

SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA BETAÍNA E COLINA EM MISTURA, POR CROMATOGRAFIA EM PAPEL ⁽¹⁾

SEPARATION AND IDENTIFICATION OF BETAINE AND CHOLINE IN MIXTURE BY PAPER CHROMATOGRAPHY

WALDOMIRO PREGNOLATTO ⁽²⁾

MYRNA SABINO ⁽²⁾

CECY CHAHIN ⁽²⁾

It was described in this work a simple method for separation and identification of choline chloride and Betaine hydrochloride, when mixed in pharmaceutical preparation, using chromatography technique in ascendent paper.

The Rf of both substances have been established, whether when mixed with pharmaceutical products whether separated in a simple water solution.

Satisfactory results are got in separation and identification of Betaine and Choline in above conditions.

INTRODUÇÃO

Identificar a betaína, quando pura, não constitui problema. A literatura já registra para isso alguns métodos ^{1, 10}. Constitui, porém, uma problema a identificação da Betaína em presença de Colina, principalmente em produtos farmacêuticos.

Valendo-se do método estabelecido por APPLETON *et alii* ² para determinação de Colina, WALL *et alii* ¹¹ determinaram espectrofotometricamente Betaína e outros compostos quaternários nitrogenados.

Outros métodos para separar Betaína de Colina têm sido indicados mas, além de trabalhosos, são demorados pois utilizam-se da técnica de cromatografia em coluna ^{4, 5, 6}, camada delgada bi-dimensional, ou eletroforese ⁹.

A Cromatografia em papel para separar bases quaternárias de amônia já foi anteriormente usada por BREGOFF *et alii* ³.

SANDI ⁸ descreve um reagente (ácido bromotálico) para a identificação de bases orgânicas como a Betaína, Colina e Nicotinamida e, especialmente, para diferenciá-las das

bases púricas como Cafeína, Teobromina e Teofilina.

Neste trabalho procuramos estabelecer um método rápido e prático, usando a técnica da cromatografia em papel ascendente pois, além de simples, pode ser executado num laboratório modesto. Para a identificação tanto da Betaína como da Colina usamos o reagente de Dragendorff modificado ⁶.

MATERIAL E MÉTODOS

1. *Material*

Papel Whatmann n.º 1

Cuba cromatográfica

Micropipetas

Cloreto de Colina E Merck AG

Cloridrato de Betaína E Merck AG

Hidróxido de Amônio

Subnitrato de Bismuto

Solvente — n-Butanol-Ácido Acético-Água (10:5:2)

Reagente de Dragendorff modificado com referências.

Preparar as soluções como segue:

(1) Trabalho realizado na Seção de Química Biológica do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

a) *Solução 1*

Subnitrato de Bismuto	0.850 g
Ácido Acético Glacial	10 ml
Água	40 ml

Solução 2

Iodeto de Potássio	8 g
Água	20 ml

Solução 3

Misture as soluções 1 e 2 e guarde na geladeira em frasco escuro.

b) *Reagente*

Prepare no momento de ser usado, o reagente de trabalho, da seguinte maneira:

Solução 3	10 ml
Ácido Acético Glacial	20 ml
Água	50 ml

2. *Método*

Separação e identificação de Betaína e Colina

a) *Preparo da amostra*

Transfira para um balão volumétrico de 50 ml uma quantidade de amostra do produto a ser analisado de maneira que cada 10 microlitros da solução contenham de 50 a 100 microgramas de Betaína e 50 a 100 microgramas de Cloreto de Colina.

Adicione cerca de 25 ml de água e algumas gotas de NH_4OH N até acertar a um pH entre 8 e 9. Complete o volume com água, Homogenize.

b) *Cromatografia*

Transfira para tiras de papel Whatman n.º 1, de 3x13 cm, com linha de partida a 2 cm da base e o fronte a 1 cm da altura, 10 microlitros da solução obtida em a. Seque ao ar.

Desenvolva a cromatograma de maneira ascendente, usando como solvente a solução n-Butanol-ácido acético-água (10:5:2). O solvente deverá atingir o fronte depois de 2h30m a 3 horas, após o início do desenvolvimento do cromatograma.

Seque o papel em corrente de ar e revele com o reagente de Dragendorff.

A mancha vermelha que aparece imediatamente a um Rf de 0,72 a 0,84 corresponde à Cloreto Colina e a mancha amarelo-laranja que aparece após alguns minutos e a um Rf de 0,36 a 0,50, corresponde à Betaína.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando se cromatografa separadamente Betaína e Colina nas condições descritas, obtém-se para Betaína um Rf de 0,54 e, para Colina, o Rf de 0,84.

Ao se revelar o cromatograma da Betaína sem Colina, a mancha amarelo-laranja aparece mais rapidamente.

Para seleção do solvente, foram testadas as seguintes misturas:

Butanol — Etanol (1:1)
Etanol — Ácido Acético (1:1)
Etanol — Butanol — Amônia (10:4:2) e (9:5:2)

Etanol a 60 — Acetona a 38% — Ácido Acético a 2% (10:5:2)

Metanol — Acetona (1:1)
Etanol — Acetona — Amônia (10:5:2)
Etanol — Butanol — Ácido Acético (10:5:2) e (10:10:2)

Butanol — Ácido Acético (100 ml Butanol — 30 ml Ácido Acético para 80 a 90 ml água)

Acetona — Ácido Acético (2:1)
Etanol — Isopropanol (3:1) e (2:2)
Etanol — Isopropanol — Amônia (3:1:1)
Etanol — Isopropanol — Ácido Acético (3:1:1)

Etanol a 95% — Amônia (95:5)
Isobutanol — Ácido Acético — Água (3:1:1)
Acetato de Etila — Ácido Acético — Água (3:1:1)

Benzeno — Clorofórmio — Butanol (1:1:1) e (2:1:1)

Benzeno — Clorofórmio (1:1)
Butanol — Clorofórmio — Água (10:5:2)
Butanol — Ácido Acético — Água (4:1:5); (4:4:1); (10:10:0,6) e (4:8:1).

De todos os solventes testados, conseguiu-se separação precária com os seguintes:

Etanol — Isopropanol — Ácido Acético (3:1:1)

Isobutanol — Ácido Acético — Água (3:1:1).

Com todos os outros, Betaína e Cloreto de Colina sempre caminhavam juntos.

Variações de pH foram testadas, e a separação da Colina da Betaína só foi possível quando a solução inicial se apresentava com pH entre 8 e 9.

Com este método conseguimos separar e identificar satisfatoriamente Cloreto de Colina, e Cloridrato de Betaína, constantes da formulação de diversos preparados farmacêuticos xaroposos, que continham, além destas substâncias, vitaminas do Complexo B, Lisina, alguns, também, citrato de ferro amoniacal.

Em xaropes contendo vitaminas do Complexo B e sais de ferro e aos quais adicionávamos Cloreto de Colina e Cloridrato de Betaína, na quantidade de 0,05 g/15 ml, sempre conseguimos separar e identificar aquelas substâncias.

CONCLUSÃO

Cloreto de Colina e Cloridrato de Betaína podem ser perfeitamente separados e identificados por cromatografia em papel, desde que respeitadas as condições de pH, tempo, e solvente descritas.

RESUMO

É descrito um método simples para separação e identificação de cloreto de Colina, e de Cloridrato de Betaína, quando em mistura em produtos farmacêuticos, usando a técnica da cromatografia em papel ascendente.

Foram estabelecidos os Rf de ambas as substâncias, quer quando em mistura em produtos farmacêuticos, quer separadas, em simples solução aquosa.

Conseguiram-se resultados satisfatórios na separação e identificação da Betaína e Colina nas condições e descritas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION FOUNDATION — Qualitative and quantitative tests for chloral betaine. *J. Pharm. Sci.*, 53:1385-6, 1964.
2. APPLETON, H. D.; LA DUE JR., B. N.; LEVY, B. B.; STEELE, J. M. & BRODIE, B. B. — A chemical method for the determination of free choline in plasma. *J. Biol. Chem.*, 205:803-13, 1953.
3. BREGOFF, H. M.; ROBERTS, E. & DELWICHE, C. C. — Paper chromatography of quaternary ammonium bases and related compounds. *J. Biol. Chem.*, 205:565-74, 1953.
4. CHRISTIANSON, D. D.; WALL, J. S.; CAVINS, J. F. & DIMLER, R. J. — Chromatography of quaternary nitrogen compounds on buffered cation-exchange resins. *J. Chromatogr.*, 10:432-8, 1963.
5. HIRDY, O. & LOCHMANOVÁ, S. — Determination of choline and betaine in the presence of each other. *Ceskosl. Farm.*, 9(7):335-9, 1960, apud *Analyt. Abstr.*, 8:1164, 1961.
6. JANOT, M. M. & LEHIR, A. — *Chromatographie sur papier*. In LEDERER, E. — *Chromatographie en chimie organique et biologique*. Paris, Masson, 1959. v. 1, p.511.
7. NIEMANN, A. — Zur Trennung von Betain und Cholin an Ionenaustauschern. *J. Chromatogr.*, 9:117-8, 1962.
8. SANDRI, G. — Bromathallic acid as a new reagent for the identification of organic bases. *Mikrochem. Acta*, 2:253-8, 1958.
9. SPEED, D. & RICHARDSON, M. — Chromatographic methods for the isolation and identification of the products of choline oxidation. *J. Chromatogr.*, 35:497-505, 1968.
10. WALKER JR., H. G. & ERLANDSEN, R. — Rapid method for determination of betaine. *Analyt. Chem.*, 23(9):1309-11, 1951.
11. WALL, J. S.; CHRISTIANSON, D. D.; DIMLER, R. J. & SENTI, F. R. — Spectrophotometric determination of betaines and other quaternary nitrogen compounds as their periodides. *Analyt. Chem.*, 32(7):870-4, 1960.

