

Absorción de la Bencidrilamina y Derivados. I. Selección de la Metodología Analítica

MARIA GUILLERMINA VOLONTE, SUSANA A. TAYLOR y PABLO LUFRANO

*Cátedra de Ensayo y Valoración de Medicamentos, Departamento de Ciencias Biológicas,
Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata,
calles 47 y 115, La Plata 1900, Argentina*

RESUMEN. Se correlacionan los resultados obtenidos en la valoración de bencidrilamina y derivados, a través de la utilización de tres métodos analíticos que emplean la extracción líquido-líquido y la cromatografía en capa fina como etapa preparativa, a los efectos de evitar la interferencia por parte de sustancias liberadas desde las membranas gástricas. Se observa buena concordancia de los valores medidos por espectrodensitometría y por espectrofotometría ultravioleta cuando se utiliza la cromatografía en capa fina como etapa previa a la medición analítica.

SUMMARY. "Absorption of Benzhydrylamine and Derivatives. I. Selection of the Analytical methodology". Data obtained through evaluation of benzhydrylamine and some derivatives by three analytical methods are correlated. The methods include liquid-liquid extraction and thin layer chromatography (TLC) as a preparative step, in order to avoid interference of substances released from the gastric membranes. Good concordance between spectrophotometric and spectrodensitometric values is noted when TLC is used as a previous step to the analytical measurement.

INTRODUCCION

Un aspecto que debe ser tenido en cuenta en el diseño de fármacos es la facilidad que poseen éstos de atravesar las membranas, como una estimación de su biodisponibilidad.

La bibliografía es abundante en modelos experimentales que operan con membranas naturales que permiten evaluar, en forma rápida, tanto la cinética de absorción de una sustancia como la gravitación de ciertos factores fisicoquí-

micos sobre la misma. Se destacan en este aspecto los trabajos de Schanker *et al.*¹, quienes analizan el rol del pH en la transferencia de drogas desde el estómago de ratas. Wiseman² pone a punto una técnica basada en el empleo de intestino aislado conteniendo soluciones de drogas. Doluisio *et al.*³, en la década del 60, hacen importantes contribuciones a la absorción de fármacos empleando un método práctico *in situ*. Más recientemente sobresalen las investigaciones efec-

PALABRAS CLAVE: Bencidrilaminas; Espectrodensitometría; Cromatografía en capa fina; Extracción líquido-líquido; Análisis estadístico.

KEY WORDS: Benzhydrylamines; Spectrodensitometry; Thin Layer Chromatography; Liquid-Liquid Extraction; Statistic Analysis.

tuadas por Hori *et al.*⁴, Suzuka *et al.*⁵, Hirano y Hunt⁶, Sakai *et al.*⁷, Hawkins y Reifenrath⁸ y el trabajo realizado por Patel y Kramer⁹ en el cual comunican los resultados de la absorción del allopurinol desde distintos sitios del tracto gastrointestinal de ratas.

Nuestro propósito es analizar la absorción de derivados de la bencidrilamina como parte de un trabajo multidisciplinario que pretende lograr un prototipo activo a partir de dicha sustancia; ya se han comunicado resultados sobre el efecto antiespasmódico y anestésico local de una serie de derivados de la bencidrilamina^{10, 11}.

En el presente trabajo se informa el estudio realizado a efectos de seleccionar una metodología analítica que permita seguir la transferencia desde el lumen estomacal de rata al torrente sanguíneo de los siguientes derivados: clorhidratos de bencidrilamina (BB₂), N,N-dimetilbencidrilamina (AB₄), N,N-dietilbencidrilamina (AB₇) y N-metilbencidrilamina (AB₁₀)

Se desarrollaron métodos basados en la aplicación de técnicas de separación con el fin de evitar interferencias en la cuantificación de las bencidrilaminas ocasionadas por las sustancias liberadas desde las membranas estomacales¹². Se utilizaron la extracción líquido-líquido y la cromatografía en capa fina para los cuatro derivados mencionados, comparándose estos métodos mediante el test de significancia de las pendientes a través del valor F¹³. La sustancia AB₄ fue también cuantificada por medio de una espectrodensitometría, manifestando una buena correlación con los resultados obtenidos mediante el método que empleó la cromatografía en capa fina.

PARTE EXPERIMENTAL

Los tres métodos que se comparan

requieren de una etapa de separación para luego medir una señal analítica que resulta ser Absorbancia para dos de ellos y Area para el restante.

En solución de Krebs a pH 3 —previamente incubada en el lumen estomacal a 37°C durante 90 min y oxigenada por burbujeo de aire— se prepararon soluciones de BB₂, AB₄, AB₇ y AB₁₀, en concentraciones comprendidas entre 40-212 γ /ml.

Método A

Emplea una extracción líquido-líquido; para ello, en recipientes de 50 ml se agrega 1 ml de cada una de las soluciones preparadas con los derivados de la bencidrilamina, 4 ml de HOK al 20% y 7 ml de diclorometano recientemente rectificado¹⁴, solvente que permite una detección más sensible en el espectro del ultravioleta. Se logra la transferencia del soluto mediante constante agitación magnética durante un tiempo variable para cada sustancia: 20 minutos para AB₁₀, 25 minutos para AB₄ y 30 minutos para AB₇ y BB₂. Esta operación de extracción se lleva a cabo a baja temperatura —en baño de hielo— y manteniendo los recipientes cerrados, a fin de evitar concentraciones por evaporación del diclorometano.

Se dejan separar las fases, se retiran 5 ml de la solución orgánica, se anhidrizan mediante filtración a través de sulfato de sodio, se completa a 5 ml con diclorometano y se leen las absorbancias —contra un blanco sometido a las mismas condiciones— a las siguientes longitudes de onda: 234 nm para BB₂, 228 nm para AB₄ y 227 nm para AB₇ y AB₁₀, en un espectrofotómetro Beckman M 26.

Método B

Utiliza como técnica de separación el siguiente sistema de cromatografía en capa fina:

Placas: Cromatofolios de aluminio Merck de silicagel 60 F₂₅₄, lavados con

acetona rectificada¹⁵, divididos en pistas de 2 cm de ancho.

Siembras: Se efectúan mediante la utilización de un microdispensador, depositando en cada pista y en forma de bandas de 0,5 cm, 20 μ l de las soluciones de distintas concentraciones preparadas con los derivados bencidrilamínicos, reservándose una pista para el blanco del ensayo.

Solvente de corrida: Acetona rectificada.

Equilibrio: La cuba de desarrollo se satura con el solvente durante una hora.

Desarrollo: Se interrumpe una vez que el frente del solvente haya ascendido 10 cm desde el sitio de siembra.

Revelado: Se ponen de manifiesto las zonas de desplazamiento exponiendo el cromatofolio bajo la luz ultravioleta de 254 nm, obteniéndose un R_f de aproximadamente 0,8, en tanto que las sustancias liberadas en el lumen gástrico quedan retenidas en el sitio de siembra.

Una vez localizadas las zonas de desplazamiento se las circunscribe a un área de 1,3 x 2 cm y se extraen las sustancias por elución; para esto se separan las áreas del folio cortándolas cuidadosamente y trasladándolas a un frasco Borrel conteniendo 5 ml de un solvente adecuado. Para las sustancias AB₇ y AB₄ se empleó HCl 10⁻³ M y se incubaron los frascos Borrel a B.M. durante 20 minutos, agitándolos constantemente. En cambio, para las sustancias AB₁₀ y BB₂ debió emplearse diclorometano, previa pulverización del cromatofolio con HONa 0,2 N, eluyéndose a temperatura ambiente durante 60 minutos.

Los líquidos de elución se trasvasan a matraces de 5 ml, se completa el volumen y se miden las absorbancias a 234 nm para BB₂, 227 nm para AB₁₀, 229 nm para AB₄ y 231 nm para AB₇.

Método C

Emplea el mismo sistema cromatográfico detallado para el Método B, con la única modificación que se siembran 5 μ l de las soluciones. Una vez completado el desarrollo del cromatofolio, éste es examinado en sentido longitudinal mediante el uso de un espectrodensitómetro Shimadzu Dual-Wavelength TLC Scanner CS-910, utilizando como longitud de onda de referencia 350 nm y como longitud de onda de registro 230 nm; el modo de medida fue el de reflectancia, barriendo a una velocidad de 20 mm/minuto. Las áreas obtenidas con las soluciones problemas de AB₄ fueron cotejadas con soluciones de referencia preparadas en solución Krebs sin haber sido sometidas a incubación; éstas fueron planificadas de forma tal de obtener áreas similares a las observadas con las soluciones problemas.

RESULTADOS

Los valores obtenidos para cada derivado de la bencidrilamina, mediante los Métodos A y B, se ordenan en Tablas 1 a 4 y Figuras 1 a 5. Al pie de las mismas se indica el valor F, calculado con el fin de cotejar ambos métodos. Para la sustancia AB₄ se comparan gráficamente los resultados obtenidos por espectrodensitometría y por el Método B a partir de idénticas soluciones.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

- Los coeficientes de correlación obtenidos con los Métodos A y B indican una relación lineal entre la señal analítica y el rango de concentración utilizado.
- Los valores F calculados con los dos coeficientes de regresión señalan que

	Método A				Método B			
	8,00	16,00	24,00	40,00	8,16	16,48	23,36	30,16
X_i								
Y_i	0,152 0,162 0,148 0,148	0,300 0,295 0,319 0,288	0,379 0,378 0,384 0,389	0,582 0,583 0,598 0,602	0,146 0,141 0,120 0,091	0,315 0,279 0,238 0,265	0,385 0,416 0,411 0,382	0,438 0,558 0,480 0,471
$\bar{Y}_i \pm s(n-1)$	$0,300 \pm 0,013$				$0,124 \pm 0,025$			

Tabla 1. Valores de Absorbancia de BB₂ (Y_i) luego de la Extracción líquido-líquido (Método A) y de la separación cromatográfica en Capa Fina (Método B), para las distintas concentraciones expresadas en γ/ml (X_i). $\bar{Y}_i \pm s(n-1)$: valores medios de Absorbancia y desviación standard.

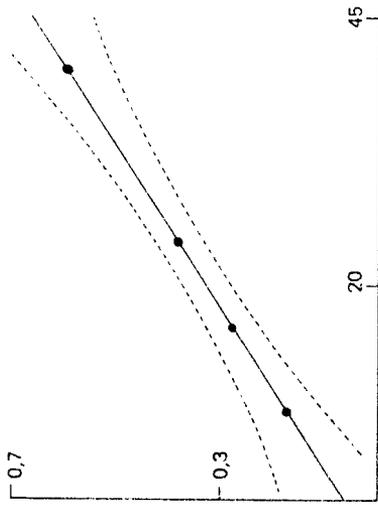


Figura 1a. Analisis de BB₂ (Extracción líquido-líquido). Ordenada: Valores promedios de Absorbancia de 4 determinaciones. Abscisa: Valores de concentración en γ/ml . El análisis estadístico rechaza la hipótesis nula de que no existe regresión o que $\beta = 0$. Recta de Regresión: $\hat{Y} = 0,0632 + 0,0133 X$; intervalos de confianza: 5% ; $r = 0,9972$.

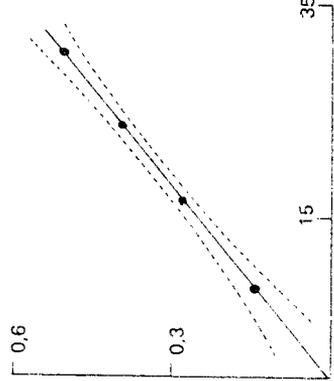


Figura 1b. Analisis de BB₂ (Cromatografía Capa Fina). Ordenada: Valores promedios de Absorbancia de 4 determinaciones. Abscisa: Valores de concentración en γ/ml . El análisis estadístico rechaza la hipótesis nula de que no existe regresión o que $\beta = 0$. Recta de Regresión: $\hat{Y} = 0,0045 + 0,0167 X$; intervalos de confianza: 5% ; $r = 0,9987$.

VALOR F = 7,02

	Método A					Método B				
	11,20	23,20	30,40	38,40	4,24	9,84	19,60	28,88		
X_i										
	0,207	0,531	0,723	0,815	0,183	0,287	0,521	0,793		
Y_i	0,250	0,563	0,689	0,922	0,178	0,271	0,503	0,835		
	0,182	0,536	0,747	0,905	0,146	0,283	0,540	0,882		
	0,217	0,545	0,780	0,853	0,170	0,316	0,478	0,714		
	0,204	0,538	0,760	0,870	0,116	0,249	0,527	0,832		
$\bar{Y}_i \pm s(n-1)$	$0,212 \pm 0,025$	$0,543 \pm 0,012$	$0,740 \pm 0,035$	$0,873 \pm 0,042$	$0,158 \pm 0,028$	$0,281 \pm 0,024$	$0,514 \pm 0,024$	$0,811 \pm 0,063$		

Tabla 2. Valores de Absorbancia de AB₄ (Y_i) luego de la Extracción líquido-líquido (Método A) y de la separación cromatográfica en Capa Fina (Método B), para las distintas concentraciones expresadas en γ/ml (X_i); $\bar{Y}_i \pm s(n-1)$: valores medios de Absorbancia y desviación standard.

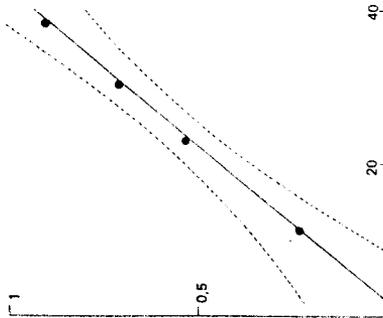


Figura 2a. Análisis de AB₄ (Extracción líquido-líquido). Ordenada: valores promedios de Absorbancia de 5 determinaciones; Abscisa: valores de concentración en γ/ml . El análisis estadístico rechaza la hipótesis nula de que no existe regresión o que $\beta = 0$. Recta de Regresión: $\hat{Y} = -0,0468 + 0,0247 X$; intervalos de confianza: 5%; $r = 0,9932$.

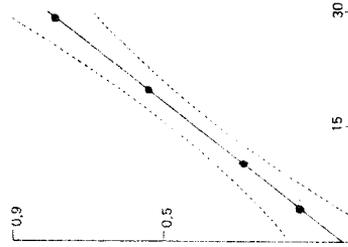


Figura 2b. Análisis de AB₄ (Cromatografía Capa Fina). Ordenada: valores promedios de Absorbancia de 5 determinaciones. Abscisa: valores de concentración en γ/ml . El análisis estadístico rechaza la hipótesis nula de que no existe regresión o que $\beta = 0$. Recta de Regresión: $\hat{Y} = 0,0294 + 0,0263 X$; intervalos de confianza: 5%; $r = 0,9950$.

VALOR F = 0.416

	Método A				Método B			
	12,00	18,37	24,00	32,80	4,80	9,76	19,68	29,20
X_i	0,258	0,382	0,505	0,694	0,094	0,248	0,612	0,916
Y_i	0,262	0,415	0,520	0,690	0,149	0,279	0,689	0,911
	0,249	0,456	0,522	0,683	0,170	0,332	0,611	0,985
	0,278	0,385	0,565	0,735	0,100	0,261	0,600	0,879
	0,271	0,480	0,509	0,719	0,118	0,272	0,575	0,900
	—	—	—	—	0,115	0,238	0,605	0,932
$\bar{Y}_i \pm s_{(n-1)}$	$0,264 \pm 0,011$	$0,414 \pm 0,047$	$0,524 \pm 0,024$	$0,704 \pm 0,022$	$0,124 \pm 0,029$	$0,272 \pm 0,033$	$0,615 \pm 0,038$	$0,920 \pm 0,036$

Tabla 3. Valores de Absorbancia de AB₇ (Y_i) luego de la Extracción líquido-líquido (Método A) y de la separación cromatográfica en Capa Fina (Método B), para las distintas concentraciones expresadas en γ/ml (X_i); $\bar{Y}_i \pm s_{(n-1)}$: valores medios de Absorbancia y desviación standard.

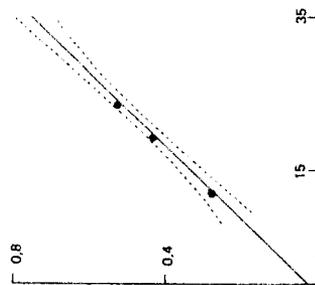


Figura 3a. Análisis de AB₇ (Extracción líquido-líquido). Ordenada: valores promedios de Absorbancia de 5 determinaciones; Abscisa: valores de concentración en γ/ml . El análisis estadístico rechaza la hipótesis nula de que no existe regresión o que $\beta = 0$. Recta de Regresión: $\hat{Y} = 0,0217 + 0,0209 X$; intervalos de confianza: 5%: $r = 0,9987$.

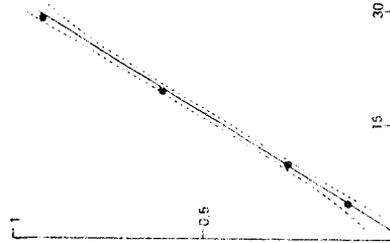


Figura 3b. Análisis de AB₇ (Cromatografía Capa Fina). Ordenada: valores promedios de Absorbancia de 6 determinaciones. Abscisa: valores de concentración en γ/ml . El análisis estadístico rechaza la hipótesis nula de que no existe regresión o que $\beta = 0$. Recta de Regresión: $\hat{Y} = -0,0395 + 0,0329 X$; intervalos de confianza: 5%: $r = 1$.

	Método A					Método B				
	X_i	10,80	19,87	27,60	33,92	42,40	12,16	22,64	29,84	34,96
Y_i	0,160	0,356	0,530	0,643	0,710	0,290	0,450	0,468	0,553	
	0,186	0,409	0,549	0,648	0,678	0,211	0,432	0,497	0,623	
	0,190	0,407	0,558	0,629	0,718	0,197	0,403	0,483	0,675	
	0,204	0,415	0,505	0,605	0,785	0,231	0,441	0,489	0,661	
	0,210	0,433	0,538	0,656	0,792	—	—	—	—	
$\bar{Y}_i \pm s_{(n-1)}$	$0,190 \pm 0,019$	$0,404 \pm 0,029$	$0,536 \pm 0,020$	$0,636 \pm 0,020$	$0,737 \pm 0,050$	$0,232 \pm 0,041$	$0,431 \pm 0,020$	$0,484 \pm 0,012$	$0,628 \pm 0,055$	

Tabla 4. Valores de Absorbancia de AB₁₀ (Y_i) luego de la Extracción líquido-líquido (Método A) y de la separación cromatográfica en Capa Fina (Método B), para las distintas concentraciones expresadas en γ/ml (X_i); $\bar{Y}_i \pm s_{(n-1)}$: valores medios de Absorbancia y desviación standard.

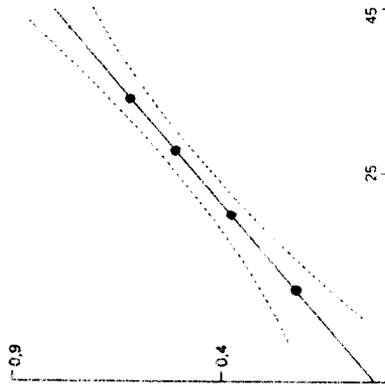


Figura 4a. Análisis de AB₁₀ (Extracción líquido-líquido). Ordenada: valores promedios de Absorbancia de 5 determinaciones; Abscisa: valores de concentración en γ/ml . El análisis estadístico rechaza la hipótesis nula de que no existe regresión o que $\beta = 0$. Recta de Regresión: $\hat{Y} = 0,0368 + 0,0172 X$; intervalos de confianza: 5%; $r = 0,9905$.

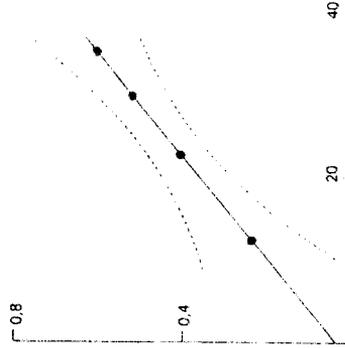


Figura 4b. Análisis de AB₁₀ (Cromatografía Capa Fina). Ordenada: valores promedios de Absorbancia de 4 determinaciones. Abscisa: valores de concentración en γ/ml . El análisis estadístico rechaza la hipótesis nula de que no existe regresión o que $\beta = 0$. Recta de Regresión: $\hat{Y} = 0,0381 + 0,0163 X$; intervalos de confianza: 5%; $r = 0,9827$.

VALOR F = 0,577

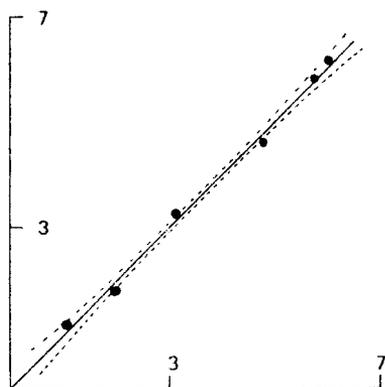


Figura 5. Representación gráfica de los valores de AB_4 expresados en mg/ml hallados por Densitometría (abscisa) y por Cromatografía en Capa Fina (ordenada). El análisis estadístico rechaza la hipótesis nula de que no existe regresión o que $\beta = 0$. Recta de regresión: $Y = 0,000479 + 1,0094 X$; intervalos de confianza: 5%; $r = 0,9982$.

no existen diferencias significativas para AB_4 , BB_2 y AB_{10} , para un nivel de probabilidad del 0,05; en cambio para el AB_7 existen diferencias altamente significativas.

- c) Puntualizamos que en el caso de la sustancia AB_7 se destaca el Método B por su mayor sensibilidad.
- d) Los parámetros estadísticos calculados con los datos ordenados en la Figura 5 señalan una correlación lineal entre las concentraciones recuperadas con cada método. El valor medio de la pendiente indica que se recupe-

ran cantidades muy próximas por ambos métodos.

- e) Considerando la amplitud del intervalo de confianza de la recta de regresión de la Figura 5, la interpolación a partir de un valor registrado mediante la espectrodensitometría muestra una buena concordancia con los valores obtenidos con el Método B. En el caso en que el valor hallado por espectrodensitometría fuera de 2,0 mg/ml corresponderían para el Método B valores de $2,02 \pm 0,162$ mg/ml, intervalo que cubre ese valor con una probabilidad del 95%, resultando aceptable para nuestro propósito.

De acuerdo a la discusión de los resultados podemos concluir que el Método B constituye una alternativa analítica válida para efectuar el seguimiento de la absorción de los cuatro derivados bencidrilamínicos, mediante la utilización de una metodología simple y de bajo costo.

AGRADECIMIENTOS. Al Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires y a COFARQUIL por financiar en parte el presente trabajo, al Laboratorio de Botánica Aplicada y al Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), por facilitarnos el uso del espectrofotómetro y del espectrodensitómetro, respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Schanker, L.S., P.A. Shore, B.B. Brodie y C.A. Hogben (1957) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 120: 528-39
2. Wiseman, G. (1961) "Methods in Medical Research" (J.H. Quastel Ed.), Chicago, pág. 287
3. Doluisio, J.T., N.F. Billups, L.W. Dittert, E.T. Sugita y J.W. Swintosky (1969) *J. Pharm. Sci.* 58: 1196-200
4. Hori, R., S. Iwakawa, J. Kagimoto, S. Okura y K. Okumura (1983) *Chem. Pharm. Bull.* 31: 3644-8

5. Suzuka, T., T. Nishihata, M. Yamazaki y A. Kamada (1985) *Chem. Pharm. Bull.* 33: 4600-5
6. Hirano, K. y C.A. Hunt (1985) *J. Pharm. Sci.* 74: 915-21
7. Sakai, K., T.M. Kutsuma, T. Nishino, Y. Fujihara y N. Yata (1986) *J. Pharm. Sci.* 75: 387-90
8. Hawkins, G.S. y W.G. Reifenrath (1986) *J. Pharm. Sci.* 75: 378-81
9. Patel, V.S. y W.G. Kramer (1986) *J. Pharm. Sci.* 75: 275-7
10. Grand, C.A., L.E. Bruno Blanch, A.G. de Vázquez, P. Lufrano y O.A.N. Baldini (1984) *Acta Farm. Bonaerense* 3: 39-45
11. Consolini, A., C.A. Grand, L.E. Bruno Blanch, P. Lufrano y O.A.N. Baldini (1985) *Acta Farm. Bonaerense* 4: 99-105
12. Volonté, M.G. (1982) *Acta Farm. Bonaerense* 1: 105-8
13. Sokal, R. y Rohlf, F. (1977) "Biometría" (H. Blume Ed.), Cap. 14, pág. 492
14. Vogel, A. (1978) "Textbook of Practical organic chemistry" (Longman Group Limited), London, pág. 267
15. Vogel, A. (1978) "Textbook of Practical organic chemistry" (Longman Group Limited), London, pág. 275