

## Rozklad vitamínu B<sub>12</sub> ozónom

J. KONEČNÝ, J. TÖLGYESSY

*Katedra rádiochemie a radiačnej chémie Slovenskej vysokej školy technickej,  
Bratislava*

Vypracovala sa metóda na uvoľnenie kobaltu z molekuly vitamínu B<sub>12</sub> jej rozkladom pôsobením ozónu. Stanovením množstva uvoľneného kobaltu izotopovou zriedovacou analýzou alebo komplexometrickou rádiometrickou titráciou možno takto určiť množstvo vitamínu B<sub>12</sub>. Uvádza sa použité experimentálne zariadenie a opisuje sa štúdium kinetiky rozkladu.

Použitie označeného vitamínu B<sub>12</sub> umožňuje stanoviť neaktívny vitamín B<sub>12</sub> nukleárnymi analytickými metódami, predovšetkým izotopovou zriedovacou analýzou [1]. Označený vitamín B<sub>12</sub> sa získa buď neutrónovou aktiváciou [2, 3], alebo fermentačnou syntézou v prostredí obsahujúcom vhodný rádioizotop kobaltu [4]. V prvom prípade sa získa preparát o veľmi nízkej špecifickej aktivite. V mnohých prípadoch je vitamín B<sub>12</sub> viazaný na biologické zložky, ako sú proteíny, kde dokonalá homogenizácia, predpokladaná pri použití izotopovej zriedovacej analýzy, je komplikovanejšia a zahrnuje rozličné separačné a čistiacie postupy.

Kobalt v trojmocnej forme je veľmi pevne viazaný v korinovom komplexe. Pevná centrálna väzba veľmi sťažuje izotopovú výmenu, ktorá pri kobalte viazanom v molekule vitamínu B<sub>12</sub> vôbec nenastáva. V prípade neprítomnosti rušivých iónov kovu by bolo výhodné stanoviť vitamín B<sub>12</sub> na základe určenia množstva uvoľneného kobaltu.

Kobalt možno z molekuly vitamínu B<sub>12</sub> uvoľniť chemickou cestou pôsobením 5 N-HCl, keď sa eliminuje ochranná skupina —CN, viazaná na kobalt, a súčasným pôsobením kyseliny askorbovej, ktorá svojím redukčným účinkom rozruší molekulu [5]. Tým sa však do analyzovaného systému prídavkom chemikálií (predovšetkým HCl) dostávajú stopy kovov, ktoré majú mimoriadne rušivý vplyv na rádiokomplexometrické stanovenie kobaltu, čím sa silne zvyšuje aj koncentrácia soli v roztoku, čo má za následok komplikovanosť sorpčných procesov pri oddeľovaní kobaltu na vymieňačoch iónov (pri ionexových rádiometrických titráciách).

Na základe uskutočnených štúdií pre účely rádiometrického stanovenia je najvýhodnejšie rozrušiť molekulu vitamínu B<sub>12</sub> pôsobením ozónu.

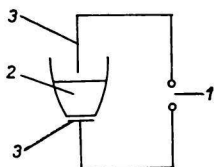
### Experimentálna časť

#### *Uvoľnenie kobaltu z molekuly vitamínu B<sub>12</sub>*

Študovali sa dve techniky rozkladu molekuly vitamínu B<sub>12</sub> pôsobením ozónu:

1. Iskrový výboj cez analyzovaný roztok, pri ktorom sa ozón tvorí priamo v roztoku z prítomného rozpusteného kyslíka, resp. v ovzduší tesne nad roztokom (obr. 1). Do roztoku sa však týmto spôsobom dostávajú časti kovovej (i platinovej) elektródy. Viditeľnému zákalu v roztoku sa nedá zabrániť ani zatavením kovovej elektródy do skla.

2. Priame zavádzanie ozónu, vyrobeného v ozonizátore, do skúmaného roztoku. Tento spôsob rozkladu sa ukázal veľmi výhodným.

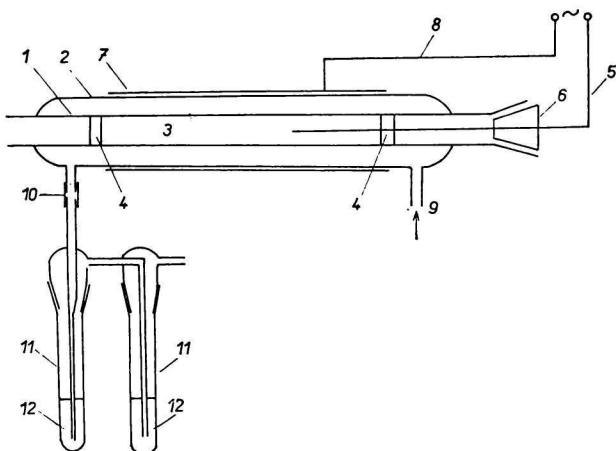


Obr. 1. Rozklad vitamínu B<sub>12</sub> iskrovým výbojom cez skúmaný roztok.

1. zdroj vysokého napätia (asi 5 kV);  
2. skúmaný roztok; 3. elektródy.

### Zariadenie na ozónovanie

Schéma zariadenia je na obr. 2. Vo vnútri trubice 1 je kovová náplň 3 z odmastených mosadzných pilín, ktorá slúži ako jedna elektróda. Plášť 2 je opatrený obalom z niekoľkokrát na seba navrstvenej hliníkovej fólie. Hliníková fólia tvorí druhú elektródu systému. Prívodné drôty k elektródam sa pripoja na vhodný zdroj vysokého napätia, ktorý zabezpečuje minimálne napätie 20 kV. Vysušený vzduch vo výboji medzi elektródami 3 a 7 sa obohacuje ozónom a potom sa prebubláva cez skúmané roztoky 12, obsahujúce vitamín B<sub>12</sub>.



Obr. 2. Zariadenie na ozónovanie.

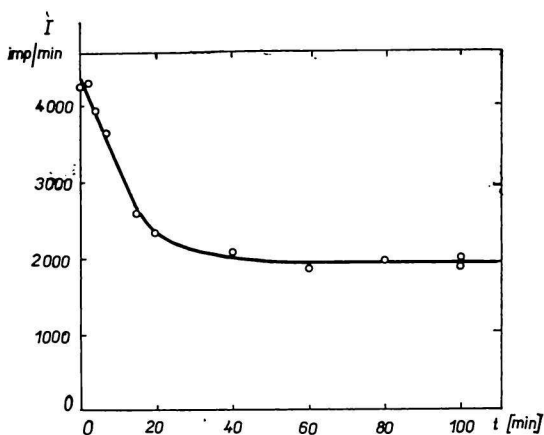
1. sklená trubica; 2. sklený plášť; 3. kovová náplň; 4. korkové zátky; 5. medený drôt; 6. gumová zátkka; 7. obal z hliníkovej fólie; 8. prívodný drôt; 9. vstup vysušeného vzduchu; 10. polyetylénová hadička; 11. zábrusové skúmavky; 12. skúmané roztoky.

### Štúdium kinetiky rozkladu vitamínu B<sub>12</sub> ozónom

Rýchlosť rozkladu vitamínu B<sub>12</sub> sa sledovala tak, že sa komplexometrickou rádiometrickou titráciou analyzovali roztoky vitamínu B<sub>12</sub> [6], ktoré boli rôznu dobu v styku s ozónom. Do zábrusových skúmaviek sa z byrety odmerali rovnaké množstvá štandardného roztoku vitamínu B<sub>12</sub>. (Na prípravu štandardného roztoku vitamínu B<sub>12</sub> sa použil štandardný preparát fy Jenapharma VEB, NDR.) Skúmavky sa nasadili na ozónovacie

zariadenie a vzorky sa ozónovali rôznu dobu. Potom sa obsah skúmaviek kvantitatívne preniesol do kadičiek a uviedol sa do varu na odstránenie nadbytočného ozónu. Var sa udržiaval asi 1–2 minúty a potom sa roztoky nechali voľne ochladiť. Do každej kadičky sa pridali presne rovnaké množstvá indikátorového roztoku kobaltu ( $^{60}\text{Co}$ ) a roztoky sa titrovali  $10^{-5}$  M odmerným roztokom EDTA použitím Dowexu W-X2 na oddelenie produktov titrácie od východiskových zložiek. Výsledky titrácie sa vyhodnocovali metódou kalibračnej krivky [6].

Na obr. 3 vidieť grafické znázornenie rýchlosti rozkladu vitamínu  $\text{B}_{12}$  pôsobením ozónu. Aktivity vynášané na os poradníc sa získali meraním rozdielu aktivít vymieňača kationov (Dowex 50 W-X2 v  $\text{Na}^+$  cykle) za použitia  $10^{-5}$  M odmerného roztoku EDTA v množstve 0,20 ml. Z molekuly vitamínu  $\text{B}_{12}$  postupne uvoľňovaný kobalt znižuje špecifickú aktivitu izolovaného substechiometrického množstva kobaltu, čo sa prejavuje poklesom nameranej aktivity s časom. (Podrobný postup pri analýze je opísaný v práci [6].)



Obr. 3. Závislosť množstva kobaltu, stanoveného rádiokomplexometrickou titráciou, od doby ozónovania.

Z obr. 3 vyplýva, že množstvo uvoľneného kobaltu po určitom čase dosiahlo konštantnú hodnotu. Táto doba sa potom berie do úvahy pri vlastných analýzach vitamínu  $\text{B}_{12}$ , a to či už izotopovou zriedovacou analýzou, alebo rádiometrickou titráciou. Pre daný systém sa odčítala jednoodhodinová optimálna doba ozónovania.

Presné množstvo kobaltu možno určiť pomocou kalibračnej krivky zostrojenej na stanovenie submikrogramových množstiev kobaltu [7]. Z takto stanoveného množstva kobaltu sa potom vypočítalo množstvo vitamínu  $\text{B}_{12}$ . Zistilo sa, že po jednoodhodinovej dobe ozónovania nastáva pri vitamíne  $\text{B}_{12}$  úplný rozklad.

Je zaujímavé, že veľmi slabé červené sfarbenie roztokov vitamínu  $\text{B}_{12}$  o koncentracii 2–10  $\mu\text{g}/5$  ml (koncentrácia analyzovaných roztokov) zmizne v priebehu jednej minúty, kým uvoľnenie kobaltu v iónovej forme nastáva až omnoho neskôr. Možno tu, pravda, predpokladať najprv rozklad dvojitych väzieb zapríčiňujúcich farebnosť a až potom ďalšiu hlbšiu deštrukciu.

Vypracovaná metóda rozkladu vitamínu  $\text{B}_{12}$  sa javí ako veľmi výhodná na kvantitatívne uvoľňovanie kobaltu z pevnej centrálnej väzby. Navrhovaným postupom sa zabráni vnášaniu stôp nečistôt vo forme kovových iónov prídavkom chemikálií. Stupeň rozkladu je taký, že kobalt sa uvoľní v požadovanej iónovej forme a stanovením jeho množstva izotopovou zriedovacou analýzou alebo rádiometrickou titráciou môžeme určiť množstvo vitamínu  $\text{B}_{12}$  v skúmanej vzorke.

РАСЩЕПЛЕНИЕ ВИТАМИНА B<sub>12</sub> ОЗОНОМ

Й. Конечни, Ю. Тэльдеши

Кафедра радиохимии и радиационной химии Словацкого политехнического института,  
Братислава

Разработан метод выделения кобальта из молекулы витамина B<sub>12</sub> ей расщеплением действием озона. Приводятся использованное экспериментальное оборудование, оптимальный срок озонизации (1 час) и изучение кинетики расщепления. Предлагаемым способом можно предотвратить внесение следов загрязнений в анализируемую систему при подачи реактивов. Определением выделенного кобальта в желательном ионном состоянии изотопным методом разбавления или радиометрическим титрованием можно определить количество витамина B<sub>12</sub> в испытуемом образце.

*Preložil M. Fedoroňko*

ZERSETZUNG DES VITAMINS B<sub>12</sub> DURCH OZON

J. Konečný, J. Tölgyessy

Lehrstuhl für Radiochemie und Strahlungschemie an der Slowakischen Technischen  
Hochschule, Bratislava

Es wurde eine Methode zur Freisetzung des Kobalts aus dem Vitamin B<sub>12</sub>-Molekül durch dessen Zersetzung mit Ozon ausgearbeitet. In der vorliegenden Arbeit wird die verwandte experimentelle Vorrichtung, die optimale Dauer der Ozonisierung (1 Std.) und das Studium der Zersetzungs kinetik angeführt. Durch das vorgeschlagene Verfahren wurde einem Eintragen von Verunreinigungsspuren in das zu analysierende System durch Zugabe von Chemikalien vorgebeugt. Durch die Bestimmung des freigesetzten Kobalts in der gewünschten Ionenform durch die Isotopenverdünnungsanalyse oder durch die radiometrische Titration kann man die Menge des Vitamins B<sub>12</sub> in der untersuchten Probe bestimmen.

*Preložil K. Ullrich*

## LITERATÚRA

1. Rosenblum C., *Talanta* **11**, 255 (1964).
2. Anderson R. C., Delabarre T., *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 4051 (1951).
3. Smith E. L., *Biochem. J.* **52**, 384 (1952).
4. Chaiet L., Rosenblum C., Woodbury D. T., *Science* **111**, 601 (1950).
5. Fragner J., Blatná J., *Vitamíny, jejich chemie a biochemie*. Nakladatelství ČSAV, Praha 1961.
6. Konečný J., Tölgyessy J., Šaršúnová M., *Z. anal. Chem.* (v tlači).
7. Konečný J., Tölgyessy J., *Sborník vedeckých prác chemických katedier UK*, Bratislava 1966 (v tlači).

Do redakcie došlo 22. 3. 1966

*Adresa autorov:*

*Inž. Jiří Konečný, doc. inž. Juraj Tölgyessy, CSc., Katedra rádiochemie a radiačnej chemie SVŠT, Bratislava, Jánska 1.*