An. Real Acad. Farm. 1980, 46: 167-178

Estudio espectrofluorimétrico de la reserpilina y de sus productos de oxidación

por

M. I. MARTINEZ, B. QUINTERO, M. SANCHEZ y J. THOMAS
Departamento de Fisicoquímica Farmacéutica. Facultad de Farmacia.
Universidad de Granada

RESUMEN

Se han determinado las características espectrofotométricas y espectrofluorimétricas de la reserpilina en medio metanol-ácido clorhídrico. El estudio espectrofluorimétrico se hizo extensivo a disoluciones en otros disolventes y se comprobó la influencia de la luz. Fue valorado el efecto de distintas concentraciones de nitrito sódico y ácido clorhídrico sobre la oxidación de la reserpilina. Se llevó a cabo un estudio de la cinética formal en la oxidación de la reserpilina por luz monocromática.

SUMMARY

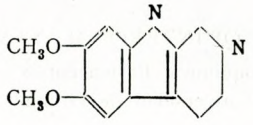
Spectrophotometric and spectrofluorimetric characteristics of reserpiline are described. Effect of light and concentrations of nitrous and clorhidric acids on the oxidation of reserpiline are discussed. Kinetic studies of photooxidation of reserpiline have been made.

INTRODUCCIÓN

La reserpilina es un alcaloide de diversas especies de Rauwolfias perteneciente al grupo de las bases indólicas que contienen un oxígeno heterocíclico.

Existen varios estudios relativos a la fluorescencia natural o a la observada después de producirse ciertas reacciones específicas para algunos alcaloides de la Rauwolfia, especialmente para la reserpina o grupo reserpina rescinamina. Es posible emplear para estos alcaloides la fluorescencia directa para su determinación (1) para disoluciones de no muy baja concentración, ya que la intensidad de emisión no es muy alta. En general, sin embargo, se recurre a determinadas reacciones químicas que producen sustancias fluorogénicas de intensidades de fluorescencia muy superiores. Una de las reacciones más importantes empleadas para este fin, es la oxidación de la reserpina con el ácido nitroso. Este método fue introducido

por Szalkowski y Mader (2). El procedimiento fue posteriormente modificado por Banes y otros (3) (4) (5) y aprobado como el método oficial (6) en EE. UU. para determinaciones de reserpina en preparaciones farmacéuticas. Haycock y col. (7) hacen un estudio cinético de esta reacción que parece ser específica (8) de los alcaloides que poseen en su molécula la agrupación: 2,3,4,9-tetrahidro-7-metoxi-1 H-pirido [3,4-6] indol:



Además del ácido nitroso, se han empleado otros agentes como tetracetato de plomo (9) y pentóxido de vanadio (10).

Una reacción de gran importancia es la transformación fotoquímica de la reserpina estudiada por Ljungberg (11) y por Wright y Tang (9).

Recientemente se ha estudiado en nuestro Departamento las propiedades fluorescentes naturales y las observadas después de su tratamiento con ácido nitroso, así como la cinética de esta última reacción para la rescinamina (12).

El hecho de que la reserpilina tenga la agrupación estructural citada anteriormente propia de la reserpina y rescinamida, nos ha hecho pensar que los métodos citados pueden ser también aplicables a ella.

En el presente trabajo se hace, en primer lugar, un estudio espectrofluorimétrico de la reserpilina en cuatro disolventes: metanol, etanol, cloroformo y disolución al 50 por 100 de metanol-ácido clorhídrico 0,1 N. En segundo término, se estudia la reacción de oxidación de la reserpilina con el ácido nitroso en sus disoluciones de metanol-ácido clorhídrico, discutiéndose la influencia de las concentraciones del ácido nitroso y del ácido clorhídrico. Finalmente, se aborda el estudio cinético de la reacción fotoquímica de la reserpilina en disolución clorofórmica. El trabajo experimental se inicia con un estudio espectrofotométrico de la disolución de reserpilina en la mezcla de metanol-ácido clorhídrico.

Parte experimental y resultados

Instrumentación y reactivos

Los espectros UV se registraron en un Beckman DB-GT y las medidas puntuales espectrofotométricas se efectuaron en un Beckman DU-2. Las medidas de fluorescencia se han realizado en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer MPF-3 L.

El clorhidrato de reserpilina utilizado es de un alto grado de pureza (*). El metanol, etanol, cloroformo, ácido clorhídrico y nitrito sódico fueron de grado reactivo de pureza.

Espectrofotometría

Se ha registrado el espectro de absorción UV de la reserpilina $5{,}0 \cdot 10^{-4}$ M en disolución metanol-ácido clorhídrico 0,1 M (al 50 por 100). Mediante pruebas previas se encontró que la reserpilina se descompone lentamente por la acción de la luz y de oxidantes; para evitar esta influencia se evacuó el aire mediante el paso de nitrógeno y se protegió el matraz con papel negro durante el período de agitación necesario para la disolución completa de la reserpilina en este disolvente.

La sustancia presenta dos máximos de absorción a 296 nm y a 306 nm. Se han determinado los coeficientes de extinción molar a las dos longitudes de onda citadas, mediante la medida de las absorbancias a diferentes concentraciones. Los resultados son de 10.140 y 9.580 M^{-1} cm^{-1}.

Espectrofluorimetría

Se han estudiado las características espectrofluorimétricas de la reserpilina en los cuatro disolventes: metanol-ácido clorhídrico 0,1 N al 50 por 100, cloroformo, metanol y etanol. En primer lugar se trabajó extremando las condiciones para evitar la acción de la luz y del oxígeno atmosférico. Las pesadas se efectuaron en la oscuridad y la agitación, durante el proceso de disolución, se realizó protegiendo el matraz con papel negro. Además se pasó una corriente de nitrógeno a la disolución para expulsar el aire. En segundo término las disoluciones de reserpilina en los cuatro medios citados se dejaron durante una hora a la luz natural y a continuación se registraron los correspondientes espectros. En todos los casos, los espectros de excitación y de emisión son espectros no corregidos. Se operó con una concentración de reserpilina. $5 \cdot 10^{-4}$ M. En las tablas I y II se recopilan los máximos principales de excitación y de emisión en las condiciones citadas de ausencia de luz y de oxígeno atmosférico y después de una exposición de una hora a la acción de la luz.

Se ha observado que el máximo de fluorescencia obtenido después de la exposición a la luz aumenta con el tiempo de la citada

(*) El clorhidrato de reserpilina nos fue suministrado por C. H. Boehringer Sohn Ingelheim S. A. E. Les expresamos nuestro agradecimiento.

exposición, sin que por ello resulte afectado el máximo de 328 nm correspondiente a la fluorescencia en ausencia de luz.

TABLA I

Máximos de fluorescencia y de excitación de la reserpilina $5 \cdot 10^{-4}$ M en metanol-ácido clorhídrico 0,1 N al 50 por 100, cloroformo, metanol y etanol, en ausencia de luz y oxígeno

Disolvente	Máximo (nm)	
	Fluorescencia	Excitación
Metanol + disolución ácido clorhídrico	296 306 316 328	260 302
Cloroformo	328	284
Metanol	328	282 316
Etanol	328	284 316

TABLA II

Máximos de fluorescencia y de excitación de la reserpilina $5 \cdot 10^{-4}$ M en metanol-ácido clorhídrico 0,1 N al 50 por 100, cloroformo, metanol y etanol, después de una exposición a la luz natural durante una hora

Disolvente	Máximo (nm)	
	Fluorescencia	Excitación
Metanol + disolución ácido clorhídrico	480	398
Cloroformo	466	398
Metanol	474	398
Etanol	470	398

Se han comparado las intensidades de fluorescencia de la reserpilina en los cuatro medios citados correspondientes al máximo de 328 nm obtenido en ausencia de luz, y del máximo registrado tras una exposición de una hora a la luz, operando con las mismas rendijas de excitación y de emisión y a igualdad de sensibilidad. Los resultados se indican en las tablas III y IV.

TABLA III

Intensidades de fluorescencia para disoluciones de reserpilina en los disolventes empleados en ausencia de luz

Disolvente	ex (nm)	em (nm)	Intensidad de fluorescencia
Metanol + disol. de ac. clorhídricco ..	300	328	20
	260	328	5
Cloroformo.....	284	328	2
Metanol.....	284	328	41
Etanol.....	284	328	33

TABLA IV

Intensidades de fluorescencia para disoluciones de reserpilina en los disolventes empleados, después de una exposición a la luz natural durante una hora

Disolvente	ex (nm)	em (nm)	Intensidad de fluorescencia
Metanol + disol. de ac. clorhídrico ...	400	480	5
Cloroformo.....	400	466	16
Metanol.....	400	474	10
Etanol..... ...	400	470	15

Se han efectuado pruebas cromatográficas de las disoluciones de reserpilina en cloroformo utilizando como soporte silicagel G y como

fase móvil cloroformo-metanol (4:1). La disolución preparada con las precauciones indicadas de ausencia de luz y oxígeno dio una sola mancha con un Rf de 0,77. En cambio, las disoluciones que estuvieron expuestas a la luz dieron dos manchas, una con Rf de 0,77 y otra, menos intensa, de 0,14.

Oxidación de la reserpilina con el ácido nitroso

La acción oxidante del ácido nitroso se ha estudiado en disoluciones de reserpilina en metanol-ácido clorhídrico. La adición de disoluciones de nitrito sódico y ácido clorhídrico ocasiona la aparición de una banda de fluorescencia a 514-516 nm, y de un máximo de excitación a 396 nm. Se observó que las intensidades de ambos máximos aumentan con el tiempo.

Influencia de la concentración del nitrito sódico

La concentración de reserpilina se mantiene siempre constante en $2 \cdot 10^{-6}$ M y la del ácido clorhídrico fue de 0,23 M. En estas condiciones se realizaron seis pruebas en las que las concentraciones finales del nitrito sódico fueron $5{,}7 \cdot 10^{-6}$ M; $2{,}8 \cdot 10^{-5}$ M; $5{,}7 \cdot 10^{-5}$ M; $2{,}8 \cdot 10^{-4}$ M; $2{,}8 \cdot 10^{-3}$ M; $5{,}7 \cdot 10^{-3}$ M. La forma de operar fue la siguiente: se prepara una disolución de reserpilina $5 \cdot 10^{-5}$ M en el disolvente citado con las precauciones indicadas anteriormente de ausencia de luz y oxígeno. Se toma 1 ml de esta disolución y se lleva a 25 con el mismo disolvente, habiendo añadido previamente volúmenes adecuados de disoluciones de ácido clorhídrico concentrado y de nitrito sódico (al 0,01 por 100, 0,1 por 100 y 1 por 100 según los casos) para que las concentraciones finales fueran las indicadas. Las disoluciones así obtenidas se mantienen a 25° C en frascos topacio. Se toman muestras periódicas y se mide la intensidad de fluorescencia a 514 nm, para una longitud de onda de excitación de 396 nm.

En las figs. 1 y 2 se representan gráficamente los resultados.

Influencia de la concentración del ácido clorhídrico

Para estudiar la influencia de la concentración del ácido clorhídrico, se prepararon diversas disoluciones en las que siempre se mantuvo constante las concentraciones de reserpilina ($2{,}0 \cdot 10^{-6}$ M) y de nitrito sódico ($5{,}7 \cdot 10^{-5}$ M), operando a las concentraciones de ácido clorhídrico siguientes: $4{,}0 \cdot 10^{-4}$ M; $4{,}6 \cdot 10^{-3}$ M; $4{,}6 \cdot 10^{-2}$ M; $9{,}2 \cdot 10^{-2}$ M; $1{,}3 \cdot 10^{-1}$ M; $2{,}3 \cdot 10^{-1}$ M; $3{,}2 \cdot 10^{-1}$ M y $4{,}6 \cdot 10^{-1}$ M.

La forma de operar fue idéntica a la indicada anteriormente en el

estudio de la influencia de la concentración del ácido nitroso. Para las dos primeras concentraciones no se observó prácticamente fluorescencia a 514 nm, ni aumento de la misma con el tiempo. Para las seis concentraciones restantes los resultados se indican en la figura 3.

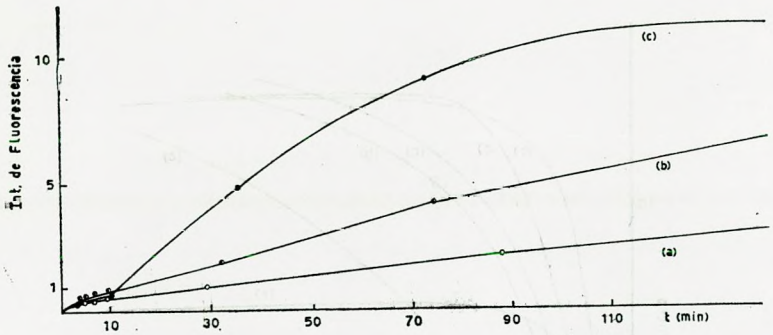


Fig. 1.—Variación de la intensidad de fluorescencia con el tiempo para concentraciones de nitrito sódico de $5{,}7.10^{-6}$ M, $2{,}8.10^{-5}$ M, y $5{,}7.10^{-5}$ M, curvas *a*, *b* y *c* respectivamente.

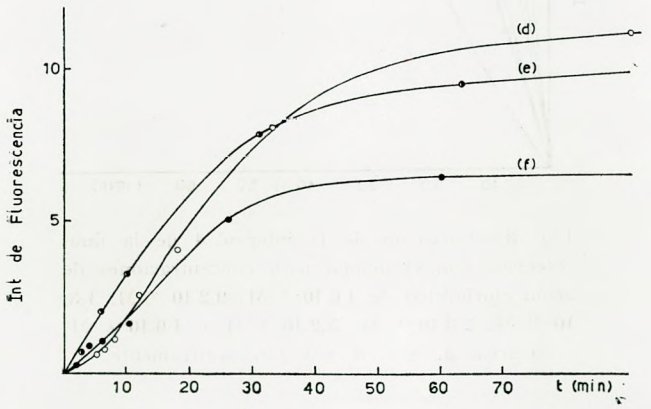


Fig. 2.—Variación de la intensidad de fluorescencia con el tiempo para concentraciones de nitrito sódico de $2{,}8.10^{-4}$ M, $2{,}8.10^{-3}$ M y $5{,}7.10^{-3}$ M, curvas *d*, *e* y *f* respectivamente.

En el estudio de la influencia del ácido nitroso y del ácido clorhídrico, se supone que la reacción ha terminado cuando la intensidad de fluorescencia es constante. En estas condiciones se han efectuado

pruebas cromatográficas en capa fina sobre silicagel G, empleando como fase móvil metanol-cloroformo (1:4) y se encuentra una sola mancha con un Rf de 0,14 que correspondería al producto de oxidación.

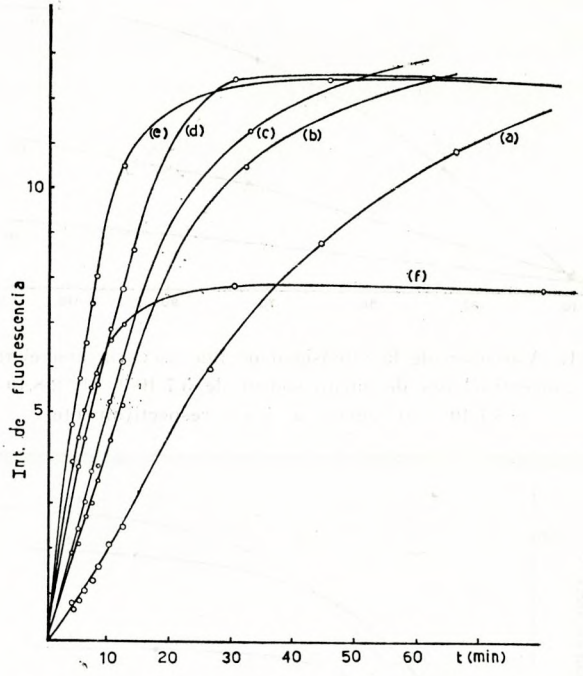


Fig. 3.—Variación de la intensidad de la fluorescencia con el tiempo para concentraciones de ácido clorhídrico de $4{,}6.10^{-2}$ M, $9{,}2.10^{-2}$ M, $1{,}3.10^{-1}$ M, $2{,}3.10^{-1}$ M, $3{,}2.10^{-1}$ M y $4{,}6.10^{-1}$ M. Curvas *a*, *b*, *c*, *d*, *e* y *f* respectivamente.

Fotooxidación de la reserpilina

Se ha estudiado la fotoreacción de disoluciones de reserpilina en cloroformo. Como fuente de irradiación se empleó la lámpara del espectrofluorímetro. Se trata de una lámpara de Xenon de alta presión OSRAM, X 30 150 w/1.

La disolución de reserpilina en cloroformo, se coloca en la cubeta que se mantiene cerrada durante el proceso de medida. Se irradia

continuamente a la longitud de onda seleccionada. El registrador se mantiene a una velocidad de 5 mm/min. y se fija la longitud de onda de emisión en 466 nm que, como se ha indicado previamente, corresponde al máximo de fluorescencia de la reserpilina irradiada en este medio. Así se obtiene directamente la curva de intensidad de fluorescencia en función del tiempo. Mediante ensayos previos se comprobó que la cinética de proceso podría ser de primer orden.

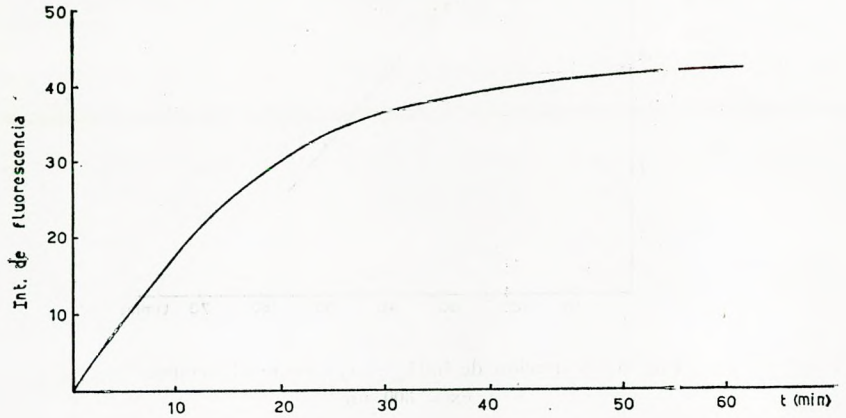


Fig. 4.—Intensidad de fluorescencia en función del tiempo, para una concentración de reserpilina $5{,}0.10^{-6}$ M. λ ex = 300 nm y λ em = 466 nm.

De entre las distintas longitudes de onda probadas, el mayor aumento de la fluorescencia con el tiempo correspondió a 290 y 300 nm, por lo que estas dos fueron las seleccionadas para la irradiación. Se hicieron, asimismo, pruebas cromatográficas en capa fina sobre silicagel G, al comienzo de la reacción, durante la misma y cuando la intensidad de fluorescencia no aumenta con el tiempo, final de la reacción. En el primer caso se obtuvo una mancha de Rf 0,77, cuando la reacción ha terminado el Rf es 0,14, y durante la reacción aparecen dos manchas a los Rf citados.

Para la longitud de onda de 300 nm, la disolución de reserpilina empleada fue de $5{,}0 \cdot 10^{-6}$ M. La temperatura de 25° C. La figura 4 indica la variación de la intensidad frente al tiempo.

Si se llama I_∞ a la intensidad de fluorescencia final, y I_t a la observada en el tiempo t, la representación gráfica de ln $(I_\infty - I_t)$ frente al tiempo se indica en la figura 5.

La recta ajustada tiene una pendiente de $-6{,}02 \cdot 10^{-2}$, una ordenada en el origen de 4,21 y coeficiente de determinación de 0,999.

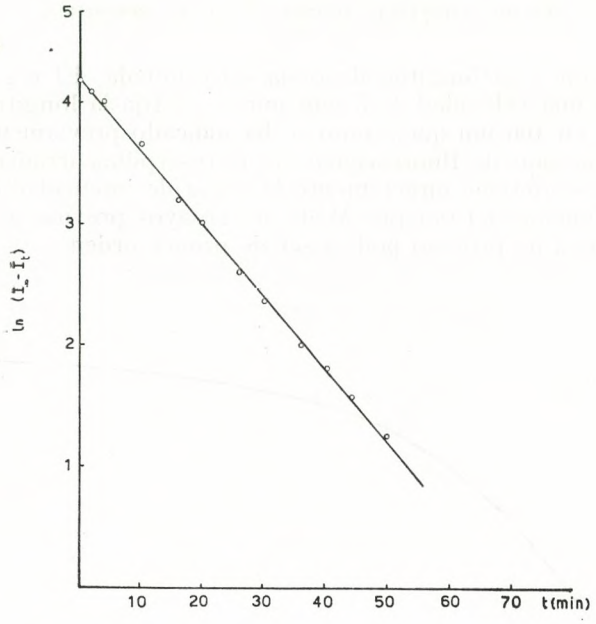


Fig. 5.—Variación de $\ln (I_\infty - I_t)$ frente al tiempo.
λ ex = 300 nm.

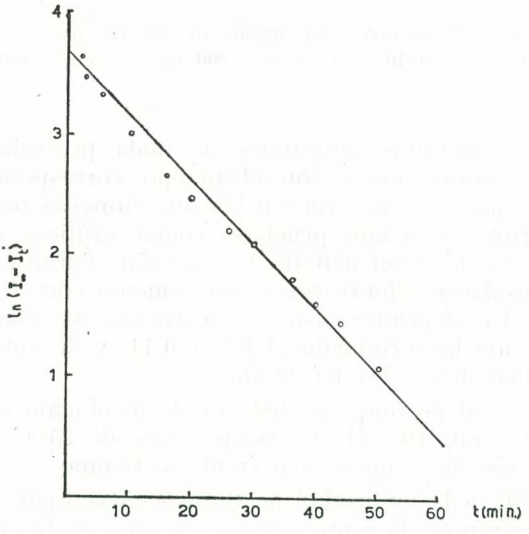


Fig. 6.—Variación de $\ln (I_\infty - I_t)$ frente al tiempo.
λ ex = 290 nm.

La constante de velocidad es, pues, de $6{,}02 \cdot 10^{-2}$ min^{-1}. Para la longitud de onda de 290 nm se utilizó una disolución $5{,}0 \cdot 10^{-5}$ M de reserpilina. La figura 6 indica la representación gráfica de ln $(I_\infty - I_t)$ frente al tiempo. La recta ajustada tiene un coeficiente de determinación de 0,892. La constante de velocidad resulta ser de $5{,}30 \cdot 10^{-2}$ min^{-1}.

Discusión

En el estudio espectrofluorimétrico se operó en primer lugar en ausencia total de luz y de oxígeno debido a la inestabilidad de la reserpilina. Los máximos de fluorescencia y de excitación de la tabla I corresponden a la reserpilina sin oxidar. En estas condiciones aparece un máximo de fluorescencia a 328 nm en todos los disolventes independientemente de su polaridad, lo cual parece indicar (13) que no existe interacción apreciable entre la molécula excitada y la molécula del disolvente. En medio clorofórmico la reserpilina presenta la mínima fluorescencia. El Rf de la reserpilina en soporte de silicagel G y empleando como fase móvil cloroforme-metanol (4 : 1) es de 0,77.

La acción de la luz sobre la reserpilina origina la aparición de un nuevo máximo de fluorescencia (tabla II), que por analogía con el efecto de la luz sobre la reserpina (9) (11) suponemos que se debe a la oxidación de la reserpilina a la 3-4 dehidroreserpilina, cuyo Rf con el mismo soporte y fase móvil es de 0,14. La acción de la luz es particularmente acusada en medio clorofórmico y mínima en el disolvente metanol ácido clorhídrico (tabla IV).

La acción oxidante del ácido nitroso, se ha efectuado en el medio metanol-ácido clorhídrico donde la fotoreacción es mínima. El ácido nitroso origina un producto cuyo Rf de 0,14 coincide con el producto originado por la acción de la luz. Suponemos que se trata también de la 3-4 dehidroreserpilina. Sin embargo, el máximo de fluorescencia se observa a 514-16 nm que supone un notable desplazamiento hacia longitudes de onda más largas, que se puede atribuir al aumento apreciable de la polaridad en este medio, pues se opera con adiciones ulteriores de ácido clorhídrico. El estudio de la influencia de las concentraciones del nitrito sódico y del ácido clorhídrico (figs. 1, 2 y 3), muestra que para las concentraciones más bajas la reacción transcurre lentamente. Para las concentraciones superiores se llega mucho antes a constancia de la fluorescencia que implica que la reacción ha terminado ; sin embargo, para la concentración mayor investigada (curva f), tiene lugar un notable descenso en la intensidad de fluorescencia, debido a los efectos amortiguantes del ácido nitroso y del ión cloruro respectivamente.

Para la concentración de reserpilina estudiada, $2{,}0 \cdot 10^{-6}$ M, los valores óptimos en la concentración, oscilan entre $2{,}8 \cdot 10^{-4}$ M a

$2{,}8 \cdot 10^{-3}$ M para el nitrito sódico y entre $2{,}3 \cdot 10^{-1}$ M a $3{,}2 \cdot 10^{-3}$ M para el ácido clorhídrico, lo cual puede ser de interés para la determinación de reserpilina mediante esta reacción.

El hecho de que la acción de la luz es particularmente acusada en cloroformo, nos indujo a estudiar la cinética formal de la reacción en este medio, que corresponde a una reacción de primer orden para el proceso global. En efecto, si a es la concentración inicial de reserpilina y x la concentración transformada en el tiempo t, concentración idéntica a la del producto formado, para una cinética de primer orden se tienen $\ln (a - x/a) = -K t$. Si admitimos que la intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración, lo cual ocurre a concentraciones bajas como en las condiciones de operación, se tendrá que I_∞ = cte. a y I_t = cte. x, por lo que $\ln (I_\infty - I_t/I_\infty) = -K t$ o bien $I_t = I_\infty (1 - e^{-Kt})$. La representación de I_t frente al tiempo será una curva exponencial que se acerca asintóticamente al valor I_∞, que corresponde con la conducta experimental (fig. 4). Por otra parte, la representación de $\ln (I_\infty - I_t)$ frente al tiempo debe dar una línea recta de pendiente $-K$. Las figuras 5 y 6 confirman que sí es cierto.

Bibliografía

(1) Haycock, R. P., Sheth, P. B. y Mader, W. J.: «J. Am. Pharm. Assoc.», 48, 479 (1959).

(2) Szalkowski, C. R. y Mader, W. J.: «J. Am. Pharm. Assoc.», 45, 613 (1956).

(3) Banes, D. y col.: «J. Am. Pharm. Assoc.», 45, 710 (1956).

(4) Banes, D., Wolff, J., Fallscheer, H. O. y Carol, J.: «J. Am. Pharm. Assoc.», 45, 708 (1956).

(5) Banes, D.: «J. Am. Pharm. Assoc.», 46, 601 (1957).

(6) «United States Pharmacopeia», 17 th rev., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1965).

(7) Haycock, R. P., Sheth, P. B., Higuchi, T., Mader, W. J. y Papariello, G. J.: «J. Pharm. Sci.», 55, 826 (1966).

(8) Haycock, R. P. y Mader, W. J.: «J. Am. Pharm. Assoc. Sci.», 46, 744 (1957).

(9) Wright, G. E. y Tang, T. Y.: «J. Pharm. Sci.», 61, 299 (1972).

(10) Urbanyi, T. y Stober, H.: «J. Pharm. Sci.», 59, 1824 (1975).

(11) Ljunberg, S.: «J. Pharm. Belg.», 14, 115 (1959).

(12) Galiana, A., Quintero, B. y Sánchez, M. (Trabajo enviado para su publicación en «J. Pharm. Sci.»).

(13) Berlman, I. B.: *Handbook of fluorescence spectra of aromatic molecules*. «Academic Press», New York (1971).