

بررسی و تحقیق بمنظور تهیه و تولید رادیوداروی
ویتامین B12 با درجه خلوص پزشکی
(گزارش اول)

حسین غفوریان*، مریم مظاهری تهرانی، سیدعلی ایزدیار، مریم
شمس رفیعی، امین نظری
مرکز تحقیقات هسته ای - سازمان انرژی اتمی ایران، صندوق
پستی ۱۱۳۶۵-۳۴۸۶، تهران، ایران
ghafourian@aeoi.org.ir

چکیده: ویتامین B12 نشاندار با کبالت - ۵۸ یکی از کیت‌های
تشخیصی مهم در بیماران مبتلا به کم خونی است. عدم جذب کافی
ویتامین B12 یکی از علل کم خونی در انسانها بوده و یکی
از روشهای دقیق سنجش میزان جذب آن، کاربرد رادیوداروی
ویتامین B12 نشاندار شده با رادیو ایزوتوپ کبالت - ۵۸ می
باشد. مهمترین مرحله تولید ویتامین B12 نشاندار جداسازی و
خالص سازی ویتامین از محیط تخمیر باکتری *Streptomyces Olivaceus* می
باشد. لذا در مرحله اول این تحقیق مطالعه و بررسی جهت
جداسازی و تخلیص با استفاده از رزینهای مختلف بر روی نمونه
های سیانوکوبالامین حاوی کبالت-۵۹ تولید شده توسط باکتری
فوق انجام شد. در بررسیها و آزمایشهای اولیه دورزین
غیرقطبی XAD-4 و XAD-7 انتخاب شد. نتایج آزمایشهای مختلف
بر روی XAD-4 و XAD-7 نشان داد که بهترین راندمان جهت تثبیت
کوبالامین بوسیله رزین XAD-4 بدست آمد. در مرحله
بعدي، تحقیقات جهت جداسازی ویتامین در روی ستون XAD-4
با استفاده از حلالهای متانول، اتانول و ایزوپروپانول
در غلظتهای مختلف انجام شد. نتایج حاصل از TLC
(کروماتوگرافی لایه نازک) نشان داد که بهترین حلال های
شستشو جهت واجذب کوبالامین از روی ستون XAD-4 استفاده از حلال
های متانول، اتانول و ایزوپروپانول با حداکثر غلظت
ویتامین B12 و در محدوده غلظتهای ۲۵ تا ۵۰ درصد، ۳۰ تا ۴۰
درصد و ۱۰ درصد برای حلالهای فوق بوده است. کوبالامین واجذب
شده در حضور استن در دمای پائین متبلور شد.
واژه های کلیدی: ویتامین B12، جداسازی، خالص سازی،
آمبرلیت^(۱)

**Investigation for Preparation and production of Radio-Kit Vitamin B12 with
Med-grade (1.Report)**

**H.Ghafourian*, M.Mazaheri Tehrani, S.A. Ezadyar, M.Shams Rafiee
A.Nazari,**

**Nuclear Research Center, AEOI, P.O.Box: 11365-3486, Tehran-Iran
ghafourian@aeoi.org.ir**

Abstract: Labelled vitamin B12 with ^{58}Co is one of the important ingredients of the diagnostic Kits for diagnosis of patients affected by anemia. Insufficient absorption of vit. B12 is one of the causes anemia in humans and one of the accurate methods for measurement of absorbed vitamin B12 is application of vit. B12 with radioisotope cobalt – 58 labelled. The isolation and purification of labelled vit. B12 from fermentation medium of *Streptomyces Olivaceus* essential process for kit preparation. The first experiment of this research was isolation and purification with using different resins with solution of cyanocobalamin containing cobalt-59 that was produced by this bacterium. After investigation and pre-feasibility experiments two non polar resins XAD-4 and XAD-7 were selected. The results of the different experiments on XAD-4 and XAD-7 showed that XAD-4 is much better than the latter one for immobilization of cobalamin. The isolation of vitamin B12 on XAD-4 column was achieved by different solvents such as methanol, ethanol and isopropanol in the different ratio concentrations. The results of TLC (Thin Layer Chromatography) showed that the best eluants solution for desorption of cobalamin from XAD-4 column are solvents such as methanol, ethanol and isopropanol with maximum concentration of vitamin B12 in the range of concentrations 25 up 50 percent, 30 up 40 percent and 10 percent respectively. Cobalamin was collected in acetone and crystallized in low temperature. .

Key words: vitamin B12, isolation, purification, amberlite.

۱- مقدمه

ویتامین B12 یا سیانوکوبالامین^(۲) یک کمپلکس آلی- فلزی است که فلز کبالت بعنوان اتم مرکزی در آن قرار گرفته است. ساختار ویتامین B12 در شکل (۱) نشان داده شده است.

شکل ۱- ساختمان ویتامین B12

ویتامین B12 که با رادیوایزوتوپهای کبالت نشاندار می شود دارای کاربردهای بسیار مهمی بوده که می توان به موارد استفاده آن در زمینه پزشکی تشخیصی اشاره کرد. یکی از کاربردهای کاملاً بارز آن سنجش عمل جذب ویتامین B12 در روده کوچک بوده که نهایتاً میزان جذب آن در تشخیص بیماریهای کم خونی megaloblastic و سندرم intestinal malabsorption کمک می کند [۱].

ویتامین B12 بایکی از ایزوتوپهای رادیواکتیو کبالت Co-56، Co-57 و Co-58 می تواند نشاندار شود و کمیت دز تابش رادیوایزوتوپ کبالت باید در حدی باشد که میزان دز جذب شده توسط سایر اعضا بدن به حداقل برسد. کبالت - ۵۸ از میان رادیوایزوتوپهای کبالت بدلیل دز مناسب، نیمه عمر کوتاه و قابلیت اندازه گیری در انواع شمارنده ها جهت مصارف پزشکی مناسبتر تشخیص داده شده است. جذب ویتامین B12 با استفاده از ویتامین B12 نشاندار بصورت یک روش دو مرحله ای قابل انجام بوده و میزان جذب ویتامین به روشهای مختلف از جمله روش دفع ادراری شیلینگ (Schilling) سنجش می شود [۲ و ۳].

در این تحقیق از نمونه حاوی ویتامین B12 غیراکتیو که منبع کبالت آن کلرید کبالت هگزا اکوا بوده، طی فرایندهای جدا سازی و خالص سازی ویتامین B12 به دست آمده است. از سال ۱۹۴۵ تاکنون روشهای زیادی برای جداسازی و خالص سازی آنالوگهای کوبالامین^(۳) صورت گرفته است که منجمله ابتدائی ترین آنها استفاده از آلومین، زغال فعال، سیلیکاژل ها می باشد. امروزه یکی از متداولترین و مؤثرترین روش جداسازی آنالوگهای کوبالامین استفاده از رزینهای تبادلگریونی (Ion-Exchanger) می باشد [۴].

آمبرلیت های پلی مر (XAD) گروهی از رزینهای غیرقطبی بوده که جهت جدا کردن و خالص سازی آنتی بیوتیکها، ویتامینهای گروه B، حشره کشهای کلردار، ترکیبات متنوع آروماتیک نیتروژن دار و پروکسیدهای هیدروژن بکار می روند. در میان این گروه، معروفترین آنها XAD-2، XAD-4 و XAD-7 می باشند [۵ و ۶].

رزینهای XAD-2 و XAD-4 رزینهای غیرقطبی هستند که کاربرد بیشتری جهت آنالیز و جداسازی ترکیبات آلی محیطی دارند. رزین XAD-7 یک حد واسط قطبی است که فنل ها را بخوبی جذب می کند. این نوع رزین قابلیت جذب مواد آبدوست را از آب و مواد آب گریز را از سیستمهای غیرآبی داراست. مشخصات این رزینها در جدول (۱) آمده است.

شماره کاتول و گ	درجه و پایه	نوع ماتریکس	اندازه	سطح تماس	قطر متوسط
۱- ۲۱۶۴۶	XAD-2	پلی استیرن	۶۰- ۲۰	۳۰۰	۹۰
۸- ۲۱۶۴۸	XAD-4	پلی استیرن	۶۰- ۲۰	۷۲۵	۴۰
۶- ۲۱۶۴۹	XAD-7	اکریلیک استر	۶۰- ۲۰	۴۵۰	۹۰

جدول ۱- مشخصات آمبرلیتهای (XAD)

ساختار شیمیایی آمبرلیت- باتوجه به تنوع ساختار آمبرلیت ها بررسی همه آنها امکان پذیر نیست. IR-P64 نوعی آمبرلیت

است که جهت جداسازی وخالص سازی ویتامین B12 بکار می رود. بخش ماتریکسی آن شامل کوپلیمری ازمتاکریلیک اسید و دی وینیل بنزن است. ساختار شیمیایی، طیف IR و مشخصات فیزیکی آمبرلیت IR-P64 در شکل های زیر نشان داده شده است [۶].

شکل ۲- ساختار شیمیایی آمبرلیت IR-

P64

۲- مواد و دستگاهها

۱-۲- مواد استفاده شده برای طرح شامل: آمبرلیت IR-120 ، IR-410 ، XAD-4 ، XAD-7 ، اتیل الکل، متانول، آب مقطر دوبار تقطیر دیونیزه، کاغذ TLC، استن، ایزوپروپانول (تمامی مواد بکاررفته از کمپانی Merck با درجه خلوص ۹۹/۹٪ خریداری شده اند).
۲-۲- دستگاههای مورد استفاده: HPLC (Intertail OSD-2) ، PH متر (744 Metrom) لامپ UV 254 nm ، روتاری (4002 Heidolph) ، پمپ خلاء (Shimadzu)

۳- روش کار

۱-۳- تهیه آب دیونیزه - به منظور جدا کردن یونهای مزاحم موجود در آب مقطر و در نتیجه کاهش هدایت، عملیات دیونیزه کردن آب مقطر بوسیله ستون رزینهای IR-410 و IR-120 انجام گرفت. در این مرحله با استفاده از رزینهای تبادلگر کاتیونی و آنیونی آب مقطر دوبار تقطیر ازدو ستون بطول ۵۰ cm و قطر ۰/۵ cm پر شده از رزینهای IR-410 و IR-120 در دماهای بین ۲۰-۷۰ °C عبور داده شد. هدایت آب دیونیزه شده در دماهای مختلف قبل از ورود به ستون کاتیونی IR-120 و بعد از خروج از ستون آنیونی IR-410 اندازه گیری شده و مقادیر آنها در جدول (۲) مشخص گردید.

هدایت الکتریکی (μs) قبل از ستون	هدایت الکتریکی (μs) بعد از ستون	دما (°C)
۵۹/۳	۴۴/۴۲	۲۵
۵۶/۵	۴۱/۲	۳۵

۴۰/۱	۵۵/۲	۴۰
۳۸/۲	۵۳/۶	۴۵
۴۱/۱	۵۱/۹	۵۰
۴۰/۶	۵۰/۹	۵۵
۴۰/۸	۴۸/۸	۶۰
۴۱/۰	۴۷/۲	۶۵
۴۲/۱	۴۶/۶	۷۰

جدول ۲- هدایت الکتریکی آب مقطر در دماهای مختلف
باتوجه به نتایج جدول (۲) جهت دیونیزه کردن آب مقطر
دماي °C ۴۵ بدلیل پائین ترین هدایت الکتریکی انتخاب شد.

۲-۳- تثبیت^(۴) کوبالامین بر روی رزینهای Amberlite و Amberlite XAD-4 XAD-7

بمنظور جداسازی بیوماس^(۵) از محیط تخمیر، ابتدا آنرا با کاغذ صافی و دستگاه سانتریفوژ صاف کرده و جهت بالابردن غلظت ویتامین B12 با دستگاه روتاری درخلاء تقطیر شد. محلول صاف و تغلیظ شده بر روی XAD-4 و XAD-7 تثبیت گردید. جهت این آزمایش ۱۰ میلی لیتر از محلول اولیه را برداشته و بداخل بالن ۵۰۰ میلی لیتری انتقال داده سپس تا ۷ برابر حجم محلول به آن رزین اضافه کردیم و بمدت چند ساعت مخلوط را همزدیم و سپس محتویات بالن را مجدداً به دستگاه تقطیر درخلاء انتقال داده تا رزین کاملاً خشک شود. ستونی از رزین خشک شده حاوی ویتامین B12 بطول ۵۰ cm و قطر ۰/۵cm طراحی کردیم [۷].

۳-۳- عملیات واجذب ویتامین B12 تثبیت شده از روی ستون

با استفاده از TLC بمنظور جداسازی و خالص سازی ویتامین B12 از روی ستونهای رزین XAD-4 و XAD-7 محلولهای زیر تهیه و عملیات واجذبی انجام گرفت.

- ۱- محلول متانول در غلظتهای ۵۰-۲۵ درصد حجمی
 - ۲- محلول اتانول در غلظتهای ۴۰-۳۰ درصد حجمی
 - ۳- محلول ایزوپروپانول در غلظت ۱۰ درصد حجمی
- پس از شستشوی ستون با حلالهای فوق، قسمتهای مختلف حاصل از شستشو به دستگاه تقطیر درخلاء منتقل شده تا حلال جدا شود. جزء باقی مانده را در یخچال قرار داده و پس از سرد شدن کریستالهای سوزنی شکل کوبالامین در حضور استن بدست آمد.

۴- بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از جداسازیهای فوق بامقایسه کروماتوگرامهای بدست آمده از دستگاه HPLC مربوط به

ویتامین B12 استاندارد و نمونه مورد آزمایش در نمودارهای ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است. نمودار (۱) بیانگر نمونه ای است که هیچگونه عملیات خالص سازی روی آن انجام نشده است. نمودار (۲) بیانگر نمونه استاندارد بوده و از آن به عنوان شاهد در همه آزمایشات استفاده شده است. همانطور که در این نمودار مشخص شده پیکری که مربوط به (R.T) ۲۰. ۷۱ می باشد معرف ویتامین B12 است. نمودار (۳) بیانگر نمونه ای است که تحت عملیات خالص سازی قرار گرفته که با نمونه شاهد ویتامین B12 بخوبی مطابقت دارد.

نمودار ۱- نمونه اولیه قبل از عملیات خالص سازی

نمودار ۲- نمونه استاندارد ویتامین B12

از نتایج مهم در این پژوهش شستشوی کوبالامین تثبیت شده بر روی رزین توسط الکل های سبک آلیفاتیک متانول، اتانول و ایزوپروپانول می باشد که نسبت حلالهای مختلف بکار رفته

در فرآیند **gradient elution** بسیار اهمیت داشته که با استفاده از کاغذ TLC تعیین گردید.

بررسیهای تجربی نشان داد که مقدار کوبالامین در قسمتهایی از محلول های جمع آوری شده از زیرستون وقتی حداکثر است که مقدار نسبت حجمی حلالهای بکار رفته به صورت زیر باشد:

- ۱- متانول ۵۰-۲۵٪ حجمی - حجمی (gradient elution)
- ۲- اتانول ۴۰-۳۰٪ حجمی - حجمی (gradient elution)
- ۳- ایزوپروپانول ۱۰٪ حجمی - حجمی (isoeratic elution)

- بررسی معادله وان دیمیتتر^(۱) روی آمبرلیت XAD-4 و XAD-7

همانطور که قبلاً بیان گردید تثبیت کوبالامین بر روی دونوع آمبرلیت XAD-4 و XAD-7 صورت گرفت. قطر ذرات XAD-4 برابر 40 A° و قطر ذرات XAD-7 برابر 90 A° می باشد. با توجه به معادله وان دیمیتتر که تاثیر عواملی از جمله نفوذگر دابی، نفوذ طولی و انتقال جرم غیر تعادلی را بر روی بازده یک ستون بررسی می کند و با مقایسه نمودار ۳ و ۴ مشاهده می شود که با انتخاب آمبرلیت XAD-4 هر یک از عوامل معادله وان دیمیتتر به حداقل مقدار ممکن رسانده شد و حداکثر بازده کوبالامین دریافت گردید [۸ و ۹].

معادله وان دیمیتتر
 $H=A+(B/U)+CU$

نمودار ۳ - نمونه اولیه خالص سازی شده با ستون آمبرلیت XAD-

نمودار ۴- نمونه اولیه خالص سازی شده باستون آمبرلیت XAD-7

پی نوشت ها :

- | | |
|-------------------|--------------|
| 1- Amberlite | 5-Biomass |
| 2- Cyanocobalamin | 6-Vandemeter |
| 3- Cobalamin | |
| 4- Immobilization | |

References:

1. B.M. Babior, "The megaloblastic anemia," williams Hematology, **5**, 471-489 (1995).
2. E.H.Belcher, "Radioisotope in Medical diagnosis," Elsiver press, 412-436 (1971).
3. J. Zittoun and R. Zittoun, "Modern clinical testing strategies in cobalamin and folate deficiency," Semin. Hematol. **36** (1), 35-46 (1991).
4. S.J. Doaglas, "Process for the preparation of a ranitidine resin absorbate," U.S. Patent **5**, 219,563 (1990).
5. J.Astruc and A.Sambet, "Ion exchanger resin: spiramycin composition," U.S. patent **1**, 180,233 (1970).
6. S.Boredkin and D.P. Sundberg, "Chewable tables including coated particles of pseudoephedine weak cation exchanger resin," U.S. Patent **3**, 597,470 (1971).
7. Miles laboratories Inc, "Detection device for enzymes and other factors in body fluid," U.S. Patent **3**, 616,251 (1970).
8. E. Heftman and B.L. Karger and L.R.Snyder, "An itroduction to separation science," Chromatography (1979).
9. D.A.Skoog, and D.M. West, "Principles of instrumental analysis," Philadelphia. Saundlers. 677-679 (1980).

*Investigation for Preparation and production of Radio-Kit Vitamin B12 with
Med-grade (1.Report)*

**H.Ghafourian^{*}, M.Mazaheri Tehrani, S.A. Ezadyar, M.Shams Rafiee
A.Nazari,**

**Nuclear Research Center, AEOI
ghafourian@aeoi.org.ir**

Abstract: Labelled vitamin B12 with ⁵⁸Co is one of the important diagnostic Kits for patients affected by anemia. Insufficient absorption of vitamin B12 is one of the causes anemia in humans and one of the accurate methods for measurement of absorbed vitamin B12 is application radioactive B12 with radioisotope cobalt – 58. The isolation and purification from fermentation medium of *Streptomyces Olivaceus* is one of the important factor. The first experiment of this research was the isolation and purification by using different resins with solution of cyanocobalamin containing cobalt-59 that was produced by this bacterium. After investigation and pre-feasibility experiments two nonpolar resins XAD-4 and XAD-7 were selected. The results of the different experiments on XAD-4 and XAD-7 showed that the best yield for immobilization cobalamin by resin XAD-4 obtained. The isolation of vitamin B12 on XAD-4 column was achieved by different solvents such as methanol, ethanol and isopropanol in the different ratio concentrations. The results of TLC (Thin Layer Chromatography) showed that the best eluting solution for desorption of cobalamin from XAD- 4 column are solvents such as methanol, ethanol and isopropanol with maximum concentration of vitamin B12 in limit range of concentrations 25 up 50 percent, 30 up 40 percent and 10 percent respectively. The collected cobalamin in acetone solution was crystallized in low temperatures .

Key words: vitamin B12, isolation, purification, amberlite.

1- Introduction

Vitamin B12 (cyanocobalamin) is an organo – metal complex which contains cobalt as a central atom. The structure of vitamin B12 is shown in figure (1).

Figure1- The structure of vitamin B12

Labelled vitamin B12 with radioisotopes of cobalt has very important applications and could be used for diagnosis in nuclear medicine.

Radioactive labelled vitamin B12 is most commonly used for assessing the absorptive function of small intestine.

Radioactive labelled B12 absorption tests have main application in the investigation of patients with megaloblastic anemia the characteristic macrocytic produced by deficiency of this vitamin and in the investigation of the intestinal malabsorption syndrome(2,4).

Vitamin B12 may be labelled with one of the radioisotopes of cobalt, such as ^{56}Co , ^{57}Co and ^{58}Co . It is very important that the absorption dose delivered by the labelling isotope in body should be as ALARA law. Because of the low radiation dose, the short half – life and measurable efficiently in all types of counters, the radioisotope of ^{58}Co is the most suitable of labelling source for application in nuclear medicine.

The measurement of B12 absorption by labelled vitamin B12 essentially is in two – stage procedure and the absorption of B12 can be assessed by different methods such as urinary excretion method of Schilling(4,10).

In the first stage of this research the isolation and purification of sample containing nonradioactive vitamin B12 with chloride cobalt hexa as one of the materials of production medium was tested.

In the second stage of the research after optimization and purification will be prepare Radio – Kit vitamin B12 by labelled cobalt-58. Since 1945 many methods have been applied for separation and purification of analogs of cobalamin. The most preliminary of those are such as alumin, active charcol, silica jel(5).

One of the most common and efficient methods for isolation analogs of cobalamin is chromatography by Ion-Exchanger. Polymeric amberlites (XAD) are group of nonpolar resins which will be used for separation and purification of antibiotics, B vitamins group, insecticide which have chloride, various nitro aromatic compound and hydrogen peroxides. The most important of this amberlite group are XAD-2, XAD-4 and XAD-7. XAD-2 and XAD-4 are nonpolar resins which have more application for analysis and separation of environmental organic compounds. So XAD-7 resin is an intermediate polar compound which absorbs phenols compound. This kind of resin can absorb either hydrophobic materials from water or hydrophilic material from nonaqueous systems(9). The characteristics of this kind of resins is shown in table (1).

Catalogue number	Code	Matrix	Size	Surface contact	Mean diameter
21646-1	XAD-2	Polystyrene	20-60	300	90
21648-8	XAD-4	Polystyrene	20-60	725	40
21649-6	XAD-7	Acrylicester	20-60	450	90

Table1-The characteristics of (XAD) amberlites

The chemical structure of amberlite- Because of various structure of all amberlite, study is impossible. IR-P64 is a type of amberlite which has applied for separation and purification vitamin B12. The matrix of this amberlite is made by methacrylic acid and divinyl benzen. The chemical structure and IR-Spectrum of IR-P64 are shown in below figures(1,3).

Figure2-IR-spectrum(right)and the chemical structure of IR-P64 (left)

2- Materials and Apparatuses

1-2-The chemical materials: amberlites IR-120, IR-140, XAD-4, XAD-7, ethylalcohol (Merck), methanol (Merck, 99%), acetone (Merck), two distilled water, TLC

2-2-Apparatuses: HPLC (Intertail OSD-2), PH meter (744 Metrom), UV lamp 254 nm, Rotary (4002 Heidolph), vacuum pump (Shimadzu)

3- Methods

1-3-Preparation of deionization of distilled water- In order to separate of ions containing in distilled water and decrease conductivity is used the resins IR-410 and IR-120.

Two columns with a length of 50 cm and diameter of 0.5 cm containing IR-410 and IR-120 are designed. The distilled water was crossed through a cationic column IR-120 and then anionic column IR-410.

Conductivity of deionized water in the different temperatures 25-70 °C before entrance to the first column and after departure of the second column was measured and given in table(2).

Temperature (°C)	Conductivity(μs)	
	1*	2*
25	59.3	44.42
35	56.5	41.2
40	55.2	40.1
45	53.6	38.2
50	51.9	41.1
55	50.9	40.6
60	48.8	40.8
60	47.2	40.0
65	46.6	42.1

Table2-Conductivity of distilled water in the different temperatures

1*=Before of ion-exchanger column 2*=After of ion-exchanger column

With attention to the table(2) results in order deionization of distilled water temperature 45°C because of the lowest conductivity is selected.

2-3-Immobilization of cobalamin on amberlite XAD-4 and XAD-7

First was filtered for separation of biomass from fermentation medium, then is centrifuged to obtain a solution without insoluble materials and for increasing

concentration of vitamin B12 by rotary apparatus in vacume was distilled. The concentrated solution was fixed on XAD-4 and XAD-7.

For fixing 10 ml of concentrated solution was transfered into a ballon with volume of 500 ml. Then about 7 equal volume of solution, resin was added and about 3 hours was mixed. Then the mixture was transfered to the rotary

until the resin missed all of the moisture.

We desinged a column containing resin plus vitamin B12 with the same size as was used for deionization of water(7).

3-3- Desorption Operations of immobilized vitamin B12 on column

In order isolation and purification vitamin B12 from columns XAD-4 and XAD-7, solutions with below concentrations by TLC prepared.

- 1- Methanol solution in concentrations 25-50 percent volume
- 2- Ethanol solution in concentrations 30-40 percent volume
- 3- Isopropanol solution in concentration 10 percent volume.

After eluting column with top solvents, the fractions deduced of eluting were gathered. Then each fraction is transfered to rotary to miss solvent. The residue parts with acetone were put in the refrigerator to form crystal of cobalamin.

4- Result and discution

Results of separation operations with comparison chromatograms HPLC of standard vitamin B12 and test sample are shown in graphs 1, 2 and 3.

Graph(1): related to a sample which has no separation and isolation process.

Graph (2): related to standard solution that it is used as blank in all of the experiments.

Graph (3): related to sample which separation and isolation operation has been done on it. It correspond with blank sample.

Graph 1- The first sample before of the purification operations

Graph 2-The standard sample of vitamin B12

Important result in this research is the eluting fixed cobalamin on resin by aliphatic alcohols such as methanol, ethanol and isopropanol and ratio concentration solvents in gradient elution is very important that by TLC paper determined. The experimental method showed that the maximum cobalamin with below solvents with related ratio Concentrants concluded.

- 1- Methanol (25%-50%) V-V gradient elation.
- 2- Ethanol (30%-40%) V-V gradient elation.
- 3- Isopropanol 10% V-V isoeratic elation.

Study Vandemeter equation on XAD-4 and XAD-7

As we mentioned in advance fixing of cobalamin was done on XAD-4 and XAD-7. The average diameter of XAD-4 and XAD-7 is 40, 90 °A respectively.

With attention to vandemeter equation and comprison graph 3 and 4 with selection amberlite XAD-4 each of the parameters A,B and C has a minimum amount and the maximum yield of cobalamin obtained. (6,8)

$$\text{Vandemeter equation} \quad H = A + (B/U) + CU$$

Graph 3- The first purified sample with XAD-4

Graph 4- The first purified sample with XAD-7

5- References

- 1- Astruc j., Sambet, A., (1970) Ion Exchanger resin: spiramycin Composition. US patent 1, 180,233
- 2- Babior, B.M., (1995) The megaloblastic anemias. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller Bs, Kipps Tj , eds. Williams Hematology, 5 th ed Newyork, Mc Graw-Hill, PP. 471-89
- 3- Boredkin, S., Sundberg, D.P., (1971) Chewable tables including Coated particles of psuedoephedine weak cation exchanger resin. US patent 3,597470
- 4- Belcher, E.H., (1971) Radio isotope in Medical diagnosis. Elsilver, London, PP. 412-436
- 5- Doaglas, SJ., Galxo Group Research Ltd. (1990) Process for the preparation of a ranitidine resin absorbate. US patent 5,219563
- 6- Heftman. E., Chromatography, 3d ed . Newyork: Van Nostrand Rein-hold, 1975, B.L.Karger, L.R.Snyder, and C. Horvath, An Introduction to Separation Science. Newyork: Wiley 1973; J.M. Miller, Separation Methods in Analysis Newyork: Wiley, 1975; R. Stock c.B.F.Rice, chromatographic Methods. 3d ed London Chapman and Hall, 1974: and Chromatographic and Applied Methods, O.Mikes, Ed Newyork: Wiley, 1979
- 7- Miles Laboratories InC, (1970) Detection device for enzymes and other factors in body fluid. US patent 3,616, 251
- 8- Skoog, D.A., West, D.M. (1980) principles of Instrumental analysis, 2d ed., pp.677-679. Philadelphia: Saunders.
- 9- Schubert H.L., Raux E., Matthews M.A., (2002) Structural diversity in metal ion chelation and the structure of urosynthase. Biochem. Soc.Trans 30 (1): 595-600
- 10- Zittoun. J., Zittoun, R.,(1991) Modern Clinical testing strategies in cobalamin and folate deficiency. Semin Hematol. Jan., 36(1): 35-46

بررسی و تحقیق بمنظور تهیه و تولید رادیوداروی
ویتامین B12 با درجه خلوص پزشکی
(گزارش اول)

حسین غفوریان*، مریم مظاهری تهرانی، سیدعلی ایزدیار، امین
نظری، منوچهر افلاکی
مرکز تحقیقات هسته ای - سازمان انرژی اتمی ایران،
ghafourian@aeoi.org.ir

چکیده: ویتامین B12 نشاندار با کبالت - ۵۸ یکی از کیت‌های تشخیصی مهم در بیماران مبتلا به کم خونی است. عدم جذب کافی ویتامین B12 یکی از علل کم خونی در انسانها بوده و یکی از روش‌های دقیق سنجش میزان جذب آن، کاربرد رادیوداروی ویتامین B12 نشاندار شده با رادیو ایزوتوپ کبالت - ۵۸ می باشد. مهمترین مرحله تولید ویتامین B12 نشاندار جداسازی و خالص سازی ویتامین از محیط تخمیر باکتری *Streptomyces Olivaceus* می باشد. لذا در مرحله اول این تحقیق مطالعه و بررسی جهت جداسازی و تخلیص با استفاده از رزین‌های مختلف بر روی نمونه های سیانوکوبالامین حاوی کبالت- ۵۹ تولید شده توسط باکتری فوق انجام شد. در بررسیها و آزمایشهای اولیه دورزین غیرقطبی XAD-4 و XAD-7 انتخاب شد. نتایج آزمایشهای مختلف بر روی XAD-4 و XAD-7 نشان داد که بهترین راندمان جهت تثبیت کوبالامین بوسیله رزین XAD-4 بدست آمد. در مرحله بعدی، تحقیقات جهت جداسازی ویتامین در روی ستون XAD-4 با استفاده از حلالهای متانول، اتانول و ایزوپروپانول در غلظتهای مختلف انجام شد. نتایج حاصل از TLC (کروماتوگرافی لایه نازک) نشان داد که بهترین محلول شستشو جهت واجذب کوبالامین از روی ستون XAD-4 استفاده از حلالهای متانول، اتانول و ایزوپروپانول با حداکثر غلظت ویتامین B12 در محدوده غلظتهای ۲۵ تا ۵۰ درصد، ۳۰ تا ۴۰ درصد و ۱۰ درصد برای حلالهای فوق بترتیب می باشد. کوبالامین واجذب شده در حضور استن در دمای پائین متبلور شد.

واژه های کلیدی: ویتامین B12، جداسازی، خالص سازی، آمبرلیت^(۱)