

EXTRACCION DE PAR DE IONES Y DIAGRAMAS DE DISTRIBUCION

Sus aplicaciones a la extracción en cromatografía de partición

III. Reserpina y Rescinamina

Artículo tomado de "Diagrammes de Distribution de Certains Alcaloides et Application à Leur Extraction en Chromatographie de Partage", tesis de grado presentada por Jaime H. Rojas para optar el título de M.Sc., Universidad de Montreal, Canadá. Director de Tesis: Rosaire Plourde, Ph.D.

1. INTRODUCCION

En publicaciones anteriores (1-3) se presentaron los resultados obtenidos en la determinación del pKa por espectrofotometría de la noscapina y del pKa de la papaverina por potenciometría y por espectrofotometría. Igualmente se estudió el comportamiento de los dos alcaloides en soluciones clorofórmicas frente a fases acuosas de ácido sulfúrico o ácido fosfórico con el fin de estudiar el comportamiento de los pares iónicos respectivos y en soluciones etéreas con el fin de elaborar los diagramas de distribución correspondientes. Los resultados obtenidos se discutieron y aplicaron a su determinación en formas farmacéuticas.

El fundamento y los métodos sobre la determinación del pKa por espectrofotometría y sobre los estudios de distribución de sustancias orgánicas y de su partición bajo forma de pares iónicos se ha expuesto ampliamente (1).

La cromatografía de partición en columna y con bases más o menos empíricas ha sido ampliamente aplicada a la determinación de tal tipo de sustancias (4-11).

Los estudios de extracción de pares iónicos han sido útiles en la planificación racional de métodos cromatográficos de separación y valoración de alcaloides y otras sustancias orgánicas nitrogenadas (12-21).

En el presente trabajo se exponen los diferentes resultados obtenidos en los estudios de distribución y reparto de los alcaloides reserpina y rescinamina los que se aplican luego a la determinación del primero en una forma farmacéutica conjuntamente con butabarbital.

Las consideraciones y limitaciones respecto de la aplicación de resultados a los ensayos cromatográficos se discutieron con anterioridad (2,3).

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materiales y métodos

Además de los diferentes materiales y reactivos citados en (1) y (2) se empleó amoníaco calidad reactivo y un patrón de butabarbital de una pureza mínima de 99.5%.

La reserpina y la rescinamina se secaron a 60° C por tres horas y se conservaron luego bajo vacío sobre anhídrido fosfórico durante 24 horas.

Los solventes orgánicos empleados fueron previamente saturados con agua destilada.

2.2. Determinación del pKa

Los estudios preliminares para determinar el valor del pKa de la reserpina y la rescinamina por espectrofotometría se realizaron a partir de soluciones 2×10^{-4} M de cada alcaloide por disolución de 6.09mg y 6.35mg respectivamente en 0.2ml de ácido acético y agua destilada para completar 50ml exactos. Estas soluciones se diluyeron 1:25 con HCl 0.01M, con solución tampón de pH 10.0 y con solución tampón de pH 6.6 para obtener los espectros de absorción del catión, de la molécula neutra y de la mezcla catión-molécula respectivamente (Figs. 1 y 2).

Las longitudes de onda para la determinación deducidas de los diferentes espectros de absorción¹ son de 215nm para la reserpina y de 220 para la rescinamina.

1 Espectrofotómetro Cary 118.

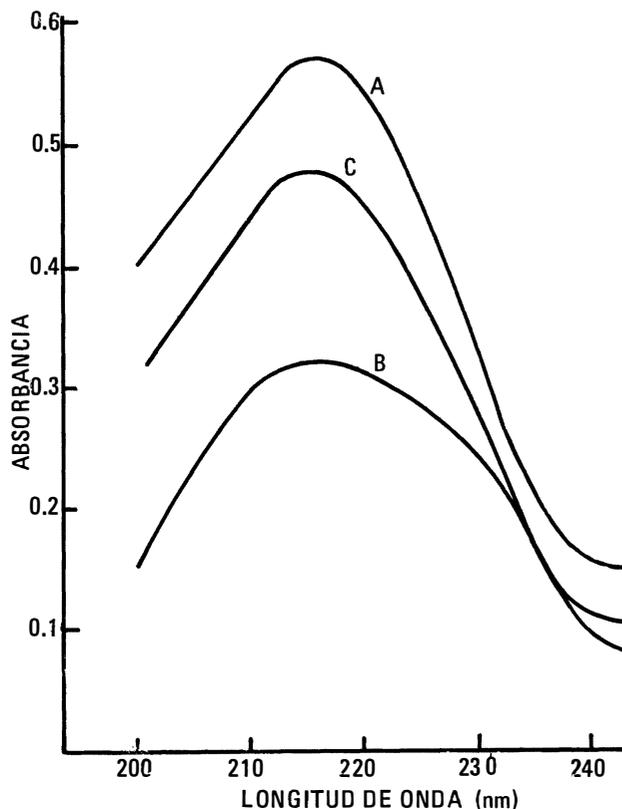


Figura 1. Espectros de absorción de una solución de reserpina $0.8 \times 10^{-5} M$: A) espectro del catión (HCl 0.01M); B) espectro de la molécula neutra (pH 10.0); C) espectro de la mezcla catión-molécula (pH 6.6).

Las determinaciones de los diferentes valores de absorción de mezclas catión-molécula para ambos alcaloides se realizaron con soluciones $0.8 \times 10^{-5} M$ a las longitudes de onda especificadas y a valores de pH situados entre 5.84 y 7.16 para la reserpina y entre 6.55 y 7.66 para

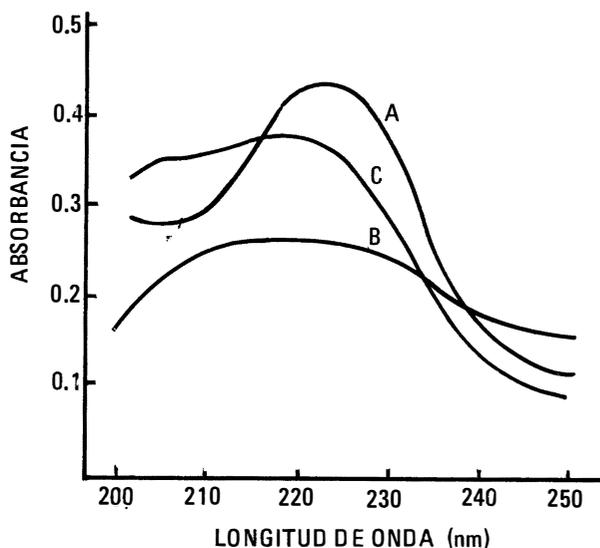


Figura 2. Espectros de absorción de la rescinnamina en solución $0.8 \times 10^{-5} M$: A) espectro del catión (HCl 0.01M); B) espectro de la molécula neutra (pH 10.0); C) espectro de la mezcla catión-molécula (pH 6.6).

la rescinnamina. Las lecturas de absorbancia se tomaron a $22^\circ C$ contra los respectivos blancos.

2.3. Estudios de reparto. Pares iónicos

Los diagramas de distribución de los dos alcaloides se establecieron de acuerdo con los resultados obtenidos mediante la mezcla y agitación de 20ml de soluciones etéreas de los mismos con 20ml de diferentes fases acuosas de valores de pH entre 3.55 y 4.50.

Las fases acuosas se prepararon mediante mezclas en proporciones adecuadas de soluciones 0.1M de ácido cítrico y de fosfato disódico. Las concentraciones empleadas de reserpina y rescinnamina fueron respectivamente $3.0 \times 10^{-5} M$ y $1.7 \times 10^{-5} M$.

La cantidad residual de reserpina en la fase etérea se determinó a 269.5nm y la correspondiente a la rescinnamina a 304nm en la misma fase. Las diferentes lecturas de absorbancia contra los blancos respectivos se extrapolaron sobre curvas de calibración preparadas con concentraciones entre $0.7-3.5 \times 10^{-5} M$ de reserpina y entre $0.6-3.0 \times 10^{-5} M$ de rescinnamina. Las concentraciones en las fases acuosas se obtuvieron por diferencia. Los resultados se reportan en los diagramas correspondientes (Fig. 3).

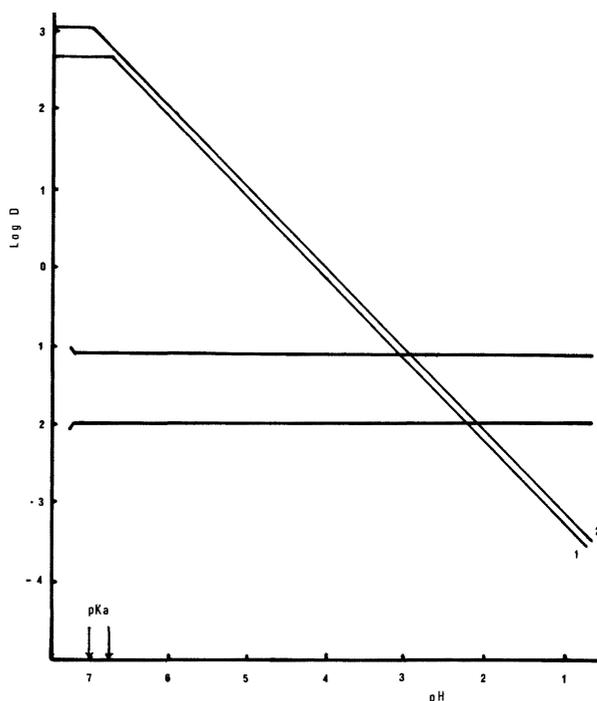


Figura 3. Diagramas logarítmicos de distribución de la reserpina (1) y de la rescinnamina (2) entre el éter y fases acuosas de diferente pH.

En los estudios previos de partición, tal como se encontró con la noscapina (2) y con la papaverina (3), los elevados valores obtenidos

para los coeficientes de distribución nos condujeron a realizar estudios de partición de la reserpina y de la rescinamina frente a los ácidos sulfúrico y fosfórico, ácidos que generalmente no forman pares iónicos solubles en cloroformo.

Un primer estudio se efectuó con concentraciones variables de los dos alcaloides en cloroformo y fases acuosas 0.1M de ácido sulfúrico o de ácido fosfórico. Las concentraciones empleadas de reserpina se situaron entre 0.7 y 3.5×10^{-5} M, y las de rescinamina entre 0.6 y 3.0×10^{-5} M.

Las concentraciones residuales respectivas se determinaron a 269 y a 303.5 nm en la fase clorofórmica mientras que las transferidas a la fase acuosa se calcularon por diferencia. Las lecturas se tomaron contra los blancos respectivos preparados simultáneamente (Figs. 4-7).

En un segundo estudio se investigó el comportamiento de los dos alcaloides frente a concentraciones variables entre 0.1 y 0.5M de cada uno de los dos ácidos. La única concentración de reserpina en la fase clorofórmica fue de 2.5×10^{-5} M en el caso del ácido sulfúrico y de 2.2×10^{-5} M en el del fosfórico. Para la rescinamina fue de 1.8×10^{-5} M en ambos casos (Figs. 8-11).

2.4. Cromatografía de partición

Los resultados obtenidos en los diferentes estudios con la reserpina se aplicaron al análisis

por cromatografía de partición de comprimidos de peso promedio 356.57mg que contenían 0.25mg de reserpina y 15.00mg de butabarbital.

Según el Formulario Nacional XIII, el butabarbital puede extraerse con cloroformo de una fase acuosa ácida. Kaplan y Levine (22) indican que por este método la extracción es incompleta. Para tabletas de butabarbital sódico, sugieren la elución de sustancias secundarias con isooctano-éter (4:1) de una columna de Celite que contiene dos fases estacionarias, la primera ácida y la segunda de carbonato de sodio. Por este tratamiento el barbitúrico es retenido por el carbonato de sodio para eluirse luego con éter.

Leyda y col. (23) estudiaron el comportamiento del butabarbital y de otros barbitúricos entre fases acuosas y una mezcla de cloroformo-isooctano (6:4). Los datos permiten prever la elución del butabarbital con éter de una fase estacionaria ácida.

Estos resultados junto con los obtenidos en nuestras investigaciones permiten planificar el método de separación y valoración de la mezcla reserpina-butabarbital.

En presencia de una fase acuosa estacionaria de ácido sulfúrico 0.1M el barbitúrico sería eluido con éter mientras que la reserpina quedaría retenida. La reserpina podría eluirse con cloroformo bajo la forma de par iónico sulfato.

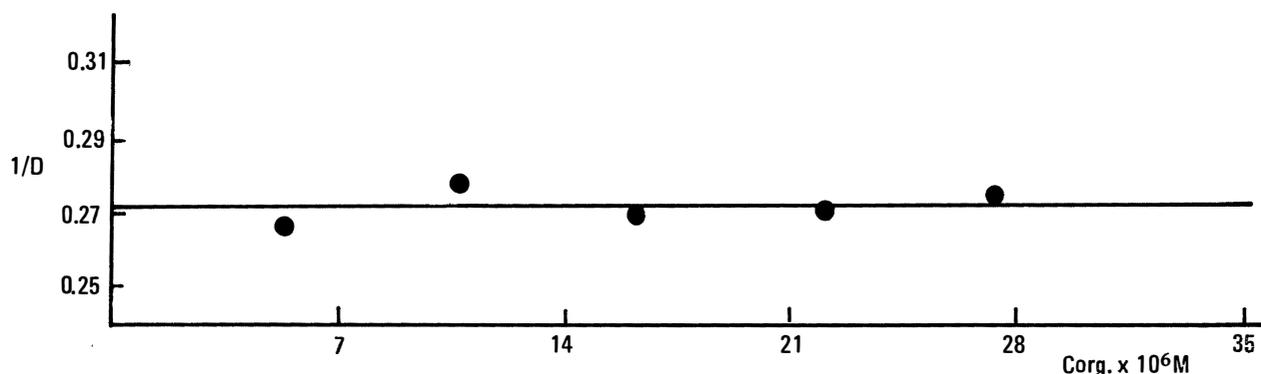


Figura 4. Relación entre la concentración de reserpina y su grado de extracción en el sistema cloroformo-ácido sulfúrico 0.1M.

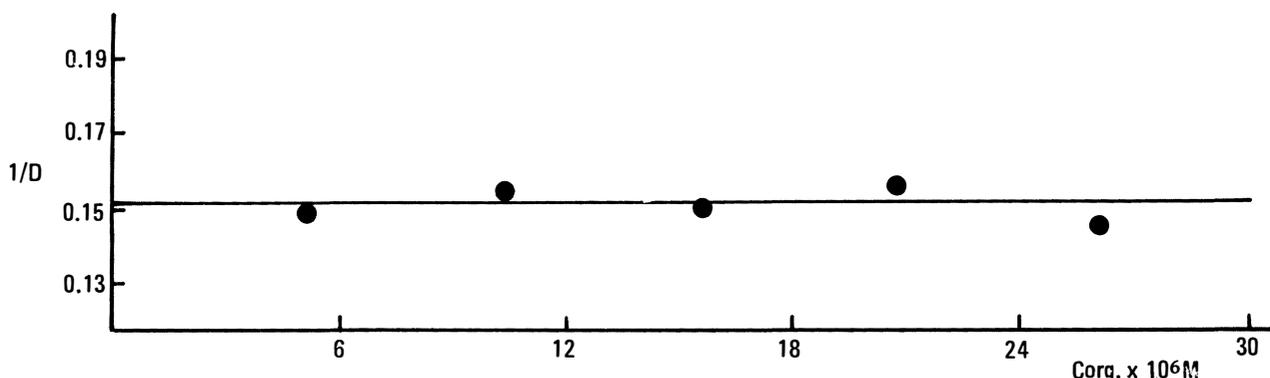


Figura 5. Relación entre la concentración de rescinamina y su grado de extracción en el sistema cloroformo-ácido sulfúrico 0.1M.

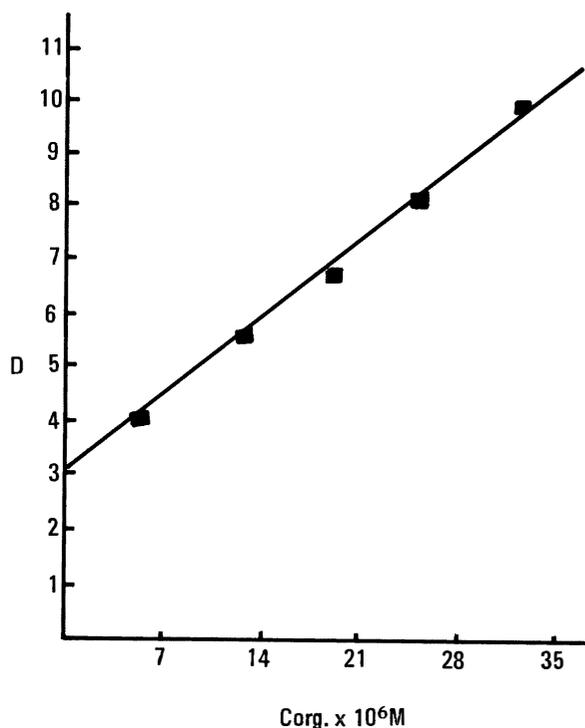


Figura 6. Relación entre la concentración de reserpina y su grado de extracción en el sistema cloroformo-ácido fosfórico 0.1M.

Antes de la lectura espectrofotométrica el butabarbital es extraído del éter con amoníaco diluido. Se prefirió el ácido sulfúrico en la fase estacionaria al fosfórico en virtud de que el par iónico reserpina-fosfato presenta un coeficiente de partición que varía con la concentración de reserpina (Fig. 6).

La técnica de la determinación se estableció como sigue:

Preparación de la Columna. En un vaso de precipitados mezclar una cantidad precisa y vecina de 720mg del polvo de las tabletas con 1ml de DMSO y 2ml de ácido sulfúrico 0.1M. Agregar 3g de Celite, mezclar y trasvasar a la columna en 3 o 4 porciones. Con ayuda de 1g de Celite pasar a la columna las últimas trazas de la mezcla y cubrir el conjunto con lana de vidrio.

Butabarbital. Eluir el butabarbital con 170ml de éter y llevar luego el eluato a un balón aforado de 200 ml con el mismo solvente. Extraer 25ml de la solución etérea con 3 porciones cada una de 30ml de amoníaco-agua (3:97), reunir los extractos y aforar a 100ml exactos con la mezcla amoniacal. Determinar la absorbancia a 239nm contra un blanco del solvente y comparar la lectura con la obtenida con un patrón de concentración 10mcg/ml.

Reserpina. Pasar a través de la columna 40ml de cloroformo y recibir el eluato en un balón aforado de 50ml. Completar a volumen con cloroformo. Determinar la absorbancia de la solución clorofórmica así obtenida a 269nm contra un blanco de cloroformo y compararla con la de un patrón de reserpina de concentración 15mcg por mililitro de cloroformo.

3. DISCUSION Y CONCLUSIONES

La investigación del pKa de la reserpina y de la rescinamina por el método potenciométrico no pudo realizarse a causa de que el método requiere concentraciones relativamente altas de sustancias y las mismas son insolubles en medios acuosos. Para la determinación por espectrofotometría fue necesario disolverlas en una pequeña cantidad de ácido acético, cantidad que luego de las diluciones efectuadas no modifica el pH de las soluciones tampón en las determinaciones espectrofotométricas. Se aclara que para cada uno de los dos alcaloides la molécula y su catión correspondiente presentan un máximo de absorción a la misma longitud de onda pero el grado de absorción es variable en función del pH del medio.

El valor reportado (23) para el pKa de la reserpina es de 6.6 a 25° C pero no se especifica el método ni las concentraciones empleadas en su determinación. El valor encontrado bajo nuestras condiciones es de 6.76 ± 0.03 .

Respecto de la rescinamina el valor hallado es de 7.02 ± 0.04 . La bibliografía no reporta el valor del pKa para este alcaloide.

Los ensayos iniciales de partición de los dos alcaloides entre cloroformo y soluciones tampón de pH entre 5.0 y 2.0 preparadas a partir de ácido cítrico 0.1M y fosfato disódico 0.1M revelaron altos valores para sus constantes de extracción, situación que dificulta la elaboración de sus correspondientes diagramas de partición en cloroformo. Fenómenos colaterales observados y que se discutirán luego constituyen un problema adicional.

Las experiencias con cloruro de metileno, n-pentanol, cloroformo-ciclohexano (2:8) y ciclohexano presentaron igualmente coeficientes de partición elevados para los tres primeros solventes, mientras que con el ciclohexano los mismos son de una magnitud similar a los hallados con éter.

Las características de partición en éter de la reserpina y de la rescinamina, como era de esperarse, presentan bastante similitud (Fig. 3). Los valores logarítmicos de las constantes de extracción ($\log K_B$) son de 2.66 para la reserpina y de 3.04 para la rescinamina.

Los estudios de partición realizados con diferentes concentraciones de los alcaloides entre cloroformo y ácido sulfúrico 0.1M no demostraron variación de las respectivas constantes de extracción (Figs. 4 y 5). Se observa que los valores de D para la rescinamina son más elevados que los presentados por la reserpina, analogía ya encontrada en los diagramas de distribución obtenidos empleando éter como solvente orgánico.

De otra parte, con el ácido fosfórico 0.1M como fase acuosa, los coeficientes de partición varían en forma lineal y progresiva con el aumento de la concentración de cada alcaloide en la fase orgánica (Figs. 6 y 7). Este tipo de resultados es completamente opuesto al obtenido precedentemente con la noscapina (2) y con la papaverina (3). Las variaciones encontradas para los coeficientes de partición conllevan un aumento en las constantes de extracción, fenómeno que se considerará luego.

La posibilidad de formación de pares iónicos solubles con los ácidos sulfúrico y fosfórico fue investigada si bien la bibliografía menciona que tales ácidos raramente forman pares iónicos solubles con sustancias orgánicas. Manteniendo constante la concentración de la reserpina y de la rescinamina y variando la correspondiente a los ácidos entre 0.1 y 0.5M, los resultados experimentales obtenidos (Figs. 8-11) demues-

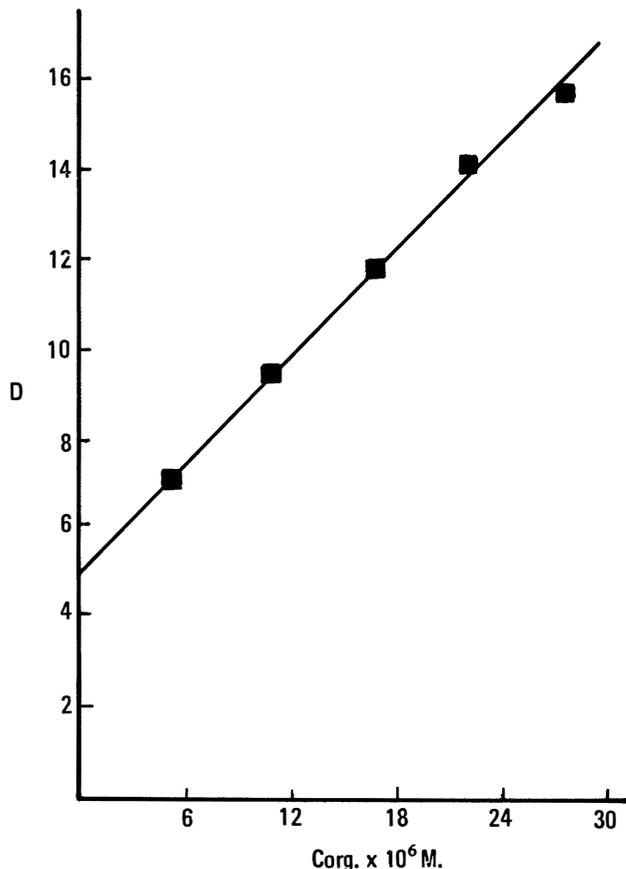


Figura 7. Relación entre la concentración de rescinamina y su grado de extracción en el sistema cloroformo-ácido fosfórico 0.1M.

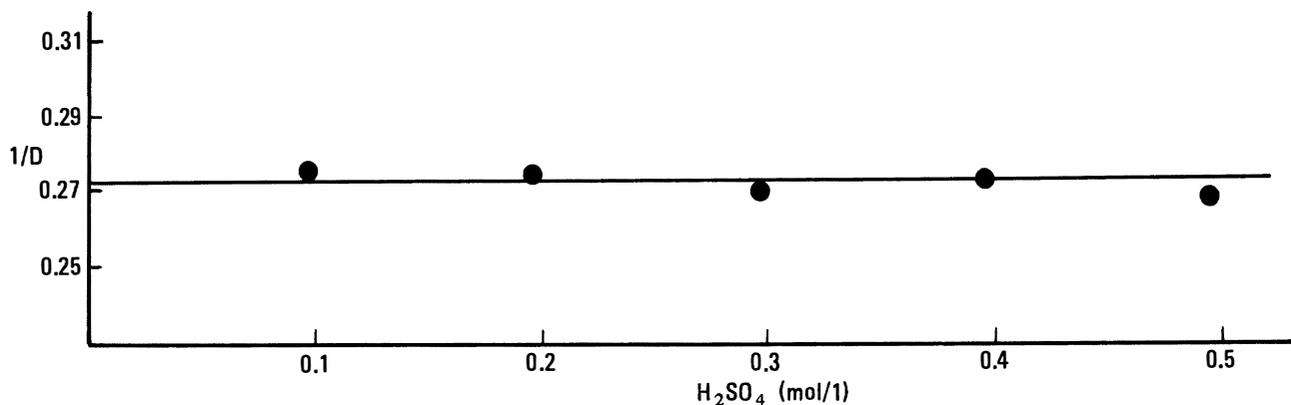


Figura 8. Extracción de la reserpina por el cloroformo en función de la concentración de ácido sulfúrico.

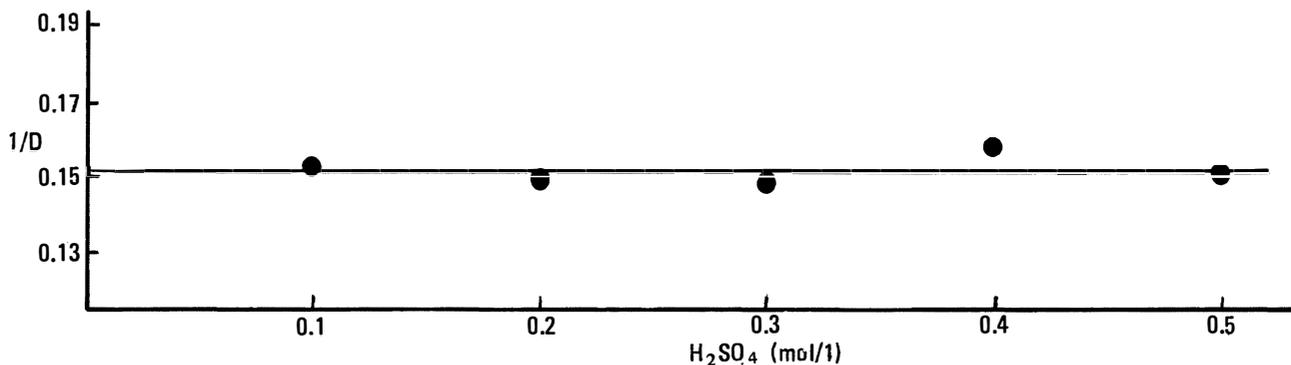


Figura 9. Extracción de la rescinamina por el cloroformo en función de la concentración de ácido sulfúrico.

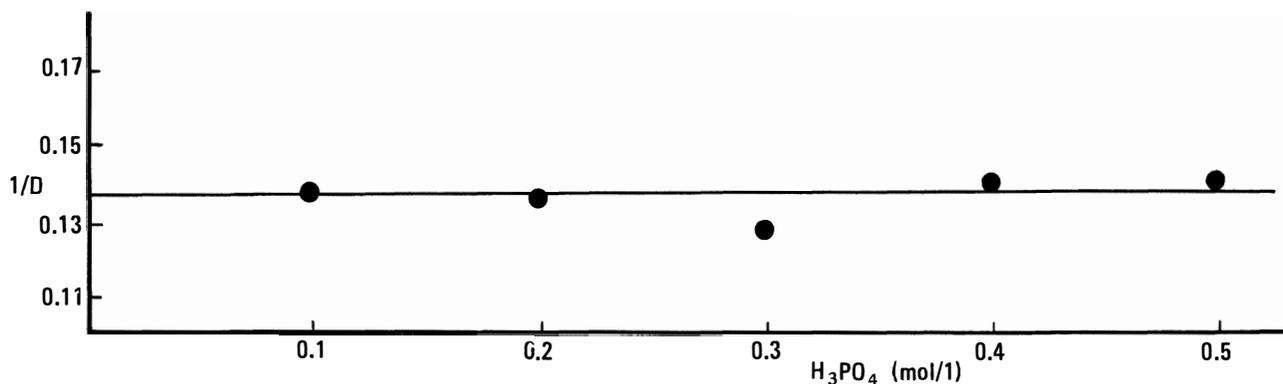


Figura 10. Extracción de la reserpina por el cloroformo en función de la concentración de ácido fosfórico.

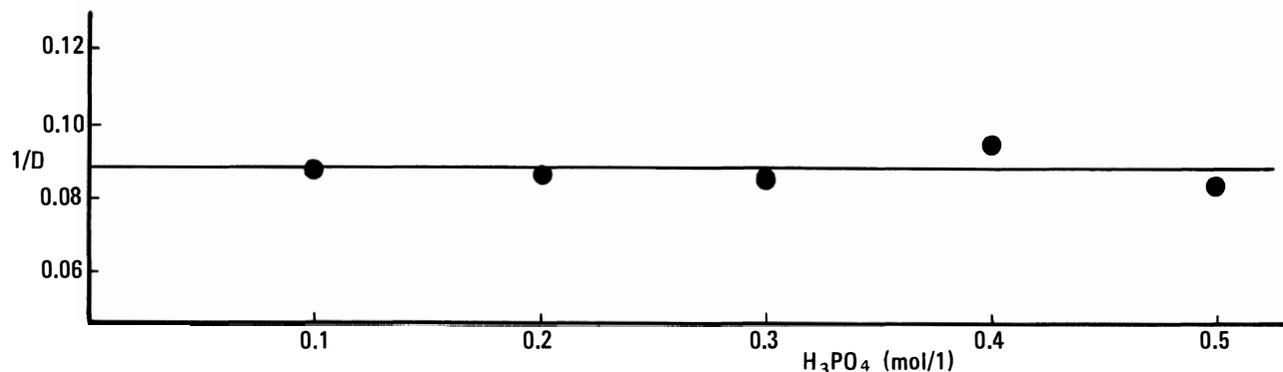


Figura 11. Extracción de la rescinamina por el cloroformo en función de la concentración de ácido fosfórico.

tran valores constantes de los coeficientes de distribución respectivos en relación con la concentración ácida de las fases acuosas y consecuentemente, la ausencia de pares iónicos solubles en el cloroformo. Los coeficientes obtenidos parecen corresponder únicamente a la extracción de la base. Durante las experiencias no se hizo manifiesta la presencia de algún fenómeno secundario.

Para la reserpina en presencia de ácido sulfúrico 0.1M (Fig. 8), el valor de $1/D$ correspondiente a $k_{D(A)} \cdot k'_{HA} / H^+$ es de 0.272 y de 0.152 para la rescinamina (Fig. 9).

Si se supone que a concentración variable de los ácidos no hay formación de pares iónicos solubles con los dos alcaloides, el valor del coeficiente de partición para la reserpina obtenido en ácido sulfúrico (Fig. 8) deducido del obtenido en ácido fosfórico (Fig. 10) debería dar un valor cuyo inverso sería prácticamente igual a 0.272, valor ya hallado para la reserpina. Los valores así obtenidos son 0.253 para la reserpina y 0.155 para la rescinamina.

Estos resultados significan que los valores encontrados en la intersecciones de las Figuras 6 y 7 corresponden a los coeficientes de partición de las bases respectivas.

De acuerdo con las variaciones en las constantes de extracción en presencia de ácido fosfórico 0.1 M (Figs. 6 y 7) se debe considerar, sin embargo, la posibilidad de extracción de pares

iónicos dímeros por la fase clorofórmica. Persson en sus trabajos con aminas sicosedativas (18) luego de la obtención de resultados similares había sugerido una fuerte tendencia a la dimerización en la fase orgánica.

Puesto que a concentraciones de ácido fosfórico entre 0.1 y 0.5M el coeficiente de distribución no presenta ninguna variación (Figs. 10 y 11), sería necesario verificar la posibilidad de extracción de pares iónicos dímeros a concentraciones de ácido menores de 0.1M.

La constante de dimerización del par iónico puede hallarse con ayuda de la ecuación utilizada por Persson y Schill (25) para la papaverina-perclorato:

$$E^*_{HAX} = E_{HAX} + 2k_2(HAX) \cdot E_{HAX}^2 \cdot C_{aq} \cdot C_{Xaq} \quad (\text{Ec. 1})$$

Los altos valores de las constantes de dimerización $k_2(HAX)$ así obtenidos son 4.3×10^4 para la reserpina y 6.0×10^4 para la rescinamina. Estas diferencias guardan relación con las obtenidas para las respectivas constantes de extracción en ácido fosfórico 0.1M y concentración variable de los alcaloides en la fase orgánica.

Los resultados obtenidos en la cromatografía de partición para el análisis de la forma farmacéutica son bastante aceptables. Las recuperaciones fueron del orden de $100.20 \pm 0.20\%$ para la reserpina y de $100.78 \pm 0.27\%$ para el butabarbital.

RESUMEN

El presente trabajo incluye la determinación espectrofotométrica del pka de la reserpina a 215nm y de la rescinamina a 233nm.

De otra parte se presentan y discuten los resultados obtenidos en los estudios de distribución y reparto para los dos alcaloides entre cloroformo y fases acuosas de ácido sulfúrico y de ácido fosfórico de concentración variable. Un estudio similar se realizó variando la concentración de los alcaloides en la fase orgánica frente a una fase acuosa 0.1M de los dos ácidos.

Los diagramas logarítmicos de distribución se establecieron a partir de los datos obtenidos mediante el reparto entre fases acuosas de diferente pH y una fase orgánica etérea.

Finalmente se estudió y analizó una mezcla de reserpina y butabarbital por cromatografía de partición de acuerdo con los diferentes resultados obtenidos en los estudios de partición.

SUMMARY

This work reports the determination of the pka value of reserpine and rescinamine by the spectrophotometric method at 215 and 233nm respectively.

The distribution of two alkaloids between two phases using ether as organic solvent and several buffer solutions at different pH values was studied. The results were used to built the logarithmic distribution diagrams.

It also presents the results obtained in the partition studies of alkaloids between chloroform and either sulfuric acid or phosphoric acid at various concentrations. The partition studies were also done with alkaloids at different concentrations in chloroform and either sulfuric acid 0.1M or phosphoric acid 0.1M as aqueous phase.

A mixture of reserpine and butabarbital was analysed by partition column chromatography.

BIBLIOGRAFIA

1. ROJAS B., J.H. Extracción de par de iones y diagramas de distribución. Sus aplicaciones a la extracción en cromatografía de partición. I. Noscapina, parte 1. *Rev Col Cienc Quím Farm*, 3, No. 2, 75, Septiembre de 1979.
2. ROJAS B., J.H. Extracción de par de iones y diagramas de distribución. Sus aplicaciones a la extracción en cromatografía de partición. I. Noscapina, parte 2. *Rev Col Cienc Quím Farm*, 3, No. 3, 105, Marzo de 1979.
3. ROJAS B., J.H. Extracción de par de iones y diagramas de distribución. Sus aplicaciones a la extracción en cromatografía de partición. II. Papaverina. *Rev Col Cienc Quím Farm*, 4, No. 1, 27, Octubre de 1983.
4. LEVINE, J. Determination of strychnine in elixir of iron, quinine and strychnine. *J Assoc Offic Agr Chemists*, 45, 595-597 (1962).
5. TURI, P. Assay procedure for pharmaceutical combinations of aspirin, phenacetin, caffeine and itobarbital with phenothiazine derivatives I. *J Pharm Sci*, 53, 396-372 (1964).
6. Official Methods of Analysis, 10th Ed., Association of Official Agricultural Chemists, Washington, D.C., 1965, sec. 32.002, 32.013-32.016, 32.072-32.078.
7. SMITH, D.J. Chromatographic separation and spectrophotometric determination of phenylephrine hydrochloride, codeine phosphate and some other pharmaceuticals in a mixture. *J Assoc Offic Agr Chemists*, 49, 536-541 (1966).
8. LEVINE, J. y HOHMANN, J. Determination of acetaminophen in combination with other drugs. *J Assoc Offic Agr Chemists*, 49, 533-536 (1966).
9. RADER, B.R. Chromatographic Analysis of chlorpheniramine, pyrilamine and methapyrilene in combination, *J Pharm Sci*, 58, 1535-1536 (1969).
10. HARVEY, M.M. Separation of trisulfapyrimidines by partition column chromatography. *J Assoc Offic Agr Chemists*, 53, 1100-1102 (1970).
11. CUNNINGHAM, C.G., BRUNER, C.A. y LEVINE, J. Collaborative study of a column chromatographic method for sodium diphenylhydantoin in capsules. *J Assoc Offic Agr Chemists*, 55, 170-172 (1972).
12. GOLUMBIC, C. y ORCHIN, M. Partition coefficients and ionisation constants of methylsubstituted pyridines and quinolines. *J Am Chem Soc*, 72, 4145-4147 (1950).
13. OTTES, R. y LEVINE, J. A unified procedure for the assay of alkaloids. *J Assoc Offic Agr Chemists*, 44, 293-296 (1961).
14. FREISER, H. y FERNANDO, Q. Ionic equilibria in analytical chemistry. Wiley, New York, p. 208, 1966.
15. SCHILL, G., MODIN, R. y PERSSON, B-A. Extraction of amines as complexes with inorganic anions. *Acta Pharm Suecica*, 2, 119-136 (1965).
16. HIGUCHI, T., MICHAELIS, A., TAN, T. y HURWITZ, A. Ion pair extraction of pharmaceutical amines. Role of dipolar solvating agents in extraction of dextrometorphan. *Anal Chem*, 39, 974-979 (1967).
17. MODIN, R. y SCHILL, G. Quantitative determination by ion-pair extraction. Part 1. Ion pairs of quaternary ammonium ions with organic anions. *Acta Pharm Suecica*, 4, 301-326 (1967).
18. PERSSON, B-A. Extraction of amines as complexes with inorganic anions. Part 3. Studies of amines with psychosedative effects containing condensed ring systems. *Acta Pharm Suecica*, 3, 335-342 (1968).
19. WESTERLUND, D. y BORG, K.O. Fluorometric determination by ion-pair extraction. Part 1. Extraction of ammonium compounds as ion pairs with anthracene-2-sulphonate. *Acta Pharm Suecica*, 7, 267-278 (1970).
20. BORG, K.O., HOLGERSSON, H. y LAGERSTROM, P.O. Determination of pibenzil in urine containing a metabolite and dextropropoxyphene by an ion-pair extraction method. *J Pharm Pharmacol*, 22, 507-511 (1970).
21. DIVATIA, G.J. y BILES, J.A. PHYSICAL chemical study of the distribution of some amine salts between immiscible solvents. *J Pharm Sci*, 50, 916-922 (1961).
22. KAPLAN, G.B. y LEVINE, J. Column chromatographic assay for sodium butabarbital in tablets. *J Assoc Offic Agr Chemists*, 55, 152-154 (1972).
23. LEYDA, J.P., LAMB, D.J. y HARRIS, L.E. Distribution coefficients and dissociation constants of a series of barbituric acids derivatives. *J Pharm Sci*, 49, 581-583 (1960).
24. Index Merck, Eighth Edition, Merck & Co., Inc. Rahway. N.J., USA, p. 912-913, 1968.
25. SCHILL G. y PERSSON, B-A. Extraction of amines as complexes with inorganic anions. Part 2. Determination of constants when the amine is extracted as complex and base. *Acta Pharm Suecica*, 3, 281-302 (1966).