

Determinación espectrofotométrica de N-(2-Mercaptopropionil) glicina (tiopronin) mediante análisis por inyección en flujo

A. Pagán Muñoz, I. López García y M. Hernández Córdoba
Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias (Químicas y Matemáticas)
Universidad de Murcia, 30001-Murcia.

Recibido: 4-3-88

Aceptado: 8-7-88

Spectrophotometric determination of N-(2-Mercaptopropionyl) glycine (tiopronin) by using flow injection analysis

Summary: A selective and rapid method for the determination of N-(2-mercaptpropionyl) glycine is described, which is based on the formation of a yellow complex at pH 10 with Ni(II). At 468 nm the calibration graph is linear over the range 30-280 $\mu\text{g/ml}$ of Tiopronin with a relative standard deviation of $\pm 0.8\%$ for 100 $\mu\text{g/ml}$ of the drug. The molar absorptivity is $300 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. The method can be successfully used with FIA purposes. The peak height is linear with Tiopronin concentration over the range 10^{-4} - $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ using a two channel manifold.

Key-words: Tiopronin determination, Spectrophotometry, Flow Injection Analysis.

INTRODUCCIÓN

La N-(2-mercaptpropionil) glicina (Tiopronin) es un compuesto usado como agente radioprotector y en el tratamiento de enfermedades hepáticas crónicas. Su estructura sugiere que puede emplearse como modelo para el comportamiento de proteínas conteniendo azufre (1-4) y que puede ser útil en la terapéutica del envenenamiento con metales pesados (5-10). Dadas, las características complejas que exhibe, responsables de buena parte de su actividad farmacológica, son diversos los estudios sobre la formación de complejos entre el tiopronin y especies metálicas (4, 11-15), si bien en la mayoría de los casos con enfoque distinto al analítico.

Se estudia en este trabajo un procedimiento analítico rápido y sencillo, de sensibilidad media, utilizable para la

determinación de Tiopronin en el control de calidad dentro de la industria farmacéutica. La técnica de Inyección en Flujo (FIA) (16,17) permite una elevada velocidad de análisis con un montaje sencillo y el empleo de un reactivo sumamente económico.

EXPERIMENTAL

Las curvas espectrales se registraron con un espectrofotómetro PYE UNICAM SP8-100.

Para el sistema de Inyección en Flujo se empleó una bomba peristáltica GILSON junto con una válvula de inyección OMNIFIT utilizando como detector un espectrofotómetro SPECTRONIC 21 (Bausch-Lomb) equipado con una célula de flujo de 18 μl (HELLMA).

PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE TIOPRONIN

Manual:

En matraces aforados de 25 ml coloque 5 ml de Ni(II) 0.01 M, 5 ml de reguladora cloruro amónico/amoniaco 1M de pH 10 y la muestra conteniendo Tiopronin para que su concentración final resulte entre 30 y 280 $\mu\text{g/ml}$. Enrase, mezcle y mida la absorbancia a 468 nm frente a un ensayo en blanco formado por todos los reactivos en ausencia de Tiopronin.

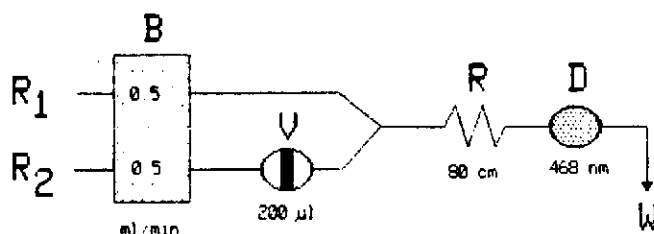


FIGURA 1. Montaje FIA propuesto. R₁, disolución de reactivo conteniendo Ni(II) $2 \times 10^{-3}\text{M}$ en reguladora cloruro amónico/amoniaco 0.2M de pH 10. R₂, portador conteniendo agua y reguladora (1:1, v/v). B, bomba peristáltica a 0.5 ml/min por canal. V, válvula de inyección de muestra con lazo de 200 μl . R, reactor de 80 cm. D, detector espectrofotométrico. W, residuos.

Con la técnica FIA:

Utilizando el montaje propuesto en la figura 1 y en las condiciones especificadas, el Tiopronin resulta determinable en el intervalo 10^{-4} - $5 \times 10^{-3}\text{M}$ con una frecuencia de muestreo de 100 muestras/hora (figura 2).

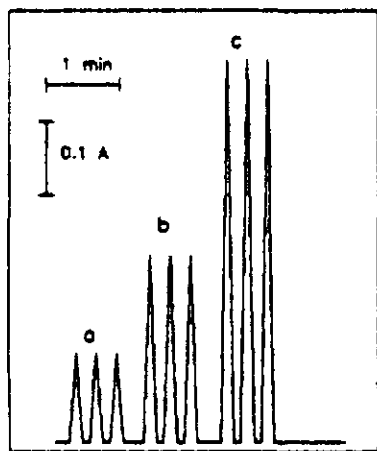


FIGURA 2. Registros obtenidos por tres inyecciones sucesivas de 200 μl de disolución conteniendo Tiopronin 5×10^{-4} , 10^{-3} y $2 \times 10^{-3}\text{M}$ (curvas a, b y c, respectivamente).

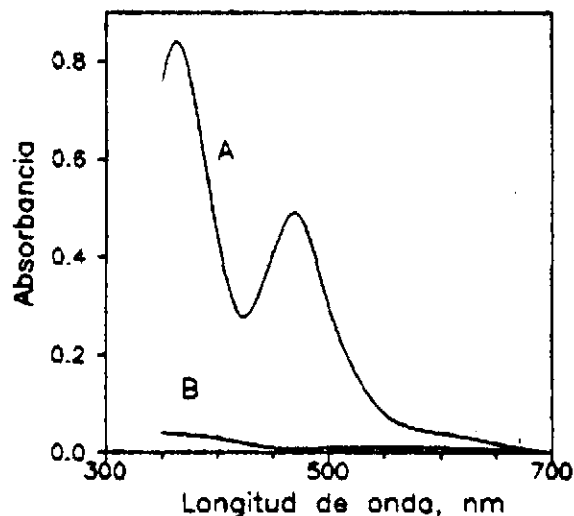


FIGURA 3. Espectros de absorción. Curva A: Ni(II) $1.6 \times 10^{-3}\text{M}$, Tiopronin $4 \times 10^{-3}\text{M}$, pH 10. Curva B: Ni(II) $1.6 \times 10^{-3}\text{M}$, pH 10.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ESPECTROS DE ABSORCIÓN

Se efectuaron diversas experiencias previas situando muestras que contienen Ni(II) y un exceso de Tiopronin en medios de diferente acidez con ayuda de disoluciones reguladoras. En medio amoniacal, el Ni(II) origina con el compuesto estudiado un color amarillo bastante perceptible. La figura 3 muestra los espectros de absorción de una disolución $1.6 \times 10^{-3}\text{M}$ en Ni(II) y $4 \times 10^{-3}\text{M}$ en Tiopronin a pH 10 ajustado con reguladora cloruro amónico/amoniaco (curva A). La curva B corresponde al ensayo en blanco, esto es, una experiencia similar en ausencia de Tiopronin. Como puede observarse, el complejo Ni(II)-Tiopronin presenta dos máximos de absorción, uno en la zona visible del espectro (468 nm) y otro en las proximidades del ultravioleta (375 nm). Experimentalmente pudo comprobarse que el máximo de 375 nm sólo aparece en exceso de Tiopronin por lo que en el resto de las experiencias se midió la absorbancia a 468 nm.

INFLUENCIA DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

En primer lugar se estudió el efecto que el pH, las concentraciones de reguladora y Ni(II) tienen sobre la determinación de Tiopronin utilizando el procedimiento manual o de equilibrio.

La figura 4 muestra el efecto del pH y la concentración de Ni(II). Como puede observarse, la absorbancia permanece constante a valores de pH superiores a 9.5 por lo que se eligió el valor de pH 10 como el más adecuado. Este pH puede ajustarse con reguladora cloruro amónico/amoniaco

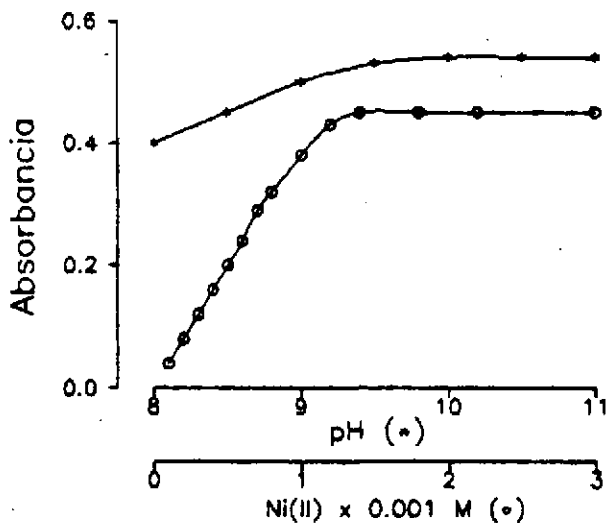


FIGURA 4. Influencia del pH y la concentración de Ni(II) en los valores de absorbancia obtenidos en presencia de 280 y 230 µg/ml de Tiopronin, respectivamente.

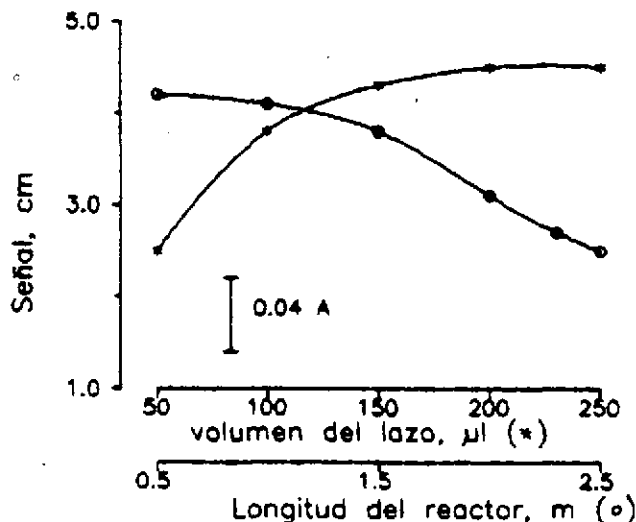


FIGURA 5. Influencia del volumen inyectado (volumen del lazo) y la longitud del reactor (R) en la señal obtenida para Tiopronin 5.7×10^{-4} y 5×10^{-4} M, respectivamente.

en concentración no superior a 0.3M para evitar su competencia con el Tiopronin en la formación de complejos con Ni(II). Por ello se escogió una concentración final de reguladora 0.2M como más adecuada.

Como muestra la figura 4 la concentración de Ni(II) ha de encontrarse en suficiente exceso como para garantizar la formación del complejo Ni(II)-Tiopronin. Se seleccionó una concentración de Ni(II) 2×10^{-3} M pues satisface esta condición en toda la recta de calibrado para Tiopronin.

Se comprobó por aplicación de los clásicos métodos de la relación molar y de las variaciones continuas que en las condiciones experimentales citadas el complejo Ni(II)-Tiopronin muestra una estequiometría 1:1.

Siguiendo el procedimiento operatorio recomendado en la Parte Experimental, la absorbancia medida a 468 nm resulta proporcional a la concentración de N-(2-mercapto-propionil) glicina entre 30 y 280 µg/ml, mostrando una absorptividad molar de $300 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ con un error de método inferior al $\pm 0.8\%$, y manteniéndose los valores de absorbancia estables con el tiempo al menos hasta 3 horas después de la preparación (máximo tiempo de observación).

A partir de los valores calculados para las variables experimentales por el método de equilibrio se estudió el montaje y las condiciones más adecuadas para la determinación de Tiopronin utilizando la técnica de Análisis por Inyección en Flujo.

La figura 1 muestra el montaje propuesto. La utilización de un segundo canal para la inyección de la muestra es aconsejable para evitar la aparición de picos negativos.

La figura 5 muestra el efecto del tamaño del lazo y de la longitud del reactor, R. Como puede observarse, un tamaño de lazo de 200 µl es suficiente para alcanzar un elevado valor en la altura de pico. Puesto que la reacción es

prácticamente instantánea un alargamiento innecesario del reactor se traduce en una disminución de la señal por efectos de dispersión, por ello se escogió como valor más adecuado el de 80 cm.

En lo referente a la velocidad de bombeo se establece una situación de equilibrio entre la frecuencia de muestreo (tanto mayor cuanto mayor es la velocidad de bombeo) y el tiempo de residencia de la muestra y reactivos en el montaje necesario para la reacción de complejación. En consecuencia se ha escogido el valor de 1 ml/min que permite además disminuir el consumo de reactivos.

Teniendo en cuenta las condiciones previamente estudiadas el Tiopronin resulta determinable en el intervalo

TABLA 1 Efecto de diversas especies en la determinación de Tiopronin 2×10^{-4} M

	Máxima relación en peso [Especie]/[Tiopronin] tolerable
Goma arábica, tartrato, ácido acetil salicílico, citrato, ácido benzóico.....	100
Glucosa, ácido ascórbico, bicarbonato sódico, gelatina, sacarina, lactosa, galactosa, fructosa.....	50
Cielamato, maltosa, sacarosa...	10
Cafeína.....	5
Almidón.....	1



10^{-4} - 5×10^{-3} M como muestra la gráfica de calibrado de la figura 2, con un error de método inferior al $\pm 0.7\%$. Bajo las condiciones seleccionadas el método presenta una alta velocidad de muestreo pues resulta posible analizar hasta 100 muestras/hora con excelente reproducibilidad.

EFFECTO DE OTRAS SUSTANCIAS

Se ha investigado el efecto de diversas sustancias que podrían acompañar al tiopronin en preparados farmacéuticos sobre la determinación a través del método propuesto en condiciones de equilibrio y utilizando la técnica de inyección en Flujo. Los resultados obtenidos por aplicación de éste último aparecen en la tabla 1. Se ha considerado una especie como interferente cuando conduce a un error en la determinación de Tiopronin superior al $\pm 3\%$.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 SUGIURA, Y.; KUMISHIMA, M.; TANAKA, H. y DEARMAN, H. H.: J. Inorg. Nucl. Chem., 37, 1511 (1975).
- 2 SUGIURA, V. y HIRIYAMA, Y.: J. Am. chem. Soc., 99, 1581 (1977).
- 3 FERRIS, N. S.; WOODRUFF, W. H.; RORABACHER, D.B.; JONES, T. E. y OCHRYMOWYCZ, L. A.: J. Am. Chem. Soc., 100, 5939 (1978).
- 4 FILELLA, M. y WILLIAMS, D. R.: Inorg. Chim. Acta, 106, 49 (1985).
- 5 SUZUKI, A.; KAJIMOTO, N.; YANAGAWA, T.; SUGIMOTO, J. y NAGATA, M.: J. Toxicol. Sci., 3, 313 (1978).
- 6 FUJIMOTO, T.; FUYUTA, M.; KIYOFUJI, E. y HIRATA, S.: Teratology, 20, 297 (1979).
- 7 CANDURA, F.; FRANCO, G.; MALAMANI, T. y SCALISIS, L.: The Lancet, 330 (1979).
- 8 BASINGER, M. A.; CASAS, J. S.; JONES, M. M.; WEAVER, A. D. y WEISTEIN, H. N.: J. Inorg. Nucl. Chem., 43, 1419 (1981).
- 9 SAKURAY, H. y TAKESHIMA, S.: Inorg. Chim. Acta, 56, L29 (1981).
- 10 JONES, M. M.; WEAVER, A. D. y BASINGER, M. A.: J. Inorg. Nucl. Chem., 43, 2175 (1981).
- 11 SUGIURA, Y.; HIRAYAMA, Y.; TANAKA, H. y SAKURAI, H.: J. Inorg. Nucl. Chem., 37, 2367 (1975).
- 12 FUNAE, Y.; KOMORI, T.; SASAKI, D. y YAMAMOTO, K.: Jpn. J. Pharmacol., 28, 925 (1978).
- 13 TERZIAM, G.; ASSO, M.; PANOSSIAN, R.; GUILIANO, M. y BENLIAN, D.: J. Chim. Phys., 79, 181 (1982).
- 14 QUESADA, M. J.; SÁNCHEZ, L. y GARCÍA VILLANOVA, R. J.: Ars. Pharmaceutica, XXII, 397 (1982).
- 15 HARMAN, B. y SOVAGO, I.: Inorg. Chim. Acta, 80, 75 (1983).
- 16 RUZICKA, J. y HANSEN, E. H.: «Flow Injection Analysis», Wiley (1981).
- 17 VALCÁRCEL, M. y LUQUE DE CASTRO, M. D.: «Análisis por Inyección en Flujo», Univ. Córdoba, Monte de Piedad y Caja de Ahorros de Córdoba (1984).