

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Sección de Fisiología General de Valencia

Valoración de derivados fenotiazínicos con la raíz aislada de *Raphanus Sativus*

por M. Solsona y A. Mora

(Recibido para publicar el día 19 de octubre de 1951)

En estos últimos años, se han utilizado órganos de plantas diversas para la determinación de sustancias de interés biológico.

El crecimiento de la raíz aislada del tomate, solamente posible en presencia de vitamina B₁, permite determinar cantidades ínfimas de tiamina (Robbins y Bartley [2]). En otros casos, la diferenciación química se basa en los distintos colores que toman cortes de tejidos vegetales en presencia de derivados indólicos (J. García-Blanco y S. Grisolia [1]).

En este trabajo se ensaya la determinación cuantitativa de dos fármacos, derivados fenotiazínicos, la 10-(2 dietilaminoetil)-fenotiazina (R. P. 2.987), y la 10-(2 dimetilaminoisopropil)-fenotiazina (R. P. 3.277), ambas en forma de clorhidrato. Los dos cuerpos son sustancias blancas que en solución acuosa toman color lentamente por la acción del oxígeno atmosférico. La misma oxidación se consigue rápidamente en presencia de agua oxigenada y una peroxidasa en concentraciones adecuadas; en soluciones muy diluídas del fármaco, la coloración es tan débil que impide su determinación, pero ésta se hace factible si sustituímos la solución de peroxiidasa por la raíz del *Raphanus Sativus*, rica en dicho fermento, y en este caso, la citada raíz blanca, se teñirá de color violeta verde aún en soluciones muy diluídas. La sencillez de los métodos empleados, permite su utilización en laboratorios sin equipo colorimétrico.

Métodos

Semillas germinadas de *Raphanus Sativus* germinadas en agua destilada durante tres o cuatro días, de una longitud de 2 a 3

centímetros, de las que solamente utilizamos la raíz, separada del resto de la planta cortándola con unas tijeras.

Cápsulas de Petri esterilizadas.

Disolución de fosfato monosódico M/10, utilizado para mantener un pH ligeramente ácido.

Disoluciones de R. P. 2.987 y R. P. 3.277 (*), de concentraciones diversas.

Plasma, suero o sangre.

Alcohol de 95°.

Agua oxigenada al 3 % valorada por permanganimetría.

Técnica y resultados

1.º Determinación en agua

En la primera fase del trabajo se estudia la concentración óptima de agua oxigenada y el límite de la sensibilidad de la reacción en solución acuosa. Para ello colocamos 9 c.c. de la disolución de fosfato monosódico M/10 en seis cápsulas de Petri, junto con 1 c.c. de solución de R. P. 2987 o R. P. 3277 M/100, a las que agregamos 1, 0'5, 0'250, 0'125, 0'100, 0'075 y 0'05 c.c. de agua oxigenada al 3 %. En todas las cápsulas introducimos cuatro raíces de *Raphanus*. Rápidamente (dos minutos) se colorean las raíces en verde violeta intenso, para esta concentración de fármaco M/100, alcanzando su mayor intensidad en las cápsulas en que hemos colocado 0'1 y 0'125 c.c. de agua oxigenada.

La misma marcha seguimos con una concentración inicial M/500 de R. P. 2987 y de R. P. 3277 (concentración final M/5.000), obteniendo también en seguida (un par de minutos) un desarrollo de color intenso, que alcanza su mayor grado para concentración de agua oxigenada al 3 % de 0'1 c.c. a 0'125 c.c. en los 10 c.c. de disolución.

Partiendo de disolución de los fármacos M/1.000, concentración final M/10.000, se obtienen resultados positivos en las cápsulas que contienen 0'1 c.c. 0'125 c.c. de agua oxigenada, observándose la aparición de un color verdoso bastante débil. Para concentraciones mayores o menores de agua oxigenada, la reacción se aprecia muy mal, no apareciendo color, o siendo tan débil, que

* Nos es grato expresar nuestro agradecimiento a los Laboratorios Specia, que por medio de su Delegación en Barcelona, nos ha proporcionado producto puro de los fármacos utilizados en las experiencias realizadas.

no es posible tomarle en consideración. A mayor dilución, la reacción resulta negativa.

El límite de reacción se encuentra, pues, en las soluciones M/10.000 o sea 0'00003 g. por c.c. de fármaco.

2.° *Determinación en plasma o suero*

Se pesan 0'033 g. de R. P. 2987 (P. M. 334,5) ó 0'032 g. de R. P. 3277 (P. M. 318), se disuelven en 5 c.c. de plasma. Esta disolución se agrega gota a gota sobre 100 c.c. de alcohol de 95° para desproteínizar, se calienta al baño de maría a una temperatura de 100° durante 5 minutos, se filtra y se elimina el alcohol por destilación. El residuo se disuelve en 20 c.c. de fosfato monosódico (solución A).

Se toman 10 c.c. de esta disolución, 0'125 c.c. de agua oxigenada y cuatro raíces, colocándose todo en una cápsula de Petri; se obtiene rápidamente el desarrollo de color, determinándose 0'0017 g. por c.c.

5 c.c. de la solución A se diluyen en 50 c.c. de fosfato monosódico M/10 (solución B). Se toman 10 c.c. de esta solución, 0'125 de agua oxigenada y cuatro raíces, que se introducen en una cápsula de Petri, desarrollándose rápidamente un color intenso, apreciable en dos o tres minutos. Se determinan 0'00017 g. por c.c.

Otros 5 c.c. de la solución B se diluyen en 25 c.c. de fosfato monosódico, 10 c.c. de esta solución se colocan, como siempre, en una cápsula de Petri, con 0'125 c.c. de agua oxigenada y raíces. Reacción positiva. Determinación de 0'00003 g. por c.c.

A mayor dilución, los resultados son negativos, con ambos fármacos.

3.° *Determinación en sangre.*

La marcha que seguimos es la misma que con el plasma, sustituyendo éste por sangre citratada. Los resultados obtenidos son semejantes, y el límite de la reacción el mismo: 0'00003 g. por c.c.

Discusión

El procedimiento histoquímico antes citado, pone a nuestro alcance un método sencillo para una determinación de R. P. 2987 y de R. P. 3277, en líquidos orgánicos. La reacción está catalizada por fermentos peroxidásicos contenidos en la raíz del rábano, por lo que se concentra y se desarrolla mejor sobre este tejido blanco, que queda intensamente coloreado, mientras que el líquido a las concentraciones en que se trabaja, queda casi incoloro.

La oxidación de las disoluciones de R. P. 2987 y R. P. 3277 por la acción del oxígeno atmosférico transcurre muy lentamente, tomando el líquido color verde azulado. Para grandes diluciones la coloración no es apreciable. Comparando los resultados obtenidos en las disoluciones de estos fármacos en agua, plasma y sangre, se pone de manifiesto que no hay absorción en estas dos últimas, ni se arrastra producto en la precipitación de proteínas.

Resumen

Se estudia un método sencillo que nos permite determinar los fármacos (R. P. 2987) ó 10-(2 dietilaminoetil)-fenotiazina, y (R. P. 3277) ó 10-(2 dimetilaminoisopropil)-fenotiazina, disueltos en agua, plasma y sangre, por la reacción verde azulada que se desarrolla en la raíz del *Raphanus Sativus*, por la oxidación de los antedichos fármacos por el agua oxigenada, reacción catalizada por los fermentos peroxidásicos contenidos en la citada raíz.

Se determina el límite de la reacción, que tanto en las disoluciones de agua como en las de plasma y sangre, es de 0'00003 g. por c.c. (M/10.000) para una concentración de agua oxigenada de 0'125 c.c. al 3 % en 10 c.c. de disolución.

Summary

A simple method is studied, which permits the determination of the medicaments R. P. 2987 (10.2 dimethylaminethyl-phenothiazin) and R. P. 3277 (10.2 dimethylaminisopropyl-phenothiazin) dissolved in water, plasma and blood. The method is founded on the bluish green reaction developed in the root of *Raphanus sativus*, the peroxidasic ferments of which catalizing the oxidation of the mentioned products by hydrogen peroxid.

The sensitiveness of reaction is determined, same being in water solution as well as in that of blood or plasma 0,00003 g. per c.c. (M/10.000) whilst the concentration of hydrogen peroxid is of 0,125 c.c. at 3 % in 10 c.c. of solution.

Bibliografía

- (1) GARCÍA-BLANCO, J. y GRISOLIA, S. : *Trab. Inst. Nac. Cienc. Med.*, **3**, 343, 1944.
- (2) STEPP, W., KUEHNAU, J. y SCHROEDER, H. : *Die Vitamine*, **89**, 1944.