

EXTRACCION Y DETERMINACION DE BASES ORGANICAS BAJO FORMA DE PARES IONICOS CON COLORANTES ACIDOS. I. Atropina, Escopolamina.

Jaime H. Rojas, Químico Farmacéutico, M.Sc., Profesor Asociado, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional.

RESUMEN

La técnica de extracción de bases orgánicas nitrogenadas mediante la formación de pares iónicos con colorantes ácidos se aplicó a los alcaloides atropina y escopolamina. La técnica se optimizó luego del estudio de los principales parámetros involucrados en el proceso de la extracción. Los colorantes empleados fueron azul de bromotimol, púrpura de bromocresol y naranja de metilo. Como solventes para la extracción de los pares iónicos se emplearon cloroformo y benceno. Las técnicas desarrolladas se aplicaron a la determinación de atropina en inyectables.

SUMMARY

The acid dye technique was applied to the ion pairs extraction of atropine and scopolamine. The dye moiety was either bromothymol blue, bromocresol purple or methyl orange. Chloroform and benzene were used as solvents for the extractions. The optimized techniques were applied to the assay of atropine injections.

INTRODUCCION

Auerbach (1) propuso el empleo de indicadores, materias colorantes aniónicas, para la determinación espectrofotométrica de sales germicidas derivadas de amonio cuaternario. La utilización de estos colorantes constituye punto de partida de nuevos métodos de valoración de sustancias orgánicas nitrogenadas (2-16).

Divatia y Biles (2) estudiaron las constantes de extracción de algunas aminas bajo forma de pares iónicos con tropaeolina 00 en solventes inmiscibles. Schill y col. (9, 11-13) estudiaron la extracción de aminas y de sales de amonio cuaternario con azul de bromotimol. Lindén y Schill (17) determinaron atropina con azul de bromotimol luego de su separación por cromatografía de partición de pralidoxima, tropina y otros productos de descomposición. Garrett y col. (18, 19) determinaron biguanidas en fluidos biológicos con azul de bromotimol y cloruro de metileno.

En el estudio desarrollado en etapas sucesivas se establecen y proponen métodos de análisis mediante la técnica con colorantes ácidos para varios alcaloides y varios antihistamínicos. Para cada sustancia se estableció su comportamiento frente a tres colorantes y a su vez cada combinación frente a dos solventes orgánicos, cloroformo y benceno. En esta publicación se exponen los resultados obtenidos para atropina y escopolamina, mientras que los restantes serán objeto de otras publicaciones. Si bien el empleo de las técnicas constituye nuevos estudios, a manera introductoria los resultados se aplicaron al análisis de atropina sulfato en inyectables.

Los procedimientos que emplean indicadores para determinar bases nitrogenadas se fundamentan en la reacción del colorante que posee un ión negativo bastante cargado con el compuesto en cuestión que posee un gran catión, para formar un complejo o par iónico en la fase acuosa el cual es luego extraído por un solvente orgánico no polar adecuado.

El Diagrama 1 presenta una serie de equilibrios para un sistema de dos fases, el cual tiene además en cuenta la posible formación de pares iónicos "parásitos" generalmente con iones inorgánicos (X^-) al igual que la presencia de sustancias dibásicas.

Las condiciones del método deben tender en consecuencia a favorecer la constante de extracción K , favoreciendo a su vez la formación y presencia del par iónico base-indicador en la fase orgánica.

Para una adecuada sensibilidad del método, especial énfasis debe hacerse respecto del tipo de solvente, del indicador (su pK_{in}) y del pH de la fase acuosa. Este último parámetro es de singular importancia ya que de él dependerá el porcentaje de las diferentes especies involucradas en cada una de las fases y consecuentemente del par iónico en la fase orgánica.

Merece especial atención la selección del sistema tampón pues su composición puede dar lugar a la formación de pares iónicos indeseables y solubles en la fase orgánica, formados a partir de la sustancia a determinar y los componentes del buffer (20-24).

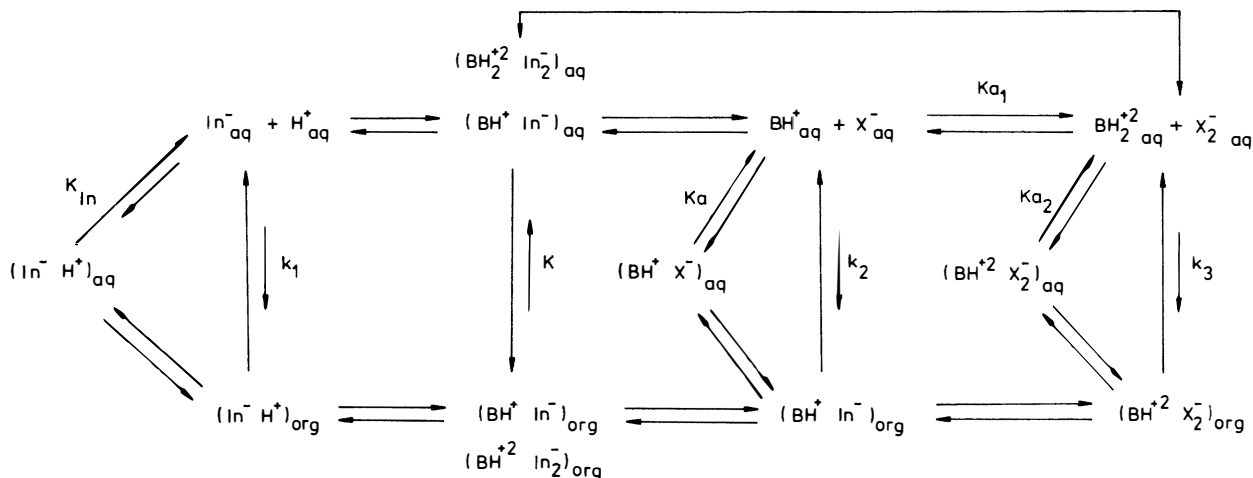


Diagrama 1 Consideración de los diferentes equilibrios involucrados en el proceso de extracción del par iónico sustancia nitrogenada-colorante ácido.

In^- es el indicador aniónico en In^- su ión coloreado

BH^+ o BH^{+2} es el componente catiónico (base nitrogenada o derivado de amonio cuaternario)

$\text{BH}^+ \text{In}^-$ o $\text{BH}^+ \text{In}_2^-$, el par iónico en estudio

$\text{BH}^+ \text{X}^-$ o $\text{BH}_2^{+2} \text{X}_2^-$ corresponden a pares iónicos "parásitos"

K_{In} , K_a , K_{a1} , K_{a2} son constantes de disociación

K_1 , K_2 , K_3 son constantes de equilibrio

K es la constante de extracción del par iónico base-colorante

PARTE EXPERIMENTAL

Soluciones tampón 0.05M preparadas a partir del ácido cítrico 0.05M y fosfato disódico 0.05 M para la zona de pH entre 3.0 y 7.8.

Soluciones tampón 0.05M preparadas a partir de ácido bórico 0.05M y bórax 0.05M y de ácido bórico 0.05M e hidróxido de sodio 0.05M para la zona de pH entre 7.8 y 9.2 y entre 9.4 y 10.6 respectivamente.

Púrpura de bromocresol, azul de bromotimol, cloroformo y benceno calidad Fisher.

Naranja de Metilo calidad BDH.

Los alcaloides Atropina Sulfato y Escopolamina Bromhidrato se valoraron por titulación potenciométrica en medio no acuoso con ácido perclórico 0.02M. La pureza de los alcaloides fue igualmente controlada por cromatografía en capa fina al igual que la de los colorantes empleados.

El comportamiento de cada uno de los alcaloides se estudió frente a los colorantes azul de bromotimol (BTB), púrpura de bromocresol (PBC) y naranja de metilo (NM). Cada posible combinación de alcaloide-colorante se experimentó frente a dos solventes, cloroformo y benceno, con constantes dieléctricas de 4.81 y 2.28 respectivamente.

Para cada sistema los principales parámetros tenidos en cuenta se relacionan con la influencia del pH, tiempo de lectura y concentración de alcaloide. El tiempo de agitación y mezcla se estudió en algunos casos debido a que luego de un corto período de

tiempo su influencia es nula. Estos resultados al igual que los obtenidos por variación de la concentración de colorante se publicarán posteriormente.

En todos los casos, los volúmenes de fase orgánica (10 ml) y fase acuosa (5 ml) se mezclaron en un erlenmeyer de tapa esmerilada de 125 ml de capacidad. Luego de efectuar las diferentes reacciones, la mezcla se dejó separar completamente en ampollas de decantación de 60 ml. Salvo en los estudios de tiempo de agitación, ésta se realizó mecánicamente y durante un tiempo de 10 minutos, aunque 5 minutos fueron suficientes para todos los sistemas.

Para aumentar la sensibilidad se agregaron a la fase orgánica que contenía el complejo en cloroformo, 3 gotas de hidróxido de tetrabutilamonio (HTBA) 0.2M a las fases con BTB o PBC y 1 ml de H_2SO_4 al 2% en alcohol anhidro a las fases con NM. Estos reactivos en fases bencénicas producen turbidez por lo cual en su lugar se podría extraer el BTB o el PBC con NaOH 0.05 M y el NM con H_2SO_4 0.1M.

Los espectros de absorción de los colorantes puros se determinaron en medios ácido y básico en concentración $1.5 \times 10^{-5}\text{M}$ para el BTB y el NM y $1.0 \times 10^{-5}\text{M}$ para el PBC. Puesto que la mayoría de los pares iónicos se forman 1:1, las concentraciones empleadas de alcaloide en los ensayos preliminares fueron aproximadamente de igual magnitud.

La influencia de la concentración del alcaloide y colorante se estudió siempre al pH óptimo previamente hallado; para todos los sistemas, a excepción de aquellos con NM, el colorante se disolvió en la fase orgánica y las sales de los alcaloides en las fases

acuosas. Con el NM, éste se disolvió en la fase acuosa y la base orgánica extraída de su sal en la fase orgánica.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los espectros de absorción de cada uno de los complejos en cloroformo o en benceno se determinaron a partir de uno de los extractos obtenidos en los estudios de pH. Estos complejos son amarillos y absorben en la región de 390-430 nm, indicando así la presencia de la forma no ionizada de los indicadores PBC y NM o del anión monovalente del ácido dibásico BTB.

Al destruir los complejos con HTBA se libera la forma azul del BTB presentando un máximo a 635 nm, que corresponde al que presenta el anión divalente en solución acuosa. Para el PBC se obtiene su forma púrpura o aniónica con un máximo a 605 nm. El tratamiento con H_2SO_4 en alcohol anhidro a complejos formados con NM libera su forma roja con una absorción máxima a 525 nm.

Dado el procedimiento general y fundamental antes descrito, el autor se limita a exponer algunos resultados bajo forma de gráficas que son ilustrativas de los obtenidos y a discutir la mayoría de los mismos. Igualmente se adjuntan tablas para cada uno de los alcaloides donde se anotan las principales condiciones experimentales establecidas para la determinación de los mismos en las diferentes combinaciones colorante-solvente.

Hacen referencia a la concentración de indicador en la fase orgánica, al pH óptimo para la extracción así como a las concentraciones de alcaloide que satisfacen la Ley de Lambert-Beer y que se expresan en microgramos por mililitro de fase acuosa.

Las absorbancias a las longitudes de onda especificadas corresponden a la última de las concentraciones mencionadas. Las longitudes de onda de 635 y 605 nm corresponden a fases orgánicas adicionales de HTBA que contenían BTB y PBC respectivamente. El HTBA puede ser reemplazado por extracción con NaOH 0.05M y lecturas a 615 nm. Para algunos sistemas se reportan las concentraciones empleadas de alcaloide cuando se determina el complejo intacto.

Los porcentajes de extracción obtenidos bajo las condiciones especificadas se reportan en las Tablas I y II y para algunos casos los hallados por extracciones sucesivas, cada vez con 10 ml de solvente. Finalmente se mencionan los sistemas ensayados que no revisten interés analítico y para los cuales la extracción fue nula o demasiado baja, aún con concentraciones elevadas de alcaloide.

1. Atropina Sulfato

A. Azul de Bromotimol-Cloroformo

En el estudio del pH, 2 ml de una solución acuosa que contenían 600 mcg de atropina sulfato se dilu-

yeron separadamente a 50 ml con cada uno de los buffer 0.05M enunciados y para cubrir la zona de valores de pH entre 5.0 y 11.0.

Para efectuar la reacción, 10 ml de una solución $1.25 \times 10^{-4}M$ de BTB en cloroformo (39.03 mg/500 ml) se mezclaron con 5 ml de cada solución tampón que contenían 120 mcg de atropina sulfato y el conjunto se sometió a agitación mecánica durante 10 minutos. Luego de separación de las fases, se adicionó a cada extracto clorofórmico 3 gotas de HTBA 0.1M. La coloración azul obtenida se determinó a 635 nm contra blancos respectivos tratados similarmente (Fig. 1). Los resultados obtenidos indican un pH de 7.4 como el óptimo para la extracción.

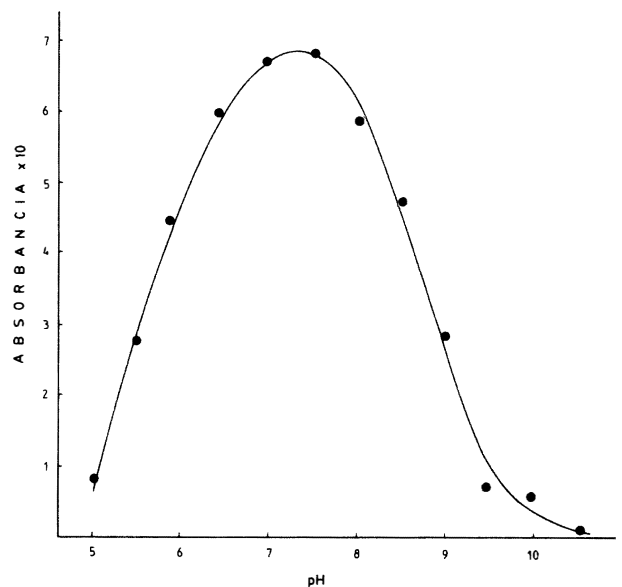


Figura 1 Influencia del pH sobre la extracción del par iónico atropina-azul de bromotimol en cloroformo (635 nm).

Este valor de pH está prácticamente de acuerdo con el valor reportado por Schill (13) y por Lindén y Schill (17) quienes encontraron un valor de 7.4 y 7.6 respectivamente para la extracción de los complejos. De otra parte, Gupta y Cadwallader (14), no se muestran de acuerdo con los anteriores valores al encontrar un valor de 6.6 para el análisis de tiamina, limitando además la concentración de BTB a $1 \times 10^{-4}M$ por la formación de emulsión a concentraciones más altas.

Debe recalarse que en realidad el valor de pH óptimo depende del sistema a emplear, al igual que la formación de emulsión del pH, del colorante y del tipo de solvente.

Es así que Gupta y Ferguson (25) en su ensayo con atropina encuentran un valor de pH de 5.2 para la extracción con cloroformo y BTB $2 \times 10^{-4}M$, prefiriendo realizar la determinación a pH 6.2 debido a la alta absorbancia del blanco a pH 5.2, así como a la formación de emulsión.

Al valor de pH óptimo encontrado no se observó formación de emulsión a concentración 1.25×10^{-4} M en BTB y la corrección debida al blanco fué muy pequeña en razón del bajo coeficiente de distribución del BTB en cloroformo a pH 7.4. Esta corrección quedaría prácticamente eliminada si se quisiera trabajar con el complejo intacto (415 nm). A valores más bajos de pH aumenta la cantidad libre de indicador en la fase orgánica, efecto que se corrige con los blancos. Un intento de trabajar a un valor de pH de 8.5 para eliminar la corrección debida al blanco (6) se tradujo en una baja sensibilidad.

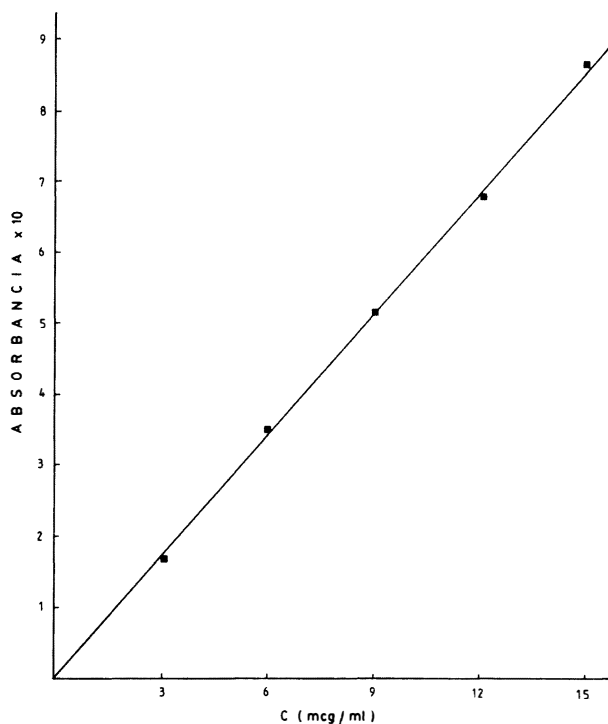


Figura 2 Curva de calibración para la extracción a pH 7.4 en cloroformo de atropina en forma de par iónico con azul de bromotimol (635 nm).

En la Figura 2 se reportan los resultados obtenidos por variación de la concentración de alcaloide en la fase acuosa. La absorción obtenida con una concentración 1.5×10^{-5} M (52.12 mcg/10 ml) es comparable a la obtenida con una concentración 1.5×10^{-5} M de BTB. De acuerdo a esta reacción 1:1, cálculos adecuados para las diferentes concentraciones de atropina indican una extracción de 99.41%.

La sensibilidad del método desarrollado es superior a la de otros reportados en la literatura (26-31), lo mismo que a la del método de Gupta y Ferguson (25), pues se propone determinar el colorante liberado del complejo.

B. Azul de Bromotimol-Benceno

El valor de pH óptimo para la extracción con este sistema fue de 5.6, valor que difiere del encontrado en cloroformo y que indica la necesidad de evaluar el pH cuando se quiera cambiar el solvente. Los resultados se deben a la diferente solubilidad del com-

plejo en los dos medios por la diferente constante dieléctrica de los dos solventes. Para ninguno de los valores estudiados se observó formación de emulsión y las fases se separaron rápidamente.

En los estudios sobre la influencia por variación de concentración de atropina se obtuvo un porcentaje de extracción de 100% para el par iónico monómero. La sensibilidad con benceno como solvente orgánico es similar a la reportada por Gupta y Ferguson (25) con BTB- CHCl_3 y superior a la de otros métodos discutidos anteriormente (26-31).

C. Púrpura de Bromocresol-Cloroformo

El pH encontrado que conduce a la extracción óptima fué de 4.4, valor inferior al encontrado con el mismo solvente pero con BTB. En este sistema el porcentaje de extracción de acuerdo a la curva obtenida es marcadamente influido por el pH a ambos lados del óptimo.

Los estudios con concentraciones variables de atropina permiten detectar la presencia de un par iónico con una extracción del 100%. Dada la mayor abortividad del PBC en medio alcalino el método se muestra unas dos veces más sensible que aquel que emplea BTB.

El valor de pH 4.4 no está totalmente de acuerdo con el encontrado por El Masry y Khalil para la hiosciamina (32). Por otro lado la sensibilidad del método propuesto es superior, hecho que según cálculos adecuados resulta de realizar las determinaciones sobre diferentes formas del PBC.

D. Naranja de Metilo-Cloroformo

Los estudios por variación de pH concluyen en un valor de 5.2 para la extracción óptima (Fig. 3) mientras que al variar la concentración de atropina las extracciones a pH 5.2 presentaron un porcentaje de extracción de 64.6% únicamente. Una segunda y

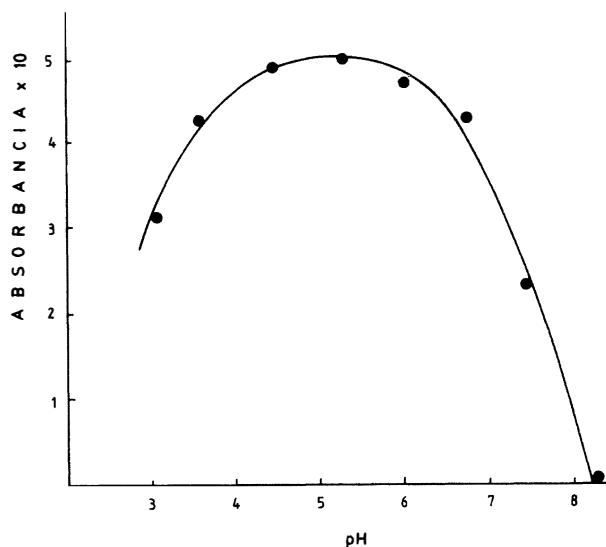


Figura 3 Extracción con cloroformo del complejo atropina-anaranjado de metilo en función del pH de la fase acuosa (425 nm).

tercera extracción realizados sobre la solución acuosa correspondiente a la última concentración de atropina aumentan el porcentaje de extracción a 92.3 y 100% respectivamente (Fig. 4).

En consecuencia, si se quiere emplear este método y aumentar al máximo la sensibilidad se debe proceder con tres extracciones consecutivas sobre la misma fase acuosa y nuevas porciones de cloroformo. La sensibilidad obtenida con una sola extracción es sin embargo superior a la reportada en algunos métodos de la literatura (26-31).

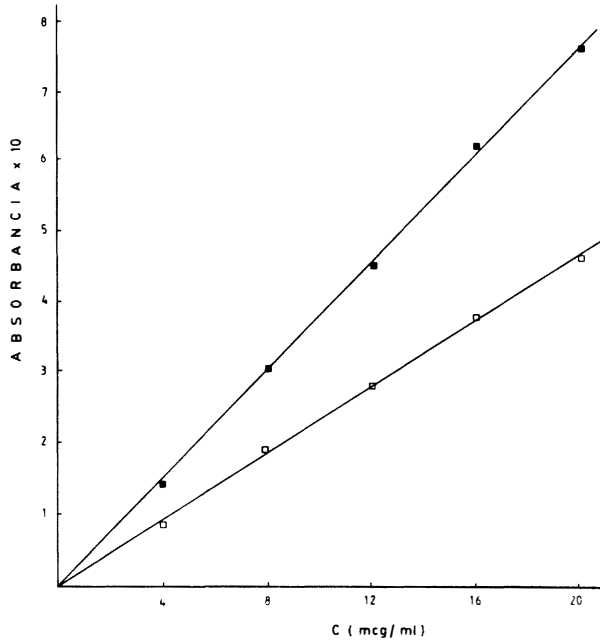


Figura 4 Curva de calibración para la extracción con cloroformo a pH 5.2 del complejo atropina-anaranjado de metilo: ■—■ : a 425 nm; □—□ : a 525 nm luego de la adición de ácido sulfúrico alcohólico.

2. Escopolamina Bromhidrato

A. Azul de Bromotimol-Cloroformo

La curva de porcentaje de extracción contra pH presentó un valor de 6.8 para el pH óptimo. El perfil de la curva es similar al obtenido con la atropina, ambas bases monoacídicas. Los estudios estequiométricos indicaron una extracción de 90.39% para el par iónico monómero, extracción incompleta debido a que la especie no es totalmente soluble en la fase orgánica. Este grado de solubilidad ha sido igualmente encontrado para otros pares iónicos de la escopolamina con aniones inorgánicos (20).

El método es un dos veces más sensible que el reportado por Khalil (32); por otra parte, una determinación a pH 5.6 recomendada (32) se podría traducir en una variación apreciable de la extracción por un ajuste inadecuado del mismo o por errada corrección del blanco.

La sensibilidad obtenida es mayor que la del método reportado por Ashley (26) y del hidroxamato

(27) así como al de la BP (33) para tabletas e inyectables. El método resulta menos sensible que el de la USP (34) por cromatografía de gases pero es menos dispendioso.

B. Azul de Bromotimol-Benceno

En los estudios de pH se encontró la máxima extracción con una fase acuosa de pH 5.9, valor que difiere del encontrado para el mismo par iónico en cloroformo. De otra parte se encontró una extracción incompleta del complejo (48.95%), inferior a la obtenida con cloroformo e indicando menor afinidad del mismo por el benceno (Fig. 5).

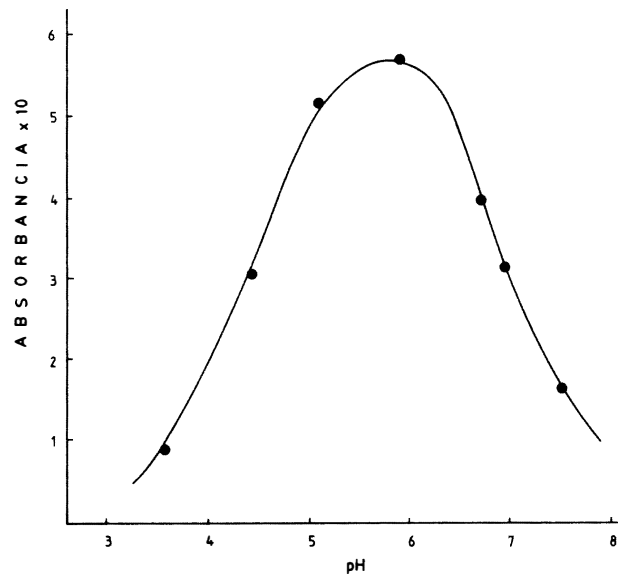


Figura 5 Extracción con benceno del complejo escopolamina-azul de bromotimol en función del pH de la fase acuosa (450 nm).

C. Púrpura de Bromocresol-Cloroformo

Las experiencias sobre la influencia del pH en la extracción del par iónico escopolamina-púrpura del bromocresol demuestran que la extracción máxima se sucede a pH 4.4 (Fig. 6), valor que difiere de 4.0 encontrado por otros autores (32) para el mismo sistema.

Para cada una de las concentraciones de la curva de calibración a pH 4.4 se obtuvo un porcentaje de extracción de 36.23% para el par iónico 1:1. Nuevas extracciones, que confirman este tipo de par iónico, produjeron cantidades adicionales de complejo. Estas extracciones, en número de tres efectuadas sobre la fase acuosa resultante de la concentración de 72 mcg/5 ml aumentaron la extracción a 64.38, 74.97 y 80.65% respectivamente.

La aplicación del método a formas farmacéuticas de uso parenteral se realizó en inyectables de atropina sulfato con una cantidad teórica etiquetada de 1 mg/ml. Se ensayaron por triplicado los sistemas en los cuales se encontró extracción de interés analítico-

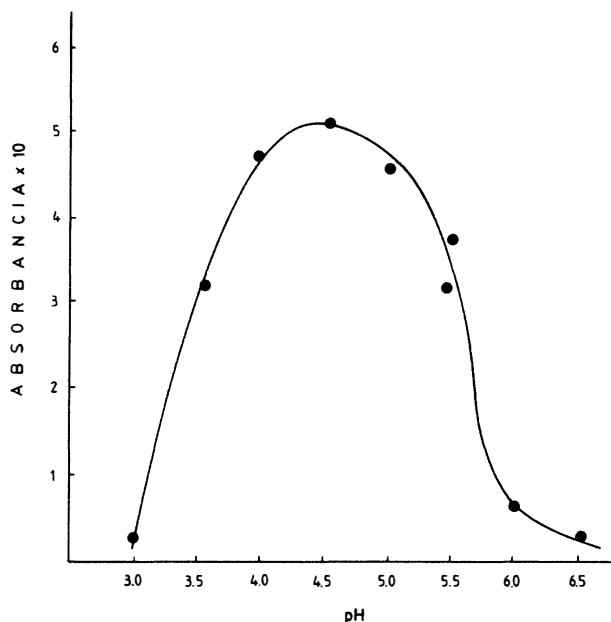


Figura 6 Influencia del pH de la fase acuosa sobre la extracción con cloroformo del complejo escopolamina-púrpura de bromocresol (605 nm).

co del alcaloide bajo forma de par iónico (Tabla I). Los resultados (Tabla II) se comparan con el método reportado por la USP XVII (35) y los mismos demuestran la fiabilidad de los obtenidos en el curso de la investigación. Los cuatro métodos, con ligeras modificaciones, se pueden aplicar a la valoración de atropina en tabletas y gotas oftálmicas.

Para el sistema BTB-CHCl₃ y PBC-C₆H₆ en caso de no disponerse del reactivo HTBA, éste puede ser reemplazado por extracción de la fase orgánica con NaOH 0.05M y lecturas de absorbancia 615 y 590 nm respectivamente. Si se quisiera o fuera necesario una mayor sensibilidad se podría reducir el volumen de NaOH para la extracción del colorante en el complejo.

La sensibilidad del método con BTB-C₆H₆ puede aumentarse igualmente por extracción con NaOH 0.05M. Lo mismo puede lograrse con el sistema NM-CHCl₃ mediante extracción con H₂SO₄ 0.1M o por adición de ácido sulfúrico alcohólico a la fase clorofórmica para lecturas de absorbancia a 507 y 525 nm respectivamente.

El método oficial de la BP (33) para la determinación de atropina en ungüentos, inyectables y tabletas requiere de unos 10 mg de sustancia, resultando menos sensible que las técnicas aquí propuestas. La técnica de la USP XXI (36) presenta mayor sensibilidad pero requiere de más tiempo, de equipo costoso y no resulta de fácil ejecución, inconvenientes que son precisamente los que se han querido eliminar dentro del principal objetivo de la investigación. Por las razones anteriores los métodos se comparan con el titrimétrico de la USP XVII (35), método que requiere de tiempo comparable pero de unos 40 mg de atropina, siendo en consecuencia pobre en sensibilidad.

TABLA No. 1

SISTEMA DE EXTRACCION PARA ATROPINA SULFATO CON COLORANTES ACIDOS

Sistema	Conc. Molar InH	pH	C mcg/ml	A	% extrac.	λ nm
BTB-CHCl ₃	1.25x10 ⁻⁴	7.4	3-15	0.857	99.16	635
BTB-C ₆ H ₆	1.25x10 ⁻⁴	5.6	6-30	0.805	100.0	405
PBC-CHCl ₃	1.25x10 ⁻⁴	4.4	1.6-8.0	0.903	100.0	605
PBC-C ₆ H ₆	1.25x10 ⁻⁴	—	—	—	—	—
NM-CHCl ₃	2.5x10 ⁻⁴	5.2	4-20	0.766	64.6	525
					92.3	
					100.0	
NM-CHCl ₃	2.5x10 ^{-3*}	5.2	4-20	0.457	64.6	425
NM-C ₆ H ₆	2.5x10 ^{-4*}	—	—	—	—	—

* Preparado en el buffer

InH: indicador o colorante aniónico

pH: valor de pH óptimo para la extracción

Cmcg/ml: concentraciones de atropina que satisfacen la Ley de Lambert-Beer

A: absorbancia obtenida con la última de las concentraciones anotadas

λ nm: longitud de onda de la determinación

TABLA No. 2

VALORACION DE ATROPINA EN INYECTABLES POR EL METODO DE EXTRACCION DE PARES IONICOS CON COLORANTES ACIDOS

Método	Cpt mcg/5ml	Apt	Apb	Atropina mcg/ml	% cant. etiq.
BTB-CHCl ₃	40	0.462	0.479	1.036	103.65
		0.466	0.483		
		0.466	0.484		
BTB-C ₆ H ₆	60	0.321	0.334	1.038	103.80
		0.328	0.338		
		0.326	0.340		
PBC-CHCl ₃	20	0.432	0.445	1.039	103.86
		0.440	0.458		
		0.448	0.468		
NM-CHCl ₃		0.323	0.334	1.038	103.79
		0.328	0.345		
		0.324	0.333		
USP XVII				1.011	101.10

C_{pt}: concentración de patrón en mcg por 5 ml de fase acuosa

A_{pt}: absorbancia del patrón

A_{pb}: absorbancia del problema

Para el caso de la determinación de los alcaloides derivados del tropano en mezclas, se necesita generalmente de una separación previa de los alcaloides (37, 38).

El Masry y Khalil (32) encuentran que la clorofila presente en tinturas de belladona no interfiere cuando se mide el color violeta del PBC presente en el complejo luego de su tratamiento con NaOH y

que la escopolamina a valores de pH superiores a 6.6 no es extraída con PBC-CHCl₃. Encuentran además que la curva de calibración para hiosciamina empleando BTB-CHCl₃ a pH 5.6 es casi idéntica a la obtenida con PBC-CHCl₃ a pH 6.6.

Por esta razón, determinan ambas sustancias a pH 5.6 con BTB y con ayuda de las pendientes obtenidas de las curvas de calibración para hiosciamina y escopolamina con PBC a pH 6.6. determinan ambos alcaloides en mezclas sintéticas, con un porcentaje de recuperación de 98.6 y 101.5% respectivamente. Se debe recalcar que estos valores de pH no son los óptimos para la extracción de los alcaloides en tales sistemas. Queriendo eliminar la posible interferencia de la escopolamina y de la atropina a pH 5.3 empleado por Durick y col. (3), emplean PBC a pH 6.6 en la determinación de hiosciamina en tinturas de balladona.

En el presente trabajo se encontró que efectivamente a pH 6.6 con el sistema PBC-CHCl₃ (Fig. 6), la escopolamina no presentaría mayor interferencia en la determinación del contenido de hiosciamina en la tintura, interferencia aún menor por el trabajo a 420 nm.

Sin embargo, el método para mezclas mediante el empleo de pendientes no es del todo adecuado, es dispendioso y requiere necesariamente del empleo de curvas de calibración.

De los resultados obtenidos para atropina y escopolamina (Tablas I y III), se podría determinar la primera con BTB-CHCl₃ a pH 9.0, con BTB-C₆H₆ a

pH 8.5 o con PBC-CHCl₃ a pH 6.5. Para estos sistemas a los valores especificados de pH la escopolamina no formaría el complejo correspondiente. Sería aún más conveniente la determinación directa de los complejos en los sistemas con cloroformo, es decir, sin adición de HTBA o extracción con NaOH. La escopolamina podría ser luego determinada por extracción de los mismos sistemas con cloroformo previo ajuste del pH de la fase acuosa a 6.7, 5.9 y 4.4 respectivamente.

Otro método que tal vez arrojaría los mejores resultados sería con NM-CHCl₃; como se ha demostrado la escopolamina no forma complejo soluble a los valores estudiados de pH por lo cual la atropina sería fácilmente determinada a pH 5.2 (Fig. 3). A continuación la escopolamina sería extraída con BTB-C₆H₆ al mismo valor de pH, valor al cual el grado de extracción del alcaloide no varía demasiado en función del pH o bien luego de ajustar el mismo a 5.9, valor óptimo para la extracción (Fig. 5).

CONCLUSIONES

Las conclusiones experimentales óptimas para la determinación de los alcaloides estudiados se establecieron luego de evaluar los principales parámetros que intervienen en la extracción de los pares iónicos.

Para cada alcaloide fue posible establecer varias técnicas de análisis para su cuantificación, y de las mismas se puede establecer la factibilidad de determinar una base orgánica nitrogenada en presencia de otra, tal como se discutió para la mezcla atropina-escopolamina.

Durante los diferentes ensayos se demostró que la presencia de la sustancia a determinar o del colorante en una u otra de las fases conduce siempre a los mismos resultados.

Cuando no se logran recuperaciones del 100% debido únicamente a una relativa solubilidad del par iónico, se recomienda realizar extracciones adicionales con solvente puro, procedimiento que en algunos casos puede mejorar la sensibilidad del método.

Los métodos y sistemas estudiados presentan una adecuada sensibilidad aún aquellos en los cuales la extracción no es completa y son bastante más sensibles que la mayoría de los reportados en la literatura. Las técnicas desarrolladas no requieren de equipo sofisticado y son de rápida y fácil ejecución.

La importancia de los métodos en el análisis de alcaloides y los resultados se verificaron sobre inyectables de atropina sulfato de 1mg/ml. La determinación del alcaloide se realizó por cuatro diferentes técnicas de las aquí establecidas, demostrando los resultados obtenidos la reproducibilidad y precisión de los métodos.

TABLA No. 1

SISTEMAS DE EXTRACCION PARA ESCOPOLAMINA BROMHIDRATO CON COLORANTES ACIDOS

Sistema	Conc. Molar InH	pH	mcg/ml	A	extrac. %	λ nm
BTB-CHCl ₃	1.25x10 ⁻⁴	6.8	3.6-18	0.847	90.39	635
BTB-C ₆ H ₆	1.25x10 ⁻⁴	5.9	2.4-12	0.675	48.95	405
PBC-CHCl ₃	1.25x10 ⁻⁴	4.4	3.6-18	0.647	36.23 64.38 74.97 80.65	605
PBC-CHCl ₃	4.0x10 ⁻⁴	4.4	16	0.321	68.86	410
PBC-C ₆ H ₆	1.25x10 ⁻⁴	-	-	-	-	-
NM-CHCl ₃	2.5x10 ^{-4*}	-	-	-	-	-
NM-C ₆ H ₆	2.5x10 ^{-4*}	-	-	-	-	-

* Preparado en el buffer

InH: indicador o colorante aniónico

pH: valor de pH óptimo para la extracción

C mcg/ml: concentraciones de atropina que satisfacen la Ley de Lambert Beer

A: absorbancia obtenida con la última de las concentraciones anotadas

λ nm: longitud de onda de la determinación

BIBLIOGRAFIA

1. AUERBACH, M.E., Germicidal Quaternary Ammonium Salts in Dilute Solution. A Colorimetric Assay Method, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, *15*, 492 (1943)
2. DIVATIA, G.I. y BILES, J.A., Physical Chemical Study of The Distribution of Some Amine Salts Between Immiscible Solvents, *J. Pharm. Sci.*, *50*, 916 (1961).
3. DURIK, F., KING, J.S. Jr., WARE, P.A. y GROHEIM, G., A Colorimetric Method for The Estimation of Some Tropine Alkaloids, *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, *39*, 680 (1950).
4. BALLARD, C.W., ISAAC, J. y SCOTT, D.G.W., The Photometric Determination of Quaternary Ammonium Salts and of Certain Amines by Compound Formation with Indicators, *J. Pharm. and Pharmacol.*, *6*, 971 (1954).
5. MUKERJEE, P., Use of Ionic Dyes in the Analysis of Ionic Surfactants and Other Organic Compounds, *Anal. Chem.*, *28*, 870 (1956).
6. HELGREN, P.F., THEIVAGT, J.G. y CAMPBELL, D.J., Methods for the Determination of TRAL, a New Anticholinergic Drug, *J. Pharm. Sci.*, *46*, 639 (1957).
7. LACHMAN, L., KURAMOTO, R. y COOPER, J., A Study of the Interaction Between Quaternary Ammonium Compounds and Several Certified Dyes, *J. Pharm. Sci.*, *47*, 871 (1958).
8. HIGUCHI, T. y BODIN, J.I., *En Pharmaceutical Analysis*, Higuchi T. y Brochmann-Hansen E., Eds., Interscience Publishers, New York-London, p. 413, 1961.
9. SCHILL, G. y MARSH, M., Photometric Determination of Amines and Quaternary Ammonium Compounds with Bromothymol Blue. I., *Acta Pharm. Suecica*, *67* (1963).
10. HULL, L.R. y BILES, J.A., Physical Chemical Study of Some Amine Salts Between Immiscible Solvents. II. Complexation in the Organic Phase, *J. Pharm. Sci.*, *53*, 869 (1964).
11. SCHILL, G., Photometric Determination of Amines and Quaternary Ammonium Compounds with Bromothymol Blue. II. Association of Bromothymol Blue in Aqueous Solutions, *Acta Pharm. Suecica*, *1* 101 (1964).
12. SCHILL, G., Photometric Determination of Amines and Quaternary Ammonium Compounds with Bromothymol Blue. III. Partition of Bromothymol Blue Between Water and Methylene Chloride, *Acta Pharm. Suecica*, *1*, 169 (1964).
13. SCHILL, G., Photometric Determination of Amines and Quaternary Ammonium Compounds with Bromothymol Blue IV. Extraction Constants and Calculation of Extraction Conditions, *Acta Pharm. Suecica*, *2*, 13 (1965).
14. GUPTA, V.D. y CADWALLADER, D.E., Acid Dye Method for the Analysis of Thiamine, *J. Pharm. Sci.*, *57*, 112 (1968).
15. GUPTA, V.D., CADWALLADER, D.E., HERMAN, H.B. y HONINGBERG, I.L., Effect of pH and Dye Concentration on the Extraction of a Thiamine Dye Salt an Organic Solvent, *J. Pharm. Sci.*, *57*, 1199 (1968).
16. The United States Pharmacopoeia, 21th rev., Mack Publishing Co., p. 605, 1041, 1985.
17. LINDEN, E. y SCHILL, G., Determination of Atropine in the Presence of Pralidoxime Chloride, *Acta Pharm. Suecica*, *4*, 327 (1976).
18. GARRETT, E.R. y TSAU, J., Application of Ion-Pair Methods to Drug Extraction from Biological Fluids I: Quantitative Determination of Biguanides in Urine, *J. Pharm. Sci.*, *61*, 1404 (1972).
19. GARRETT, E.R., TSAU, J. y HINDERLING, P.H., Application of Ion-Pair Methods to Drug Extraction from Biological Fluids II: Quantitative Determination of Biguanides in Biological Fluids and Comparison of Protein Binding Estimates, *J. Pharm. Sci.*, *61*, 1411 (1972).
20. ROJAS, J.H., Diagrammes de Distribution de Certains Alcaloides et Application à Leur Extraction en Chromatographie de Partage, *Memoire de Maîtrise-Es-Sciences, Faculté de Pharmacie, Université de Montréal*, 1975.
21. MOORE, F.L., Long-Chain Amines Versatile Acid Extractants, *Anal. Chem.*, *29*, 1660 (1957).
22. LEVINE, J., Analysis of Organic Bases by Salt Partition, *J. Pharm. Sci.*, *54*, 485 (1965).
23. SCHILL, G., MODIN, R. y PERSSON, B.A., Extraction of Amines as Complexes with Inorganic Anions, *Acta Pharm. Suecica*, *2*, 119 (1965).
24. DOYLE, T.D. y LEVINE, J., Application of Ion-Pair Extraction to Partition Chromatographic Separation of Pharmaceutical Amines, *Anal. Chem.*, *39*, 1182 (1967).

25. GUPTA, V.D. y FERGUSON, N.M., Quantitative Determination of Small Quantities of Atropine Sulfate in Antispasmodic Elixirs and Tablets, *Am. J. Hosp. Pharmacy*, 26, 168 (1969).
26. ASHLEY, M.G., An Application of the Vitali-Morin Reaction to the Determination of Small Quantities of Hyosciamine Hydrobromide in Some Pharmaceutical Preparations, *J. Pharm. and Pharmacol.*, 4, 181 (1952).
27. FELDMAN, J.A. y ROBB, B.J., Colorimetric Determination of Atropine, Homatropine, Scopolamine and Their Derivates for the Ferric Hydroxamate Method, *J. Pharm. Sci.*, 59, 1646 (1970).
28. BANDELIN, F.J., The Colorimetric Determination of Various Alkaloids, *J. Am. Pharm. Assoc.*, 39, 493 (1950).
29. GAUTIER, J.A., RENAULT, J. y RABIAN, J., Microdosage Spectrophotometric (UV) d'Alcaloids à l'Etat de Tétrapénylborures, *Ann. Pharm. Franc.*, 17, 401 (1959).
30. BOBTELSKY, M. y COHEN, M.M., Reactions Between Alkaloids and Tetraphénylboron and Their Analytical Application. A Heterometric Study, *Anal. Chim. Acta*, 22, 328 (1960).
31. BOBTELSKY, M. y COHEN, M.M., Reactions Between Alkaloids and Bismuth Iodide. The Compound Formed and Their Analytical Application. A Heterometric Study, *Anal. Chim. Acta*, 22, 270 (1960).
32. EL-MASRY, S. y KHALIL, S.A.H., Microdetermination of Hyosciamine and Scopolamine in Mixtures, *J. Pharm. Sci.*, 62, 1332 (1973).
33. The British Pharmacopoeia, The Pharmaceutical Press, London, p. 237, 1973.
34. The United States Pharmacopoeia, 21th rev., Mack Publishing Co., p. 89, 1985.
35. Ibid, 17th rev., p. 53, 1965.
36. The United States Pharmacopoeia, 21th rev., Mack Publishing Co., p. 953, 1985.
37. BRACEY, A. y SELZER, G., Determination of Microgram Quantities of Belladonna Alkaloids in Neomycin-Caolin-Pectin Suspension, *J. Pharm. Sci.*, 57, 464 (1968).
38. WU CHU, B.L., MIKA, E.S., SOLOMON, M.J. y CRANE, F.A., Quantitative Determination of Hyosciamine and Scopolamine by Direct Photodensitometry of Thin-Layer Chromatograms, *J. Pharm. Sci.*, 58, 1073 (1969).