

# Identificación y Determinación Cuantitativa de las Vitaminas K Sintéticas por una Reacción de Color (\*)

• MARIA ISABEL ARDAO •

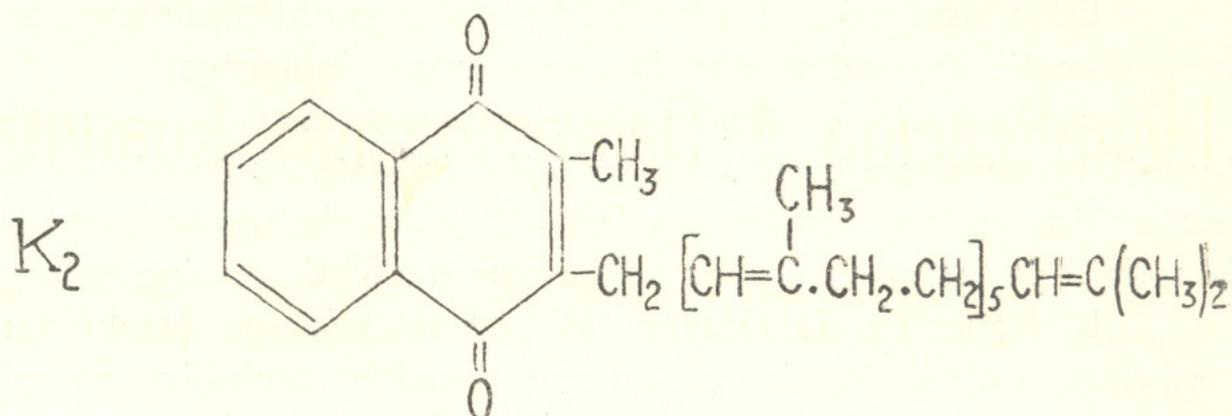
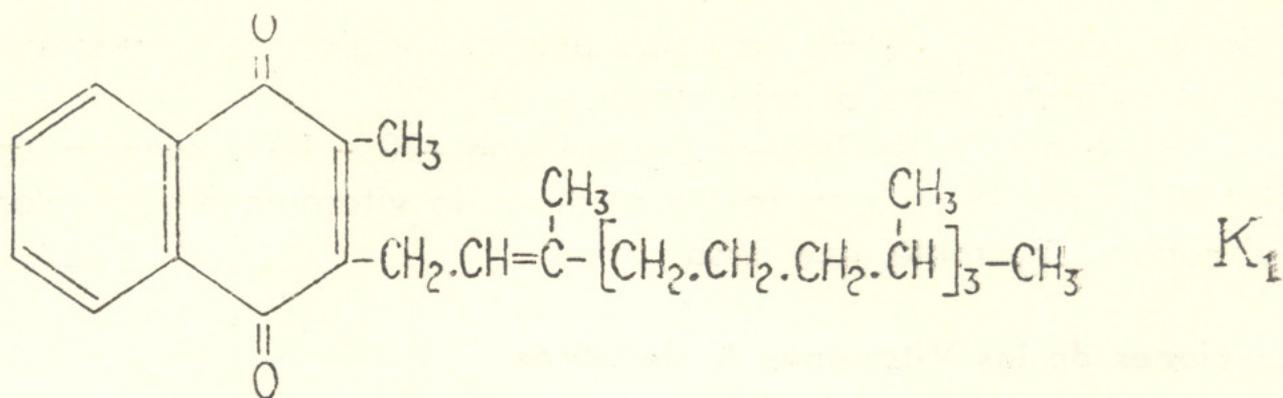
## Introducción —

En 1939, Karrer y col. (1) y Fieser (2, 3), aislaron en forma pura el factor antihemorrágico de la alfalfa, descubierto y llamado por Dam (4) "Koagulation vitamin", o vitamina K.

Al mismo tiempo Doisy y col. (5, 6) aislaron la vitamina K de la alfalfa y la de la carne de pescado, difiriendo ambas en la constitución química y en el grado de actividad fisiológica. Llamaron a la primera vitamina K<sup>1</sup> y a la segunda vitamina K<sup>2</sup>. Sus fórmulas son:

---

(\*) Trabajo de Agregación a la cátedra de Análisis Químico Aplicado, de la Facultad de Química y Farmacia de Montevideo, presentado en Octubre de 1942. La bibliografía se cita hasta esa fecha.



Aunque la vitamina  $K^1$  fué sintetizada por Doisy y Binkley (7, 8), Fieser (9, 10, 11) y Almquist y Klose (12, 13), se estudiaron otros compuestos sintéticos más simples, relacionados químicamente a los anteriores y dotados, en mayor o menor grado, de la misma acción fisiológica. La más importante de estas sustancias es la 2-metil-1, 4-naftoquinona, llamada también menadiona (14, 15), de la cual, numerosos derivados lipó e hidrosolubles tienen empleo en clínica.

La menadiona se adoptó como sustancia tipo en los ensayos de vitamina K, siendo la unidad biológica de vitamina K la acción específica de un microgramo de, 2-metil-1, 4-naftoquinona (16).

### Reacciones de las Vitaminas K. naturales.

Estos derivados 2-3 substituídos de p-naftoquinona dan las siguientes reacciones químicas.

a) Reacción de Dam-Karrer (17). El etilato de sodio da con la vitamina  $K^1$  un color azul inestable que pasa al rojo y al pardo. Karrer (18 y Fieser (19), estudiaron el mecanismo de esta reacción.

b) Reacción de Butler modificada por Fieser. Solución de vitamina  $K^1$  en ácido acético, tratada con igual volúmen de tricloru-

ro de antimonio al 80 % en ácido acético, origina color amarillo que, en caliente, pasa al rojo clavel.

c) Reacción de Irreverre y Sullivan (20). En presencia de ditiocarbamato de etilo en medio alcalino, la vitamina K<sup>1</sup> da color azul cobalto inestable, que pasa al rojo.

### **Reacciones de las Vitaminas K sintéticas.**

Estos derivados 2-sustituídos de la p-naftoquinona, en general 2-metil derivados, dan las reacciones siguientes:

a) Reacción de Berlín (21), propuesta para el diacetato de 2-metil-1, 4-naftoquinona. La solución de esta sustancia en metilacetanilida acuosa adicionada rápidamente de un volumen igual de soda 2 N, estando ambas soluciones a 18° C, origina color rojo.

b) Reacción de Craven (22). A la solución alcohólica del compuesto naftoquinónico se agrega solución alcohólico amoniacal y unas gotas de cianoacetato de etilo. Aparece color azul intenso el cual por adición de potasa 6 N, pasa al verde y al amarillo. Dan esta reacción sólo las p-naftoquinonas sustituidas en posición 2, por lo tanto no la dan las vitaminas K<sup>1</sup> y K<sup>2</sup> (23, 24).

c) Reacción de Novelli (25), propuesta para la 2-metil-1, 4-naftoquinona y compuestos relacionados. A una o dos gotas de su solución en metanol se agregan tres gotas de solución al 1 % de 2-4-dinitrofenilhidrazina en ácido clorhídrico 2 N. Se calienta suavemente, se enfría, se agregan dos gotas de amoníaco y un c.c. de alcohol amílico. Añadiendo agua al alcohol amílico se separa coloreado en verde tanto más intenso cuánto mayor es la cantidad de quinona presente.

d) Reacción de Fieser (26). Si a una solución alcohólica de 2-metil-1, 4-naftoquinona se agrega una solución de cisteína y soda, se produce un intenso color amarillo estable, muy sensible.

### **Métodos químicos de determinación de las Vitaminas K.**

a) El método de Trenner y Bacher (27), modificado por Scudi y Buhs (28), aplicable a la determinación de las vitaminas K naturales y compuestos sintéticos relacionados. Se basa en la oxidación de la hidroquinona correspondiente a la vitamina por diclorofenolindofenol, en presencia de fenosafranina como indicador. Tren-

ner y Bacher proponen el método hidrovolumétrico, mientras Scudi y Buhs lo hacen colorimétrico. Es aplicable a soluciones conteniendo de 5 a 15 microgramos de vitamina K<sup>1</sup>, y de 2 a 10 microgramos de 2-metil-1, 4-naftoquinona por ml. El método exige el aislamiento de la vitamina en los productos complejos y la reducción catalítica de la misma.

b) Método colorimétrico basado en la reacción Dam-Karrer, y propuesto por Almquist (29). Tiene el inconveniente de la inestabilidad de la reacción.

### **Métodos químicos de determinación de los derivados de la 2-metil-1, 4-naftoquinona.**

a) Método colorimétrico basado en la reacción de Novelli, según lo anuncia en su libro "Química y Bioquímica de las Vitaminas" (30), pero no hemos podido encontrar la descripción del método.

b) Método colorimétrico de Scudi y Buhs (31), basado en la reacción de Fieser, (cisteína en medio alcalino). Es muy sensible, permite determinar de 10 a 100 microgramos y tiene la ventaja de ser aplicable en líquidos complejos.

### **REACCION DE LAS p-NAFTOQUINONAS CON ACIDO SULFURICO EN MEDIO ALCOHOLICO.**

Es sabido que las quinonas y muchos compuestos orgánicos dan coloraciones diversas con el ácido sulfúrico concentrado (32).

Estudiando esta reacción en diferentes condiciones, hemos hallado que la 1, 4-naftoquinona y algunos derivados 2-metil-1, 4-naftoquinónicos con acción de vitamina K, originan al ser calentados en solución alcohólica con ácido sulfúrico concentrado un color rosa rojizo, que pasa al violáceo intenso y característico por dilución con agua.

Se procede así:

A 1 volúmen de solución del compuesto quinónico en alco-

hol al 70 u 80 %, adicionar 1 volúmen de ácido sulfúrico concentrado mezclando de inmediato. Llevar a baño maría hirviente por 5-10 minutos. Enfriar y diluir a 8 volúmenes con agua destilada. Se desarrolla un color violáceo permanente con zona de máxima absorción alrededor de 550 milimicras. La sustancia coloreada precipita en sus soluciones acuosas, más o menos rápidamente, según la concentración.

### **Sensibilidad.**

La reacción es positiva con concentraciones mayores de 10 microgramos por ml. del compuesto naftoquinónico. Por debajo de 35 microgramos, sin embargo, no se desarrolla el color violáceo al diluir con agua sino que la solución permanece rosa.

### **Comportamiento ante la ley de Beer.**

La curva, fig. 1, representativa de la variación de la extinción en función de las concentraciones, demuestra que por encima de 35 microgramos la sustancia sigue la ley de Beer.

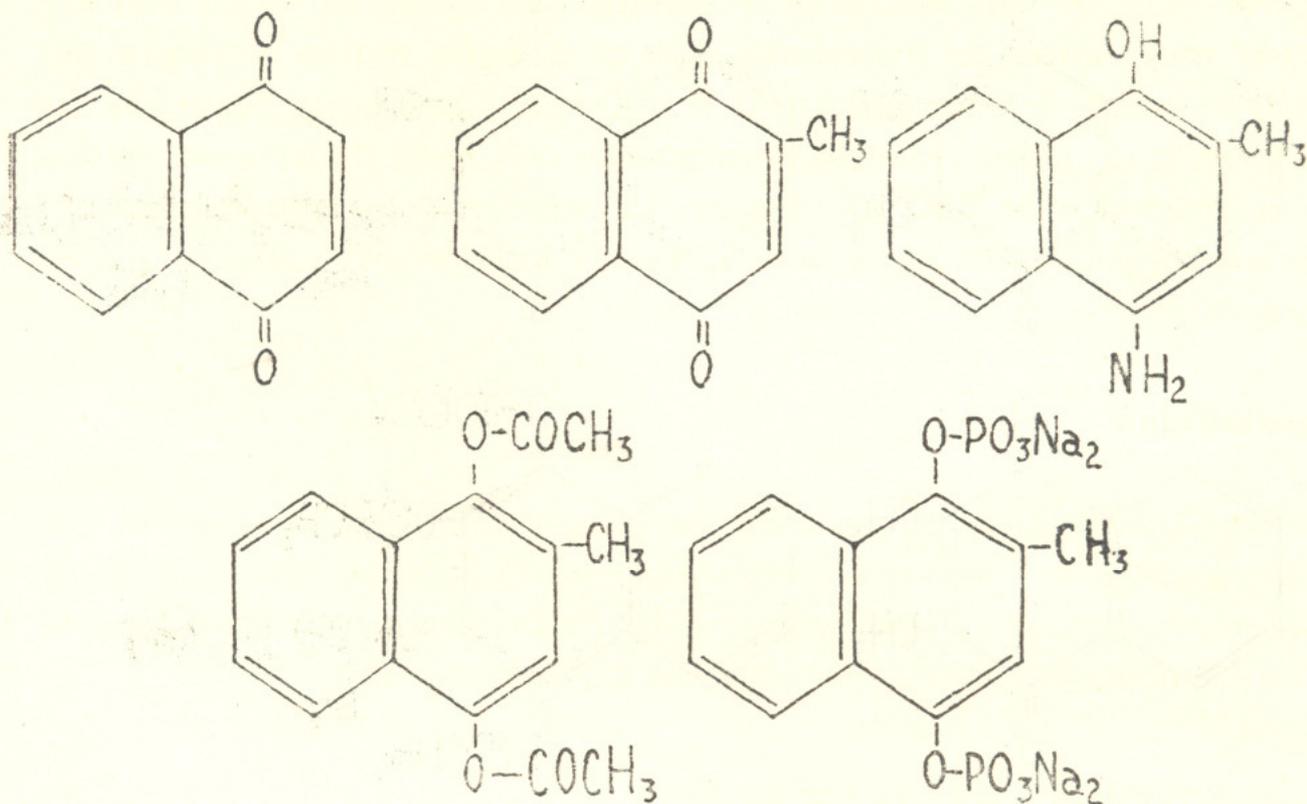
Para concentraciones inferiores a 35 microgramos, la desviación a dicha ley se explica porque en esa zona de concentraciones no se obtiene el color violáceo característico.

### **Especificidad.**

Dan la reacción los siguientes compuestos:

- 1) 1-4-naftoquinona e hidroquinona correspondiente.
- 2) 2-metil-1, 4-naftoquinona e hidroquinona correspondiente.
- 3) Diacetato de 2-metil-1, 4-naftohidroquinona.
- 4) Sal sódica de los esteres disulfato, disulfito y difosfato de 2-metil-1, 4-naftohidroquinona.
- 5) 2-metil-4-amino- 1-naftol.

Con excepción del número 1, estos compuestos circulan en el comercio como vitaminas K.



No dan la reacción:

a) Derivados de 1-4-naftoquinona sustituidos en las posiciones 2 y 3 (\*).

Siendo las vitaminas K naturales naftoquinonas sustituidas en las posiciones 2 y 3, es de presumir que no dan la reacción.

b) Otros derivados del naftalano sustituidos en posición 1-4.

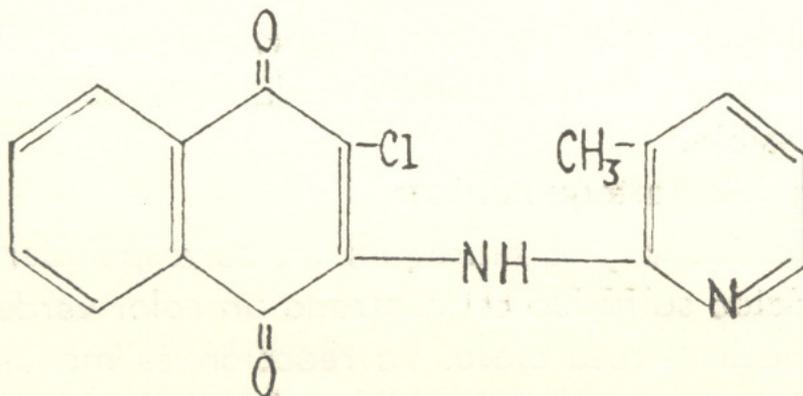
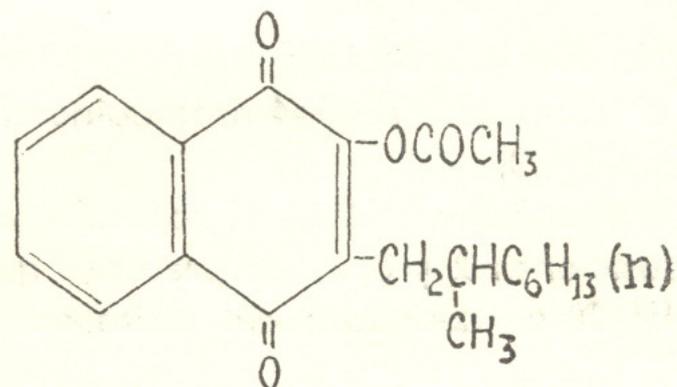
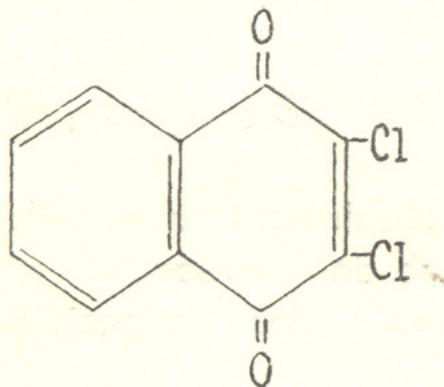
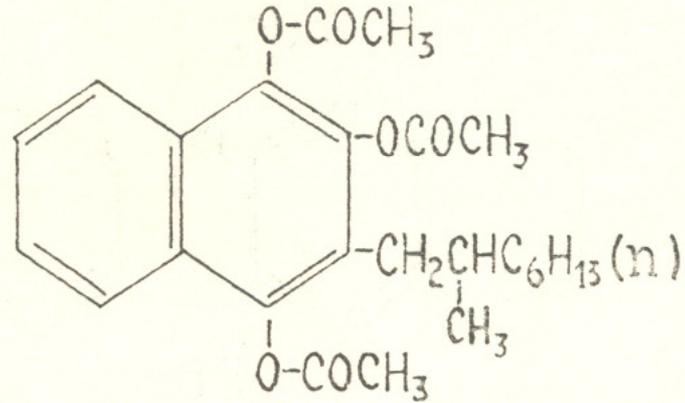
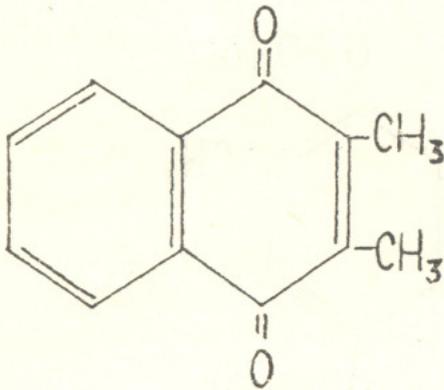
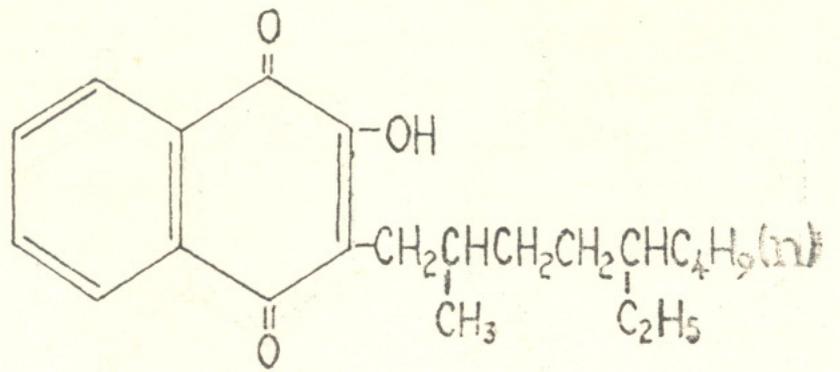
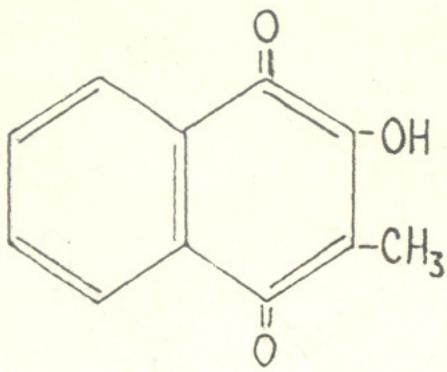
El ácido 1- naftol-4-sulfónico, da una reacción semejante, pero el color es amarillo pardo que pasa al amarillo oro al diluir.

El ácido 1-amino-4-naftalensulfónico da una reacción color ámbar muy poco sensible.

c) Derivados 1-2-naftoquinónicos.

La 1-2-naftoquinona y la hidroquinona correspondiente dan al ser tratados con ácido sulfúrico concentrado un color verde esmeralda que al diluir pasa al rosa claro. La reacción es menos sensible que la que en iguales condiciones da la 1-4-naftoquinona. El

(\*) Agradecemos al Dr. L. S. Fosdick de Northwestern University, Dental School, Chicago, el envío de 7 derivados 2-3 sustituidos de 1-4-naftoquinona, y a la Dra. H. Rothschild, de la Universidad de Sao Paulo, el envío de lapachol.



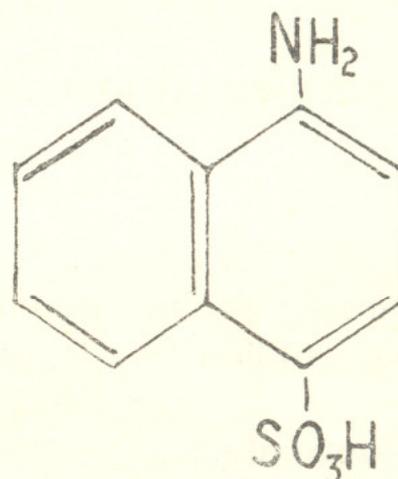
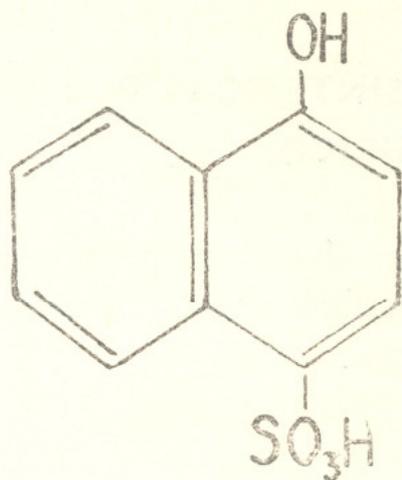
color verde aparece por encima de 20 microgramos, mientras que el color rosa se hace visible por encima de 100 microgramos por ml.

El ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico da la reacción de 1-2-

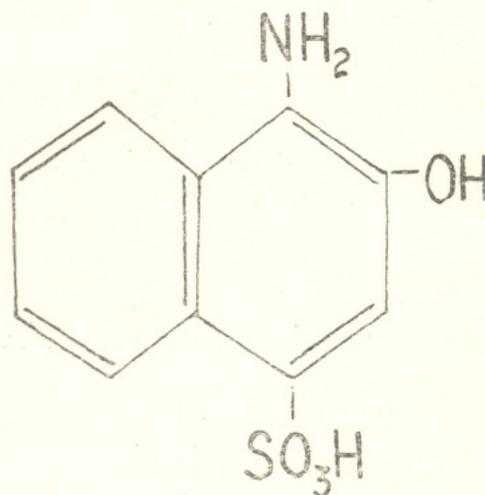
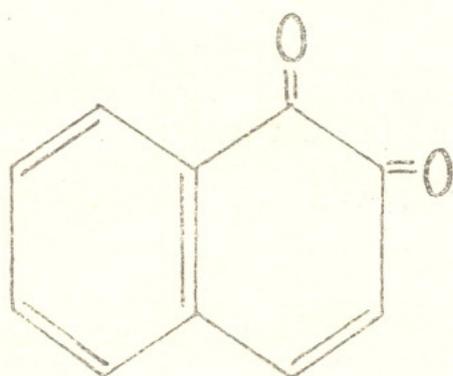
naftoquinona.

d) Otros derivados del naftaleno no sustituidos en posición 1-4 no dan la reacción. Se ensayaron los siguientes:

Naftaleno; alfa y beta naftol; 1-3 dinaftol; alfa y beta naf-



tilamina; dimetil-naftilamina; ácido 2-naftalensulfónico; ácido 1-5-naftalensulfónico; ácido 2-7-naftalensulfónico; ácido 1-amino-3-naftalensulfónico; ácido 1-amino-8-naftol-3-6-disulfónico.



e) Otras quinonas. Con ácido sulfúrico dan:

Benzoquinona	verde,	desaparece al diluir.
Dioxiantraquinona	rojo,	" " "
Tocoferilquinona	pardo,	" " "
Benzohidroquinona	amarillo,	" " "
Antraquinonsulfonato de sodio	No da color.	

f) Otras vitaminas liposolubles:

Vitamina A	rojo,	desaparece al diluir.
Vitamina D	pardo,	" " "
Vitamina E	amarillo,	" " "
Caroteno	azul fugaz.	

## DETERMINACION DE LAS VITAMINAS K SINTETICAS POR LA REACCION DEL ACIDO SULFURICO.

Con el fin de aplicar la reacción antes descrita a la estimación de las vitaminas K sintéticas que circulan en el comercio, se estudian los distintos factores que la afectan.

### Disolvente.

Se obtiene la mayor intensidad de coloración en el alcohol etílico o metílico al 70 u 80 %. La reacción se produce también en alcohol al 50 o 96 %, en alcohol butílico, cloroformo, piridina, etc.

### Temperatura.

De acuerdo al cuadro siguiente, el ácido sulfúrico puede agregarse a la temperatura ambiente, pero es preciso calentar para obtener rápidamente el máximo de intensidad.

Menadiona 2.5x10 <sup>-3</sup> M.	Adición de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Color obtenido
1 ml.	1 ml. enfriando en baño de hielo.	amarillo intenso. Desaparece al diluir.
1 ml.	1 ml. a temperatura ambiente.	rosa rojizo que se desarrolla durante días.
1 ml.	1 ml. a temperatura ambiente y luego 10 minutos a baño maría hirviente.	rosa rojizo que alcanza rápidamente el máximo.
1 ml.	1 ml. a temperatura de baño maría hirviente.	rosa rojizo que alcanza rápidamente el máximo.

Es suficiente calentar 5 o 10 minutos, pero un tiempo mayor no es perjudicial.

Menadiona 2.5x10 <sup>-3</sup> M.	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Tiempo a baño maría	H <sub>2</sub> O	Extinción, Fotom. Pulfrich. F. S. 53.
1 ml.	1 ml.	2.5 min.	5 ml.	0.28
1 ml.	1 ml.	5 "	5 ml.	0.40
1 ml.	1 ml.	10 "	5 ml.	0.40
1 ml.	1 ml.	15 "	5 ml.	0.40
1 ml.	1 ml.	30 "	5 ml.	0.40

### Dilución final.

La coloración violeta aparece para cierto valor de la dilución final. Si se diluye a 5 ml., por ejemplo, la solución permanece rosa sea cualquiera la concentración de la naftoquinona. Esto indica que la concentración del ácido sulfúrico debe disminuir para que aparezca el color violáceo. A diluciones por encima de 6 ml. se obtiene el color rosa violáceo característico, tanto más intenso cuanto mayor es la concentración de naftoquinona.

### Concentración de la p-naftoquinona.

Con concentraciones inferiores a 35 microgramos el color violáceo no aparece. Sea cualquiera el volumen final a que se lleve el producto de la reacción, la solución permanece color rosa.

Menadiona microgr. por ml.	Volumen final	Color
17.2	8 ml.	Rosa
25.8	8 ml.	"
34.4	8 ml.	Violáceo
43.0	8 ml.	"
51.6	8 ml.	"

Con concentraciones por encima de 150-200 microgramos por ml., según el compuesto de que se trate, tiene lugar la precipitación de la sustancia coloreada.

## **Técnica.**

Medir en un tubo graduado 1 ml. de solución, conteniendo entre 35 y 150 microgramos del derivado metilnaftoquinónico en alcohol etílico al 70-80 por ciento. Agregar, mezclando 1 ml. de ácido sulfúrico concentrado. Mantener en baño maría hirviendo 5-10 minutos. Enfriar y diluir a 8 ml. con solución de goma al 0.2 por ciento. Comparar en colorímetro corriente con solución tipo del mismo compuesto naftoquinónico que se determina; o medir la extinción en fotocolorímetros a 550 milimicras, trazando previamente la curva de extinción con el mismo derivado naftoquinónico.

## **Aplicaciones.**

La reacción requiere que la naftoquinona se encuentre pura en solución alcohólica, ya que numerosas sustancias orgánicas interfieren en la coloración.

Cuando el producto farmacéutico es una forma diferente de solución, por ejemplo, comprimido, hay que efectuar previamente la extracción de la vitamina. Se desintegra el producto con agua y se extrae por cloroformo o éter de petróleo. Se lava el extracto con agua y se evapora a sequedad. Se hace una dilución conveniente del residuo en alcohol al 70 por ciento y se efectúa la reacción.

## **S u m a r i o**

Se propone una reacción de color específica de la 1-4-naftoquinona y derivados 2 metil substituídos. La reacción es simple, sensible (10 microgramos por ml.) y estable.

No dan esta reacción derivados de 1-4-naftoquinona con ambas posiciones substituídas, 2 y 3. La posición 3 debe estar libre.

La 1-2-naftoquinona y ciertos derivados con substituciones en las posiciones 1 y 4, pero con la posición 3 libre, dan una reacción de color diferente. Esto permite diferenciar ambas, para y orto naftoquinonas.

No dan la reacción otros derivados del naftaleno, otras quinonas u otras vitaminas liposolubles.

Basado en esta reacción se describe un método colorimétrico

para la determinación de las vitaminas K sintéticas, entre límites de concentración de 35 y 150 microgramos por ml.

## B I B L I O G R A F I A

- (1) Karrer P. y col. *Helv. Chim. Acta* 22, 1513, 1939.
- (2) Fieser L. *J. Am. Chem. Soc.* 61, 2561, 1939.
- (3) Fieser L. *J. Am. Chem. Soc.* 61, 3474, 1939.
- (4) Dam H. *Biochem. Z.* 215, 475, 1929.
- (5) Doisy E. y col. *J. Biol. Chem.* 130, 219, 1939.
- (6) Binkley S. B. y col. *J. Biol. Chem.* 131, 326, 1939.
- (7) Cuorquodale D. y col. *J. Biol. Chem.* 131, 357, 1939.
- (8) Binkley S. B. *J. Am. Chem. Soc.* 61, 2558 y 2206, 1939.
- (9) Fieser L. *J. Am. Chem. Soc.* 61, 2559, 2561 y 3467, 1939.
- (10) Fieser L. *J. Biol. Chem.* 133, 391, 1940.
- (11) Fieser L. *Science.* 91, 31, 1939.
- (12) Almquist H. y Klose A. *J. Biol. Chem.* 130, 791, 1939.
- (13) Almquist H. y Klose A. *J. Biol. Chem.* 132, 469, 1940.
- (14) Ansbacher S. y Fernholz E. *J. Am. Chem. Soc.* 61, 1924, 1939.
- (15) Thayer y col. *J. Am. Chem. Soc.* 61, 2563, 1939.
- (16) Fernholz E. y Ansbacher S. *J. Am. Chem. Soc.* 62, 430, 1940.
- (17) Dam. H. y Karrer P. *Helv. Chim. Acta.* 22, 310, 1939.
- (18) Karrer P. *Helv. Chim. Acta* 22, 1146, 1939.
- (19) Fieser L. y col. *J. Am. Chem. Soc.* 61, 2206, 1939.
- (20) Irreverre y Sulliman *Science*, 94, 497, 1941.
- (21) Berlin (1940) en Novelli A. *Química y Bioquímica de las Vitaminas.* El Ateneo. Bs. As. 1942.
- (22) Craven R. J. *J. Chem. Soc.* 1605, 1931.
- (23) Mc Cuorquodale D. W. y col. *J. Biol. Chem.* 131, 537, 1939.
- (24) Binkley S. B. y col. *J. Biol. Chem.* 133, 721, 1940.
- (25) Novelli A. *Science* 93, 358, 1941.
- (26) Fieser L. *An. Int. Med.* 15, 648, 1941.
- (27) Trenner y Bacher J. *Biol. Chem.* 137, 745, 1941.
- (28) Scudi y Bush. *J. Biol. Chem.* 141, 451, 1941.
- (29) Almquist H. y Klose A. *J. Am. Chem. Soc.* 61, 1610, 1939.
- (30) Novelli A. *Química y Bioquímica de las Vitaminas.* El Ateneo 1942.
- (31) Scudi y Buhs. *J. Biol. Chem.* 144, 599, 1942.
- (32) Weyl. *Methodes de la Chimie Organique.* Dunod 1920, IV, 1548.

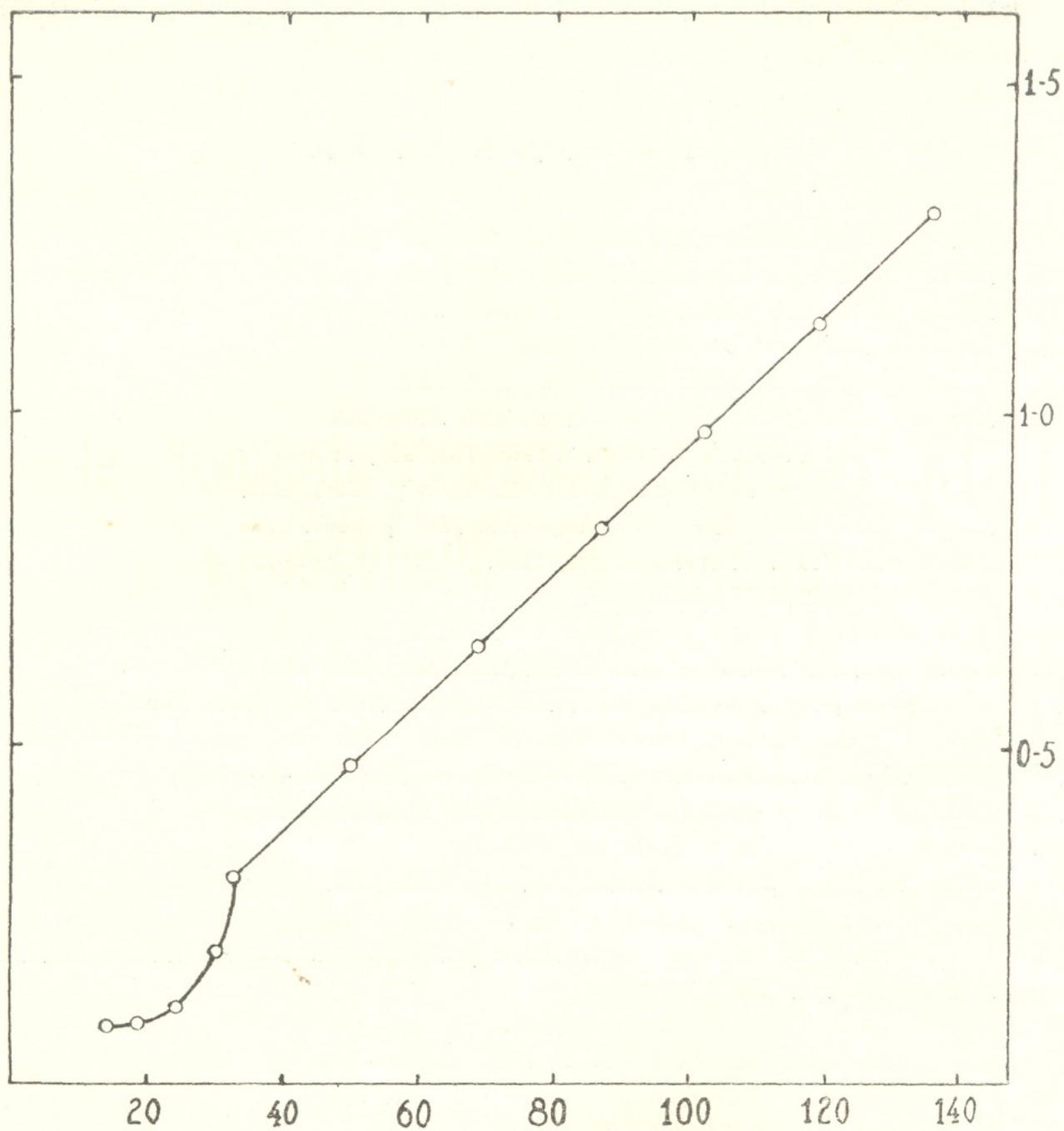


Fig. 1 — Ordenada, Extinción. Abscisa, microgramos de menadiona.  
Fotometro de Pulrich. Filtro S53.