

The spectra of the heptanic solutions show a single, intense, large and smooth band due to the $N \rightarrow V$ type transition. The position of the band maximum is defined within a few $m\mu$. In the case of monoolefinic alcohols, the measurements on parent olefinic hydrocarbons with respect to intensity and position of maxima have been confirmed. As to the polyolefinic alcohols, the UV. spectra will allow to determine the number of double bonds involved.

Laboratoires de Recherches de
GIVAUDAN, Société Anonyme,
Vernier-Genève

287. Dosage de traces de vitamine B_{12} par celui du groupe CN qu'elle renferme

par D. Monnier, R. Saba et Y. Galiounghi

Dédié au professeur TH. POSTERNAK à l'occasion de son soixantième anniversaire

(9 IX 63)

La vitamine B_{12} ($C_{63}H_{88}O_{14}N_{14}PCo$) renferme, entre autre, 1 atome de cobalt, 1 groupe CN^- et le radical caractéristique diméthyl-5,6-benzimidazole.

De nombreuses méthodes de dosage ont été proposées. La méthode colorimétrique directe recommandée par la pharmacopée helvétique V n'est ni assez sensible, ni assez sélective pour le but que nous nous proposons de doser des traces de B_{12} dans les produits pharmaceutiques. La méthode polarographique permet de déceler jusqu'à 0,02 μg de B_{12} mais les résultats ne sont pas reproductibles. BACHER et coll.¹⁾ utilisent la méthode de dilution isotopique: elle ne permet pas de doser moins de 5 μg de vitamine. RUDKIN & TAYLOR²⁾ transforment la B_{12} en di-cyanocobalamine, le complexe formé est extrait par l'alcool benzylque, puis par l'eau et dosé par colorimétrie. BOXER & RICKARDS³⁾ déterminent le groupement diméthyl-5,6-benzimidazole par colorimétrie et fluorimétrie. IRELAND & FANTES⁴⁾ font une hydrolyse et estérifient les acides rouges qui en résultent. Toutes ces méthodes sont relativement peu sensibles, et les résultats, peu reproductibles.

Tableau I. Vitamine B_{12} et ses principaux analogues

Nom	Groupe mobile	Radical caractéristique dérivé de	Source naturelle
Cyanocobalamine (B_{12})	CN^-	diméthyl-5,6-benzimidazole	foie et liqueur de fermentation
Hydroxocobalamine (B_{12a})	OH^-	diméthyl-5,6-benzimidazole	liqueur de fermentation ou décomposition de la B_{12}
Aquocobalamine (B_{12b})	OH_2	diméthyl-5,6-benzimidazole	les mêmes que pour la vit. B_{12a}
Nitrocobalamine (B_{12c})	NO_2^-	diméthyl-5,6-benzimidazole	liqueur de fermentation
Pseudo-vitamine B_{12}	CN^-	adénine	matière fécale de porc

¹⁾ F. A. BACHER, A. E. BOLEY & C. E. SHONK, *Analyt. Chemistry* **26**, 1146 (1954).

²⁾ G. O. RUDKIN & R. J. TAYLOR, *Analyt. Chemistry* **24**, 1155 (1952).

³⁾ G. E. BOXER & J. C. RICKARDS, *Arch. Biochemistry* **29**, 75 (1950).

⁴⁾ K. H. FANTES & D. M. IRELAND, *Biochem. J.* **46**, XXXIV (1950).

Nous avons publié⁵⁾ une méthode très sensible qui consiste à doser colorimétriquement (nitroso-sel R) le cobalt renfermé dans la B₁₂, après séparation des substances gênantes (entre autre le cobalt ionique) et destruction de la vitamine. La méthode donne de bons résultats jusqu'à 5 µg par ml de cette dernière, présente une bonne sélectivité mais ne permet pas le dosage de la B₁₂ en présence de ses analogues puisque la plupart d'entre eux renferment du cobalt (voir tableau I).

Tous ces composés renferment 1 atome de cobalt fortement lié.

Le groupe CN⁻ étant pratiquement spécifique de la vitamine B₁₂ (la pseudovitamine B₁₂ en contient également mais on la rencontre rarement), il est possible de déterminer la concentration de celle-ci en présence de ses analogues, par un dosage du cyanure qu'elle renferme. Deux difficultés se présentent: le cyanure ne représentant que le 2% du poids de la B₁₂, il faut donc disposer d'une méthode de dosage très sensible. De plus, on observe parfois, lorsqu'on chauffe en présence d'acide certaines substances biologiques ou pharmaceutiques exemptes de B₁₂, une libération de cyanure susceptible de fausser le dosage; des séparations préalables sont donc nécessaires. Il ne semble pas que les auteurs ayant utilisés cette méthode de dosage soient parvenus à éviter cette grave cause d'erreur.

Parmi ceux-ci citons NORMANN et coll.⁶⁾ qui dégradent la vitamine B₁₂ avec le permanganate de potassium en milieu acide. L'acide cyanhydrique libéré est entraîné par un courant d'azote, absorbé dans la soude caustique et dosé colorimétriquement. D'autres auteurs utilisent l'oxalate à la place du permanganate. BOXER & RICKARDS⁷⁾ dosent le HCN dégagé par l'action réductrice de l'acide hypophosphoreux à 100° sur la vitamine B₁₂. Ces auteurs ont aussi étudié l'effet de la lumière sur la B₁₂ en fonction du pH et PAHLOUDEK, FABINI & BROCKELT⁸⁾ dosent le cyanure libéré par photolyse (sensibilité: 5 à 50 µg de B₁₂; erreur maximum ± 10%).

Nous proposons une microméthode qui comprend la libération du groupe CN de la B₁₂ par rayonnement UV. en milieu acide et la séparation de l'HCN formé, en cuve de CONWAY, par microdiffusion isothermique. Cette méthode est plus sensible, plus sélective que celles citées ci-dessus. Grâce à un procédé de séparation que nous avons développé, elle peut s'effectuer sur des échantillons renfermant du cyanure minéral et des substances susceptibles d'en libérer.

I. Dosage et séparation du cyanure. - 1. *Etude analytique.* Parmi les méthodes colorimétriques proposées pour le dosage de traces de cyanure nous ne citerons que celles dont la sensibilité est inférieure ou égale au µg/ml, basées sur la formation d'isopurpurate rouge (1 µg/ml)⁹⁾ et sur la formation de bleu de prusse (sensibilité: 0,5 µg/ml)¹⁰⁾. KOLTHOFF¹¹⁾ utilise la phénolphtaline (sensibilité: 0,5 µg/ml), et NICOLSON¹²⁾, l'*o*-crésophtaline (sensibilité: 1 µg/ml). La méthode d'ALDRIGE¹³⁾ à la pyridinebenzidine a une sensibilité de 0,02 µg/ml. Elle a été modifiée par BAKER & FOR-

⁵⁾ D. MONNIER, Y. GALIOUNGHI & R. SABA, *Analyt. chim. Acta* 20, 30 (1963).

⁶⁾ G. NORMANN, A. KUEHL et coll., *Science* 72, 354 (1950).

⁷⁾ G. E. BOXER & J. C. RICKARDS, *Arch. Biochemistry Biophysics* 30, 372 (1950).

⁸⁾ R. PAHLOUDEK, R. FABINI & G. BROCKELT, *Pharmazie* 14, 253 (1959).

⁹⁾ A. D. WALLER, *J. Amer. chem. Soc.* 37, 601 (1911).

¹⁰⁾ A. O. GETTLER & L. GOLDBAUM, *Analyt. Chemistry* 19, 922 (1947).

¹¹⁾ I. M. KOLTHOFF, *Z. Analyt. Chem.* 57, 11 (1918).

¹²⁾ R. I. NICOLSON, *Analyst* 66, 189 (1941).

¹³⁾ W. N. ALDRIGE, *Analyst* 69, 262 (1944).

STER¹⁴), NUSSBAUM & SKUPEK¹⁵). Nous lui préférons pourtant celle d'EPSTEIN¹⁶) à la pyridine-pyrazolone, améliorée par KRUSE & MELLON¹⁷), LUDZACK et coll.¹⁸) puis par JORGENSEN¹⁹). Nous y avons apporté encore un certain nombre de modifications qui nous permettent de doser des quantités de B₁₂ de l'ordre du μg .

Réactifs (voir mode opératoire, p. 2561).

1) Solutions étalons de cyanure de concentrations comprises entre 0,4 et 0,004 $\mu\text{g/ml}$.

2) Solution de chloramine T à 0,1%.

3) Réactif d'EPSTEIN ou réactif de JORGENSEN.

Réactif d'EPSTEIN: à 50 ml d'une solution saturée de méthyl-3-phényl-1-pyrazolone-5 (monopyrazolone), on ajoute 10 ml d'une solution de bis-pyrazolone dans la pyridine à 10%. A conserver dans un flacon brun à 4°.

Réactif de JORGENSEN. Mélange de 1 partie de bis-pyrazolone et 5 parties de monopyrazolone solides. Avant l'emploi on dissout 300 mg du mélange précédent dans 50 ml de pyridine.

Principe de la méthode. Le cyanure est transformé en chlorure de cyanogène par la chloramine T, puis en chlorure de cyanopyridine par la pyridine. Le cycle pyridinique s'ouvre par hydrolyse et donne l'aldéhyde glutaconique. Ce dernier, condensé avec deux molécules de monopyrazolone, forme un complexe qui, après avoir passé par le rose et le violet, acquiert une coloration bleue dont le maximum d'absorption est à 630 $m\mu$.

Développement et stabilité de la coloration. La coloration bleue atteint son maximum après 80 min. à la température ambiante (voir mode opératoire, p. 2561). Elle reste stable environ 90 min. ($\pm 2\%$ près) puis elle diminue lentement et vire au jaune après 24 heures. Une trop grande quantité de chloramine T décolore la solution. Dans nos conditions on obtient une coloration stable et reproductible avec 0,2 ml d'une solution de chloramine T à 0,1%. L'excès est éliminé par addition d'une quantité suffisante de réactif de JORGENSEN ou d'EPSTEIN. La bis-pyrazolone renfermée dans ces réactifs augmente la stabilité de la coloration. Nous avons remarqué que la durée du traitement par la chloramine ne doit pas dépasser une minute. Au-delà, la coloration diminue car il se produit des pertes par volatilisation du chlorure de cyanogène, qui atteignent 4% après 5 min. Il faut donc effectuer cette opération dans la glace.

L'étude de l'effet du pH entre 3 et 13, effectuée sur des solutions tamponnées renfermant 0,4 $\mu\text{g/ml}$ de cyanure, montre que la coloration est maximum entre les pH 4

Tableau II. Développement de la coloration avec le réactif d'EPSTEIN en fonction du pH
Volume de la solution: 7 ml, conc. de CN 0,0571 $\mu\text{g/ml}$

pH	3	4	5	6	7	8	9	13
Densité optique	0,218	0,225	0,227	0,226	0,227	0,223	0,221	0,000
CN ⁻ trouvé μg	0,384	0,396	0,400	0,398	0,400	0,393	0,389	0,000
%	96	99	100	99,5	100	98,2	97,2	0

¹⁴) M. O. BAKER & R. A. FORSTER, *Analyt. Chemistry* 27, 448 (1955).

¹⁵) I. NUSSBAUM & P. SKUPEK, *Sewage and industr. Wastes* 25, 875 (1951).

¹⁶) J. EPSTEIN, *Analyt. Chemistry* 19, 272 (1947).

¹⁷) F. H. KRUSE & M. G. MELLON, *Analyt. Chemistry* 25, 447 (1953).

¹⁸) F. J. LUDZACK & C. C. RUCHHOFT, *Analyt. Chemistry* 26, 1784 (1954).

¹⁹) K. JORGENSEN, *Acta chem. scand.* 9, 49 (1955).

et 7 (voir tableau II). En dehors de ces limites, elle s'atténue et disparaît même en milieu fortement alcalin.

Pour augmenter l'intensité de la coloration, NUSSBAUM & SKUPEK²⁰⁾ proposent d'extraire le complexe coloré par le *n*-butanol. En fait cette opération est très délicate car le butanol forme, avec la phase aqueuse, une émulsion difficile à rompre. JORGENSEN¹⁹⁾ a modifié la composition du réactif pyridine-pyrazolone (voir p. 2560) de sorte qu'il n'emploie que 0,8 ml de celui-ci alors qu'il faut 5,8 ml du réactif d'EPSTEIN.

Remarquons que dans la méthode d'EPSTEIN la coloration ne se forme plus lorsque la teneur en cyanure est inférieure à 0,04 $\mu\text{g/ml}$.

Nous proposons un mode opératoire quelque peu différent (voir ci-dessous). Comme le montre le tableau III, la méthode qui en dérive est plus sensible avec le réactif de JORGENSEN qu'avec celui d'EPSTEIN.

Tableau III. *Sensibilité des réactifs d'EPSTEIN et de JORGENSEN selon notre mode opératoire*
D = densité optique

CN ⁻ μg	0,400	0,240	0,200	0,120	0,080	0,040	0,020	0,012	0,004
D { réactif d'EPSTEIN	0,227	0,135	0,114	0,070	0,050	0,020	—	—	—
{ réactif de JORGENSEN	0,765	0,460	0,370	0,230	0,153	0,077	0,036	0,018	0,007

Mode opératoire. 1 ml de la solution de cyanure (à moins de 0,6 $\mu\text{g/ml}$) est introduit dans une petite éprouvette refroidie dans de la glace. On ajoute 0,2 ml d'une solution de chloramine T à 0,1% et on agite doucement. Après 1 à 2 min., on ajoute 0,8 ml du réactif de JORGENSEN (voir p. 2560). On mélange bien en procédant par rotation.

Après 80 à 90 min. de repos à la température ambiante, on mesure la densité optique à 630 $m\mu$ par rapport à un blanc sans cyanure préparé en même temps.

Sélectivité de la méthode. La méthode est très sélective. Seul le SCN⁻ donne la même réaction. Les corps susceptibles de gêner sont les agents réducteurs tels que les aldéhydes, les alcools, l'hydrogène sulfuré, car en leur présence, la coloration ne se développe pas.

2. *Séparation du cyanure par microdiffusion.* La séparation de micro-quantités de cyanure n'est pas aisée. La distillation avec ou sans entraînement, même dans des appareils de très faible volume, ne permet pas une récupération quantitative. Les pertes sont dues principalement à la condensation de gouttelettes d'eau sur les parois du ballon. La microdiffusion en cuves de CONWAY par contre, lorsqu'on travaille dans des conditions bien déterminées (le choix de la température étant particulièrement important), permet de distiller quantitativement jusqu'à 0,004 μg de cyanure. Si on effectue cette opération à la température du laboratoire elle prend 5 heures.

Si on sature de SO₄(NH₄)₂ la solution de cyanure, il suffit de 2 heures de diffusion à la température du laboratoire, et de 1 heure à 37°.

Tableau IV. *Microdiffusion de quantités variables de cyanure*

CN ⁻ introduit (μg)	0,500	0,300	0,200	0,100	0,050	0,020
CN ⁻ trouvé (μg)	0,494	0,2946	0,195	0,0975	0,0482	0,0192
rendement %	98,8	98,3	97,5	97,5	96,4	96,0

²⁰⁾ I. NUSSBAUM & P. SKUPEK, *Metal Finishing* 61, 49 (1951).

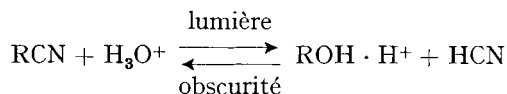
Mode opératoire pour le dosage du cyanure par microdiffusion. On met dans le compartiment extérieur d'une cuve de CONWAY en évitant qu'ils entrent en contact: 1 ml d'une solution d'acide tartrique à 10%; 1 ml de la solution de cyanure à doser; 1,4 g de sulfate d'ammonium. Dans le compartiment central, on introduit 1 ml de NaOH 0,1N.

Le bord de la cuve est enduit de silicone. La cuve est fermée puis agitée doucement par rotation pour mélanger l'acide tartrique et le cyanure.

Après avoir laissé la cuve 2 h à la température ambiante, puis 1 h à 37°, on dose l'HCN absorbé dans la soude caustique (voir p. 2564).

Des contrôles faits avec du cyanure marqué au ^{14}C ont confirmés les résultats obtenus par la méthode colorimétrique. Pour ce contrôle un certain nombre de précautions sont nécessaires que nous précisons dans un prochain article.

II. Dosage de la vitamine B_{12} . - 1) *Principe.* Les solutions aqueuses de vitamine B_{12} sont fortement photolysées. Etudiant ce phénomène DE MERRE & WILSON²¹⁾ ont constaté que l'activité biologique de la vitamine diminue de 34% après deux heures d'exposition à la lumière solaire. La photolyse est maximum aux longueurs d'ondes de 360 et 540 $\text{m}\mu$. VEER et coll.²²⁾ ont montré, au moyen des spectres d'absorption, qu'en milieu acide et sous l'effet de la lumière, la vitamine B_{12} se transforme quantitativement en vitamine B_{12b} (aquocobalamine) avec libération d'une molécule d'acide cyanhydrique. En milieu neutre ou alcalin, dans l'obscurité et en présence d'ion cyanure, la vitamine B_{12} se reforme:



En se basant sur ces constatations, nous avons mis au point une méthode de dosage de la B_{12} , qui consiste à irradier en milieu tartrique aux rayons UV. l'échantillon introduit dans le compartiment extérieur d'une cuve de CONWAY, à recevoir l'HCN libéré dans de la soude caustique et à le doser par la méthode décrite à la page 2564.

2) *La microdiffusion isothermique* doit se faire à une température aussi basse que possible sans pourtant que la durée de l'opération en soit trop allongée. L'irradiation aux UV. dans les conditions fixées (voir plus loin), maintient la solution au voisinage de 40°, température qui correspond aux exigences de la méthode. Nous avons alors étudié, en fonction du temps, le rendement de la distillation du cyanure libéré par l'irradiation UV. de 10 μg de B_{12} en solution acide tartrique (voir tableau V).

Tableau V. *Dosage de la B_{12} par microdiffusion du cyanure*
Temps de distillation entre 2 et 8 h. Quantité de B_{12} : 10 μg

Temps en heure	2	3.30	4	4.30	5	5.30	6	6.30	7	7.30	8
Rendement en %	52,06	87,67	92,60	95,89	95,89	97,53	99,72	100	100	99,72	100

Il faut donc 5 h 30 pour récupérer quantitativement le cyanure.

Des expériences témoin effectuées dans l'obscurité et en présence d'acide tartrique montrent qu'à 18° il ne distille dans le même temps que 2,5% de CNH et moins de 5% à 45°.

²¹⁾ J. DE MERRE & C. WILSON, J. Amer. pharmaceut. Assoc., Sci. Ed. 45, 129 (1956).

²²⁾ W. L. C. VEER, J. G. EDELHAUSEN, H. G. WIJMENGA & J. LANS, Biochem. biophysica Acta 6, 225 (1950).

La courbe d'étalonnage établie selon le mode opératoire de la page 2563 montre qu'il est possible de doser 1 μg de B_{12} (0,02 μg de cyanure) avec une erreur maximum de 13%, et 5 μg de B_{12} avec une erreur maximum de 5%.

Tableau VI. *Chiffres pour une courbe d'étalonnage pour le dosage de la B_{12}*

Quantité de vitamine B_{12} en μg	Densités optiques	Densité optique moyenne	Valeurs trouvées en μg	Erreurs extrêmes en %	
				Min.	Max.
1,00	0,0395		1,079		
1,00	0,0355		0,970		
1,00	0,0350	0,0366	0,956	+ 9,2	- 12,6
1,00	0,0320		0,874		
1,00	0,0400		1,092		
1,00	0,0380		1,038		
3,00	0,105		2,763		
3,00	0,120		3,158		
3,00	0,115	0,114	3,026	+ 5,2	- 7,9
3,00	0,110		3,158		
3,00	0,120		3,158		
3,00	0,115		2,894		
5,00	0,200		5,128		
5,00	0,195		5,000		
5,00	0,200	0,195	5,128	+ 2,56	- 5,1
5,00	0,185		4,743		
5,00	0,192		4,923		
5,00	0,196		5,025		
7,00	0,260		7,00		
7,00	0,255		6,873		
7,00	0,266	0,260	7,169	- 1,8	+ 2,4
7,00	0,258		6,954		
7,00	0,265		7,143		
10,00	0,372		10,108		
10,00	0,365		9,918		
10,00	0,363	0,368	9,864	+ 1,08	- 1,36
10,00	0,368		10,00		
10,00	0,370		10,054		
10,00	0,370		10,054		

Remarque. La vitamine B_{12a} ne renferme pas de cyanure, aussi ne gêne-t-elle pas le dosage de la vitamine B_{12} selon notre procédé, contrairement à ce qui est le cas de la quasi-totalité des méthodes en usage.

3. *Dosage de la B_{12} en présence d'ion cyanure ou de substances susceptibles d'en dégager.* La B_{12} est stable en milieu tartrique dans l'obscurité. Nous opérons par deux microdiffusions successives en présence d'acide tartrique, la première à l'abri de la lumière pour éliminer le cyanure libre et celui provenant des substances en dégageant dans ces conditions, la seconde en présence d'UV. après avoir changé la solution de NaOH du compartiment intérieur (voir tableau VII).

Tableau VII. Dosage de B_{12} en présence de 0,500 μg cyanure libre

Vitamine B_{12} trouvée	μg %	10,01 100,1	9,975 99,75	9,956 99,75	9,895 98,95	10,06 100,6	9,958 99,58	10,03 100,3	9,967 99,67
CN ⁻ libre trouvé	μg %	0,495 99	0,503 100,6	0,492 98,4	0,508 101,6	0,487 97,4	0,494 98,8	0,492 98,4	0,501 100,2

Extraction de la B_{12} . Pour rendre la méthode encore plus sélective et éliminer toute substance susceptible de gêner le dosage colorimétrique du cyanure, nous proposons une méthode d'extraction. La B_{12} est insoluble dans la plupart des solvants organiques (sauf les alcools inférieurs, l'acétone et le phénol).

L'extraction au phénol que nous employons dans la méthode déjà citée⁵⁾ est inutilisable ici car il reste toujours des traces de ce solvant qui gênent le dosage colorimétrique. Nous avons donc fait appel à l'alcool benzylique; le coefficient de partage est moins avantageux, mais on l'améliore en saturant la solution aqueuse de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. On peut alors extraire quantitativement la B_{12} en une seule opération. L'étude systématique de cette opération au moyen de B_{12} marquée au ^{60}Co a permis d'en établir les conditions optimum.

Application de la méthode

Mode opératoire (voir réactifs p. 2560). L'échantillon contenant au moins 10 μg de vitamine B_{12} est dissous dans 10 ml d'eau, la solution est filtrée sur papier. 5 ml de filtrat sont introduits dans un tube à centrifuger, saturés de sulfate d'ammonium et additionnés de 2 ml d'alcool benzylique. Après 1 min. d'agitation on sépare les phases par centrifugation et prélève 1 ml de l'alcool benzylique, qu'on introduit dans un autre tube à centrifuger avec 1 ml d'eau distillée et 4 ml d'éther. On agite 1 min. On sépare la phase organique et lave la phase aqueuse renfermant la vitamine B_{12} , avec 2 ml d'éther pour éliminer toute trace d'alcool. On introduit 0,5 ml de cette dernière dans le compartiment extérieur d'une cuve de CONWAY avec 1 ml d'une solution d'acide tartrique à 15%, et 1 ml de soude caustique 0,1N dans le compartiment central. On ferme hermétiquement la cuve par une plaque de verre et on l'expose 6 heures à la lumière UV.

La solution alcaline renfermant le cyanure est transvasée au moyen d'une pipette graduée de 1 ml dans une éprouvette graduée de 10 ml. Le volume de la soude caustique a diminué au cours de la microdistillation à 0,8–0,9 ml. On rince le compartiment central de la cuve avec une petite quantité d'eau de telle sorte que le volume final de la solution alcaline, y compris l'eau de lavage, ne dépasse pas 1 ml.

Le dosage colorimétrique du cyanure à la pyridine-pyrazolone décrit plus haut (voir p. 2561), doit être modifié comme suit en raison du pH très alcalin de la solution. A une partie de la solution de chloramine T, on ajoute 3 parties d'une solution de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 1M. On obtient ainsi une suspension homogène, stable pendant 20 min., qu'on emploie à la place de la solution de chloramine T primitive. Grâce à la présence de phosphate monopotassique dans le réactif à la chloramine, le pH de la solution de cyanure + chloramine est compris entre 5 et 6. On ajoute 0,8 ml du réactif de pyridine-pyrazolone et mesure après 90 min. la densité optique à 630 $m\mu$. La quantité de vitamine B_{12} est déterminée au moyen de la courbe d'étalonnage (voir p. 2563) par rapport à un blanc. On peut aussi recourir à un étalon interne. Le facteur de dilution est de 8 dans le procédé décrit.

On peut doser de plus petites quantités de vitamine B_{12} , en prélevant des volumes plus grands au cours de chaque opération; le facteur de dilution en est évidemment modifié.

III. Applications de la méthode de dosage de la B_{12} à quelques produits pharmaceutiques. – 1. *Nucléovite B_{12}* (ampoule buvable). Composition déclarée: par ampoule, nucléotide de Na 200 mg, nucléotide de Fe 0,32 mg, nucléotide de Mn 0,31 mg, nucléotide de Cu 0,07 mg, vitamine B_{12} 10 μg et sirop aromatisé Q. S. P. 3 ml.

Résultat: $9,7 \pm 0,3 \mu\text{g}$ de vitamine B_{12} par ampoule.

2. *Omnibionta* (capsule). Composition déclarée: par capsule, vitamine A 2500 UI, vitamine B_1 4 mg, vitamine B_2 2 mg, nicotinamide 20 mg, pentothénate de Ca 5 mg, vitamine B_6 2 mg, vitamine C 50 mg, acide folique 0,5 mg, vitamine D_3 500 UI, vitamine H 20 mg, vitamine K_4 2 mg, vitamine P 10 mg, vitamine B_{12} 2 μg .

Résultat: $2,07 \pm 0,1 \mu\text{g}$ par capsule.

3. *Vitamine B₁₂ Vifor* (injectable). Composition déclarée: par ml, vitamine B_{12} 1000 μg .

Résultat: $970 \pm 30 \mu\text{g/ml}$.

4. *Eryfol* (injectable). Composition déclarée: par ampoule, vitamine B_{12} 30 μg , acide formylfolique 10 mg.

Résultat: $30 \pm 2 \mu\text{g}$ par ampoule.

5. *Cal-Iron* (capsule). Composition déclarée: par capsule, SO_4Fe 75 mg, Mo_2O_3 1,1 mg, vitamine A 6000 UI, vitamine D 600 UI, vitamine E 1 UI, vitamine C 100 mg, vitamine B_{12} 2 μg , vitamine B_3 5 mg, vitamine B_6 2 mg, pentothénate de Ca 5 mg, nicotinamide 30 mg, CO_3Ca 400 mg.

Résultat: $2,1 \pm 0,1 \mu\text{g}$ par capsule.

RÉSUMÉ

On décrit le dosage de la vitamine B_{12} par celui du cyanure qu'elle renferme. La vitamine est introduite dans une cuve de CONWAY et irradiée en milieu tartrique aux rayons UV. Le cyanure libéré est reçu dans le compartiment intérieur renfermant du NaOH et dosé par colorimétrie selon une méthode à la pyridine-pyrazolone. En présence de cyanure libre ou de substances susceptibles d'en former, on effectue deux microdiffusions sur le même échantillon, l'une dans l'obscurité, l'autre à la lumière. On peut doser jusqu'à 1 μg de B_{12} (0,02 $\mu\text{g CN}^-$).

La méthode est sélective, même en présence de cyanure libre. On peut encore augmenter la sélectivité par une extraction à l'alcool benzylique. Cette méthode a été appliquée aux dosages de traces de B_{12} dans les produits pharmaceutiques les plus divers.

Laboratoires de chimie minérale et analytique
de l'Université de Genève