

EXTRACCION DE PAR DE IONES Y DIAGRAMAS DE DISTRIBUCION. SUS APLICACIONES A LA EXTRACCION EN CROMATOGRAFIA DE PARTICION. I. Noscapina. Parte 1

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 B. para optar el título de M.Sc., Universidad de Montreal, Canadá.

Director de Tesis: ROSAIRE PLOURDE, Ph. D.

I — INTRODUCCION

Las sustancias de carácter alcaloidal, de gran importancia en farmacia, han sido objeto de numerosas investigaciones en el dominio farmacéutico, incluyendo el de su análisis y control de calidad por métodos a veces empíricos. Estas sustancias han sido relativamente poco estudiadas en su comportamiento bajo condiciones bien controladas antes de aplicar los resultados a su extracción cuantitativa en una determinada mezcla. En el curso de los últimos años se han realizado investigaciones sistemáticas para la extracción cuantitativa de sustancias orgánicas nitrogenadas con solventes orgánicos de soluciones ácidas conteniendo aniones particulares. Este método parecía contradictorio al método clásico de extracción de dichas sustancias. La extracción tiene lugar bajo la forma de un par de iones, formado a partir del anión y del catión nitrogenado.

El fenómeno de extracción del par de iones con solventes orgánicos apropiados, el cual se creía apenas como una excepción, ha sido objeto de numerosos estudios. Los diferentes parámetros físico-químicos han sido estudiados en un gran número de sustancias ni-

trogenadas y otras mediante el desarrollo de una teoría apropiada del fenómeno. La aplicación nacional de esta teoría ha servido de base para el establecimiento de métodos de extracción cuantitativa de numerosas bases orgánicas en mezcla y en variadas formas farmacéuticas.

Es necesario precisar que los coeficientes de partición de sustancias orgánicas nitrogenadas y otras utilizadas para el desarrollo de métodos de extracción están igualmente ligados a las propiedades hidro-lipofílicas de las mismas en el organismo. Las características de partición están directamente influidas por su constante de disociación K_a .

En la presente investigación nos hemos propuesto el estudio de factores implicados en la partición de algunos alcaloides, con la finalidad de su extracción cuantitativa en formas farmacéuticas. Los fenómenos secundarios o "parásitos" observados en el transcurso de la investigación han sido estudiados e interpretados. Los resultados se muestran de acuerdo con las nuevas teorías sobre los factores de extracción de sustancias orgánicas bajo la forma de par de iones.

Dentro de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas medicamentosas el grado de disociación, reflejado por el pK_a , al igual que su coeficiente de distribución constituyen la mayor parte del tiempo factores importantes con relación directa a la actividad biológica. En efecto, cuando un medicamento está en solución en los fluidos gastrointestinales, la transferencia del mismo se hará a una velocidad y según un grado que serán directamente dependientes de la afinidad de ese medicamento por la fase lipídica. Así, más el coeficiente de distribución o de partición favorece los aceites o grasas, más la absorción será considerable (1). De otra parte, el paso del medicamento bajo la forma no disociada a través de la membrana gastrointestinal es en general considerado como mucho más rápido que aquel de las formas disociadas (2). Estas dos propiedades, constante de disociación y coeficiente de partición, pueden influir también la reabsorción tubular y la excreción urinaria al igual que la distribución en la biofase.

El conocimiento del pK_a es igualmente precioso tanto en el dominio analítico como en el de la preparación de medicamentos. Igualmente es importante para la elaboración de los diagramas de distribución o de partición, y éstos con el fin de estudiar las diferentes posibilidades de extracción y valoración en preparados farmacéuticos.

Antes de los años 30 los métodos corrientes de determinación del pKa eran la potenciometría con ayuda de indicadores y la conductimetría, métodos largos y poco precisos. Es igualmente importante señalar la gran confusión existente respecto de la constante de disociación de una sustancia dada. El grado de precisión de la mayor parte de estos valores no se conoce ni tampoco a veces las condiciones de su determinación.

La determinación precisa del pKa de los alcaloides bajo condiciones bien controladas se efectuó por potenciometría o por espectrofotometría, métodos los más ventajosos y reproducibles (3). El método espectrofotométrico fue seguido para la noscapina. En el curso de una determinación cualquiera la desviación no debe ser mayor de ± 0.06 .

Siendo indispensable un criterio sobre la pureza e identidad de una sustancia, luego de secado apropiado, se juzgó suficiente la toma de los puntos de fusión, su valoración y en algunos casos la cromatografía en capa delgada. Los puntos de fusión se determinaron por el método de Totoli y la valoración por potenciometría con ácido perclórico 0.02N. Todos los alcaloides poseían una pureza no menor del 99.1%.

II — MATERIALES Y METODOS

Potenciómetro Accumet modelo 310 de Fisher Scientific con escala expandida y electrodos de vidrio Fisher N° 13-639-3 y de calomel Fisher N° 13-639-52.

Electrobalanza Cahn modelo G.

Espectrofotómetro Cary 118 con celdas de cuarzo de 1 cm.

Espectrofotómetro Unicam SP 550 (manual).

Espectrofotómetro Unicam SP 800 (con registro).

Los siguientes reactivos de la más alta pureza, A.C.S. o grado reactivo fueron utilizados:

Biftalato de potasio 0.05M, borato de sodio 0.05M, ácido clorhídrico 0.1 y 0.01M, hidróxido de potasio 0.1 y 0.01M, ácido bórico, ácido cítrico, ácido sulfúrico, fosfato de potasio monobásico, fosfato disódico, cloroformo, ciclohexano, éter, cloruro de metileno, 1-pentanol, noscapina.

El cloroformo fue antes tratado con ácido sulfúrico al 10% seguido de destilación para eliminar el alcohol empleado como preservativo. La noscapina fue secada a 105° C. durante 1 hora y luego conservada bajo vacío en presencia de anhídrido fosfórico durante 24 horas.

A. Determinación del pK_a .

Schill y Gustavii (4) determinaron el valor del pK_{a_1} y del pK_{a_2} de la morfina por espectrofotometría, valores que confirman por potenciometría. Una revisión de los métodos de determinación de constantes de disociación por potenciometría ha sido presentado por Benet y Goyan (5), mientras que Perrin (6) presentó un resumen de constantes de disociación de bases orgánicas establecidas por diferentes métodos.

En la determinación del pK_a por potenciometría se hace uso de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Ácidos: } pK_a = pH + \log[HA] - \log[A] \quad \text{Ec. 1}$$

$$\text{Bases: } pK_a = pH + \log[B] - \log[BH^+] \quad \text{Ec. 2}$$

Estos valores son constantes a una temperatura dada, por lo cual en la determinación se debe controlar rigurosamente la temperatura; para las sustancias de carácter ácido esta influencia es pequeña, mientras que para las bases, sobre todo las fuertes, una débil variación de la temperatura influye sensiblemente el valor del pK_a . En la determinación del valor del pK_a por espectrofotometría, es necesario que la sustancia en estudio posea un máximo de absorción diferente de aquel de la forma iónica.

En este método, la determinación se fundamenta en el hecho que un cambio en el pH produce un cambio en el coeficiente de extinción específico de la molécula. Existe una relación entre la constante de disociación de la molécula y su coeficiente de extinción:

$$pK_a = pH \pm \log \frac{E_A - E_C}{E_C - E_B} \quad \text{Ec. 3}$$

donde: E_A : coeficiente de extinción específico del ión.

E_B : coeficiente de extinción específico de la molécula.

E_C : coeficiente de extinción específico de la mezcla ión-molécula.

Puesto que las condiciones experimentales son las mismas durante el transcurso de la determinación, el valor de E puede ser reemplazado por el valor de absorbancia:

$$\text{Acidos: } pK_a = pH + \log \frac{A - C}{C - B} \quad \text{si } A > B \quad \text{Ec. 4}$$

$$pK_a = pH + \log \frac{C - A}{B - C} \quad \text{si } A < B \quad \text{Ec. 5}$$

$$\text{Bases: } pK_a = pH + \log \frac{C - B}{A - C} \quad \text{si } A > B \quad \text{Ec. 6}$$

$$pK_a = pH + \log \frac{B - C}{C - A} \quad \text{si } A < B \quad \text{Ec. 7}$$

El método consiste en medir las concentraciones relativas del ión y de la molécula de la substancia en estudio en soluciones tamponadas a diferentes valores de pH . La absorción se mide contra un blanco que contiene la misma concentración de tampón. Los valores de pH de la solución y del blanco no deben diferir en más de 0.03 unidades.

La determinación se debe realizar en lo posible a la longitud de onda que muestre la más grande diferencia de absorción entre el ión y la molécula (longitud de onda analítica).

Mediante un ensayo preliminar y con ayuda de un tampón, cuyo pH sea susceptible de dar una ionización parcial de la molécula, se calcula un valor aproximado del pK_a . Luego se preparan diluciones apropiadas de una solución madre de la substancia en tampones cuyos valores de pH se encuentren a ± 0.6 unidades de aquel hallado como valor aproximativo del pK_a .

B. Diagramas de distribución. Par de iones.

Puesto que existe una relación estrecha entre el pK_a de una substancia y su grado de elución en cromatografía de partición, una revisión de la literatura revela la utilización más o menos extensa de la cromatografía de partición en columna de medicamentos (7-14). En 1962, Levine (15) presentó una revisión excelente sobre el empleo de la cromatografía de partición en columna aplicada a varios grupos de medicamentos.

Golumbic y Orchin (16) efectuaron tal vez los primeros ensayos sobre la determinación de coeficientes de partición trabajando con derivados metilsubstituidos de la piridina y de la quinolina. En 1961, Levine y Ottes (17) propusieron un método de extracción

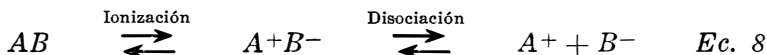
bajo la forma de par de iones por cromatografía de partición para la separación de medicamentos aminados en formas farmacéuticas.

Levine (8) y Levine y Doyle (12) aplicaron el mismo principio a la separación de aminas en mezclas. Doyle y Levine (18) adaptaron las técnicas descritas por Sillen y otros (19, 20, 21) para la construcción de diagramas de distribución de codeína, de pirilamina y de sus pares de iones con el ión nitrato. Ellos encontraron una excelente correlación entre los volúmenes de retención experimentales en cromatografía de partición sobre columnas de Celite y los valores predichos de acuerdo a los coeficientes de partición. Una correlación análoga había sido señalada por Schill y colaboradores (22).

En su estudio con dextrometorfano, Higuchi y colaboradores (23) investigaron la influencia de la concentración del agente solvatante, cloroformo en ciclohexano, y de la concentración de aniones sobre la formación del par de iones.

Doyle y Levine (24) elaboraron diagramas de distribución del dextrometorfano, de varios antihistamínicos, de la efedrina y de sus pares de iones clorhidrato, los que emplean en determinaciones cuantitativas de preparados farmacéuticos.

La ionización constituye el proceso de formación de iones, mientras que la disociación representa la separación de las especies iónicas. Esto puede representarse como sigue:



La especie $A+B^-$ se denomina un par de iones. El grado de disociación iónica está en gran parte controlado por la constante dieléctrica del medio. En solventes de fuerte constante dieléctrica, la formación del par de iones es transitoria y en aquellos de constante dieléctrica débil o media, el grado de disociación es débil y es posible detectar la presencia del par de iones.

La mayor parte de bases farmacéuticas importantes pueden formar con ciertos ácidos sales llamadas par de iones susceptibles de ser extraídos de una solución acuosa por el cloroformo u otros solventes. Los procedimientos clásicos de extracción líquida-líquida de alcaloides o bases orgánicas se basan en el principio general que la base libre (forma no disociada) es soluble en la fase orgánica mientras que la sal de la base (forma disociada) es soluble en la fase acuosa. El principio de estos procedimientos clásicos se aplica a la determinación cuantitativa de alcaloides tanto en el NF XIII (25) como en la USP XVIII (26).

En ciertos casos existe una desviación a esta regla general y es la escogencia del solvente y del ácido utilizado en la fase acuosa que influyen en la dirección de la partición (27). Higuchi y Bodin (28) especifican que en el curso de la extracción de alcaloides por solventes inmiscibles en presencia de ácidos en medio acuoso, el ácido clorhídrico debe evitarse en presencia de cloroformo ya que ciertos clorhidratos de alcaloides son solubles en ese solvente. Esta excepción no se limita al sistema cloroformo-ácido clorhídrico; solventes tales como el cloruro de etileno presentan el mismo fenómeno (29). La extracción cuantitativa de sales de alcaloides por la técnica convencional en separadores carece a menudo de precisión a causa de características de partición que favorecen la fase acuosa. La influencia de coeficientes de partición desfavorables es en gran parte corregida incorporando al proceso la cromatografía de partición.

Con esta técnica, la relación de volúmenes de fase orgánica y acuosa puede escogerse adecuadamente para aumentar la eficacia de la extracción y de la recuperación cuantitativa en un tiempo mucho más corto. La partición de alcaloides y de bases orgánicas bajo forma de sales de una variedad de ácidos por cromatografía aporta a menudo una mejor selectividad susceptible de numerosas aplicaciones. La escogencia del ácido empleado para un alcaloide debe tener en cuenta las características de partición de la sal formada. El coeficiente de partición de la sal debe ser suficientemente favorable para su elución completa con un volumen razonable de solvente. Se deduce entonces, que es necesario investigar el comportamiento de la sustancia en presencia de diferentes aniones y en una ancha gama de concentraciones, así como del solvente orgánico.

Todos los autores reconocen la posibilidad de que la base libre sea extraída al mismo tiempo que el par de iones aún en medio fuertemente ácido. Para obviar este problema, el *pH* del medio es ajustado de forma que la extracción de la base sea despreciable.

La extracción de un par de iones por la fase orgánica puede representarse por la siguiente ecuación:



donde *Ks*: constante condicional de extracción o constante clásica de extracción.

BH^+_{aq} : base protonada en la fase acuosa.

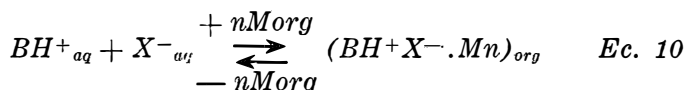
X^-_{aq} : el anión en la fase acuosa.

$BH^+X^-_{org}$: el par de iones en la fase orgánica.

Hull y Biles (30), estudiando el papel del agente solvatante, llegaron a la conclusión que era necesario utilizar un solvente donador de protones para mejorar la partición.

En general, el solvente orgánico produce la solvatación del par de iones y aparentemente lo vuelve más compatible con la fase orgánica por enmascaramiento del carácter aniónico del par de iones, es decir, del puente ión-ión.

Puesto que el agente solvatante juega un papel importante en el curso de la extracción, es necesario tenerlo en cuenta en la ecuación.



donde M: agente solvatante,

n : número de moléculas de M asociadas al par de iones.

Esta expresión está regida por la constante de equilibrio, K_o , o constante de estabilidad del sistema completo:

$$K_o = \frac{[BH^+X^-.Mn]_{org}}{[BH^+]_{aq} [X^-]_{aq} [M]_{org}^n} \quad Ec. 11$$

y el coeficiente de partición está dado por:

$$D = \frac{[BH^+X^-.Mn]_{org}}{[BH^+]} \quad Ec. 12$$

Si se trabaja a concentración constante del anión X^- , la gráfica de $\log D$ en relación a $\log M$ debe dar una línea recta cuya pendiente debe corresponder a n . De esta forma, es posible tener una idea aproximada de la molecularidad aparente de la asociación entre el par de iones y el solvente.

El estudio de estos parámetros permite predecir que la distribución de la amina entre las dos fases es función de la amina, del par de iones, del anión, del agente solvatante y de sus concentraciones respectivas.

La constante de extracción condicional del par de iones representada en la ecuación 8 puede expresarse como sigue:

$$\frac{[BH^+X^-]_{org}}{[BH^+]_{aq}} = K_s [X^-]_{aq} \quad Ec. 14$$

Así, la relación de la partición del par de iones es una función lineal de la concentración del anión X^- , independiente del pH de la fase acuosa. Aun si se aumenta el pH de la fase acuosa, la proporción de la base libre extraída aumenta igualmente.

Si se representa la ecuación clásica de la distribución de la amina libre por:

$$K_B = \frac{[B]_{org}}{[B]_{aq}} \quad Ec. 15$$

donde K_B representa la constante de extracción de la amina, y si la constante de disociación de la amina es:

$$K_a = \frac{[B]_{aq} [H^+]_{aq}}{[BH^+]_{aq}} \quad Ec. 16$$

la relación de distribución D , puede expresarse en términos de la concentración total de la amina, C , en cada fase y resuelta por las variables independientes $(H^+)_{aq}$ Y $(X^-)_{aq}$

$$D = \frac{(C)_{org}}{(C)_{aq}} = \frac{(B)_{org} + (BH^+X^-)_{org}}{(B)_{aq} + (BH^+)_{aq}} \quad Ec. 17$$

Esta ecuación puede ser representada como sigue:

$$D = \frac{\frac{K_a}{(H^+)_{aq}} \cdot K_B + K_s (X^-)_{aq}}{\frac{K_a}{(H^+)_{aq}} + 1} \quad Ec. 18$$

Ecuación que puede separarse en dos términos que representan la extracción de la base libre y la del par de iones:

$$D = \frac{K_B}{1 + \frac{(H^+)_{aq}}{K_a}} + \frac{K_s (X^-)_{aq}}{1 + \frac{(H^+)_{aq}}{K_a}} \quad Ec. 19$$

Resulta entonces que la partición de la amina depende de los valores relativos de K_B y K_s . Sin embargo, si se considera el caso

el cual solamente la base libre es extraída, es decir, cuando no hay anión susceptible de ser extraído o cuando el solvente, por ejemplo el éter, no extrae el par de iones, el término de la derecha en la ecuación 19 es despreciable.

Para el término de la izquierda, que representa la extracción de la base, cuando el $pH > pKa$ en dos unidades o más, la relación $(H^+)/Ka$ es mucho más pequeña que la unidad y en consecuencia despreciable, de suerte que el valor de D es prácticamente equivalente a K_B e independiente del pH en esta región. Al contrario, en regiones donde el $pH < pKa$ por dos unidades o más, la relación $(H^+)/Ka$ es mucho más grande que la unidad y el valor de D puede ser representado por:

$$D = \frac{K_a K_B}{(H^+)_{aq}} \quad Ec. 20$$

Con ayuda de estas aproximaciones, es posible representar en una gráfica los valores de $\log D$ en función del pH ; se observa dos líneas rectas que se encuentran en el lugar donde el pH es igual al pKa . Cuando los valores de pH son más elevados que el pKa , la extracción de la base libre predomina, la cual es esencialmente constante. A valores de $pH < pKa$, la base libre en la fase acuosa se vuelve más y más protonada y su extracción disminuye.

En el diagrama de distribución, la región ácida que se encuentra a la derecha de la extracción de la base, corresponde a la extracción del par de iones, la que es independiente del pH hasta el momento donde el valor del pH alcanza la línea del diagrama de distribución.

Para que la ley de distribución (Ec. 14) pueda ser aplicada, deben cumplirse ciertas condiciones, a saber: disociación completa de las especies en la fase acuosa, formación de un monómero en la fase orgánica y dependencia de la constante de extracción (K_s) del par de iones de las diferentes especies iónicas presentes en la fase acuosa.

Cuando los valores del coeficiente de distribución son demasiado elevados, para obtener resultados reproducibles, es posible proceder empleando una técnica de doble extracción, cambiar la concentración de la base, o aún cambiar convenientemente la relación de volúmenes de las dos fases; en el último caso, el coeficiente de distribución viene dado por:

$$D = \frac{C_{org}}{C_{aq}} \cdot \frac{V_{aq}}{V_{org}} \quad Ec. 21$$

Para establecer los diagramas de distribución y de par de iones, generalmente se emplea volúmenes iguales de la fase orgánica y de la fase acuosa. Todas las fases orgánicas se saturan antes de su empleo con agua y las diferentes fases acuosas con el solvente orgánico en cuestión.

Para obtener el equilibrio, las dos fases en presencia se agitan mecánicamente durante 30 minutos y luego se transvasan a ampollas de 60 ml. Luego de un reposo apropiado, cada fase es ordinariamente filtrada por algodón.

La concentración de la substancia en cada una de las fases se determina directamente o por diferencia. Las determinaciones se llevaron a cabo por espectrofotometría y a la longitud de onda donde la especie respectiva presenta un máximo de absorción. Cuando la absorción de una substancia varía con el *pH*, es necesario ajustar antes el *pH* para obtener el máximo de absorción.

Investigaciones preliminares permiten prever las condiciones óptimas para la determinación de los coeficientes de partición.

El principio del método consiste en determinar las características de partición o de solubilidad de la substancia entre dos fases inmiscibles cualesquiera, lo que es en suma un reflejo de sus propiedades intrínsecas.

C. Cromatografía de partición.

Los diferentes resultados obtenidos sobre las características de partición de los diferentes pares de iones de una substancia al igual que de sus diagramas de distribución, permiten la planificación de su elución cuantitativa por cromatografía de partición en columna con el fin de un control analítico del alcaloide presente en una determinada mezcla.

El porcentaje de extracción "*P*" del alcaloide de la fase acuosa a la fase orgánica luego de un primer equilibrio está ligado al coeficiente de partición:

$$P = \frac{100}{1 + \frac{V_{aq}}{V_{org}} \cdot \frac{1}{D}} \quad Ec. 22$$

Un porcentaje de extracción igual o inferior a 1 se obtiene cuando $D \cdot V_{org}/V_{aq}$ es igual o inferior a 10^{-2} ; un porcentaje igual o superior a 99 se obtiene cuando $D \cdot V_{org}/V_{aq}$ es igual o superior a 10^2 . La separación de dos sustancias en mezcla no puede realizarse por una sola extracción si los logaritmos de los coeficientes de partición (D) de las sustancias presentes en la mezcla no difieren al menos en cuatro unidades. Es necesario precisar entonces la relación que existe entre el coeficiente de partición y el volumen de retención en cromatografía de partición:

$$V_R = V_r + V_s/D \quad \text{Ec. 23}$$

donde V_R : volumen de retención del sistema cromatográfico.

V_r : volumen de desplazamiento de la fase móvil.

V_s : volumen de la fase estacionaria.

Schill y colaboradores (22) observaron una excelente correlación entre los volúmenes de retención experimentales sobre columnas de Celite y los valores calculados de acuerdo a los coeficientes de partición de pares de iones encontrados experimentalmente. La separación se considera aceptable si uno sólo de los constituyentes de la mezcla es totalmente eluido con 100 ml. de eluyente de una columna constituida por 2 ml. de fase estacionaria adsorbida sobre 3 gramos de Celite. En la práctica, los volúmenes de retención que responden a estas condiciones son de 50 ml. para la elución completa de la sustancia y de 150 ml. antes del comienzo de la elución de las otras sustancias que permanecen en la columna. Estos volúmenes corresponden a coeficientes de partición de 0.057 y 0.015 respectivamente, es decir, $\log D > -1.3$ para la elución y $\log D < -1.8$ para la retención. De esta forma, por encima de $\log D - 1.3$ la sustancia debe ser eluida, mientras que por debajo de $\log D - 1.8$, ella debe ser retenida con el mismo volumen de solvente. En la práctica se emplea $\log D \geq -1.2$ para la elución y $\log D \leq -2.0$ para la retención.

III — RESULTADOS

A. Determinación del pK_a .

Estudios preliminares para determinar el valor del pK_a de la noscapina por espectrofotometría y en concentración $3.0 \times 10^{-4}M$,

demonstraron que el alcaloide (la molécula neutra) se descompone en una solución de KOH 0.01M (figura 1). Una descomposición análoga se observó tratando de aislar la molécula neutra en un tampón de borax-NaOH 0.05M de pH 10.0. La molécula neutra de la noscapina presenta dos máximos de absorción, a 290 y a 313 nm, con descomposición a las dos longitudes de onda y cambio en la posición del máximo de absorción a 290 nm (desplazamiento hipsocrómico).

En presencia de este problema, es necesario encontrar el valor de la absorción de la molécula neutra (*B*) por métodos indirectos. Luego de experiencias preliminares, la solución madre se preparó solubilizando 41.34 mg. de noscapina en 2 ml. de HCl 0.1M y llevando a 50 ml. con agua destilada para obtener una concentración 2.0×10^{-3} M. Esta solución madre se diluyó 1 en 10 para obtener una concentración de trabajo de 2.0×10^{-4} M. Esta última solución se efectuó con KOH 0.01M para efectuar las lecturas de absorbancia a 290 y 313 nm durante 40 y a cada uno de los minutos. Los resultados de estas absorciones se encuentran en la figura 2 y muestran las curvas respectivas de descomposición de la noscapina a cada una de las dos longitudes de onda. La absorción a tiempo cero es de 0.868 para la longitud de onda de 313 nm y 0.648 para la de 290 nm.

La selección de la longitud de onda analítica se establecerá luego del estudio del espectro de absorción del catión (*A*) y de la mezcla catión-molécula a pH 6.6 (*C*). Para el espectro de absorción del catión, la dilución 1 en 10 se llevó a cabo con HCl 0.01M mientras que para la mezcla catión-molécula la dilución se realizó con el tampon fosfato 0.05 M de pH 6.6 (figura 3).

De estas experiencias se deduce que la longitud de onda a emplear es aquella de 290 nm y la absorción extrapolada para la molécula neutra de 0.648.

Para la investigación de los diferentes valores de *C* de mezclas catión-molécula a pH diferentes, la solución madre se diluyó 1 en 10 con tampones de fosfato 0.05 M apropiados para valores de pH de 5.80, 6.00, 6.20, . . . a pH 6.81. Las medidas de la absorción se realizaron a 22° C. y a 290 nm. Los resultados se muestran en la Tabla I.

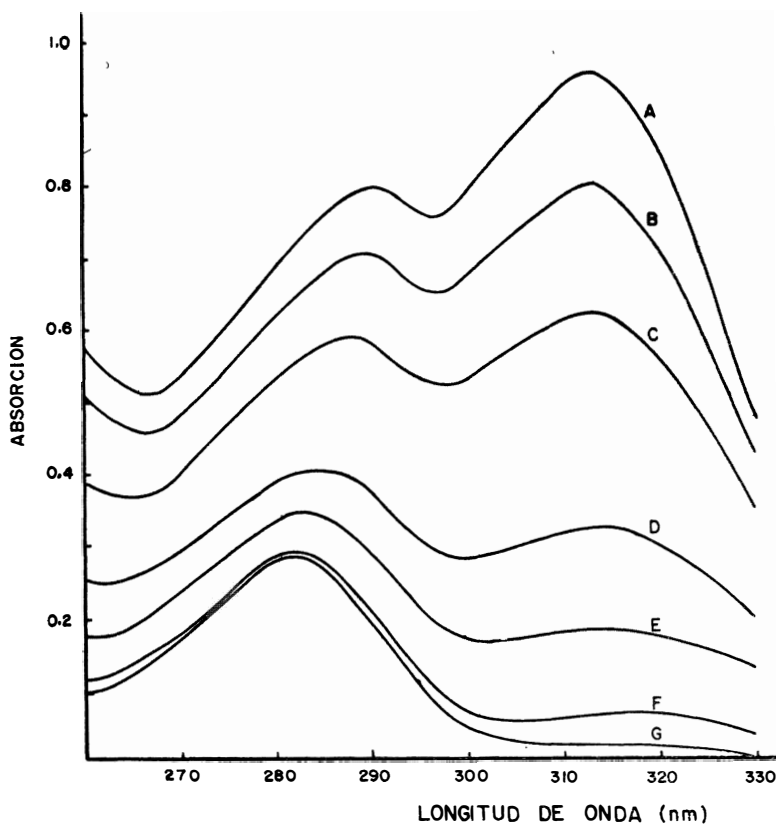


Figura 1. Variación con el tiempo del espectro de absorción de una solución de nescapina ($3.0 \times 10^{-4} M$) en KOH $0.01 M$: A) a los 2 minutos; B) a los 3 minutos; C) a los 5 minutos; D) a los 10 minutos; E) a los 15 minutos; F) a los 30 minutos; G) a los 45 minutos

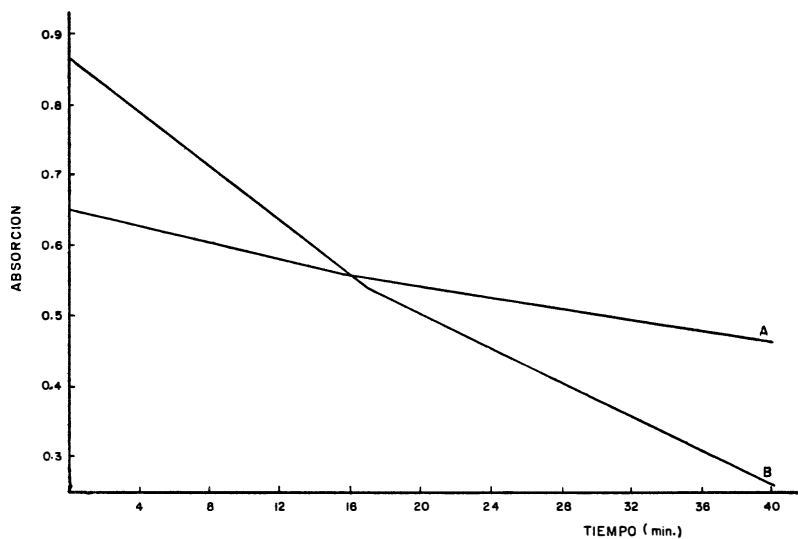


Figura: 2. Influencia del tiempo sobre la absorción de la nescapina ($2.0 \times 10^{-4}M$) en solución de KOH 0.01M a 290nm (A) y a 313 nm (B).

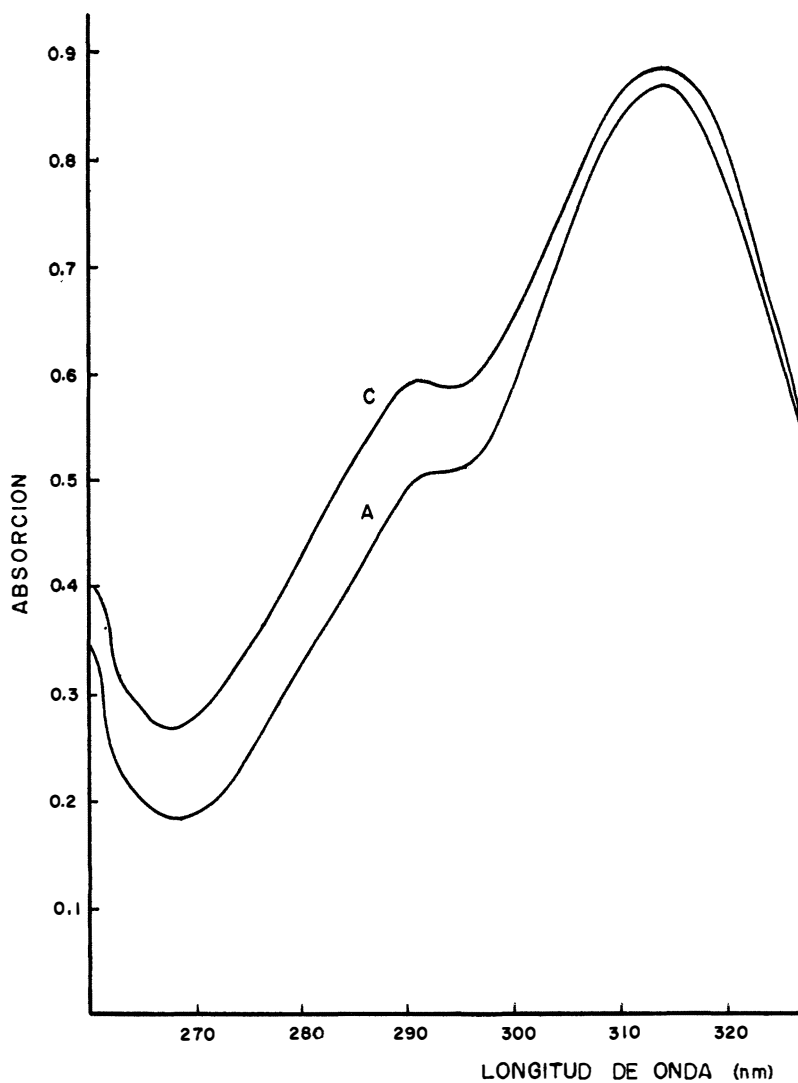


Figura 3. — Espectros de absorción de una solución de noscapina $2.0 \times 10^{-4}M$: A) espectro del catión (HCl 0.01 M); C) espectro de la mezcla catión-molécula (pH 6.6).

Igualmente, el valor de la absorción de la molécula neutra, necesario para el cálculo del pK_a , puede hallarse transformando la Ecuación 7 como sigue:

$$K_a = [H^+] \frac{(C - A)}{(B - C)} \quad \text{Ec. 24}$$

$$C = B - \frac{[H^+] (C - A)}{K_a} \quad \text{Ec. 25}$$

De acuerdo a la ecuación 25, por el método de los cuadrados mínimos y empleando los resultados de la Tabla I para cada pH , el valor de la absorción calculada para la molécula neutra (B) sería 0.647.

B. Estudios de partición.

El diagrama de distribución para la noscapina, ha sido realizado utilizando tampones apropiados como fases acuosas y el éter como fase orgánica.

El diagrama de partición de la noscapina en el éter se llevó a cabo por el procedimiento general que consiste en equilibrar 20 ml. de la fase etérea que contenía una concentración adecuada del alcaloide con 20 ml. de un tampón de ácido cítrico-fosfato disódico 0.1M de valores apropiados de pH .

La concentración empleada de noscapina fue de $1.2 \times 10^{-4}M$ (4.962 mg/100 ml) en la fase etérea para el equilibrio con tampones de pH 3.30, 3.60, 3.85, 4.10 y 4.30. Los resultados se anotan en la Tabla II y representados en forma de gráfica en la figura 4.

En cada fase, luego del equilibrio, la cantidad residual del alcaloide se determinó por espectrofotometría a 308 nm y con ayuda de una curva de calibración (0.3 a $1.5 \times 10^{-4}M$) y contra blancos apropiados preparados simultáneamente. La concentración del alcaloide en la fase acuosa se obtuvo por diferencia.

IV — DISCUSION. CONCLUSIONES

En la determinación espectrofotométrica del pK_a de la noscapina fue necesario solubilizar la base en la cantidad equivalente de HCl 0.1N. El espectro presenta dos máximos de absorción, uno a 290 nm y el otro de una absorción mayor a 313 nm. La descomposi-

ción de la noscapina en medio alcalino es tan rápida que hace prácticamente imposible la determinación del espectro de absorción de la molécula neutra "B". Se ha observado que la descomposición

TABLA I

Determinación espectrofotométrica del pK_a de la noscapina.

pH	$H \times 10^7$	C	$H^+(C-A)$ 10^8	$H^+(C-A)$ 10^8	$H^+(C-A)$ $C \times 10^8$	pK_a
5.80	15.894	0.538	4.279	13.31×10^{-16}	2.302	6.41
6.00	10.000	0.547	3.600	12.96×10^{-16}	1.969	6.44
6.20	6.310	0.554	2.711	7.35×10^{-16}	1.502	—
6.32	4.786	0.570	2.824	7.94×10^{-16}	1.610	6.44
6.58	2.630	0.591	2.104	4.43×10^{-16}	1.244	6.43
6.81	1.549	0.609	1.508	2.27×10^{-16}	0.918	6.40

Concentración de la solución diluida de noscapina: $2.0 \times 10^{-4} M$.

Longitud de onda analítica: 290 nm.

Absorción del catión (A): 0.511.

Absorción de la molécula neutra: (B): 0.647.

Temperatura: 22° C.

TABLA II

Influencia del pH sobre el coeficiente de partición de la noscapina en el sistema éter-agua.

pH	$C_{org} \times 10^5 M$	$C_{aq} \times 10^5 M$	D	$\log D$
3.30	3.132	8.868	0.353	-0.452
3.60	4.941	7.059	0.700	-0.155
3.85	6.654	5.346	1.245	0.095
4.10	8.182	3.818	2.143	0.331
4.30	9.338	2.662	3.058	0.545

Concentración de noscapina: $1.2 \times 10^{-4} M$ (4.962 mg/100 ml).

V_{aq}/V_{org} : 20 ml/20 ml.

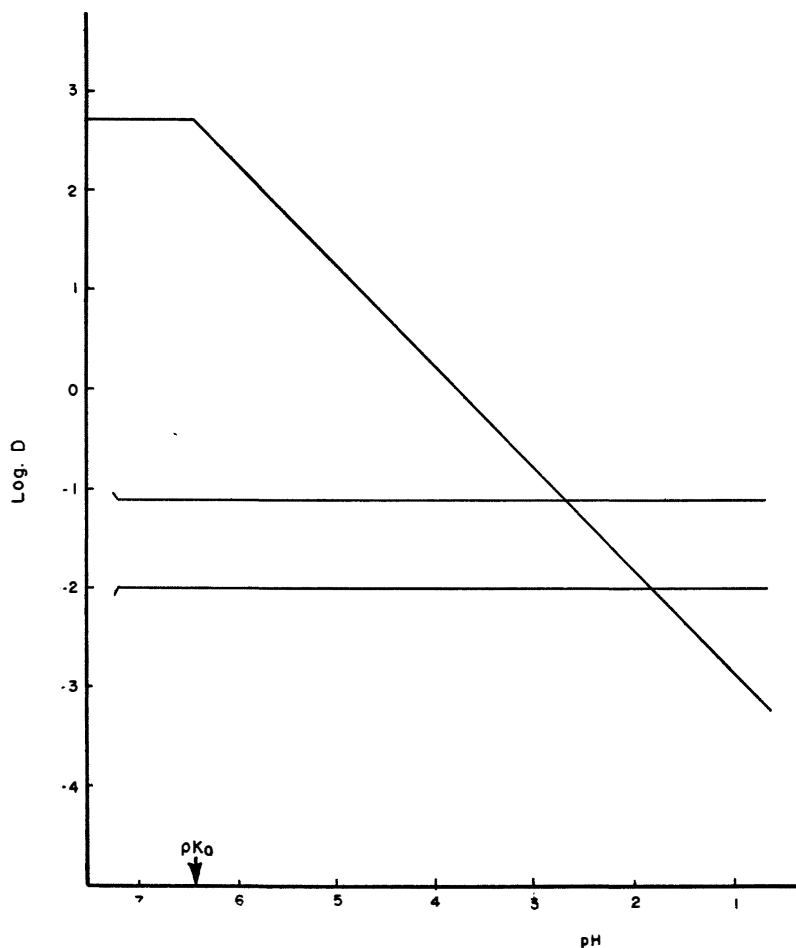


Figura 4. Diagrama de distribución logarítmico de la noscapina en el éter

del alcaloide procede a una velocidad diferente según la longitud de onda considerada. La disminución de la absorción de la noscapina fue determinada durante 40 minutos y a intervalos de un minuto a las dos longitudes de onda.

La diferencia de la absorción con el cambio del pH es más neta a 290 nm que a 313 nm (Figura 3). Por estas razones, la longitud de onda de 290 nm fue escogida para la determinación espectrofotométrica del pKa de la noscapina.

El valor teórico de la absorción de la molécula neutra "B" de la noscapina encontrado por extrapolación es de 0.648, valor confirmado por el método de los cuadrados mínimos con un valor de 0.647.

La investigación del pKa de la noscapina por el método potenciométrico no puede realizarse a causa de la baja solubilidad de la noscapina. Igualmente su determinación por colorimetría según el método general de Albert y Serjeant (3) con las concentraciones señaladas por Kolthoff (31) no pudo realizarse ya que a la primera adición de KOH hay precipitación y descomposición del alcaloide.

El valor del pKa encontrado se compara en la Tabla III con los valores encontrados en la literatura (Perrin, 6).

TABLA III

Comparación del valor obtenido para el pKa de la noscapina con los valores encontrados en la literatura.

pKa	Literatura a)			Resultado experimental		
	$T^{\circ}C$	Concentración	Método	pKa	$T^{\circ}C$	Método
6.37	15.0	0.0006-0.0030	1	6.43 \pm 0.03	22	4
4.38	55.0	—	2			
5.86	24.0	—	3			

1) Colorimétrico con indicador de pKa conocido.

2) Catalítico (rata de inversión de la sucrosa).

3) Potenciométrico (electrodo de hidrógeno).

4) Espectrofotométrico (absorción de la luz en función del pH).

a) Resultados especificados inciertos.

Los ensayos preliminares de partición de la noscapina entre el cloroformo y un tampón ácido cítrico-fosfato disódico 0.1M de valores apropiados de pH entre 5.0 y 2.0, revelaron coeficientes de partición y constantes de extracción demasiado elevadas, haciendo difícil la elaboración del diagrama de partición en dicho solvente. Además, fenómenos de asociación y de dimerización que se trata-

rán en una próxima publicación (Noscapina. Parte 2), complican dicha elaboración.

Investigaciones iniciales de partición para el mismo alcaloide entre otros solventes orgánicos, el cloruro de metileno, el n-pentanol, el cloroformo al 20% en ciclohexano y el ciclohexano y los mismos tampones dieron igualmente coeficientes de partición elevados para los tres primeros solventes mientras que para el ciclohexano los grados de extracción son más o menos iguales a los presentados por el éter. El valor logarítmico de la constante de extracción encontrado ($\log K_B$) para la noscapina en el éter es de 2,72.

RESUMEN

El presente trabajo incluye algunos aspectos teóricos relativos a la determinación del pK_a , de la extracción de par de iones y características de distribución de sustancias orgánicas. Además presenta algunos resultados experimentales obtenidos sobre la noscapina.

La determinación del pK_a de la noscapina se realizó por el método espectrofotométrico a 22° C. El valor obtenido fue de 6.43 ± 0.03 . El diagrama de partición de la noscapina se estableció utilizando el éter como fase orgánica y como fases acuosas diferentes tampones de valores apropiados de pH . El valor de la constante de extracción de la base ($\log K_B$) fue de 2.72.

SUMMARY

This work includes some theoretical aspects of the determination of the pK_a , the extraction of the ion-pairs and distribution characteristics of organic substances. It also presents some experimental results obtained in the work with noscapine.

The pK_a value of the noscapine was made by the spectrophotometric method at 22° C. The value obtained was 6.43 ± 0.03 .

The distribution of the noscapine between two phases using ether as organic solvent and several buffer solutions at different pH values was studied. The partition diagram was made and the log of the extraction constant of the base ($\log K_B$) was 2.72.

RÉSUMÉ

Le travail comment quelques aspects théoriques concernant la recherche de la valeur du pK_a , ainsi que sur l'extraction des paires d'ions et caractéristiques de distribution des substances organiques. En plus, il inclu des résultats expérimentaux obtenus sur la noscapine. La détermination de la valeur du pK_a de la noscapine a été faite à l'aide de la méthode spectrophotométrique dont la valeur trouvée à 22° C. a été de 6.43 avec un écart de ± 0.03 .

L'établissement du diagramme de partage de la noscapine a été accompli entre des tampons appropriés et l'éther. La valeur logarithmique de la constante d'extraction de la base ($\log K_B$) a été de 2.72.

BIBLIOGRAFIA

1. SCHANKER, L. S. The Mechanis of Absorption of Drugs from the Gastro-intestinal Tract., *J. Med. Pharm. Chem.*, **2**, 343-349 (1960).
2. SCHANKER, L. S. Physiological Transport of Drugs., *Advn. Drug Res.*, **1**, 71-106 (1964).
3. ALBERT, A. y SERJEANT, E. P. Ionisation Constants of Acids and Bases., Methuen & Co. Ltd., London, 1962.
4. SCHILL, G. y GUSTAVII, K. Acid Dissociation Constants of Morphine., *Acta Pharm. Suecica*, **1**, 24-35. (1964).
5. BENET, L. Z. y GOYAN, J. E. Potentiometric Determination of Dissociation Constants., Review Article, *J. Pharm. Sci.*, **56**, 665-680. (1967).
6. PERRIN, D. D. Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solution., Butterworths, London, 1965.
7. HEUERMAN, R. F. y LEVINE, J. The Analysis of Combinations of Acetylsalicylic Acid, Acetophenetidin, and Caffeine with Other Drugs., *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, **47**, 276-280. (1958).
8. LEVINE, J. The Determination of Codeine in Mixtures with Antihistamines., *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, **44**, 285-287. (1961).
9. LEVINE, J. Determination of Dihydrocodeinone in Mixtures with Antihistamines., *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, **46**, 641-642. (1963).
10. LEVINE, J. Analysis of Organic Bases by Salt Partition., *J. Pharm. Sci.*, **54**, 485-488. (1965).

11. MIŁOS, C. Spectrophotometric Determination of Codeine in Terpin Hydrate Elixirs., *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 48, 607-608. (1965).
12. LEVINE, J. y DOYLE, T. D. Determination of Dihydrocodeinone in Mixtures with Antihistamines. II. Methapyrilene., *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 48, 608-612. (1965).
13. ELLISTON, S. C. y COLES, M. L. Partition Chromatography and Determination of Noscapine in Cough Preparations., *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 53, 585-588. (1970).
14. KAPLAN, G. B. y LEVINE, J. Column Chromatographic Assay for Sodium Butabarbital in Tablets., *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 55, 152-154. (1972).
15. LEVINE, J. Column Partition Chromatography in Pharmaceutical Analysis. Review Article., *J. Pharm. Sci.*, 52, 1015-1031. (1963).
16. GOLUMBIC, C. y ORCHIN, M. Partition Coefficients and Ionisation Constants of Methylsubstituted Pyridines and Quinolines., *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 4145-4147. (1950).
17. LEVINE, J. y OTTES, R. T. A New Extraction Procedure for Alkaloids., *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 44, 291-293. (1961).
18. DOYLE, T. D. y LEVINE, J. Application of Ion-Pair Extraction to Partition Chromatographic Separation of Pharmaceutical Amines., *Anal. Chem.*, 39, 1282-1287. (1967).
19. SILLEN, L. G. Treatise on Analytical Chemistry., Part I. Vol. 1, Chap. 8, Kolthoff I. M. y Elving P. J., Eds., Interscience, New York, 1959.
20. BUTLER, J. N. Ionic Equilibria, A Mathematical Approach., Addison Wesley, Reading, Mass., 1944.
21. FREISER, H. y FERNANDO, Q. Ionic Equilibria in Analytical Chemistry., Wiley. New York, p. 208, 1966.
22. SCHILL, G., MODIN, R. y PERSSON, B. A. Extraction of Amines as Complexes with Inorganic Anions., *Acta Pharm. Suecica*, 2, 119-136. (1965).
23. HIGUCHI, T., MICHAELIS, A. TAN, T. y HURWITZ, A. Ion Pair Extraction of Pharmaceutical Amines. Role of Dipolar Solvating Agents in Extraction of Dextromethorfan., *Anal. Chem.*, 39, 974-979. (1967).
24. DOYLE, T. D. y LEVINE, J. Selection of Partition Chromatographic Systems from Distribution Diagrams: Determination of Dextromethorfan in Cough Sirups., *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 51, 191-199. (1968).
25. The National Formulary, 13th., J. B. Lippincott Co., Philadelphia, Pa., p. 776-777, 1970.
26. The United States Pharmacopoeia, 18th rev., Mack Publishing Co., Easton, Pa., p. 911, 1970.

27. LEVINE, J. The Evolution of Pharmaceutical Analysis., J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, *57*, 237-242. (1974).
28. HIGUCHI, T. y BODIN, J. I. En Pharmaceutical Analysis, Higuchi T. y Brochmann-Hanssen E., Eds., Interscience Publishers, New York-London, p. 320, 1961.
29. CURRY, A. D. Review Article: Toxicological Analysis., J. Pharm. and Pharmacol., *12*, 321-339. (1960).
30. HULL, L. R. y BILES, J. A. Physical Chemical Study of the Distribution of Some Amine Salts Between Immiscible Solvents. II. Complexation in the Organic Phase., J. Pharm. Sci., *53*, 869-872. (1964).
31. KOLTHOFF, J. M. Die Dissociationskonstante, das Löslichakeitsprodukt und Die Titrierbarkeit von Alcaloiden., Biochemical, Z., *162*, 289-353. (1925).