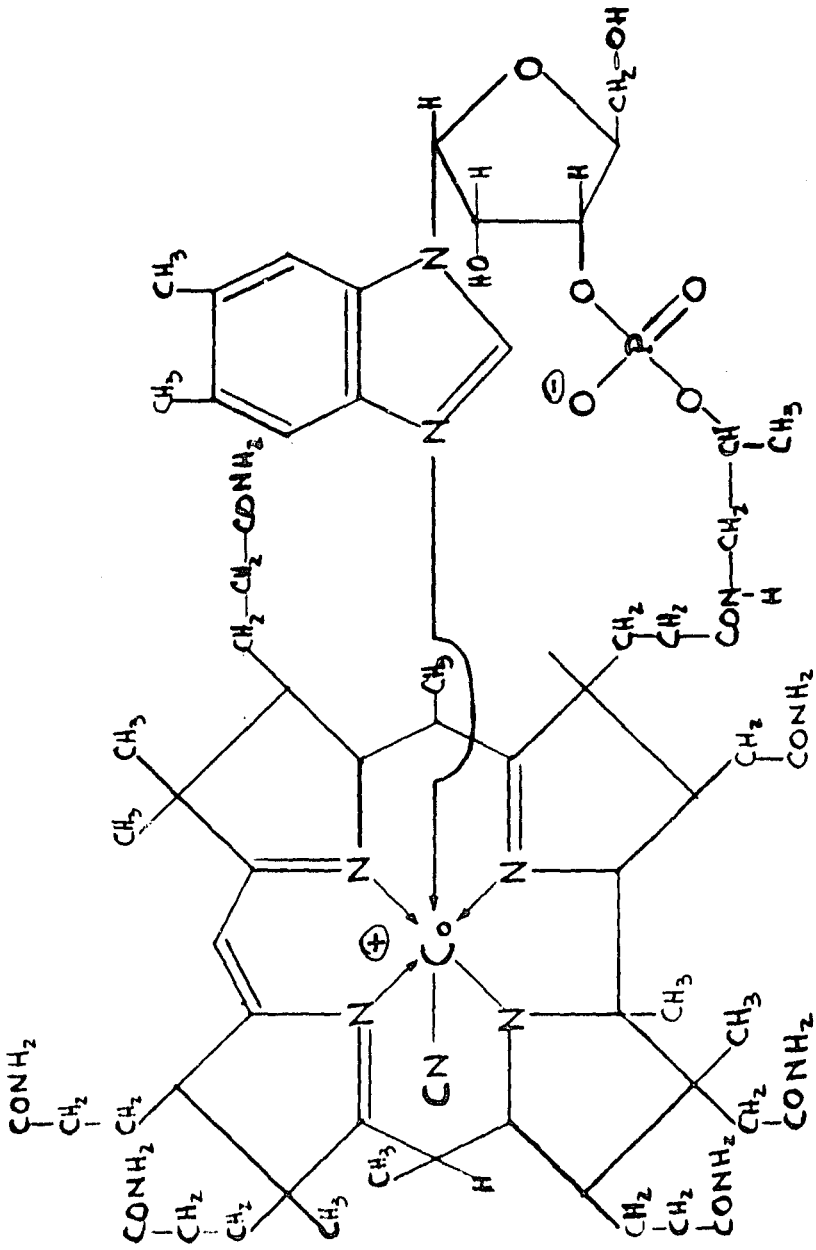
2132 cm.⁻¹ que es atribuido a una unión C≡N

3320 cm.^{-1} que es atribuido a una unión N-H

3600 cm.^{-1} " " " " " " 0-H

La vitamina B₁₂ se altera de manera importante por los oxidantes y reductores, así como por los metales pesados y el fenol. Una solución acuosa es estable al aire y a la luz en un pH entre 5 y 6. Es termoestable dentro de ciertos límites. Resiste un calentamiento en solución acuosa de 15 min. a 120°C y a un pH de 5.5 Sin embargo en medio 0.01N de ácido clorhídrico ó 0.015N de hidróxido de sodio la vitamina se destruye.

El grupo CN puede ser desplazado de la cianocobalamina de varios modos: por fotólisis ó por medio de agentes reductores que dan vitamina B₁₂ conteniendo cobalto divalente (o un producto más reducido) el cual rápidamente pasa a hidroxicobalamina por reoxidación aérea. En soluciones ácidas la hidroxicobalamina neutra toma un ión hidrógeno el cual convierte el hidroxilo en una molécula coordinada de agua.



Esta acuocobalamina es básica y da sales con los ácidos. Por lo que en solución existe un equilibrio - con la hidroxicobalamina y como es más estable en pH ácido los productos comerciales están principalmente en la forma de acuocobalamina. El término "hidroxicobalamina" que se ha establecido en la literatura médica es incorrecto porque su fórmula corresponde a la acuocobalamina; "vitamina B ^{12a}" y "vitamina B ^{12b}" son sinónimos de la misma substancia. También puede pasar a la "vitamina B ^{12c}", ó nitrocobalamina.

FUNCIONES BIOLÓGICAS.

1.- Factor de crecimiento.

Las proteínas animales contienen un factor de crecimiento ausente en las proteínas vegetales. Los - Laboratorios Lederle han podido demostrar que el principio antianémico pernicioso del hígado es el constituyente principal del principio proteínico animal.

Por otra parte, todo parece indicar que la vitamina B₁₂ juega un papel en el metabolismo de las proteínas y sobre todo en su síntesis. Indicaciones similares son estas en los trabajos de CHARKEY, DRILL y WILLIAMS (1). Estos autores afirman que la vitamina B₁₂ reduce la tasa de proteínas en la sangre. Así, la cantidad de arginina libre, lisina, metionina, triptofano, histidina, treonina y valina disminuye por la adición de esta vitamina a los alimentos. De este hecho, la vitamina B₁₂ parece jugar un papel en el metabolismo y consiste en el aumento de la utilización de los aminoácidos para la elaboración de tejidos. Los autores han comprobado que los pollos a los que se les administra esta vitamina se desarrollan más rápidamente. Parece asimismo que esta vitamina es necesaria en la síntesis de las ribonucleoproteínas en los núcleos de las células hepáticas.

II. - Factor antipernicioso.

La administración de vitamina B₁₂ produce una reducción rápida prácticamente en todos los casos de la -

anemia perniciosa . Este tipo de anemia se caracteriza principalmente por la disminución de glóbulos rojos en la sangre y éstos son de un tamaño superior a lo normal . En lugar de ser normocitos (diámetro aproximado de 7 micras) estos glóbulos rojos se llaman megalocitos ó macrocitos (diámetro aproximado de 11 micras) . Estos megalocitos contienen - más hemoglobina de la normal y por consiguiente un contenido de hierro excesivo . Se les nombra hiperocrómicos en oposición a los glóbulos rojos normales que son normocrómicos . Por otra parte, mientras que habitualmente se encuentran - los normoblastos en la médula ósea (ellos son los precursores de las células rojas) en el caso de la anemia perniciosa se encuentran igualmente los megaloblastos en la sangre periférica .

La anemia perniciosa es frecuentemente acompañada de una destrucción exagerada de glóbulos rojos por el sistema reticuloendotelial .

Esta destrucción excesiva entraña un aumento notable de bilirrubina en la sangre que conduce algunas veces a estados subictéricos.

En la anemia perniciosa se muestra un trastorno ocasionado por los ácidos digestivos. La atrofia de la mucosa gástrica, que entraña la desaparición de la secreción de ácido clorhídrico por células de la mucosa estomacal, es un síntoma característico. Esta aclorhidria es histamino-refractaria; la misma asociación de histamina no estimula la secreción de ácido clorhídrico; por lo tanto la acidez del contenido gástrico en anemia perniciosa es de 0 unidades.

No existía ninguna prueba de Laboratorio que permitiera al químico asegurarse de la persistencia del factor antipernicioso. El ensayo clínico solo podía dar una respuesta en cada lote de extracto sometido a este experimento.

En efecto, la imposibilidad de obtener en los animales una anemia megaloblástica que pueda parecerse a la del hombre, la evidencia de la actividad de cada extracto

sería obligatoriamente sobre la enfermedad producida en el hombre.

Fué descubierto un factor de crecimiento en la rata (factor X) por CARY y HARTMAN (1) en 1946. - Este factor se reconoció en particular sobre ciertos extractos hepáticos. Otros trabajos paralelos al anterior estaban -- siendo realizados en aves de corral cuando MARY SHORB -- (1) al efectuar ensayos para identificar este factor X por vía microbiológica descubrió en el extracto de hígado, en 1947, - un principio vitamínico necesario en el desarrollo del Lactobacillus Lactis Dornier (factor LLD), diferente de todos los factores B hasta entonces conocidos. La investigadora observó que la concentración de los extractos hepáticos en el factor LLD son paralelos a la intensidad de su poder curativo - en la anemia perniciosa. Este método se usa en la valoración casi exclusivamente de la vitamina B₁₂; y se puede utilizar también otros microorganismos tales como el Lactobacillus Leichmanuii.

Además de su acción en el tratamiento de la anemia perniciosa y de su poder nutritivo, STEKAL (1) - pretende que la vitamina B₁₂ por una parte actúa como transporte de hidrógeno en los radicales disulfuros y por otra parte juega un papel importante en la biosíntesis de metilos libres. Se señala asimismo, el papel de esta vitamina en la síntesis de la metionina a partir de la homocisteína y de la colina a partir de glicocola aunque ella no participa, sin duda, directamente en las transmetilaciones.

CAPITULO II

El propósito de esta tesis es el de encontrar un método para separar y valorar la vitamina B_{12b} en mezcla con vitamina B₁ (tiamina) y B₆ (piridoxina) en solución inyectable, debido a que este preparado vitamínico se usa frecuentemente en medicina. A continuación se describen los métodos existentes hasta el momento de iniciarse la parte experimental de esta tesis.

Método No. 1 (3)

A una muestra que contenga aproximadamente 200 microgramos de vitamina B₁₂, se le agrega cianuro de sodio, de tal manera que se obtenga una concentración final de 1 microgramo por mililitro. Se practica la operación bajo la campana.

Se agita para disolver el cianuro de sodio y el pH se ajusta de 9.5 a 10.0 con hidróxido de sodio al 10⁰%, si es necesario. Se deja reposar por 5 horas a temperatura

ambiente para convertir en complejo dicianurado todas las -
variantes de la vitamina B₁₂. Se agrega sulfato de sodio anhi-
dro de manera que la concentración final sea del 20⁰/₀ (P/V).
El pH se ajusta con hidróxido de sodio entre 11.0 y 11.5; la -
solución se pasa a un embudo de separación y se extrae con -
3 porciones iguales a la décima parte de su volumen con ----
alcohol bencílico.

A los extractos alcohólicos reunidos, se -
les agrega la mitad de su volumen de cloroformo, extrayendo
con 3 volúmenes de la décima parte de la mezcla alcohol ben-
cílico - cloroformo con agua. Las fases acuosas se aforan en
un matraz de 25 ml.

A una alícuota de 10 ml. del extracto acuo-
so se le agregan 2ml. de solución al 10⁰/₀ de cianuro de sodio
A otra alícuota de 10ml., se le agregan 2 ml. de solución al -
12.5⁰/₀ de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) para ajustar el pH
entre 5.0 y 6.0

La densidad óptica de cada solución es me-
dida a 582 m μ en una celdilla de 1cm. por la fórmula que el

autor establece, con sus factores especiales a las condiciones del método.

Método No. 2 (4)

Este método se basa principalmente en que la vitamina B₁₂ en solución acuosa es esencialmente no iónica en su comportamiento con ciertas resinas cambiadoras de iones, mientras que las vitaminas del complejo B restantes y la vitamina C tienen una actividad iónica con estas resinas. Si hay vitaminas A, D, y E se hace una extracción preliminar.

Este método consiste en hacer pasar una mezcla de la solución vitamínica por una columna con resinas y medir la densidad óptica de los eluidos en un espectrofotómetro de acuerdo con las siguientes especificaciones:

Para la extracción preliminar de las vitaminas solubles en aceite (A, D, y E) se solubilizaron primero en una solución de propilenglicol-agua. Se extrajeron con una mezcla 1:1 de tetrahidrofurano y cloroformo.

Las resinas se preparan para su uso haciéndolas estar en contacto, durante toda la noche, con una solución acuosa del regenerante. El exceso de la solución regeneradora se decanta y las resinas se lavan con agua destilada hasta que el agua de los lavados sea neutra al bromo cresol verde, para resinas regeneradas con ácidos y con fenolftaleína, para las resinas regeneradas con álcalis.

La columna seleccionada para este método contiene resinas de la serie Amberlita y consiste en una cama inferior, de 8cm., de Amberlita IRA-400 regenerada con hidróxido de sodio al 10⁰%. La cama superior, de 7 cm., contiene una mezcla 1:1 de Amberlita IRA-400 regenerada con una solución de hidróxido de sodio al 10⁰% y Amberlita IR-120 regenerada con una solución de ácido sulfúrico al 2.5⁰%(V/V). Estas resinas fueron empacadas en tubos de cromatografía en columna de 50 ml., en su parte inferior se puso un tapón de lana de vidrio, se llena de agua y se empaca la resina dejándola caer mezclada con agua hasta que se alcance la altura deseada; se pone lana de vidrio en la parte superior para que la resi-

na permanezca fija durante las adiciones de las muestras. --

Las columnas se lavan profusamente con agua destilada.

La alícuota que se hace pasar es de 10ml.-

y se recoge en un matraz volumétrico de 25 ml. llegando al -
aforo con lavados de la misma columna. El matraz debe con-
tener aproximadamente 1ml. de solución amortiguadora a pH
5.4. El flujo es de 8ml. por minuto.

Se usa un espectrofotómetro Beckman mo-
delo DU con celdillas Corex de 1, 5 y 10 cm. La lámpara con
filamento de tungsteno se usó para las lecturas a 550m μ

La misma lámpara con el filtro adecuado se usa para las lec-
turas de 361m μ

Abajo de los 330m μ se usan celdillas de
cuarzo de 1 cm. y una lámpara de hidrógeno.

La cantidad de vitamina B₁₂ se calcula así:

se hace un patrón con vitamina B₁₂ cristalina la cual se pasa
por la columna. Se mide antes y después de su paso por la --
columna dando ΔE_p y ΔE_c el cual se corrige por cambios

de celdillas y de volumen.

$$\frac{\Delta E_e}{\Delta E_p} \times 100 = \% \text{ de recuperación}$$

$$\frac{\Delta E_m \times 100}{\Delta E_t \times \% \text{ DE RECUPERACIÓN}} \times \left\{ \text{ACT. DE DIL.} = \text{Vit B}_{12} \right.$$

Donde ΔE_m es la absorbancia del eluido

(corregido para celdas de 1 cm., de 5 cm. ó de 10 cm. según la que se use) y ΔE_t es la absorbancia teórica de una concentración específica de vitamina B₁₂ cristalina patrón.

12

Método No. 3 (5)

Este método es una combinación de los dos anteriores, con algunas modificaciones.

Se trata una solución problema que contenga al menos 200 gammas de vitamina B₁₂ a una concentración no menor de una gamma por ml. con cianuro de potasio sólido hasta alcanzar una concentración final del 10%; se agita para disolver el cianuro adicionado, quedando el pH de la solución entre 9.0 y 10.0. Se deja durante 5 horas a la temperatura ambiente, para lograr la conversión total de las variantes de vitamina B₁₂ a complejo dicianurado. Se añade sulfato sódico

12

anhidro hasta una concentración del 20⁰/₀ (P/V) y una vez disuelto se ajusta el pH entre 11.0 y 11.5 con una solución concentrada de hidróxido de sodio. En un embudo de separación se extrae con 3 porciones iguales a la décima parte de su volumen con alcohol bencílico. Al extracto bencílico se le añade la mitad de su volumen de cloroformo extrayendo con 3 volúmenes de la décima parte de la mezcla alcohol bencílico-cloroformo con agua. Se completa el volumen de la fase acuosa hasta 25 ml. y se adicionan 12.5 gr. de sulfato amónico. Una vez disuelto, se extrae con 3 volúmenes de 5 ml. cada uno con alcohol n-butílico, se añaden 8 ml. de cloroformo y se vuelve a hacer una extracción con 3 porciones de 3 ml, cada una con agua, el volumen se lleva a 15 ml. y se filtra.

A una parte alícuota de 5 ml. se adiciona 1 ml. de solución de cianuro de potasio al 10⁰/₀ y a otros 5 ml. se adiciona 1 ml. de la solución de fosfato monopotásico al 12.5⁰/₀ dando un pH entre 5.0-6.0 Se dejan 15 minutos y se mide ahora la diferencia de densidades ópticas a 580m μ en una

celdilla de 1 cm. tomando la solución de fosfato como blanco.

El contenido de vitamina B₁₂ se calcula por un proceso similar al método No. 1.

Como la cianocobalamina suele estar en estas mezclas en presencia de lactoflavina que interfiere en la valoración, para retener ésta pasamos la solución a través de una columna de resinas de cambio iónico de 15 a 20 cm. de altura y 1.5 cm. de diámetro. En un principio se usaron resinas de la serie Amberlita IRA-400 y IR-120; se encontraron con ellas buenos resultados. Posteriormente, debido a la dificultad para conseguir Amberlitas en el mercado, se emplearon como equivalentes Zerolit 225 y Zerolit F.F. pero se comprobó que la resina ácida Zerolit 225 retenía hasta un 30% de la vitamina B₁₂, siendo por tanto inútil su empleo. Utilizando únicamente la resina fuertemente básica Zerolit F.F.-SRA-69, los resultados que se han encontrado son satisfactorios. La resina debe activarse previamente durante 12 horas con una solución de hidróxido de sodio al 10%.

El método de valoración que se describe - consiste en añadir a la mezcla polivitamínica una cantidad conocida previamente valorada de vitamina B₁₂ y la solución se pasa a través de una columna de resina fuertemente básica - para retener la vitamina B₂ (riboflavina).

En la solución resultante se valora la vitamina B₁₂ por el método de extracción expuesto anteriormente.

Técnica Operatoria:

Las determinaciones de vitamina B₁₂ se han efectuado en mezclas polivitamínicas liofilizadas que contienen vitaminas B₁, B₂, B₆, C, nicotinamida y pantotenato sódico.

Se disuelve el liofilizado, que contiene 50 gammas de vitamina B₁₂ con 3 ml. de una solución de cianocobalamina que tiene 70 gammas por ml. y se lleva a un volumen total de 10 ml. con agua destilada. Este líquido se pasa por la columna que ha sido lavada con agua destilada después de la -

reactivación y se recoge en un matraz aforado de 25 ml., en el cual se han puesto previamente 2 gotas de ácido acético glacial para acidificar el medio.

A 3 ml. de la solución se añade 1 ml. de cianuro de potasio al 10⁰/o y a otros 3 ml., 1 ml. de solución de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) se deja 15 minutos y se valora en el espectrofotómetro a 580 m μ contra la solución de fosfato monopotásico como blanco, siempre que la diferencia de densidades ópticas medidas a 525 m μ , 540 m μ y 554 m μ sea cero. El contenido en vitamina B₁₂ se calcula similarmente al método No. I.

Método No. 4. (6)

Aparatos:

- a) dos tubos de vidrio para cromatografía de 9 por 1/2 pulgadas.
- b) celulosa DEAE (polvo Whatman DE 50)
- c) carboximetilcelulosa (Whatman CM 70)

Se mezcla la celulosa DEAE con hidróxido de sodio 0.5 N y la CMC con ácido clorhídrico 0.5N y se diluye cada mezcla con agua destilada, dejando sedimentar y se quita la mayor parte del líquido sobre nadante por decantación. Se agita cada sedimento con agua destilada, transfiriéndolos a un embudo Buchner y se lavan profusamente, sacando toda el agua después de cada lavado. Suspensiones de estas celulosas pueden guardarse listas para su uso.

Se pasan porciones de estas suspensiones a los tubos vacíos (uno para cada celulosa) después de haber insertado lana de vidrio. La columna DEAE(A) es llenada por gravedad hasta una altura de 8 pulgadas. La columna CMC (B) es apretada firmemente mientras se va llenando, hasta una altura de 4 pulgadas. Se lava cada columna hasta que el agua de los lavados tengan un pH constante.

Cuando la columna A esté libre de álcali, la celulosa es apretada con un gendarme pero cuidadosamente hasta una altura de 6 pulgadas. Es importante que no se aprie-

te demasiado porque daría un flujo muy lento.

Se agrega a cada columna un tapón de lana de vidrio y se drena hasta que quede una pequeña cantidad de agua sobre el empaque. Se pone la columna A sobre la columna B de tal manera que el eluido de A fluya sobre B.

Se comprueba el pH de la solución sin diluir y si no está todavía ácida, agregue unas gotas de ácido clorhídrico para dar un pH abajo de 4.0 y asegurar la completa conversión a la forma acuosa. Con una pipeta se miden -- 20 ml. de esta solución y se añaden por la parte superior de -- la columna A y se deja correr a través de las 2 columnas desechando el primer eluido sin color. Continúe agregando agua a la columna A, colectando el eluido coloreado de B en un -- matraz aforado de 50ml. hasta llegar al aforo.

En este momento el eluido de las columnas debe ser casi incoloro. Se anota la absorbancia del eluido a 360-361 m μ empleando agua como blanco y se calcula la cantidad de otras cobalaminas como vitamina B₁₂ seca usando $E_{1cm}^{1\%} = .20$

En este punto la apariencia de la columna debe ser la siguiente:

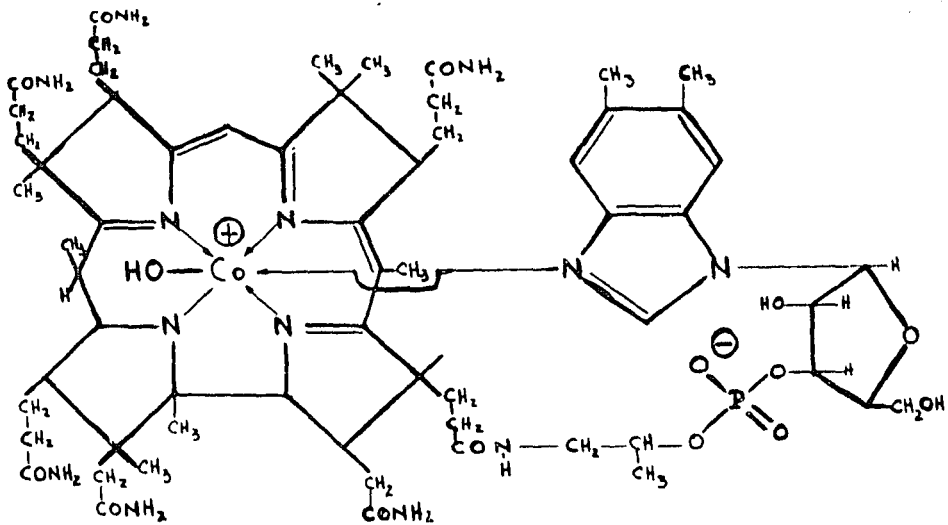
En la columna A, debe haber una o más -
bandas de color rosa producidas por los ácidos rojos. En la
columna B, la acuocobalamina es fuertemente retenida, en -
una banda de color rojo oscuro, en la parte superior de la -
misma. Una banda de color rojo, más angosta debe apare-
cer más abajo de la columna y es debida a la hidroxicobalamina
retenida débilmente. El eluido contiene cianocobalamina y -
otras cobalaminas neutras.

Se diluyen las bandas de color rosa de la
columna A directamente en un matraz aforado de 50 ml. con
cloruro de sodio al 1^o/_o en agua hasta llegar al aforo. Se re-
mueve y se mide la absorbancia entre 355 y 360 m μ
en una celdilla de 1 cm. empleando una solución de cloruro de
sodio al 1^o/_o como blanco. Se calcula el contenido de los áci-
dos rojos como hidroxicobalamina en la substancia seca usan-
do $E_{1cm}^{1\%} = .190$

Si se desea, la acuocobalamina puede ser eluida de la columna B con una solución de cloruro de sodio - al 1^o/_o, en un matraz de 250 ml. aforado y llevarlo al aforo con lavados. Se mide la absorbancia a 350-351m μ empleando - una solución de cloruro de sodio al 1^o/_o como blanco, en una - celdilla de 1 cm. El cloruro de acuocobalamina de la muestra seca se calcula usando $E_{1\text{cm}}^{1\%} = .190$

CAPITULO III

Esta tesis se encaminó a separar y valorar espectrofotométricamente la vitamina B₁₂ ó hidroxicobalamina, de fórmula condensada C₆₂ H₈₉ O₁₅ N₁₃ P Co y desarrollada.



Esta vitamina se encuentra en una de sus asociaciones con las vitaminas B₁ y B₆ en solución inyectable.

. Sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas son semejantes a las de la vitamina B₁₂ ó cianocobalamina, las cuales han sido anteriormente mencionadas.

Cada ml. contiene:

Clorhidrato de tiamina	100 mg.
Clorhidrato de piridoxina	50 mg.
Hidroxicobalamina o vitamina B _{12b}	1 mg.

Se necesita un método rápido, pues el que se usa para valorar la vitamina B_{12b}, microbiológico, es bastante lento ya que hay que preparar las cajas Petri con el medio, inocular el microorganismo, incubar durante 24 horas y leer tanto la curva tipo como el problema lo cual requiere más de 24 horas.

Todas las lecturas fueron hechas en un espectrofotómetro Beckman modelo DU y se usaron celdillas de cuarzo

de un centímetro. Para las lecturas en la región ultravioleta se usó una lámpara de hidrógeno y en el visible, una lámpara con filamento de tungsteno.

Las resinas estudiadas fueron:

I.- De la Nalco Chemical Co.

a)- Nalcite SAR.- Fuertemente básica, aniónica, hecha de estireno y divinilbenceno, conteniendo grupos de amonio -- cuaternario. Se activa y regenera con hidróxido de sodio al 10⁰‰.

b)- Nalcite SBR.- Fuertemente básica, aniónica, hecha de estireno y divinilbenceno, conteniendo grupos de amonio -- cuaternario. Se activa y regenera con hidróxido de sodio al 10⁰‰.

c)- Nalcite SBR-P.- Muy porosa, fuertemente básica, aniónica, hecha de estireno y divinilbenceno, conteniendo grupos de amonio cuaternario. Se activa y regenera con hidróxido de sodio al 10⁰‰.

d)- Nalcite HCR.- Fuertemente ácida, catiónica, hecha de un copolímero sulfonado de estireno y divinilbenceno. Se activa

y regenera con ácido clorhídrico al 5⁰/_o

e).- Nalcite HCR-W.- Catiónica, hecha de estireno y divi -
nilbenceno conteniendo grupos de ácidos sulfónico. Se acti-
va y regenera c ácido clorhídrico al 5⁰/_o.

II.- De la Casa L. Merck A.G.

a).- Cambiador de Iónes I.- Fuertemente ácida, catiónica,
hecha de un derivado de poliestireno, con grupos de ácido
sulfónico núcleo-substituidos. Se activa y regenera con ácido
clorhídrico al 5⁰/_o.

b).- Cambiador de Iónes IV.- Débilmente ácida, catiónica,-
hecha de un derivado poliacrílico. Se activa y regenera con
ácido clorhídrico al 3⁰/_o.

III.- De la Dow Chemical Interamerican Limited.

a).- Dowex IX 8.- Aniónica, hecha de estireno, con grupos
de amonio cuaternario. Se activa y regenera con hidróxido
de sodio al 10⁰/_o.

b).- Dowex 50 X 8.- Catiónica, hecha de estireno, con gru-
pos de ácido sulfónico. Se activa y regenera con ácido clor-
hídrico al 5⁰/_o.

Todas estas resinas se activaron durante 12 horas en suspensión con una solución del regenerante respectivo. Se lavaron con agua destilada hasta que el pH de los lavados se mantuvo estable y se secaron al medio ambiente

No se usaron las resinas de la serie Amberlita, debido a que no se encontraron en el mercado y solo se podían adquirir por importación, tardando 3 meses en llegar aquí, además de ser bastante caras ya que una libra de resina IRA-400 ó IR-120 cuesta alrededor de 12.50 dólares (156.25 pesos).-

Se usó como columna una bureta de 10 ml.- y se empacó de la siguiente forma: En la parte inferior se puso un tapón de algodón con objeto de retener la resina. Se llena de agua y se vierte la resina en suspensión con agua por la parte superior hasta llegar a la altura deseada. Encima de la resina se pone otro tapón de algodón para mantenerla fija durante la adición de las alícuotas. Se lava abundantemente con agua destilada dejando ésta algo más arriba (0.5 cm.) del algodón superior, quedando así lista la columna para su uso.

El método que encontré más adecuado a mis propósitos es el siguiente:

En un matraz aforado de 25 ml., se pone la mezcla de las vitaminas B₁, B₆ y B_{12b} y se lleva por -- diluciones adecuadas una concentración aproximada de 50 gammas de vitamina B_{12b} por ml.

Por otra parte se pesa exactamente un patrón de vitamina B_{12b} cristalina (equivalente a 10 mg.) y se llevan a un matraz volumétrico de 200 ml. aforando con agua, - teniendo así una concentración de 50 gammas por ml.

A estas 2 soluciones (problema y patrón) se les agrega cianuro de potasio sólido (1 mg. por ml. de solución) y se deja reposar durante 5 horas en una campana, a temperatura ambiente.

En una bureta de 10ml. se prepara una columna con una cama de 15 cm. de altura, con la resina Dowex-50X 10, activada tal y como se explicó anteriormente.

Se miden 5 ml. de la solución problema y se pasan a través de la columna, deshechándose el primer eluido incoloro. Se recibe el eluido conteniendo la vitamina B₁₂ en -

forma de complejo dicianurado en un matraz volumétrico de 25 ml. al que previamente se le ha adicionado 2 ml. de solución amortiguadora pH 5.4 y se lleva al aforo con el agua de los lavados hechos a la columna. De igual forma se procede con la solución patrón en otra columna de las mismas características.

En un espectrofotómetro se miden las densidades ópticas a 361 m μ usando la solución amortiguadora pH 5.4 como blanco.

$$\frac{\Delta E_m}{\Delta E_p} \times 100 = \% \text{ de vitamina B}_{12}$$

donde ΔE_m es la densidad óptica del problema y --
 ΔE_p es la densidad óptica del patrón.

CAPITULO IV

La siguiente tabla se hizo con muestras cuya fórmula es la siguiente. Unicamente se hizo variar la cantidad de vitamina B₁₂

Cada ml. contiene:

clorhidrato de tiamina 100 mg.

clorhidrato de piridoxina 50 mg.

hidroxicobalamina ó vita

mina B₁₂

Para encontrar la desviación relativa y el error relativo se usaron las siguientes ecuaciones.

$$\text{Desviación Relativa} = \frac{\text{Desviación Promedio.}}{\text{Valor Promedio .}} \times 100$$

$$\text{Error Relativo} = \frac{\text{Valor Encontrado.}}{\text{Valor Promedio.}} \times 100$$

n la

en la

on -

a B₁₂,

hidróxi-

n una

mente

esa-

or fa-

na de

rtó

m.,

T A B L A I.

Muestra	Cantidad de Vitamina B ₁₂ b (gammas por ml.)	Valores Encontrados.	Valor Promedio.	Desviación	Desviación Promedio
1	20	0.0595		0.000	
2	20	0.0590		0.0005	
3	20	0.0600	0.0595	0.0005	0.00033
4	40	0.1300		0.0005	
5	40	0.1350		0.0014	
6	40	0.1360	0.1336	0.0024	0.00146
7	60	0.2075		0.0010	
8	60	0.2030		0.0035	
9	60	0.2090	0.2065	0.0025	0.00233
10	80	0.2630		0.0090	
11	80	0.2720		0.0000	
12	80	0.2820	0.2720	0.0090	0.0060
13	100	0.3180		0.0120	
14	100	0.3350		0.0050	
15	100	0.3370	0.3300	0.0070	0.0080
16	200	0.6900		0.0050	
17	200	0.6930		0.0020	
18	200	0.7020	0.6950	0.0070	0.0046

T A B L A I.

Valores Encontrados.	Valor Promedio.	Desviación	Desviación Promedio	Desviación Relativa - (%)	Error Relati- vo (%)
0.0595		0.000			1.00
0.0590		0.0005			0.99
0.0600	0.0595	0.0005	0.00033	0.0196	1.00
0.1300		0.0005			0.97
0.1350		0.0014			1.01
0.1360	0.1336	0.0024	0.00146	0.01	1.01
0.2075		0.0010			1.00
0.2030		0.0035			0.98
0.2090	0.2065	0.0025	0.00233	0.01	1.01
0.2630		0.0090			0.96
0.2720		0.0000			1.00
0.2820	0.2720	0.0090	0.0060	0.02	1.03
0.3180		0.0120			0.96
0.3350		0.0050			1.01
0.3370	0.3300	0.0070	0.0080	0.02	1.02
0.6900		0.0050			0.99
0.6930		0.0020			0.99
0.7020	0.6950	0.0070	0.0046	0.06	1.01

DISCUSION DEL METODO.

1.- La concentración de la alícuota no influye en la recuperación de la vitamina B_{12b} ya que como se verá en la tabla I, este método sigue la Ley de Lambert-Beer.

2.- Se le agrega cianuro de potasio en exceso con - objeto de formar el complejo dicianurado de la vitamina B₁₂, el cual es deseable por dos motivos:

a.- Convierte todas las variantes de la vitamina B₁₂. (hidróxi-cobalamina, acuocobalamina, nitrocobalamina, etc.) en una sola substancia.

b.- Encontré que el complejo dicianurado pasa íntegramente por la columna.

3.- El tiempo de reacción de cinco horas es necesario para la conversión de todas las pseudocobalaminas.

4.- Se usó una bureta de 10 ml. debido a la mayor facilidad en su manejo y limpieza, no siendo necesario una de mayor tamaño.

5.- La altura de 15 cm. de cama es la que reportó mejores resultados, ya que una cama de 10 cm. ó 12 cm.,

permite el paso de la piridoxina y la tiamina no siendo éstas totalmente retenidas y mientras menor es la altura de la cama mayor cantidad de vitamina B₁ y B₆, pasa a través de la columna. Estas pruebas se hicieron con sal de Reinecke y ácido fosfomolibdico respectivamente. La tiamina, en medio clorhídrico, da un precipitado de color rosa con la sal de Reinecke y la piridoxina, con el ácido fosfomolibdico, da un precipitado de color crema.

6.- La resina usada Dowex 50 X 10 fué la única que sirvió a mis propósitos, ya que todas las demás no dieron los resultados apetecidos.

Todas las resinas aniónicas sin excepción no retienen la vitamina B₁ ni la B₆, siendo estas resinas Nalcite SAR, SBR, SBR-P, Dowex 1 X 8. Hice pruebas a diferentes alturas de cama, en buretas de 10 ml., 25 ml. y 50 ml. sin resultados. Las resinas catiónicas Nacite HCR, HCR-W, cambiador de iones I y IV, y Dowex 50 X 8 resultaron satisfactorias en cuanto al problema de retención de las vitaminas B₁ y B₆ pero con el inconveniente de adsorber también la

vitamina B_{12b} en más de un 30% siendo por tanto inconveniente su empleo. La resina Dowex 50 X 10 fué la única que trabajó más satisfactoriamente aunque reteniendo -- aproximadamente el 10% de esta vitamina. Agregando cianuro a la vitamina B_{12b} encontré que se recuperaba en 100% ó sea que el complejo dicianurado pasa íntegramente a través de la columna.

7.- Se añaden 2 ml. de amortiguador a pH 5.4 con el objeto de convertir el complejo dicianurado en cianocobalamina por desplazamiento del segundo grupo cianhídrico.

8.- Las densidades ópticas se miden a 361 m μ ya que a esta longitud de onda, la cianocobalamina tiene su máximo en el espectro.

CAPITULO V.

CONCLUSIONES.

- 1.- El método propuesto y modificado es un método rápido, ya que todas las manipulaciones necesarias toman un tiempo aproximado de dos horas. Tomando en cuenta las cinco horas necesarias para la reacción hace un total de siete horas más ó menos, en contraposición con el método microbiológico -- para determinar vitamina B₁₂ el cual dura 24 horas o más.
- 2.- Es un método reproducible y exacto según se puede observar por los resultados de la tabla 1 concernientes al error relativo y desviación relativa.
- 3.- Es un método de fácil manejo puesto que no entraña ninguna manipulación engorrosa ó difícil de efectuar.
- 4.- El error máximo de este método es del orden del 1^o/₆- de acuerdo con los resultados obtenidos.
- 5.- Se puede decir que es económico ya que los reactivos - usados son bastante baratos excepto quizá la resina.

CAPITULO VI.

BIBLIOGRAFIA.

1.- Crabbé Pierre.

Determination de la Structure de la Vitamine B₁₂.

L'Ingénieur Chimiste, Tome XXXIX, No.207, Mars
pags. 23-41 (1957).

2.- The United States Pharmacopeia.

XVI Revisión, Pags. 186-187. (1960)

3.- Rudkin G.O. and Taylor R.J.

Chemical Method for Determining Vitamin B₁₂

Anal. Chem. Vol. 24, pags. 1155-1156. (1952)

4.- Marsh Max M. and Kuzel Norbert R.

Separation and Determination of Crystalline

Vitamin B₁₂ in Synthetic Vitamin Mixtures.

Anal. Chem. Vol. 23, pags. 1773-1776.(1951)

5.- Domínguez Aparicio, Gayo y Martínez Oller.

Determinación Química de la Vitamina B₁₂ en Extractos

de Hígado y Mezclas Polivitamínicas.

Galénica Acta (Madrid) vol. 14, pags. 157-163 (1961)

6.- Smith E. Lester, Martin J.L., Gregory R.J. and Shaw -
W.H.C.

Standardisation of Hidroxicobalamin.

The Analyst, Vol. 87, No,1032, pags. 183-186 (1962)

7.- Williams R.J. et al.

The Biochemistry of the B Vitamins.

Reinhold Publishing Corp. New York. (1950)

8.- Kleiner and Orten.

Biochemistry.

6a. Ed. C.U. Mosby Co. (1962)

9.- Smith E. Lester.

Vitamin B₁₂

Methuen and Co. Ltd. Londres (1960)