

## Determinación polarográfica de riboflavina en extractos hepáticos

Por R. Portillo y G. Varela

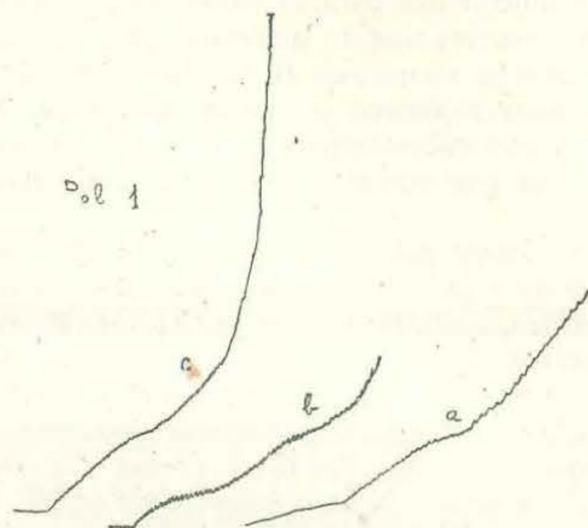
La presencia de la riboflavina en preparados comerciales de hígado ofrece una serie de dificultades para su valoración, ya que de las diferentes técnicas las más corrientemente utilizadas para la valoración de este componente del complejo vitamínico B son las fluorométricas, que en el caso de los preparados hepáticos no tienen utilización sencilla, porque, como es sabido, en los extractos hepáticos aparecen componentes con fluorescencia propia y que por interferir con la de la riboflavina impiden su determinación.

En 1939, G. E. SHAW publica un método de determinación de riboflavina en extractos de hígados que es recogido en la *British Extra Pharmacopœa*, basado en la técnica fluorométrica. En un embudo de separación de unos 50 centímetros cúbicos se ponen un centímetro cúbico de extracto y otro de ácido clorhídrico normal, se mezclan y se añaden lentamente y agitando 10 centímetros cúbicos de acetona. Se añaden 10 centímetros cúbicos de cloroformo, se agita y se deja reposar con objeto de permitir la separación de fases. Retirar la capa inferior y verterla en otro embudo de separación de unos 100 centímetros cúbicos. Continuar con la capa superior que quedó en el primer embudo el mismo tratamiento de acetona y cloroformo tantas veces como sea necesario, hasta que la capa inferior no dé fluorescencia azul a la lámpara ultravioleta. Reservar la capa superior. Los líquidos de extracción se tratan con porciones de cinco centímetros cúbicos de agua tantas veces como sea necesario para que no quede nada de sustancia fluorescente. Desechar la capa inferior y reunir los extractos acuosos, extrayéndolos con cantidades sucesivas de cloroformo para suprimir algún compuesto que pudiera tener fluorescencia azul. Este extracto acuoso se lleva a un matraz de fondo redondo y se le añade la capa superior que se había separado en las primeras operaciones, privándosele de la acetona por calentamiento al vacío a 35 ó 40 grados. Se añade hidróxido sódico N hasta que dé color a la fenoltaleína y se completa el volumen a 30 centímetros cúbicos. Se lleva a un plato de evaporación y se le añade su volumen de soña normal. Exponer a la luz ultravioleta, transvasar la solución irradiada a un embudo de separación de 200 centímetros cúbicos y añadir solución de ácido cítrico al 20 por 100 hasta re-

acción débilmente ácida a la fenoltaleína y extraer con porciones de 10 centímetros cúbicos de cloroformo hasta que no quede nada de compuesto fluorescente sin separar. Se lleva a un volumen determinado y se compara con una solución patrón de riboflavina.

Como se ve, este método de SHAW es muy largo de ejecución y bastante engorroso, y como las determinaciones de riboflavina en estos preparados son muy frecuentes en los laboratorios, hemos tratado de aplicar el método polarográfico a la resolución de este problema.

Los extractos hepáticos, por su naturaleza compleja, dan polarogramas que varían de unos a otros, lo que impide la valoración de compuestos cuyo potencial de onda media coincida con la curva propia del extracto. En el polarograma 1 se ve el aspecto de algunas curvas de extractos hepáticos. La riboflavina tiene un potencial de onda media en solución

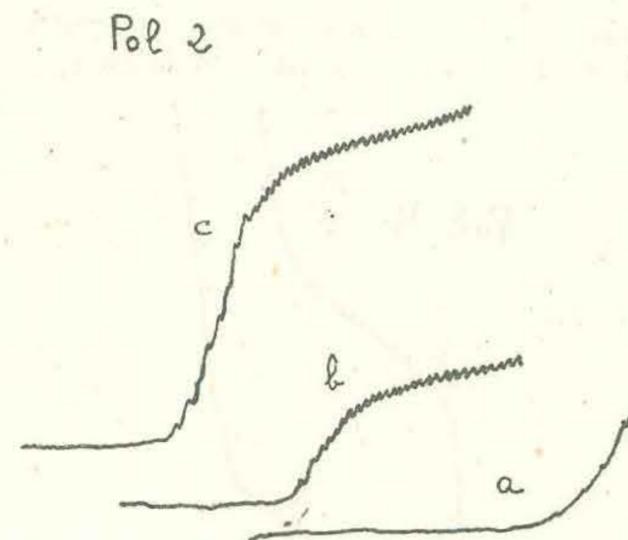


fondo de cloruro potásico 0,1 normal de  $-0,672$  voltios con relación al electrodo normal de calomelanos; por ello, como su potencial es muy bajo, la onda propia de la vitamina debería aparecer antes que empezara el trazado de la curva debida al hígado. En efecto, la onda propia de la riboflavina no es interferida por el trazado del preparado, ya que aparece antes que aquél.

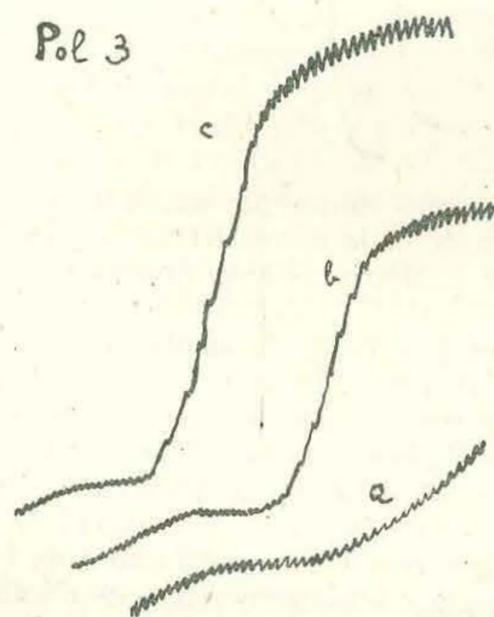
En el polarograma 2 aparece la curva de un preparado que no contiene riboflavina. La curva (a) se obtiene con un centímetro cúbico de solución fondo de cloruro potásico 0,1 normal y un centímetro cúbico de un inyectable de hígado que corresponde a 600 gramos de glándula fresca por centímetro cúbico. La curva (b) se obtiene al añadir a la primera 0,77 miligramos de riboflavina; y la curva (c), con una cantidad doble de vitamina. Como se puede observar, las alturas son proporcionales a las concentraciones de vitaminas.

Por otro lado, era interesante conocer la influencia que en la altura de onda de la riboflavina tuviera las diferentes concentraciones de hígado,

y se observó que la altura de onda permanece constante al variar las concentraciones de hígado.



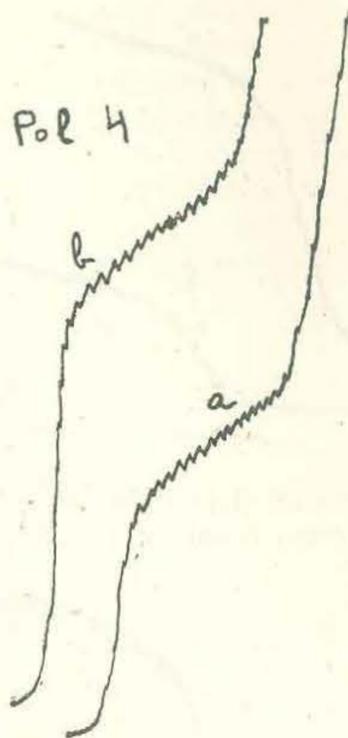
El polarograma 3 muestra el trazado de una valoración cuantitativa en un comprimido de extracto hepático. El comprimido se tritura en un



mortero con la cantidad conveniente de solución fondo (en nuestro caso cada comprimido correspondía a 600 gramos de hígado fresco y lo disolvimos en 10 centímetros cúbicos de cloruro potásico 0,1 normal), y una vez filtrado por papel se ponen en la vasija polarográfica dos centímetros cúbicos y se polarografían directamente, apareciendo la curva (a), que al añadirle riboflavina aparece con el aspecto de (b) y que con una cantidad

doble de la vitamina da la curva (c). Como se ve, la valoración cuantitativa de esta vitamina es perfectamente realizable por el método polarográfico.

Se ha estudiado también el comportamiento polarográfico de aquellos preparados que tienen riboflavina y se ha visto en éstos que en el trazado



de su polarograma aparece claramente marcada la onda de la vitamina, aumentando en altura de onda con la adición de una solución patrón de vitamina, lo que hace posible conocer la riqueza en riboflavina del preparado ensayado.

En el polarograma 4 se recoge la valoración polarográfica de un preparado farmacéutico en forma de elixir y que tenía riboflavina. (a) es el trazado de 1,5 centímetros cúbicos de solución fondo de cloruro potásico 0,1 normal y 0,5 centímetros cúbicos del preparado problema. La altura de onda es de 26 milímetros. En (b) se añaden a la anterior solución 0,206 miligramos de riboflavina y la altura de onda es de 45 milímetros. Fácilmente se deduce de este aumento en la altura de onda una concentración de 0,5 miligramos por centímetro cúbico de riboflavina en el elixir de hígado.

En el cuadro aparece el resumen de los resultados obtenidos con hígados de diferentes procedencias y de concentraciones diversas, así como en las formas farmacéuticas de administración más corriente, ampollas bebibles e inyectables, comprimidos, jarabes y elixires. El trazado de la curva es muy distinto de una a otra, pero en cualquier caso ha permitido la valoración cuantitativa de la vitamina.

La sensibilidad del método para la riboflavina es del orden  $10^{-6}$  M., que cubre las concentraciones presentes en este tipo de preparados.

Se han estudiado ocho preparados.

1. *Ampollas inyectables.*—1 c.c. corresponde a 600 gramos de hígado fresco.
2. *Ampollas inyectables.*—1 c.c. corresponde a 2.000 gramos de hígado fresco.
3. *Ampollas inyectables.*—1 c.c. corresponde a 600 gramos de hígado fresco.
4. *Elixir.*—En 125 c.c. el equivalente a 4.000 gramos de hígado.
5. *Ampocas vía oral.*—1 c.c. corresponde a 600 gramos de glándula.
6. *Ampollas inyectables.*—1 c.c. corresponde a 500 gramos de hígado fresco.
7. *Comprimidos.*—Un comprimido equivale a 600 gramos de hígado fresco.
8. *Elixir.*—100 c.c. equivalen a 5.000 gramos de hígado fresco.

A la vista de los resultados consignados en la tabla primera, el problema de la valoración de la riboflavina por el método polarográfico parece en principio resuelto, ofreciendo, a la vez, una precisión y rapidez muy superiores a las de los demás métodos.

Es de consignar que en el valor asignado para la sensibilidad del método el galvanómetro trabajaba a un décimo de su sensibilidad, con lo que, naturalmente, podría ser aumentada esta sensibilidad sin más que aumentar la del galvanómetro, lo que podría hacerse por medio de la conexión de Ilkovic o por el multicapilar. Pero, como antes decíamos, las cifras presentes en la práctica son cubiertas ampliamente trabajando con un décimo de la sensibilidad del galvanómetro. La solución fondo utilizada es la décimonormal de cloruro potásico y el registro ha de empezarse en el potencial 0, dado el bajo potencial de onda media de la riboflavina.

Cuando el producto tiene riboflavina seguimos el método de adición, y, como antes se ha dicho, la resolución de su valoración es del mismo orden de precisión que en los anteriores casos, como era de esperar. Del producto se toman 0,5 centímetros cúbicos, se les añaden 1,5 centímetros cúbicos de la solución fondo de cloruro potásico y unos cristallitos de sulfato sódico para reducir la onda de oxígeno (se ha estudiado el comportamiento de este reductor y se ha visto que no influye en la altura de onda de la riboflavina) y se polarografía directamente buscando la sensibilidad adecuada. Se añade una cantidad conocida de solución patrón, y, por una sencilla proporción entre el aumento de la altura de onda en esta segunda curva y la primera, podemos conocer la riqueza en vitamina del problema.

Pero en la práctica terapéutica es corriente que asociados a la riboflavina y al extracto hepático vayan otra serie de fármacos que cumplen mediante esta asociación un fin terapéutico. El problema entonces de la valoración de esta vitamina se complica, y nosotros hemos tratado de ver si la presencia de estos fármacos interferían en la altura de onda de la riboflavina.

El excipiente de los comprimidos, como ya hemos dicho, no interfiere en la onda de la riboflavina, sobre todo, si después de la disolución del mismo en la solución fondo se tiene la precaución de filtrar simplemente por papel.

En los elixires y preparados para tomar por vía bucal se emplean la sacarosa y sustancias diversas aromatizantes, con objeto de corregir el sabor y olor poco agradables de estos fármacos. Hemos estudiado diferentes elixires del mercado y las cifras de riboflavina encontradas y añadidas están tan próximas como los valores consignados en el cuadro, por lo que en las concentraciones terapéuticas corrientes no interfieren con la altura de onda.

El ácido fénico, que algunas veces llevan estos preparados como agente conservador, ha sido ensayado en las proporciones normalmente presentes en los inyectables (cinco miligramos por centímetro cúbico), sin que experimente variación la altura de onda de la riboflavina.

El resto de los componentes del complejo vitamínico B que corrientemente se les asocia en los preparados de tipo reconstituyente han sido estudiados por los autores en otro lugar, y allí se hizo notar la no interferencia de estos compuestos con la riboflavina.

Por las propiedades antianémicas de los preparados hepáticos se les asocia algunas veces extracto de mucosa gástrica. Nosotros hemos ensayado preparados comerciales que tenían hasta el equivalente de 25 gramos de mucosa gástrica por centímetro cúbico y la altura de onda se mantuvo igual cuando a igualdad de volumen en el producto existía el extracto de mucosa gástrica como cuando no la había.

El comportamiento, en relación con la onda propia de la riboflavina, del alcohol etílico, arrhenal, nitrato de estricnina y clorhidrato de procaína ha sido también estudiado, y en las condiciones antes dichas no interfieren para nada en la onda de la vitamina.

En resumen, creemos que el método polarográfico resuelve el problema de la valoración de la riboflavina en los preparados hepáticos y en sus asociaciones más corrientemente utilizadas en la práctica farmacéutica.

Madrid, junio de 1949.

Laboratorio de Técnica Física y Físicoquímica de la Facultad de Farmacia.—Sección de Físicoquímica Biológica del Instituto A. de Gregorio Rocasolano, del C. S. I. C.

Producto núm.	RIBOFLAVINA Inicial en el método de adición	DIFERENCIA De alturas de onda en mm.	RIBOFLAVINA		DIFERENCIA en mg.
			encontrada en mg.	añadida en mg.	
1	0,193	50-25 = 25	0,193	0,193	0,000
2	0,386	25-12 = 13	0,385	0,386	0,001
3	0,193	32-11 = 21	0,101	0,0965	0,004
4	0,579	44-22 = 22	0,579	0,579	0,000
5	0,206	42-21 = 21	0,206	0,206	0,000
6	0,206	37-18 = 19	0,195	0,206	0,011
7	0,096	60-40 = 20	0,193	0,193	0,000
8	0,096	69-45 = -24	0,180	0,193	0,013