

SISTEMA AUTOMÁTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO SALICÍLICO EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS COM DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA

Jorge M.P.J. Garrido*, José L.F.C. Lima, Cristina Delerue-Matos* e Vincent V.M. Meijden*

CEQUP / Departamento de Química-Física, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua Aníbal Cunha 164, 4050 Porto-Portugal

Abstract

This paper describes the determination of salicylic acid in pharmaceutical preparations by flow injection analysis (FIA) using amperometric detection. The developed system allows the direct determination of the specie on aqueous solution after simple dilution of the formulations in phosphate buffer at pH 7.

The determination of salicylic acid in pharmaceutical preparations were carried out in a single channel FIA manifold, giving recoveries between 99 and 103% with a sampling rates of 150 samples/h.

Key words: Salicylic acid, Flow Injection Analysis, Pharmaceutical preparations, Amperometric detection

Introdução experimental

A reacção de degradação dominante do ácido acetilsalicílico (AAS), a vulgar aspirina, é a hidrólise resultando ácido salicílico (AS) e ácido acético [1]. Estudos recentes mostraram que sob certas condições podem-se formar um grande número de outros produtos [2]. No entanto, o ácido salicílico continua a ser um bom indicador da extensão da degradação da aspirina na avaliação da estabilidade de produtos farmacêuticos além de ser o único composto cuja quantidade é limitada especificamente, nos comprimidos contendo AAS, pela Farmacopeia Portuguesa [3].

Vários métodos têm sido desenvolvidos para a determinação de AS em formulações farmacêuticas que contêm AAS, nomeadamente a colorimetria [4], a cromatografia gasosa [5], a cromatografia líquida de alta pressão [6] e a voltametria [7]. Encontra-se ainda descrito na literatura um trabalho baseado num sistema FIA de elevada complexidade, envolvendo uma derivatização prévia seguida de detecção amperométrica [8].

* Endereço Permanente: Instituto Superior de Engenharia do Porto, Rua S. Tomé, 4200 Porto

Esta situação justificou que se tivesse desenvolvido um sistema FIA, com detecção amperométrica, simples, de fácil operação e que possibilite a obtenção de elevados ritmos de amostragem. O sistema foi utilizado na determinação de AS em formulações farmacêuticas contendo AAS existentes no mercado Português, não sofrendo as amostras qualquer pré-tratamento além da dissolução num electrólito adequado.

Não existindo um método de referência para a determinação do AS em formulações farmacêuticas, optou-se por fazer a comparação dos resultados obtidos no sistema desenvolvido com os provenientes da determinação por voltametria de onda quadrada já descrita na literatura [7].

Parte experimental

Instrumentos e eléctrodos

O sistema FIA desenvolvido (Fig. 1) é constituído por uma bomba peristáltica da marca Ismatec, modelo Mini S-840, uma válvula de injeção de 6 portas Rheodyne 5020 e por um detector electroquímico da marca Metrohm com uma célula de jacto impungente Metrohm 656, constituída por três eléctrodos da mesma marca. Os eléctrodos de trabalho e auxiliar eram de carbono vítreo e o eléctrodo de referência de AgCl/Ag (KCl 3M). Para ligar entre si os diferentes componentes da montagem FIA, usaram-se tubos de teflon da marca Omnifit de diâmetro interno 0,8 mm. Para registo dos sinais analíticos, foi utilizado um registor da marca Kipp & Zonnen, modelo BD 112.

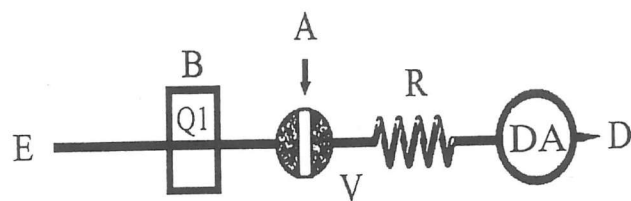


Figura 1- Sistema FIA para a determinação de ácido salicílico em preparações farmacêuticas. E- electrólito (tampão fosfato pH 7); B- bomba peristáltica; Q1- caudal (2,4 mL/min); A- amostra; V- válvula rotatória de 6 vias; R- reactor (30 cm); DA- detector amperométrico; D- dreno.

As determinações por voltametria de onda quadrada, usadas como método de comparação, foram efectuadas num sistema voltamétrico da marca Ecochimie/Autolab com potenciostato PSTAT 10 ligado a um sistema de eléctrodos da marca Metrohm, modelo 663 VA, constituído

por dois eléctrodos de carbono vítreo, como eléctrodos de trabalho e auxiliar, e um de AgCl/Ag (KCl 3M), como eléctrodo referência.

Reagentes e soluções

Foram utilizados reagentes de qualidade p.a ou semelhante sem terem sido sujeitos a qualquer purificação adicional. Na preparação das soluções foi utilizada água de elevada pureza (condutividade < 0,1 μ S/cm).

O tampão fosfato pH igual a 7 unidades foi preparado por dissolução das quantidades apropriadas de KH_2PO_4 e K_2HPO_4 (Riedel). Esta solução foi utilizada como transportador no sistema FIA e como electrólito suporte nas determinações realizadas por métodos discretos.

As soluções padrão de AS (Riedel), preparadas no electrólito suporte, foram obtidas por diluições sucessivas a partir de uma solução preparada por dissolução de uma massa rigorosa de AS.

Preparação da amostra

As amostras analisadas, em todas as determinações, foram preparadas pulverizando 5 comprimidos de cada formulação farmacêutica e dissolvendo, em seguida, uma quantidade apropriada na solução de electrólito suporte tampão pH 7. Para facilitar a solubilização, usou-se um banho ultrassónico durante 5 minutos.

Resultados e sua discussão

A optimização do sistema FIA foi efectuada com o objectivo de obter o máximo de frequência de amostragem e reprodutibilidade. Os parâmetros estudados foram o potencial aplicado, o caudal de entrada no detector e o volume de injeção.

Relativamente ao potencial aplicado, verificou-se que a amplitude do sinal analítico aumentava com o potencial até atingir o máximo a 1,4 V, a partir do qual se mantinha praticamente constante, pelo que este valor foi seleccionado como potencial de trabalho.

Para o caudal de entrada no detector, verificou-se que fluxos superiores a 2,4 mL/min provocavam sobrepressões na célula que prejudicavam a reprodutibilidade dos sinais analíticos. Como caudais inferiores comprometiam a frequência de amostragem, utilizou-se um caudal de 2,4 mL/min.

Outro parâmetro optimizado foi o volume de injeção. Verificou-se que variando o comprimento do "loop" entre 7 e 17 cm se obtinha uma boa reprodutibilidade e que esta se mantinha praticamente constante neste intervalo. Em contrapartida, o aumento do comprimento do "loop"

provocava uma diminuição do ritmo de amostragem, pelo que se utilizou um "loop" de 7 cm a que corresponde um volume de injeção de cerca de 80 μL , seguindo de perto processos descritos anteriormente [9].

Nestas condições, traçou-se a curva de calibração recorrendo à injeção em triplicado de padrões de ácido salicílico com concentrações no intervalo compreendido entre 1×10^{-5} e 5×10^{-5} M. Obtiveram-se sempre relações lineares entre a intensidade de corrente de pico e as concentrações ($r^2 = 0,9994$, $n = 5$). Na Fig. 2 apresenta-se um fiagrama, correspondente à injeção em triplicado de 5 padrões e 4 amostras, obtido na determinação de ácido salicílico em formulações farmacêuticas.

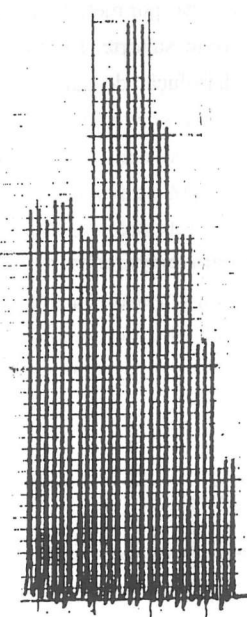


Figura 2- Fiagrama obtido na determinação de ácido salicílico em preparações farmacêuticas. O registro corresponde à injeção em triplicado de 5 padrões, com concentrações compreendidas entre 1 e 5×10^{-3} M, e de 4 amostras.

A avaliação da qualidade da montagem desenvolvida foi efectuada comparando os resultados obtidos por FIA (CF) e pelo método voltamétrico de comparação (CV) para 7 formulações farmacêuticas sendo o desvio relativo (DR%) na generalidade inferior a 5% (Tabela 1). Estabeleceu-se a relação $CF = -8,11 \times 10^{-3} + 0,997 CV$ e atendendo aos parâmetros da recta verificou-se existir uma boa concordância entre as duas metodologias ($r^2 = 0,998$). Determinaram-se ainda, os índices de recuperação para cada amostra, tendo-se verificado que estes variavam entre 99 e 103%.

Para avaliar a reprodutibilidade dos resultados obtidos pelo sistema FIA, efectuaram-se 20 injeções repetidas da mesma amostra, tendo-se obtido sempre coeficientes de variação inferiores a 1%.

Com o sistema FIA desenvolvido, o limite de detecção (3σ) [10] obtido foi de 1×10^{-6} M sendo o ritmo de amostragem de cerca de 150 amostras/h.

Tabela 1- Resultados obtidos na determinação de AS em preparações farmacêuticas comerciais usando um sistema FIA com detecção amperométrica e voltametria de onda quadrada.

Amostra [†]	% AS / AAS FIA [‡]	% AS / AAS Voltametria	DR %	Recuperação %
A	$1,75 \pm 0,05$	1,76	- 0,6	103,5
B	$1,67 \pm 0,25$	1,66	+ 0,6	101,7
C	$1,49 \pm 0,08$	1,57	- 5,1	99,8
D	$4,08 \pm 0,26$	4,14	- 1,4	100,5
E	$3,42 \pm 0,48$	3,47	- 1,4	100,0
F	$3,29 \pm 0,57$	3,24	+ 1,5	99,1
G	$2,65 \pm 0,04$	2,62	+ 1,1	101,8

[†] Preparações farmacêuticas disponíveis no mercado Português;

[‡] Média e desvio padrão de 3 determinações da mesma amostra.

Conclusões

O sistema FIA desenvolvido permite a determinação de AS em formulações farmacêuticas sem recurso a pré-tratamento prévio além da dissolução num electrólito adequado. Com este sistema obteve-se um ritmo de amostragem de cerca de 150 amostras/h, sendo os índices de recuperação próximos de 100%.

O sistema proposto é simples e fácil de operar o que o torna particularmente útil em análises de rotina.

Agradecimentos

Os autores agradecem o financiamento obtido através do Programa Praxis XXI (2/2.1/SAU/1190/95). Um de nós (V.V.M.M.) agradece ao Programa Erasmus o financiamento do estágio no ISEP.

Referências

- [1]- C.A. Kelley, *J. Pharm. Sci.*, 59 (1970), 1053,
- [2]- V.Y. Taguchi, M.L. Cotton, C.H. Yates e J.F. Millar, *J. Pharm. Sci.*, 70 (1981), 64;
- [3]- Farmacopeia Portuguesa, V Edição, Imprensa Nacional Casa da Moeda, 1986;
- [4]- U. Sahe e K. Baksi, *Analyst*, 110 (1985), 739;
- [5]- R.N. Galante, J.C.E. Goville, A.J. Visalli e D.M. Patel, *J. Pharm. Sci.*, 70 (1981), 167;
- [6]- D.R. Heidemann, E.S. Schulenberg e W.H. Smith, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70 (1987), 964;
- [7]- Y-S Fung e S.F. Luk, *Analyst*, 114 (1989), 943;
- [8]- M. Neumayr, O. Friedrich e G. Sontag, *Anal. Chim. Acta*, 273 (1993), 469;
- [9]- J.L.F.C. Lima e A.O.S.S. Rangel, *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 24 (1990), 49;
- [10]- Analytical Methods Committee, Royal Society of Chemistry, *Analyst*, 112 (1987), 199.

DEVELOPMENT OF AN AMPEROMETRIC IMMUNOSENSOR FOR THE DETECTION OF LPS USING HORSERADISH PEROXIDASE LABELLED ANTI-RABBIT Ig-G

Coelho, C.M.F., Rebelo, M.J.F.*

CECUL - Centro de Electroquímica e Cinética da Universidade de Lisboa.
Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences of Lisbon
Rua da Escola Politécnica N° 58 1250 LISBOA - Portugal

ABSTRACT

An immunosensor based on indirect amperometric immunoassay was developed for the determination of LPS. The immunosensor employed horseradish peroxidase labelled antirabbit Ig-G. Peroxidase is a heme containing enzyme that catalyzes the oxidation of a variety of organic and inorganic compounds by hydrogen peroxide [1,2]. In this work the reaction between hydrogen peroxide and hydroquinone was catalyzed by HRP and the electrochemical reduction of the oxidised benzoquinone[3] yielded a current that was related to the concentration of LPS used.

LPS was immobilized on an IMMobilon AV membrane, incubated with anti-LPS rabbit serum and, in a second incubation step, with anti rabbit Ig-G - HRP. Capping and washing procedures were made in between, similarly to what is done in ELISA. The membranes thus prepared were applied to an US biosensor electrode base, similar to what has been used before[4]. A potential of -150mV was applied from an Amperometric Biosensor Detector and the current corresponding to the reduction of benzoquinone was recorded. Different incubation times and antibody dilutions were tested. The immunosensor was found to be sensitive to LPS and have good reproducibility.

Key Words: Immunosensor; amperometric; LPS; HRP, Hydroquinone.

INTRODUCTION

Amperometric immunosensors combine the high selectivity of antibody antigen reaction with the versatility and low detection limits of modern electrochemical techniques. They are cheaper than the alternative techniques for the detection of the analyte of interest. Besides that, they do not suffer from problems of sample turbidity, quenching and interferences from the many absorbing and fluorescing compounds that usually exist in samples and hamper spectroscopic techniques.

In this work, an amperometric immunosensor for the detection of LPS (Lipopolysaccharide) from the outer membrane of a strain of a sulphate reducing bacteria (SRB) was developed.

EXPERIMENTAL

Materials

Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaHCO₃, KCl and NaCl pro analysi, Hydroquinone zur synthese and Perhydrol, 30% H₂O₂ zur Analyse were from Merck; Na₂CO₃ was BDH, AnalaR; Ethanolamine was Fluka, purum.

Tween: Polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween-20) and bovine serum albumin BSA A-7906 were Sigma.

LPS was a gift from Prof. Ana Rosa L. Lino