

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE QUIMICA**

**ESTUDIO COMPARATIVO PARA CUANTIFICACION**  
**DE VITAMINA B<sub>2</sub> POR FLUOROMETRIA,**  
**COLORIMETRIA Y CROMATOGRAFIA**

**MARIA DE LOURDES GOMEZ SORIANO**  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**1 9 8 0**

M-21675



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE :

|                |                            |
|----------------|----------------------------|
| PRESIDENTE     | EVELVINA MEDRANO DE JAIMES |
| VOCAL:         | ANDRES ZUÑIGA PADILLA      |
| SECRETARIO:    | FERNANDO ABADIA CLEMENTE   |
| 1er. Suplente: | JOSE LUIS IBARMEA AVILA    |
| 2o. Suplente:  | HECTOR JARA FARJEAT        |

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA :

LABORATORIOS ENDO DE MEXICO, S.A.

SUSTENTANTE:



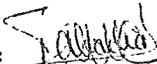
MA. DE LOURDES GOMEZ SORIANO

ASESOR:

ANDRES ZUÑIGA PADILLA



SUPERVISOR TECNICO :



FERNANDO ABADIA CLEMENTE

A MIS PADRES, con mi eterna  
gratitud, respeto y cariño.

A TOÑO, por su ayuda y ejemplo.

A mis Hermanas y a LALO  
con cariño.

A mi amor, AGUSTIN, por tu cariño  
y compañía ahora que te tengo con  
migo para siempre.

Agradezco al Q.F.B. Andres Zúñiga Padilla  
su dirección en el presente trabajo.

Muchas gracias al Q.F.B. Fernando  
Abadía Clemente por su supervisión  
y atenciones para la realización de  
este trabajo.

Agradezco a los Laboratorios Endo  
de México, S. A., por la ayuda pres  
tada para el desarrollo de este traa  
bajo.

## I N D I C E

|                                | pág. |
|--------------------------------|------|
| OBJETIVO .....                 | 1    |
| GENERALIDADES .....            | 2    |
| Historia                       |      |
| Propiedades químicas y físicas |      |
| Propiedades espectroscópicas   |      |
| Mecanismo de acción            |      |
| Acción farmacológica           |      |
| Aplicaciones terapéuticas      |      |
| Requerimientos humanos         |      |
| Deficiencia de Riboflavina     |      |
| Compuestos relacionados        |      |
| Fuentes de obtención           |      |
| PARTE EXPERIMENTAL .....       | 16   |
| Fórmula del multivitamínico    |      |
| Métodos de análisis utilizados |      |
| Técnicas                       |      |
| RESULTADOS.....                | 27   |
| Valoración:                    |      |

|                       |    |
|-----------------------|----|
| Método fluorométrico  |    |
| Método cromatográfico |    |
| Método colorimétrico  |    |
| Tiempos de análisis   |    |
| Costos                |    |
| DISCUSION.....        | 35 |
| CONCLUSIONES.....     | 41 |
| BIBLIOGRAFIA.....     | 42 |

O B J E T I V O

El tener la confianza de que una forma farmacéutica reúne todas las cualidades necesarias para que cumpla con su fin fundamental de prevenir o curar una enfermedad, nos conduce a la necesidad de contar con una metodología adecuada que nos permita asegurar la calidad óptima de dicha forma farmacéutica.

Actualmente se busca realizar lo anterior considerando como punto importante el reducir los costos de operación en el área del laboratorio analítico. Esta razón nos llevó a planear y realizar el presente trabajo con el fin fundamental de poder contar con una técnica analítica rutinaria para cuantificar la Vitamina B<sub>2</sub> en forma de Riboflavina-5-fosfato de sodio en un producto multivitamínico inyectable y que este método cumpliera además con los requisitos de: exactitud, precisión y rapidéz.

Para ello se seleccionaron tres métodos diferentes a probar: un método colorimétrico, un método empleando cromatografía en capa fina para la separación de la vitamina y su posterior --cuantificación espectrofotométrica y el método fluorométrico oficial descrito en la United States Pharmacopoeia en su XIX edición.

Asimismo se hicieron las pruebas necesarias para poder determinar si alguno de éstos métodos reunía además condiciones --necesarias suficientes para poder usarlo como método analítico --indicador de estabilidad.

GENERALIDADES

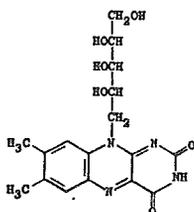
Historia.- La Riboflavina fue identificada primero en la leche por Blyth, en 1879. Se le dió el nombre de Lactocromo en razón de su intenso color amarillo. Posteriormente se aislaron compuestos amarillos de una gran variedad de substancias y se les llamó flavinas, nombre al que se agregó la indicación del origen (lactoflavina, ovoflavina, hepatoflavina, etc.). Pronto se demostró que estas diferentes flavinas tenían la misma composición química.

Entretanto, se logró la separación de la vitamina B hidrosoluble en dos partes: el factor antiberiberi termolábil ó vitamina  $B_1$  y el factor termoestable que favorece al crecimiento ó vitamina  $B_2$ . También se les denominó vitaminas F y G. Pronto se apreció que los concentrados de la llamada vitamina  $B_2$  tenían color amarillo, cuya intensidad estaba relacionada con la actividad vitamínica. Se demostró también que la lactoflavina cristalizada tenía las mismas propiedades químicas que la substancia pigmentada de los concentrados vitamínicos.

La vitamina fué designada con el nombre de Riboflavina por el Consejo de Farmacia y Química a causa de la presencia de ribosa en su estructura. Después el nombre se hizo oficial en la U.S.P.

Propiedades químicas y físicas. - El nombre químico de -

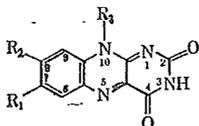
Ribloflavina<sup>16</sup> es 7,8-dimetil-10-D-ribitil isoaloxazina ó 7,8-dimetil-10-(D-ribo-2,3,4,5-tetrahidroxipentil) isoaloxazina, su fórmula condensada  $C_{17}H_{20}N_4O_6$ . Tiene un peso molecular de 376.4 --- punto de fusión<sup>16</sup> de 278-282°C con descomposición (se oscurece - a alrededor de 240°C). Su estructura química es la siguiente:



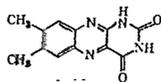
Se presenta como polvo cristalino amarillo o amarillo-naranja con ligero olor característico. Recristalizada de piridina, agua, alcohol o ácido acético 2N de agujas finas naranja-amarillas<sup>16</sup>. Rotación específica + 56.5° a +59.5° en una solución de 50 mg. por 10 ml. de HCl<sup>9</sup> ó  $[\alpha]_D^{25}$  - 112° a -122° (50 mg. en 2 ml. de solución hidroalcohólica de hidróxido de sodio 0.1N diluído a 10 ml. con agua<sup>16</sup>. Su pH en solución saturada es de 5.5 a 7.2<sup>15</sup>. La solubilidad va de 1 en 3000 a 1 en 20000 en agua, dependiendo esta variación de su estructura cristalina interna que puede presentarse en tres formas<sup>15</sup>. Es más soluble en solución salina isotónica y en solución de urea al 10%; prácticamente insoluble en alcohol, benceno, acetona, cloroformo y éter ligeramente soluble en ciclohexanol, acetato de amilo y ---

Como se explicó anteriormente, la Riboflavina es muy susceptible a los agentes reductores, pero aún en ausencia de estos agentes externos la porción de isoaloxazina sufre una foto-reducción con ayuda de la cadena de ribosa que actúa como donador de electrones, pasando a la forma de leucoriboflavina.

Generalmente cuando esta forma de la molécula se oxida espontáneamente al exponerla al aire puede ocurrir una fragmentación para dar varios fotoproductos como indica la tabla siguiente:



| COMPUESTO           | R <sub>1</sub> R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub>   |
|---------------------|-------------------------------|--|
| Riboflavina         | -CH <sub>3</sub>              | -CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> OH |
| Formilmetilflavina  | -CH <sub>3</sub>              | -CH <sub>2</sub> CHO   |
| Carboximetilflavina | -CH <sub>3</sub>              | -CH <sub>2</sub> COOH  |
| Lumiflavina         | -CH <sub>3</sub>              | -CH <sub>3</sub>   |
| Lumicromo           |                               |  |



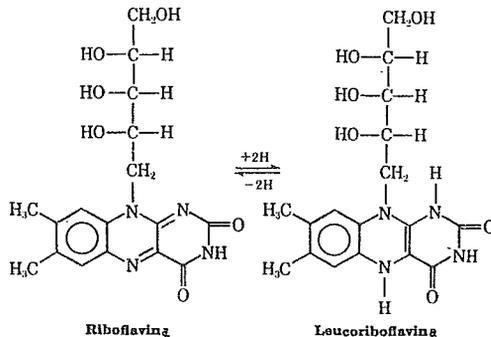
13

Propiedades espectroscópicas.- El espectro ultravioleta-visible de la Riboflavina en solución a pH 7 consiste en cuatro bandas principales centrales alrededor de 220, 266, 375 y 444 nm.

16  
 fenol. Es muy soluble pero inestable en soluciones de álcalis -  
 diluídos, se incrementa la solubilidad por compuestos aromáticos  
 tales como la nicotinamida, probablemente porque existe la forma  
 15  
 ción de un complejo de solvatación intermolecular.

Es incompatible con álcalis y sales de metales pesados.  
 Se debe conservar en envases resistentes a la luz, cuando se en-  
 cuentra en forma de polvo seco no le afecta la luz difusa en --  
 forma apreciable, pero en solución, especialmente en presencia -  
 de álcalis, se deteriora rápidamente, siendo ésta deterioración  
 15, 20  
 acelerada por luz.

Presenta propiedades de óxido-reducción, se reduce en pre-  
 sencia de ditionito de sodio, Zinc metálico en medio ácido y tri-  
 cloruro de Titanio. 20

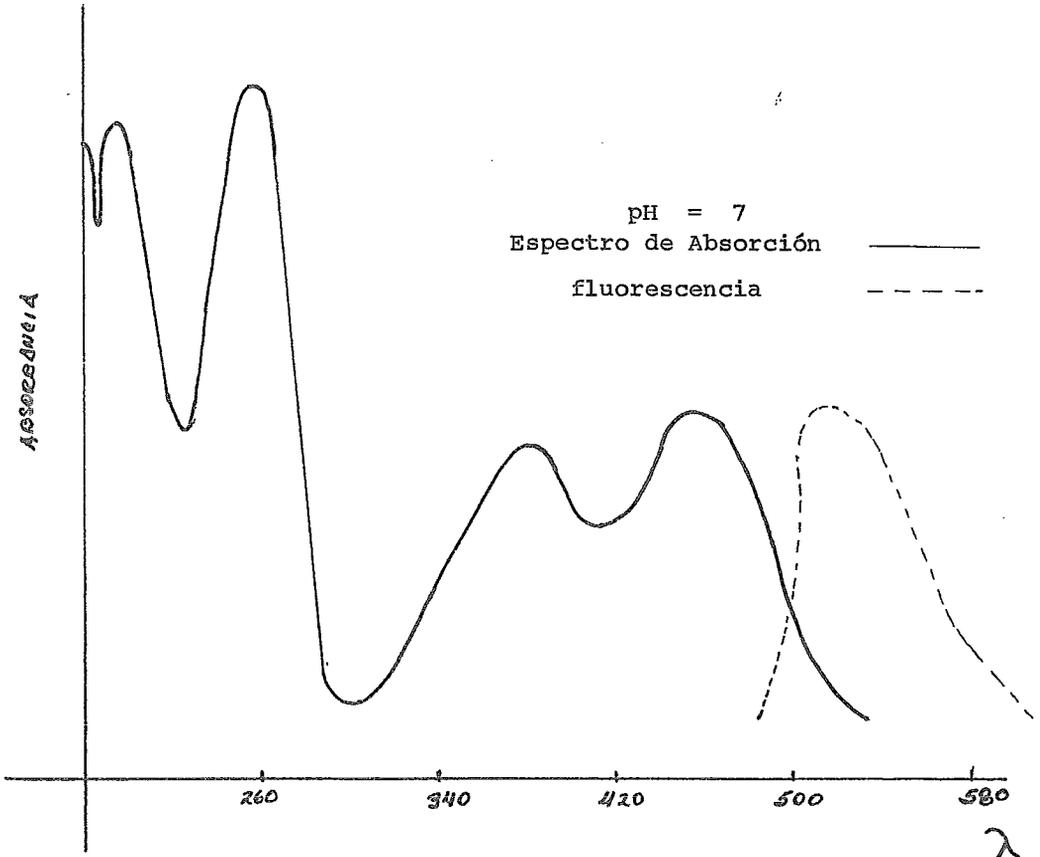


Respecto a esta propiedad de óxido-reducción la molécula  
 de la Riboflavina sufre un fenómeno muy especial, una FOTOLISIS  
 INTRAMOLECULAR o FOTORREDUCCION INTRAMOLECULAR. 13, III

La banda que da a 375 nm. se ve muy afectada por el disolvente que se use, generalmente cambiando a una longitud de onda mas corta a medida que se usen disolventes de menor polaridad.

La posición de la banda que se presenta en el visible a 444 nm. no se afecta apreciablemente.

Muestra una intensa fluorescencia con longitud de onda -- máxima de 530 nm. para emisión. Su espectro es el siguiente:



10,15

Absorción, destino y excreción.-

La absorción y excreción de la vitamina es esencialmente idéntica ya sea riboflavina ó su sal fosfato de sodio administra da oralmente. La absorción por vía parenteral es excelente en el sitio de aplicación.

La riboflavina formada de riboflavina-5-fosfato de sodio (flavinmononucleotido) o dada directamente como riboflavina base se convierte eventualmente a flavinmononucleótido en la mucosa intestinal fosforilandose enzimáticamente.

Absorbida la riboflavina, pasa a la sangre y se distribuye en todos los tejidos en donde se almacena en pequeñas cantidades. La concentración mas alta se encuentra en hígado, riñón y corazón, tal vez debido a su alto contenido de enzimas. En to das las células se transforma en mono y dinucleótido uniéndose a las proteínas del plasma quedando bien retenidas.

Cuando se administra por vía oral, cantidades por enzima de 50 mg, la concentración en el plasma se incrementa arriba de 300 ng/ml y del 20 al 40 % de la dosis de excreta en la orina.

Después de una inyección intravenosa de 84 mg., la concen tración en el plasma se eleva a 1.8 mcg/ml y el 97 % de la dosis se excreta por la orina.

La eliminación de la riboflavina es resultado de excreción renal, excreción biliar, mínima secreción por otras vías (leche) e interconversiones a otras flavinas, coenzimas y flavoproteínas.

Puntualizando, la riboflavina se metaboliza parcialmente en el organismo y el exceso se excreta inalterada en la orina y en la leche.

En las heces siempre está presente la riboflavina debido a que probablemente se trate de riboflavina sintetizada por los microorganismos intestinales.

3, 10

#### Acción farmacológica.

La administración por vía oral o parenteral de la riboflavina no produce acción farmacodinámica manifiesta.

13

#### Mecanismo de acción

La riboflavina desempeña un papel importante en los sistemas enzimáticos relacionados con la respiración celular, u oxidaciones tisulares. Forma parte de las flavoproteínas flavinmononucleólido y flavinadenindinucleotido, enzimas que están constituidas por una proteína, la apoenzima y un grupo prostético - que es la riboflavina. Son necesarios para la oxidación de carbohidratos, aminoácidos, aldehídos y otros productos del metabolismo así como para conservar la integridad de los tejidos superficiales como piel y mucosas.

Gracias a la propiedad de la vitamina de oxidoreducción, la riboflavina presente en el sistema gana o pierde hidrógeno. Así el substrato, carbohidrato o aminoácido pueden oxidarse por

eliminación de hidrógeno.

El primer aceptor de hidrógeno en la cadena es nicotinade nindinucleotido. El sistema de riboflavina oxidada sirve entonces como aceptor de hidrógeno para el sistema de coenzimas y nuevamente es oxidada por el sistema de citocromos.

Finalmente el hidrógeno se pasa a un oxígeno para completar el ciclo oxidativo.

10

#### Aplicaciones terapéuticas.

La única aplicación terapéutica comprobada de la riboflavina es el tratamiento y la profilaxis de la arriboflavinosis o carencia de la vitamina.

La arriboflavinosis raramente ocurre como deficiencia aislada sin que acompañe a otras deficiencias nutricionales, especialmente la pelagra. Por tanto, el tratamiento de la arriboflavinosis debe incluir generalmente a los demás miembros del complejo B.

Siendo el papel que desempeña la riboflavina en los sistemas enzimáticos tan importante, es de llamar la atención como la carencia de la vitamina produce solamente fenómenos de naturaleza poco peligrosa. Problabmente se deba a la existencia de otras enzimas que suplen esa deficiencia.

10

#### Requerimientos humanos.

Los requerimientos de riboflavina están estrechamente re-

lacionados con el gasto energético. Los adultos normales requieren alrededor de 1.3 a 1.8 mg diarios incrementándose durante la preñez y la lactación a 2.0 mg diarios.

Los niños necesitan 0.6 mg al día al nacer aumentando hasta los quince años en que llega a 2 mg diarios.

Dosis:

|                    |                   |
|--------------------|-------------------|
| Profiláctica       | 1 a 4 mg diarios  |
| Terapéutica        | 5 a 10 mg diarios |
| Rango usual U.S.P. | 1 a 22 mg diarios |

10

Deficiencia de Riboflavina: Arriboflavinosis

No en muchos lugares del mundo se tienen conocimiento de la existencia de arriboflavinosis.

En países como los Estados Unidos de Norteamérica, al Sur, India y China existen síntomas comunes de esta carencia que a su vez se favorece con la presencia de diarrea.

La carencia provoca trastornos principalmente:

- I. Bucales
- II. Cutáneos
- III. Oculares

I.- TRANSTORNOS BUCALES.- Queilosis que consiste en enrojecimiento, descamación y ulceración (fisura) de las comisuras de la boca.

II.- TRANSTORNOS CUTANEOS.- Dermatitis escamograsosa seborreica en la nariz, orejas y surco nasolabial.

III.- TRANSTORNOS OCULARES.- Queratitis, ardor en los ojos, lagrimeo, fotofobia, vascularización anormal en la unión esclerocorneana e invasión vascular de la córnea apareciendo opacidades que reducen la visión.

Como sucede en todos los casos de avitaminosis, la administración de la riboflavina en los casos de carencia de la misma hace desaparecer los transtornos correspondientes.

14

Fuentes de obtención.

La riboflavina se encuentra distribuída ampliamente en la naturaleza, en plantas, animales y sintetizada por microorganismos.

Los órganos que hacen una contribución importante de la riboflavina son principalmente el hígado, riñón y corazón de los animales.

Se tiene una pérdida moderada de la vitamina durante la cocción de los alimentos, carnes y verduras.

Algunos de los organismos que la sintetizan son:

Hongos : Ashbya gossypii, Eremothecium ashbyii,

Levaduras: Candida guillermondii, Candida spp :

Protozoarios: Chilemonas paramecium, Tetrahymena gleii,

Bacterias: Clostridium spp, Aerobacter spp, Azotobacter spp, Lactobacilus casei y algunas mas como las bacterias intestinales que la sintetizan en pequeñas cantidades.

Existen muchas evidencias que soportan la teoría de que una purina sirve como precursor obligatorio de la riboflavina en su biosíntesis.<sup>13</sup>

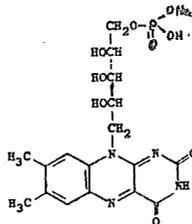
Esto se ha determinado con la incorporación de carbono 14 en bicarbonato y glicina utilizados por los microorganismos.

### Compuestos relacionados

#### Flavoproteínas relacionadas

15,9,3

#### Riboflavina-5-fosfato de sodio



7,8-dimetil-10-(D-ribit-1-il)isaloaxazina 5-fosfato de sodio dihidratado.

C<sub>17</sub> H<sub>20</sub> N<sub>4</sub> Na O<sub>9</sub> P. 2 H<sub>2</sub>O

P.M. 514.4

Descripción.- Polvo cristalino amarillo o amarillo naranja casi inodoro, higroscópico con ligero sabor característico.

Equivalencia.- 1.37 g de riboflavina 5-fosfato de sodio equivale aproximadamente a 1 g de riboflavina.

pH Una solución al 2 % en agua tiene de 4 a 6.3

Rotación específica.- 1.5 % en HCl 5N - 38° a - 42°

Solubilidad.- Soluble 1 en 20 de agua, muy ligeramente soluble en alcohol y dicloroetano, poco soluble en acetona y acetato de etilo, prácticamente insoluble es éter.

Salvo estas propiedades que difieren de la riboflavina base, todas las mencionadas anteriormente son las mismas que presenta la riboflavina 5-fosfato.

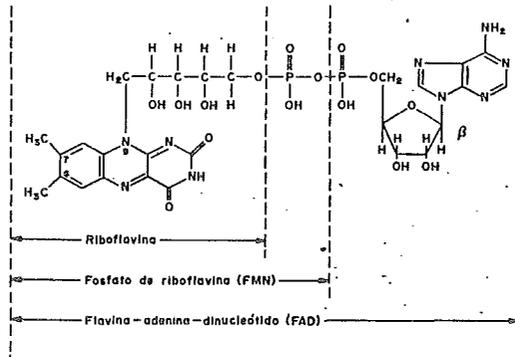
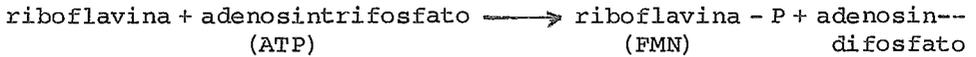
Algunas sustancias afines a la riboflavina también poseen actividad fisiológica, pero no se pueden hacer variar mucho la estructura de la vitamina sin provocar su inactividad.

De todas las cadenas laterales que han sido unidas al nitrógeno en la posición 10 solo las moléculas que contienen ribosa o arabinosa manifiestan actividad vitamínica.

La presencia del grupo metilo en 7 y 8 también es esencial. Si faltan ambos grupos metilo el compuesto se comporta como antagonista de la riboflavina.

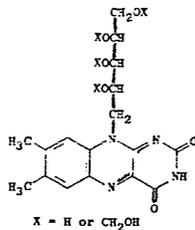
Las funciones de la riboflavina en el organismo se realizan en forma de sus coenzimas, el FLAVIN MONO NUCLEOTIDO (FMN) o riboflavina 5-fosfato y el FLAVIN ADENIN DINUCLEOTIDO (FAD).

La conversión de riboflavina en FMN y FAD se efectúan por las siguientes reacciones catalizadas por enzimas.



### Metilolriboflavina<sup>16</sup>

(Hyflavina)



Mezcla de metilol ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ) derivados de riboflavina formados por la acción de formaldehído sobre la riboflavina en solución débilmente alcalina.

El número de grupos metilol en la cadena de ribosa varía de uno a tres.

Descripción.- Polvo naranja a amarillo, higroscópico. Puede tener un ligero olor a formaldehído.

Solubilidad.- Soluble en agua, prácticamente insoluble en alcohol, benceno, éter y cloroformo.

pH al 10 % en solución acuosa 6.7 a 7.9

Rotación específica.- Dextrorrotatorio

Estabilidad.- El polvo seco es inestable y pierde su actividad biológica, en el curso de varios meses con liberación de formaldehído y formación parcial de productos prácticamente insolubles en agua.

Dosis.- Se administra parenteralmente a infantes y adultos. Dosis recomendada 0.6 mg diarios a niños y se incrementa de 2 a 2.5 mg entre 13 y 20 años.

Aplicación terapéutica.- Se empleó como fuente de cofactor que utilizan algunas enzimas. Semejante a la Riboflavina.

FORMULA  
DEL  
MULTIVITAMINICO

A continuación se detallan los componentes de la formulación de la solución polivitáminica bajo estudio.

El hecho de que se trate de una solución facilita de manera notable la realización de la determinación analítica.

Cada ml contiene:

|                                     |          |
|-------------------------------------|----------|
| Riboflavina 5-fosfato de sodio..... | 13.70 mg |
| equivalente a 10 mg de Riboflavina  |          |
| Clorhidrato de Tiamina.....         | 25.00 mg |
| Clorhidrato de Piridoxina.....      | 5.00 mg  |
| Nicotinamida.....                   | 50.00 mg |
| Pantenol.....                       | 10.00 mg |
| Vehículo c.b.p.....                 | 1.0 ml   |

PART E

EXPERIMENTAL

METODOS DE ANALISIS UTILIZADOS

1,2

GENERALIDADES

Para elegir cual de los métodos conocidos puede proporcionar mejores resultados con mayor rapidéz depende principalmente de la naturaleza de la muestra y el contenido previsto de riboflavina.

1,2

## METODO FLUOROMETRICO

El método fluorométrico es más sensible que el colorimétrico por lo que se puede utilizar tanto en preparaciones farmacéuticas como en productos naturales.

Es un método reproducible unicamente cuando la solución problema se halla exenta de otras substancias fluorescentes. --

En la parte final del análisis se convierte la riboflavina a leucoriboflavina no fluorescente reduciéndola con ditionito de sodio, se determina la fluorescencia residual de la solución y el valor obtenido se resta de la lectura lograda antes de este tratamiento. En este paso debe emplearse en lo posible, la misma cantidad de ditionito para cada determinación y preferentemente no exceder los 20 mg. ya que una concentración salina demasiado alta puede afectar la fluorescencia.

1,2

## METODO DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Posee las ventajas del método colorimétrico en cuanto a -

la determinación final de la vitamina. Aún mejor, al llevar a cabo una separación de la vitamina del resto de los componentes del multivitamínico eliminando las interferencias causadas por estos.

1,2

## METODO COLORIMETRICO DIRECTO

Generalmente la medida directa del color intrínseco de la riboflavina suele ser suficiente para el análisis en preparaciones farmacéuticas. El color amarillo obedece a la ley de Beer a las concentraciones que se utilizan para la medición a 444 nm, - el intervalo óptimo es de 1 a 2 mg. de riboflavina por 100 ml.- por lo que el método se aplica solamente a concentrados de vitamina B<sub>2</sub> y medicamentos que la contengan en estas cantidades y - siempre y cuando no estén presentes en su formulación substancias coloreadas.

T E C N I C A S

18

## METODO FLUOROMETRICO.

Preparación de reactivos y soluciones:

Solución del Estándar:

Pesar exactamente alrededor de 50 mg de Riboflavina Estándar de Referencia U.S.P., transferirlos en matraz volumétrico de 500 ml y disolverlos en aproximadamente 300 ml de ácido acético glacial 0.02 N con ayuda de calor. Enfriar y diluir al volúmen con ácido acético glacial 0.02 N. De esta solución tomar una alícuota de 10 ml y transferirla a un matraz aforado de 100 ml. Llevar al volúmen con ácido acético 0.02 N. Tomar una alícuota de 10 ml de la solución interior y llevarlos a un matraz volumétrico de 100 ml.; llevar al volúmen con agua.

Solución del Problema:

Transferir una alícuota de la muestra que contenga aproximadamente el equivalente a 100 mg. de Riboflavina a una matraz volumétrico de 500 ml. y llevar al volúmen con agua. De esta solución tomar una alícuota de 10 ml. y aforar a 1000 ml. con agua. De esta última dilución transferir una alícuota de 5 ml. y se aforan a 100 ml. con agua.

Solución de Permanganato de potasio.

Pesar 1 g de Permanganato de potasio y disolverlo en 25 ml de agua.

Solución de Peróxido de Hidrógeno.

Preparar una solución que contenga una parte de Peróxido de Hidrógeno al 30% por nueve partes de agua.

Procedimiento.

Pipetear en cada uno de cuatro tubos de ensayo una alícuota de 10 ml. de la solución problema e identificarlos como 1, 2, 3, y 4, respectivamente. A los tubos 1 y 3 se adiciona enseguida 1 ml. de la solución estándar y a los tubos 2 y 4 un ml. de agua. Enseguida agregar 1 ml. de ácido acético glacial a cada uno de los cuatro tubos. Finalmente ya para leer, adicionar 0.5 ml. de la solución de permanganato de potasio a cada tubo y se dejan reposar 2 minutos exactamente.

Transcurrido este tiempo agregar 0.5 ml. de la solución de peróxido y agitar los tubos vigorosamente hasta desaparecer el color rosa y las burbujas. Tan pronto desaparezcan éstas se procede a vaciar las soluciones en las cubetas del fluorómetro y se lee la fluorescencia que emiten empezando por los tubos 2 y 4.

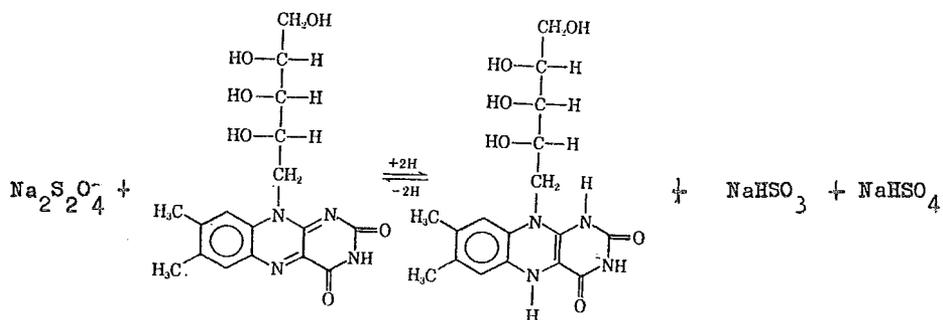
Se regresan las soluciones a los tubos originales respectivos. Enseguida leer nuevamente las soluciones después de adicionar 20 mg de ditionito de sodio (Hidrosulfito de sodio)  $(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4)$  a cada tubo, uno a la vez. Debe agregarse rápidamente el ditionito, agitar fuertemente y leer en el curso de 5 a 10 segundos a partir de la adición.

Durante la preparación de las soluciones de riboflavina deben cubrirse con tela oscura ó una protección para evitar la incidencia de la luz.

Los filtros del fluorómetro son de alrededor de 365 nm en

## MECANISMO DE REACCION

## Método fluorométrico



la entrada y de 435 nm en la salida.

El fluorómetro se ajusta a cero con aire o sea sin cubeta en la parte que le corresponde.

Calculos.

$$\text{mg de Riboflavina/ml} = \frac{I_u - I_b}{I_s - I_u} \times \frac{\text{mg de estándar}}{5} \times \text{pureza est.}$$

$I_u$  = promedio de lecturas de los tubos 2 y 4 sin Ditionito de sodio

$I_s$  = promedio de lectura de los tubos 1 y 3 sin Ditionito de sodio

$I_b$  = promedio de lectura de los tubos 1, 2, y 3 y 4 con Ditionito de sodio.

17

METODO CROMATOGRAFICO.

Material y reactivos:

Placas de vidrio para cromatografía en capa fina 20x20 cm.

Se cubre las placas con silica gel GF<sub>254</sub> con un espesor de 0.25 mm .

Microjeringas

Cámara para cromatografía

Acido fórmico

Dietanolamina

Fosfato dibásico de sodio M/15

## Preparación de las Soluciones:

### Solución del Estándar

- Pesar 500 mg de Riboflavina U.S.P. Estándar de Referencia y se pasan a un matraz aforado de 50 ml., disolver con aproximadamente 30 ml. de ácido acético 0.020 N y con ayuda de calor. Ya disuelto completamente, enfriar y llevar al aforo con el mismo ácido. De esta solución tomar una alícuota de 10 ml. y transferir a un matraz volumétrico de 25 ml. aforado con agua.

### Solución del problema.

Transferir un volumen de la muestra que contenga aproximadamente el equivalente a 100 mg de Riboflavina y se llevan a un matraz aforado de 25 ml., llevar al volumen con agua.

### Procedimiento:

En una placa de cromatografía previamente activada 30 min. a 105°C y dividida en cinco carriles se aplican por separado, -- 0.025 ml. de solución estándar y 0.025 ml. de la solución del -- problema, por duplicado, (hacer preferentemente dos estándares y dos problemas distintos) y el último carril se toma como blanco.

El ancho de la banda de aplicación no debe ser mayor de 0.5 cm.

Se introduce la placa en la cámara de cromatografía que previamente se ha dejado saturar una hora aproximadamente con un sistema de ácido fórmico: dietanolamina: fosfato dibásico de

sodio M/15 (3:1:5).

Cubrir la cámara con tela oscura y permitir que el sistema recorra la placa casi hasta el límite de la línea superior de la placa ( el tiempo aproximado es de 60 minutos) y se saca de la cámara. Se evapora el disolvente con corriente de nitrógeno y protegiendo de la luz. Se observan las manchas bajo luz ultravioleta a una onda de 254 nm observandose una mancha amarilla de la riboflavina sobre un fondo verde y a una longitud de onda de 336 nm las manchas son fluorescentes. Inmediatamente se marcan los límites de las manchas en la silicagel y se raspan cuidadosamente transfiriendo cuantitativamente el polvo a matraces aforados de 10 ml llevar al aforo con agua destilada. Agitar perfectamente los matraces y centrifugar las soluciones a 3000 rpm durante 5 minutos.

Las soluciones perfectamente claras se leen en un espectrofotómetro adecuado a 444 nm y celdas de 1 cm usando como blanco la solución que se obtuvo del carril que se dejó libre para este fin.

#### Cálculos

$$\text{Mg de Riboflavina/ml} = \frac{\text{Abs. prob.}}{\text{Abs. est.}} \times \frac{\text{mg est.}}{50} \times \text{pureza est.}$$

11

METODO COLORIMETRICO DIRECTO

Preparación de reactivos y soluciones

#### Solución estándar

Pesar exactamente alrededor de 50 mg de Riboflavina Estándar

dar de Referencia U.S.P. y transferirlos a un matraz volúmetrico de 500 ml. disolverlos en aproximadamente 300 ml de ácido acético 0.02 N con ayuda de calor. Enfriar y diluir a 500 ml con el ácido acético 0.02 N. De esta solución transferir una alícuota de 10 ml a un matraz de 100 ml y aforar con agua.

#### Solución Problema

Transferir una alícuota de la muestra que contenga aproximadamente el equivalente a 100 mg de Riboflavina a un matraz aforado de 100 ml y llevar al volumen con agua. De esta solución transferir una alícuota de 1 ml a otro matraz aforado de 100 y se lleva al volumen con agua.

#### Solución de Hidróxido de sodio 1 N

Pesar 40 g de hidróxido de sodio R.A. y se lleva a un matraz aforado de 1000 ml. Se lleva al volumen con agua.

#### Solución de Acido Acético 5 N.

Llevar 290 ml de ácido acético glacial a un matraz volúmetrico de 1000 ml y se afora con agua.

#### Procedimiento.

Al realizar la segunda dilución de las soluciones estándar y problema se adicionan 3 ml. de solución de hidróxido de sodio y 2 ml. de solución de ácido acético y se lleva al aforo con agua. Se leen las absorbancias de las soluciones en un espectro

fotómetro adecuado a una longitud de onda de 444 nm y celdas de 1 cm utilizando agua como blanco.

Durante todo el procedimiento de preparación de las soluciones de Riboflavina se les debe cubrir de la luz.

Cálculos.

$$\text{mg de Riboflavina/ml} = \frac{\text{Abs. Prob.}}{\text{Abs. Est.}} \times \frac{\text{mg Est.}}{5} \times \text{pureza del est.}$$

## R E S U L T A D O S

RESULTADOS DE LA VALORACION DE RIBOFLAVINA-5-FOSFATO DE SODIO  
COMO RIBOFLAVINA POR EL METODO FLUOROMETRICO

Se llevaron a cabo 25 determinaciones de la vitamina sobre el multivitamínico dando los resultados siguientes en porcentaje basados en el contenido teórico de Riboflavina, que es de 11.50 mg/ml.

|        |        |
|--------|--------|
| 95.98  | 103.40 |
| 96.42  | 95.73  |
| 100.54 | 94.36  |
| 96.90. | 98.27  |
| 95.23  | 96.69  |
| 100.86 | 96.69  |
| 103.04 | 95.03  |
| 101.45 | 95.41  |
| 97.82  | 92.98  |
| 100.00 | 97.51  |
| 96.86  | 101.78 |
| 100.79 | 100.63 |
| 97.10  |        |

$$\bar{x} = 98.06 \%$$

límites de confianza al 95 %

$$\sigma = 2.8465$$

$$t = 2.06$$

$$\frac{\sigma}{\sqrt{N}} \times t = \frac{2.8465 \times 2.06}{\sqrt{25}} = 1.1727$$

$$98.06 \pm 1.1727 \%$$

RESULTADOS DE LA VALORACION DE RIBOFLAVINA 5 FOSFATO DE SODIO  
 COMO RIBOFLAVINA POR EL METODO CROMATOGRAFICO

Se llevaron a cabo 25 determinaciones de la vitamina sobre el multivitamínico dando los resultados siguientes en porcentaje basados en el contenido teórico de Riboflavina que es de 11.50 -- mg/ml.

|        |        |
|--------|--------|
| 90.96  | 99.69  |
| 92.04  | 92.91  |
| 93.91  | 96.14  |
| 97.97  | 95.89  |
| 96.39  | 94.70  |
| 96.39  | 101.55 |
| 96.90  | 98.59  |
| 98.17  | 95.69  |
| 96.90  | 100.60 |
| 98.81  | 101.73 |
| 103.01 | 94.68  |
| 103.09 | 98.48  |
| 100.68 |        |

$$\bar{x} = 97.38 \%$$

límites de confianza al 95 %

$$\sigma = 3.3484$$

$$t = 2.06$$

$$\frac{\sigma \times t}{\sqrt{N}} = \frac{3.3484 \times 2.06}{\sqrt{25}} = 1.3795$$

$$97.38 \pm 1.3795 \%$$

RESULTADOS DE LA VALORACION DE RIBOFLAVINA 5 FOSFATO DE SODIO  
COMO RIBOFLAVINA POR EL METODO COLORIMETRICO

Se llevaron a cabo 25 determinaciones de la vitamina sobre el multivitamínico dando los resultados siguientes en porcentaje basados en el contenido teórico de Riboflavina que es de 11.50 -- mg/ml.

|        |        |
|--------|--------|
| 99.99  | 99.62  |
| 98.29  | 98.38  |
| 99.73  | 99.87  |
| 99.47  | 99.37  |
| 100.25 | 99.62  |
| 99.38  | 99.37  |
| 99.39  | 98.38  |
| 102.08 | 101.90 |
| 97.17  | 102.65 |
| 98.91  | 101.65 |
| 99.87  | 101.40 |
| 97.63  | 100.90 |
| 99.37  |        |

$$\bar{x} = 99.79 \%$$

$$\sigma = 1.3683$$

limites de confianza al 95 %

$$t = 2.06$$

$$\frac{\sigma \times t}{\sqrt{N}} = \frac{1.3683 \times 2.06}{\sqrt{25}} = 0.5637$$

$$99.79 \pm 0.5637 \%$$

RESULTADOS DE LA VALORACION DE RIBOFLAVINA 5 FOSFATO DE SODIO SOBRE UNA MUESTRA DEL MULTIVITAMINICO CON TRES AÑOS DE ELABORACION MANTENIDA A TEMPERATURA AMBIENTE.

Se realizaron cinco determinaciones de Riboflavina 5 fosfato de sodio como Riboflavina, los resultados se expresan en - mg/ml

METODO FLUOROMETRICO

13.05 mg/ml

12.24 "

12.24 "

12.16 "

13.74 "

METODO CROMATOGRAFICO

11.77 mg/ml

11.82 "

11.36 "

11.72 "

11.14 "

METODO COLORIMETRICO

11.84 mg/ml

11.84 "

11.84 "

11.65 "

11.79 "

TIEMPO DE ANALISIS REQUERIDO PARA REALIZAR LA  
VALORACION DE LA RIBOFLAVINA POR CADA UNO DE  
LOS TRES METODOS

METODO FLUOROMETRICO

|                       |          |       |   |         |              |
|-----------------------|----------|-------|---|---------|--------------|
| DILUCIONES REALIZADAS | Estándar | 50 mg | → | 500 ml  | (100 mcg/ml) |
|                       |          | 10 ml | → | 100 ml  | ( 10 mcg/ml) |
|                       |          | 10 ml | → | 100 ml  | ( 1 mcg/ml)  |
|                       | Problema | 10 ml | → | 500 ml  | (200 mcg/ml) |
|                       |          | 10 ml | → | 1000 ml | ( 2 mcg/ml)  |
|                       |          | 5 ml  | → | 100 ml  | (0.1 mcg/ml) |

PREPARACION DE MUESTRAS      Preparar cuatro tubos por cada problema.  
Adición de reactivos y reposo.

LECTURA DE SOLUCIONES      Después de leer la absorbancia de cada  
tubo se realiza una mas posterior a la -  
adición del agente reductor.

TIEMPO ESTANDAR REQUERIDO:      80 minutos

METODO CROMATOGRAFICO

|                       |          |          |   |       |            |
|-----------------------|----------|----------|---|-------|------------|
| DILUCIONES REALIZADAS | Estándar | 500 mg   | → | 50 ml | (10 mg/ml) |
|                       |          | 10 ml    | → | 25 ml | ( 4 mg/ml) |
|                       |          | 0.025 ml | → | 10 ml | (10 mg/ml) |
|                       | Problema | 10 ml    | → | 25 ml | ( 4 mg/ml) |
|                       |          | 0.025 ml | → | 10 ml | (10 mg/ml) |

PREPARACION DE PLACAS  
APLICACION DE SOLUCIONES  
ELUCION DE LAS BANDAS DE RIBOFLAVINA  
CENTRIFUGADO DE LAS SOLUCIONES

TIEMPO ESTANDAR REQUERIDO:      70 minutos

METODO COLORIMETRICO

## DILUCIONES REALIZADAS

Estandar 50 mg  $\rightarrow$  500 ml (100 mcg/ml)10 ml  $\rightarrow$  100 ml ( 10 mcg/ml)Problema 10 ml  $\rightarrow$  100 ml ( 10 mcg/ml)1 ml  $\rightarrow$  100 ml ( 10 mcg/ml)TIEMPO ESTANDAR REQUERIDO: 30 minutos

NUMERO DE ANALISIS POSIBLES DE REALIZAR  
EN SERIE UTILIZANDO CADA UNO DE LOS TRES  
METODOS DE ANALISIS

Tomando en cuenta la susceptibilidad a la descomposición de la riboflavina en solución, se realizarían los siguientes análisis de tal manera que el tiempo que transcurre durante su elaboración no afecta seriamente a la vitamina.

| <u>METODO DE ANALISIS</u> | <u>No. DE ANALISIS EN SERIE</u> |
|---------------------------|---------------------------------|
| FLUOROMETRICO             | 2                               |
| CROMATOGRAFICO            | 2                               |
| COLORIMETRICO             | 5                               |

COSTO DE CADA UNO DE LOS METODOS DEANALISIS

Tomando como base el costo hora-químico de \$ 78.00

## METODO FLUOROMETRICO

Tiempo de análisis: 80 minutos

|               |                  |
|---------------|------------------|
| hora- químico | \$ 104.00        |
| reactivos     | \$ 4.00          |
| total         | <u>\$ 108.00</u> |

## METODO CROMATOGRAFICO

Tiempo de análisis: 70 minutos

|              |                  |
|--------------|------------------|
| hora-químico | \$ 90.00         |
| reactivos    | \$ 25.00         |
| total        | <u>\$ 115.50</u> |

## METODO COLORIMETRICO

Tiempo de análisis: 30 minutos

|              |                 |
|--------------|-----------------|
| hora-químico | \$ 39.00        |
| reactivos    | \$ 5.00         |
| total        | <u>\$ 44.00</u> |

## D I S C U S I O N

DISCUSION

Tomando en cuenta que el producto a valorar es la vitamina B<sub>2</sub> en forma de fosfato 5 de riboflavina que se encuentra formando parte de una solución inyectable polivitamínica y como en todo producto farmacéutico y más en aquellos que son de aplicación parenteral requieren de un estricto control de calidad muy especialmente en el renglón del control químico, es necesario -- contar con métodos de gran especificidad, así como de exactitud y precisión.

Los métodos usados para este estudio como ya se discutió con anterioridad son:

- METODO FLUOROMETRICO (USP)
- METODO CROMATOGRAFICO EN PLACA FINA
- METODO COLORIMETRICO

Cada uno de ellos tiene ventajas así como desventajas lo cual a continuación se expone.

METODO FLUOROMETRICO

Es el método mas sensible de los tres utilizados, alrededor de 0.1 mcg/ml de riboflavina.

En cuanto a especificidad, no se puede considerar que este método sea muy específico ya que existe en la formulación la tiamina que en su forma oxidada también emite fluorescencia e -- igualmente un producto de descomposición de ésta que es el tio--

cromo.

Por lo que respecta a la exactitud y precisión logrado con éste método se observa que no se tienen los mejores resultados -- con el.

#### Ventajas.

La sensibilidad tan alta del método (0.1 mcg/ml) pudiera - considerarse como una ventaja para la determinación, sin embargo, ya que en la preparación existe una concentración de riboflavina mas que suficiente para un análisis colorimétrico directo no re-- sulta tan ventajosa esta propiedad para esta preparacion particular.

#### Desventajas.

Se observó que por otra parte, debido a la concentración - tan pequeña necesaria para leer en el fluorómetro resulta un inconveniente ya que para disminuir la concentración de riboflavina de 10 mg/ml a 0.1 mcg/ml se requiere de una serie de diluciones para las que es necesario emplear mas tiempo que en cualquiera de los otros dos métodos.

Esta serie de maniobras hacen que la exposicion de la vitamina a la luz sea inadecuada o la menos aconsejable para la riboflavina.

La presencia de un material fluorescente la vitamina B<sub>1</sub> --

(clorhidrato de Tiamina) presente en la formulación resulta una seria desventaja para la determinación debido a que se pueden -- falsear los datos obtenidos.

Para tratar de eliminar al máximo interferencias en éste análisis se realiza una purificación de la vitamina en la parte final, cuando se tienen las soluciones en los tubos, adicionando 0.5 ml de Permanganato de Potasio (1:25) y posteriormente adicionar 0.5 ml de agua oxigenada (3 %) para eliminar el exceso de -- permanganato de potasio. Al finalizar ésta operación se efectúa la lectura de las soluciones, una vez hecho esto se realiza una nueva lectura de cada tubo ahora reduciendo la riboflavina como ditionito de sodio o sea haciéndola no fluorescente para al to-- mar la lectura de la solución se tenga la fluorescencia debida a otro material.

Este último paso debe realizarse con mucho cuidado y rapidéz ya que la lectura solo se puede obtener de 5 a 10 seg. des-- pués de haber agregado el ditionito. Este valor influye mucho - al realizar los cálculos de la valoración por lo que es muy importante.

Como puede verse en los resultados obtenidos para este método se tuvo una variación muy alta debido en gran parte a este factor.

Finalmente, al emplear el análisis, tanto tiempo induce--

a un costo mas alto, mas del 50 % que el método colorimétrico.

#### METODO COLORIMETRICO DIRECTO

La sensibilidad que presenta el método colorimétrico directo es de 10 mcg de riboflavina/ml. Su especificidad es alta debido a que en el producto estudiado no existe ninguna otra substancia que intervenga en el análisis a la longitud de onda utilizada en la determinación.

La exactitud y precisión encontradas al utilizar éste método resultan muy aceptables y mejores que los otros dos métodos.

#### Ventajas.

Debido a la cantidad de riboflavina presente en el multivitamínico (10 mg/ml) resulta fácil obtener la concentración de la vitamina que requiere el método para la determinación (10 mcg/ml). Consecuente al utilizar menor tiempo de preparación de la solución problema se evita la exposición de la riboflavina a la luz, factor muy importante durante el análisis.

Al llevar a cabo la cuantificación de la vitamina se observa que los reactivos requeridos son mínimos resultando que el costo de éste en cuanto a reactivos es casi imperceptible. Asimismo considerando el tiempo utilizado para el análisis puede observarse una notable diferencia entre el costo horas-químico de ésta técnica analítica en comparación con las otras dos, por lo

tanto este método es mas barato que los otros.

También, se considera una ventaja mas el haber encontrado que el método colorimétrico directo puede utilizarse como método indicador de estabilidad para cuantificación de riboflavina en - este caso, previa separación cromatográfica.

#### Desventajas

Después de describir las características de ésta técnica, no se encuentra ninguna desventaja.

#### METODO CROMATOGRAFICO

En cuanto a especificidad del método ésta es alta ya que se realiza una separación completa de la vitamina B<sub>2</sub> del resto de vitaminas que están presentes en la solución polivitamínica, así como los posibles productos de degradación, impidiendo que exista alguna interferencia.

La exactitud y precisión resultante después de las determinaciones y estudio estadístico muestran que éste método no mejora los valores obtenidos para el método colorimétrico.

#### Ventajas.

De los tres métodos es el que presenta la mayor especificidad.

### Desventajas

El tiempo requerido para el análisis a partir de la aplicación en la placa cromatográfica es alto aún sin tomar en cuenta el tiempo en el que el eluyente recorre la placa. Esta es -- una seria desventaja para la riboflavina pues se aumenta el riesgo de descomposición por la incidencia de la luz.

La cantidad de reactivos que se utiliza para ésta técnica es superior a los empleados en los otros dos métodos, factor muy importante que aumenta el costo del análisis. Igualmente, las horas químico ocupadas son demasiadas. Esto da por resultado que este método llega a ser el más costoso de los tres utilizados.

Esta técnica emplea aparatos un tanto específicos tales como: centrífuga, microjeringas, con lo que se observa que no se trata con una técnica muy adecuada para emplearse rutinariamente en el análisis de la riboflavina en el multivitamínico.

## C O N C L U S I O N E S

Después de hacer el análisis de la parte experimental y de la discusión, las conclusiones del presente trabajo de tesis son:

1o. El método analítico mas adecuado para la valoración de la Riboflavina en la forma farmacéutica estudiada es el método - COLORIMETRICO DIRECTO ya que presenta varias ventajas ya descritas anteriormente sobre los otros dos métodos de análisis y que son: el menor costo, y mayor rapidéz, exactitud y precisión.

2o. Para poder ser usado como método indicador de estabilidad es necesario realizar una separación inicial de la Riboflavina por cromatografía en capa fina y después cuantificar la vitamina utilizando dicho método, siendo de esta forma una ventaja más de esta técnica de análisis.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Análisis de vitaminas Métodos comprobados  
Strohecker, R. & Henning, H.M.  
1a. Ed., pág. 120 a 150  
Editorial Paz Montalvo  
Madrid. (1967)
  
- 2.- Assay of Vitamins in Pharmaceutical Preparations  
Manzur-UL-Haque-Hashmi  
1st. edition, Págs. 105-122  
John Wiley & Sons  
London (1973)
  
- 3.- Bases Farmacológicas de la Terapéutica  
Goodman, L.S. & Guillman, A.  
4a. edición Pág. 1376-1377  
Ed. Interamericana  
México. (1974)
  
- 4.- British Pharmacopoeia 1973  
Her Majesty's Stationary Office  
Londres (1973)  
Pág. 711-712
  
- 5.- Bristish Pharmaceutical Codex  
1st Ed.  
The Pharmaceutical press  
London (1963)
  
- 6.- Control total de la Calidad.  
Feigenbaum, R  
7a. impresión pág. 230 a 461  
Ed. C.E.C.S.A.  
México, D.F. (1975)
  
- 7.- European Pharmacopeia  
vol. 1 pág 356 - 357  
France (1969)

- 8.- Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos  
Sria. de Salubridad y Asistencia  
4a. edición pág 1083  
México, D.F. (1974)
- 9.- Farmacos 1973  
Camara Nal. de Labs. Quim. Farm.  
págs. 293 a 296
- 10.- Farmacología Experimental y Clínica  
Litter, M.  
5a. edición pág. 1102 a 1109  
Ed. El Ateneo  
México, D.F. (1977)
- 11.- Pharmaceutical Analisis  
Higuchi, T., Hansen, E.B.  
New York, U.S.A. (1961)  
Interscience Publeshers  
Págs. 660-668
- 12.- Pharmacopea Internationalis  
1st. edition, pág. 76  
vol II  
Switzerland (1957)
- 13.- Riboflavin  
Rivlin, R.  
1st. edition  
Ed. Plenum Press  
New York, (1975)
- 14.- The Chemistry of the Vitamins  
Dyke, S.F.  
1st. edition, pág. 31-51  
Ed. Interscience Publishers  
(1965)
- 15.- Martindale The Extra Pharmacopoeia

- Wade, A.  
27 th edition, pág. 1696  
The Pharmaceutical press  
London (1977)
- 16.- The Merck Index  
9th, edition, pág. 795, 1065-1065  
Merck and Co. Inc.  
New York, (1976)
- 17.- Thin Layer Chromatography  
Stahl, E.  
2nd, edition, pág. 293, 296-297  
Sringer-Verlag  
New York (1969)
- 18.- The United States Pharmacopea  
XIX ed.  
Pág. 441  
1975
- 19.- Vitamins and Coenzymes  
Wagner, A.F.  
1st, edition, pág. 46-71  
Interscience Publishers  
New York, U.S. . (1964)
- 20.- Remington's Pharmaceutical Science  
Mack. Publishing Co.  
15 5h edition, pág 593, 960, 963

ARTICULOS

- I Thaba E. Fahmy "Quantitative Séparation of Riboflavin from Vitamin Mixtures", Journal of Pharmacy and Pharmacol. 17, 489 (1965)
- II Bealey L., & Alridge D.A., "The Determination of Riboflavin in Pharmaceutical Products", *J. Pharm. Pharmacol.* 8, 885, (1956)
- III William, L.C. & David, E.M., " Photochemical Degradation of Flavins ", Am. Chem. Soc., 93, 93 (1971)