

DETERMINACION COLORIMETRICA DE DERIVADOS DE  
DIHIDROXIFENILAMINOETANOL

Por

J. VANACLOCHA, M. SANCHEZ y J. THOMAS

RESUMEN

Se describe un método colorimétrico para la determinación de derivados de dihidroxifenilaminoetanol. El método se basa en la reacción coloreada de estos derivados con la hidrazida del ácido isonicotínico en medio alcalino. Se discute la influencia de la temperatura, tiempo y pH para determinar las condiciones óptimas del procedimiento.

SUMMARY

A colorimetric method for the determination of Dihydroxyphenylaminoethanol derivatives is reported. The method is based on the colour reaction of these derivatives with isonicotinic acid hydrazide in alkaline medium. The influence of temperature, time and pH are discussed to determine the optimal conditions for the assay procedure.

RESUME

On fait la description d'une methode colorimetrique pour la determination de derives de dihydroxyphénylaminoetanol. La methode est basé sur la reaction colorée des ces derives avec l'hydrazide de l'acide isonicotinique en milieu alcalin. On discute l'influence de la temperature, le temps et le pH pour determiner les meilleures conditions du procédé.

Los derivados de hidroxifeniletilaminas tienen gran interés químico y farmacéutico desde diversos puntos de vista. En primer lugar, por la actividad simpaticomimética de muchos de ellos. Además, las aminas consideradas tienen otro efecto importante, no adrenérgico, como es la estimulación del sistema nervioso central. Finalmente, otro aspecto de interés, de este tipo de sustancias, es su capacidad de formación de compuestos

complejos tanto con iones metálicos como con compuestos moleculares. Debido a las propiedades citadas, es de gran importancia disponer de métodos analíticos para su valoración.

La mayoría de los métodos descritos para la determinación de este tipo de sustancias, se basan en la formación de diferentes compuestos debido a la reacción de las funciones fenólico y amino. Asimismo es de gran interés la determinación fluorimétrica de hidroxifenilaminas.

Entre los métodos basados en la reactividad del grupo fenólico, cabe citar los que se fundan en la valoración colorimétrica con 4-amino-antipirina mediante la formación en medio alcalino del correspondiente colorante pirazolónico, método muy usado en la determinación de estas sustancias en productos farmacéuticos (1) (2). La bromación (3), acoplamiento con sal de diazonio (4) y reacción de Millon (5). En el caso concreto de los catecoles es interesante el método colorimétrico basado en el complejo formado por la sustancia activa y el Fe(II) (6) (7) (8).

La valoración del grupo amino ha dado lugar a diferentes métodos, tales como la reacción del disulfuro de carbono con las aminas secundarias para la formación de ácidos ditiocarbámicos, seguida de la reacción con Cu(II) para la formación de un complejo (9) (10) (11). Otros métodos se basan en la extracción de la amina de su fase acuosa con ácido dietilhexilfosfórico con formación de un par iónico (12) (13). En la formación de los respectivos tetrafenilboratos (14) y en la valoración amperométrica por titulación con tetrafenilbórico (15) (16) (17).

La determinación fluorimétrica de hidroxifenilaminas se ha descrito en numerosos trabajos (18) (19) (20) (21) (22) (23). Para derivados dihidroxilados el método implica la oxidación, seguida de la formación en medio alcalino de los correspondientes derivados lutinicos que son fluorescentes en el visible. Se han propuesto, además, otros métodos fluorimétricos directos (24) (25) (26) (27) (28).

Hashmi y otros (29), han indicado que el catecol en medio alcalino da una reacción coloreada con la hidrazida del ácido isonicotínico, y han empleado dicha reacción para la determinación de la citada hidrazida. Maggi y Cometti (30) aplicaron la reacción coloreada citada para la determinación del levodopa. Tomando como base estas comunicaciones, hemos abordado en el presente trabajo la determinación del (-) -1-(3,4-dihidroxife-

nil)-2-metilaminoetanol (I) y del 1-(3,4-dihidroxifenil)-2-isopropilaminoetanol (II). Ambas sustancias, con los grupos hidróxilo en posición orto entre sí, dan con la hidrazida del ácido isonicotínico, un color amarillo rojizo que obedece la ley de Beer. Se discute la influencia de la temperatura, del pH del tiempo y de la concentración de la hidrazida para determinar las condiciones óptimas de la citada determinación.

## PARTE EXPERIMENTAL

### *Aparatos*

Los espectros de absorción se registraron en un espectrofotómetro Beckman DGBT. Las medidas puntuales de absorbancias se hicieron en un espectrofotómetro Beckman DU-2. El pH se midió en un pH Meter-6, Radiometer.

### *Reactivos*

Todos los reactivos usados fueron de alto grado de pureza, como se comprobó mediante determinación de constantes fisicoquímicas<sup>1</sup>.

Se partió de disoluciones de (I) y de sulfato de (II) de 500 mg/l. El disolvente fue ácido clorhídrico 0,1 N. Para la hidrazida del ácido isonicotínico se preparó una disolución acuosa al 0,1%. Asimismo se emplearon disoluciones de hidróxido sódico 0,150 N.

### *Espectro de absorción*

La figura 1 presenta las curvas de absorción de los reactivos y de la reacción coloreada en las mismas condiciones de medio básico. La curva A corresponde a la absorción de (I), la B a la de la hidrazida del ácido isonicotínico y la C a la del producto de reacción A + B. Análogamente, la curva D corresponde a (II) y la E a la reacción D + B. Se observa que el producto de reacción presenta en ambos casos una absorción en un in-

1 Las catecolaminas nos fueron suministradas por C. H. Boeringer Sohn Ingelheim S.A.E. Les expresamos nuestro agradecimiento.

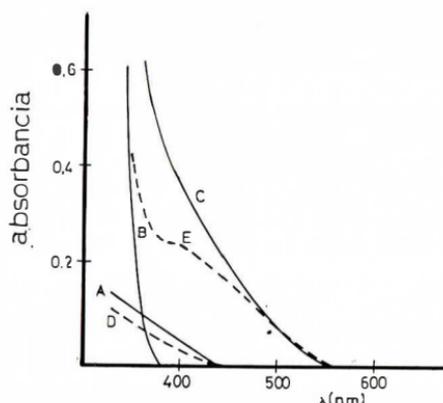


Fig. 1.—Espectro de absorción de los compuestos puros y de los productos de la reacción

tervalo de 420 a 550 nm en el cual no absorben los reactivos puros, si bien no aparece un máximo en las curvas correspondientes (C y E), debido a que el color tiene lugar cerca del ultravioleta donde tanto los reactivos puros como los productos de reacción absorben fuertemente. Todas las medidas posteriores se efectuaron a 440 nm.

## RESULTADOS Y DISCUSION

La formación de color está fuertemente afectada por la temperatura, el tiempo, el pH y por la concentración de la hidrazida. El intervalo de las concentraciones en las dihidroxifenilaminas estudiado fue de 10 a 50 mg/l.

### *Influencia de la temperatura*

Operando al pH apropiado de 10,5, como posteriormente se comprobará, se encontró que para temperatura ambiente la formación del color transcurre muy lentamente. Hacia los 30°C la reacción transcurre ya a velocidad apreciablemente mayor. En todas las experiencias la reacción se efectuó a una temperatura de 35°C, que se mantuvo constante en un termostato, con una precisión de  $\pm 0,5^\circ\text{C}$ .

### *Influencia del tiempo*

Para ver la influencia del tiempo se han elegido las concentraciones de 15 y de 50 mg/l de las dihidroxifenilaminas.

En la figura 2 se presenta la influencia del tiempo operando a 35°C y al pH apropiado de 10,5.

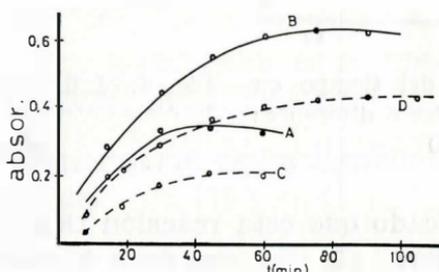


Fig. 2.—Influencia del tiempo en la formación del color. I (—); II (— —)

Las curvas de trazo continuo se refieren a (I). La curva A corresponde a una concentración de 15 mg/l y la B a 50 mg/l. Las curvas de trazo discontinuo corresponden a las mismas concentraciones de 15 mg/l (curva C) y de 50 mg/l (curva D). Se observa que para bajas concentraciones se alcanza la máxima absorbancia a tiempos menores. A partir de 50 a 60 minutos la absorbancia se mantiene prácticamente constante, si bien existe una ligera tendencia a disminuir para tiempos apreciablemente mayores. A la vista de estos resultados se eligió como tiempo de operación 60 minutos.

### *Influencia del pH*

La influencia del pH se indica en la figura 3 para (I) y en la figura 4 para (II) donde se presentan absorbancias frente a tiempos en minutos a tres pH, 9,0, 10,5 y 11,3 para (I) y 9,8, 10,5 y 11,3 para (II). La concentración de las dihidroxifenilaminas fue de 15 mg/l.

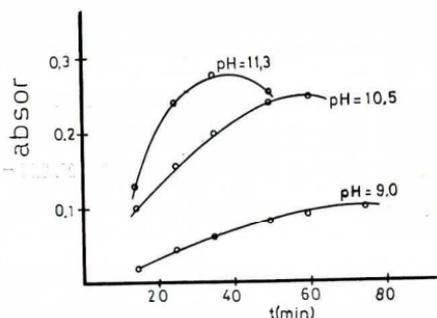


Fig. 3.—Influencia del tiempo en la formación del color a diferentes pH (I)

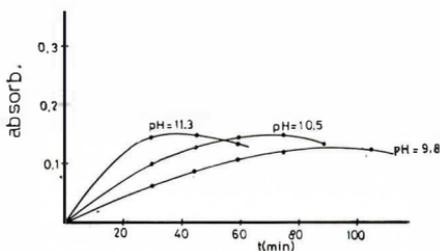


Fig. 4.—Influencia del tiempo en la formación del color a diferentes pH (II)

Ya se ha indicado que esta reacción tiene lugar solamente en medio básico. Para pH menores de 9, la reacción transcurre muy lentamente, apenas se observa el color. A pH superiores a 11, se alcanza con relativa rapidez un color máximo en la absorbancia, pero este valor decrece rápidamente con el tiempo, es decir, el color no es estable. A pH del orden de 10,5, en cambio, se consiguen valores de absorbancias prácticamente iguales que a pH superiores, con la ventaja de que las absorbancias se mantienen más constantes en intervalos de tiempo mayores, aunque también se observa una tendencia a decrecer para tiempos más altos. De acuerdo con lo dicho, el pH óptimo de operación es de 10,5.

#### *Influencia de la concentración de la hidrazida del ácido isonicotínico*

Para el intervalo de las concentraciones de las dihidroxi-fenilaminas indicado de 10 a 50 mg/ml, se ha estudiado la influencia de la concentración de la hidrazida del ácido isonicotínico. En la figura 5 se presentan las absorbancias frente a la concentración en % de la hidrazida para una concentración de 15 mg/l de (I). Se observa que para concentraciones inferiores al 0,05% de la hidrazida las absorbancias son pequeñas. En cambio, para concentraciones comprendidas entre 0,05 y 0,7 % las absorbancias se mantienen prácticamente constantes, aunque se presenta un ligero máximo a la concentración de 0,1%. Resultados análogos se obtienen para (II). De acuerdo

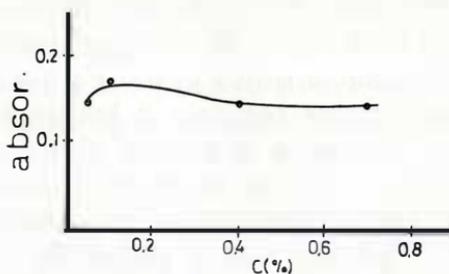


Fig.  
tración de la hidrazida para (I)

con lo dicho anteriormente se ha elegido la concentración de 0,1% de la hidrazida.

#### PROCEDIMIENTO

Teniendo en cuenta los anteriores resultados, el procedimiento que proponemos es el siguiente: Se preparan cinco disoluciones de las dihidroxifenilaminas de 10, 20, 30, 40 y 50 mg/l en ácido clorhídrico 0,01N. De cada una de ellas se toman 10 ml y se le añaden 10 ml de disolución acuosa de la hidrazida del ácido isonicotínico al 0,1%, 20 ml de agua destilada y un ml de hidróxido sódico 0,150N. Se agita la mezcla así formada y se mantiene durante 50 minutos en un termostato a 35°C. A continuación se deja a temperatura ambiente durante 10 minutos y se mide la absorbancia a 440 nm, frente a un blanco preparado de la misma manera. Las figuras 6 y 7 presentan las curvas de calibrado obtenidas para (I) y (II), respectivamente.

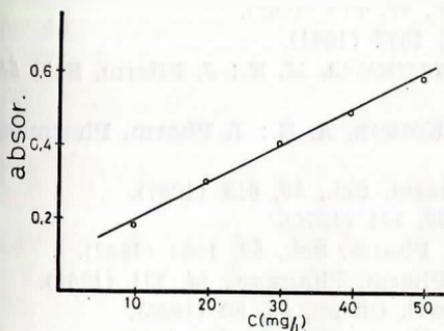


Fig. 6.—Curva

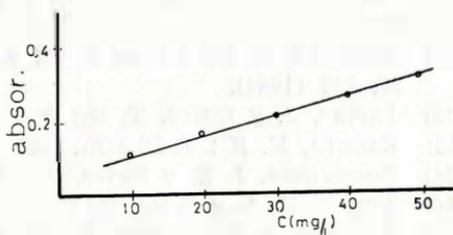


Fig. 7.—Curva de calibrado (I)

Se hicieron ensayos para muestras de concentraciones intermedias respecto a la curva de calibrado obteniéndose resultados reproductibles con un alto grado de precisión. Para concentraciones altas o bajas respecto a las de la curva de calibrado, los errores relativos máximos encontrados fueron de  $\pm 2\%$ . Creemos que el método es suficientemente preciso siempre que se sigan escrupulosamente las condiciones indicadas. Finalmente estimamos un límite visual de identificación del orden de 1 mg/l.

El mecanismo de la reacción no está claro, suponemos que se forma un compuesto complejo a través de los nitrógenos de la hidrazida con los grupos fenólicos de las dihidroxifenilaminas mediante unión por puente de hidrógeno. Se hicieron pruebas consistentes en la determinación del compuesto empleando el método de valoraciones continuas, pero sin resultados concluyentes. El método de la razón de moles tampoco dió resultados debido a que creemos que el presunto complejo debe tener una constante de formación muy baja.

#### BIBLIOGRAFIA

- (1) HISKEY, C. F. y LEVIN, N.: *J. Pharm. Sci.*, 50, 393 (1961).
- (2) KOSHY, K. T. y HITCHNER, H.: *J. Pharm. Sci.*, 52, 802 (1963).
- (3) "United States Pharmacopeia", 26 th rev., Mack Publishing Co. Saston, Pa., 1960, p. 530.
- (4) AUERBACH, M. E.: *J. Pharm. Sci.*, 39, 50 (1950).
- (5) KELLY, C. A. y AUERBACH, M. E.: *J. Pharm. Sci.*, 50, 490 (1961).
- (6) DOTY, J. R.: *Anal. Chem.*, 20, 1166 (1948).
- (7) "United States Pharmacopeia", 16 th rev., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1960, p. 895.
- (8) TUCKERMAN, M. M.: *J. Pharm. Sci.*, 51, 700 (1962).
- (9) UMBREIT, G. R.: *Anal. Chem.*, 33, 1572 (1961).
- (10) PHILLIPS, B. M., KRAUS, P. J. y STRATMAYER, M. E.: *J. Pharm. Sci.*, 54, 803 (1965).
- (11) KARAWYA, H. S., WAHBA, S. K. y KOZMAN, A. R.: *J. Pharm. Pharmac.*, 19, 332 (1967).
- (12) LEVINE, J. y DOYLE, T. D.: *J. Pharm. Sci.*, 56, 619 (1967).
- (13) KAISTHA, K. K.: *J. Pharm. Sci.*, 59, 241 (1970).
- (14) SINSHEIMER, J. E. y SMITH, E.: *J. Pharm. Sci.*, 52, 1080 (1963).
- (15) JOHSON, C. A. y KING, R. E.: *J. Pharm. Pharmac.*, 14, 771 (1962).
- (16) SMITH, E. y SINSHEIMER, J. E.: *Anal. Chem.*, 35, 58 (1965).
- (17) SINSHEIMER, J. E. y HONG, D.: *J. Pharm. Sci.*, 54, 805 (1965).
- (18) Von EULER, V. S. y LISHAJKO, F.: *Acta Physiol. Scand.*, 45, 122 (1959).
- (19) ANTON, S. y SAYRE, D. F.: *J. Pharmacol.*, 138, 360 (1962).

- (20) MERRILLS, R. J.: *Nature*, 193, 988 (1962); *Anal. Biochem.*, 6, 272 (1965).
- (21) VOCHTEN, R. F. C., HOSTE, J. DELAUNOIS, y SCHAEPPDRYVER, A. F.: *Anal. Chim. Acta*, 40, 443 (1968).
- (22) CHIN, L., PICCHIONI, A. L. y CHILS, R. F.: *J. Pharm. Sci.*, 52, 907 (1963).
- (23) PRASAD, V. K., RICCI, R. A., NUNNING, B. C. y GRANATCK, A. P.: *J. Pharm. Sci.*, 62, 1130 (1973); 62, 1135 (1973).
- (24) JAMES, T.: *J. Pharm. Sci.*, 62, 669 (1973).
- (25) MILES, C. I. y SCHEN., G. H.: *Anal. Chem.*, 45, 130 (1973).
- (26) SANCHEZ, M. y THOMAS, J.: En prensa en *Ciencia e Industria Farmacéutica*.
- (27) SANCHEZ, M.: En prensa en *Ciencia e Industria Farmacéutica*.
- (28) SANCHEZ, M., GUTIERREZ, P. y THOMAS, J.: En prensa en *Ciencia e Industria Farmacéutica*.
- (29) HASHMI, M. H., ADIL, A. S., MALIK, F. R. y AJMAL, A. I.: *Mikrochim. Acta (Wien)*, 1969, 772.
- (30) MAGGI, N. y COMETTI, A.: *J. Pharm. Sci.*, 61, 924 (1972).