

DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DO SULFATO DE NEOMICINA EM MEDICAMENTOS, DIRETAMENTE E APÓS SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA *

Waldomiro PREGNOLATTO **
Myrna SABINO **

RIAL-A/398

PREGNOLATTO, W. & SABINO, M. — Determinação espectrofotométrica do sulfato de neomicina em medicamentos, diretamente e após separação por cromatografia em camada delgada. *Rev. Ins. Adolfo Lutz*, 34: 41-46, 1974.

RESUMO: Usando-se a reação da neomicina com ninhidrina em meio glicérico, em condições pré-estabelecidas, pode-se determinar rapidamente o teor de neomicina em um medicamento que a contenha. O método baseia-se na reação de neomicina com um reagente ninhidrina contendo glicerina: nestas condições, a reação é mais sensível e os resultados são reproduzíveis. A Lei de Beer é obedecida entre 4 e 40 μg de sulfato de neomicina por ml.

Alguns interferentes foram estudados. Quando necessário uma prévia separação da neomicina antes da reação, um método de separação por cromatografia em camada delgada foi aplicado.

DESCRITORES: sulfato de neomicina, determinação em medicamentos; cromatografia em camada delgada e espectrofotometria, na determinação do sulfato de neomicina.

I N T R O D U Ç Ã O

Para facilitar a análise de rotina de medicamentos contendo sulfato de neomicina, outro sal ou a base livre, estudamos e desenvolvemos um método baseado na reação da neomicina com ninhidrina, antes ou depois de sua separação, por cromatografia em camada delgada, de outros componentes que possam interferir nesta reação.

A neomicina e seus sais reagem com diversas substâncias, formando compostos coloridos que podem ser usados em sua determinação; assim é que furfural, p-bromoanilina¹³, orcino⁸, floroglucino³, foram já usados em tentativas na determinação da neomicina. A ninhidrina foi pela primeira vez usada, numa tentativa para determinar neomicina, por LARBRE & DORCHE⁸, num estudo comparativo quando usou também

* Realizado na Seção de Química Biológica do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S.P.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

para o mesmo fim uma solução de furfural; este método é em si trabalhoso e pouco específico.

Muitos outros autores estudaram a reação da neomicina com a ninhidrina e muitas técnicas foram descritas ^{1, 4, 7, 11, 14}.

No método que agora descrevemos, o reagente foi preparado em presença de glicerina, o que tornou a reação bem mais sensível e quantitativamente reproduzível.

Nos casos de medicamentos contendo outros antibióticos, como polimicina, viomicina, bacitracina, penicilina, tirotricina, é necessário inicialmente separar a neomicina daquelas substâncias. Diversos autores tentaram essa separação através de técnicas cromatográficas em coluna ¹³ e em coluna de resina — troca iônica ¹⁰, em camada delgada ^{3, 6}, em papel ^{5, 11, 14} e por cromatografia em fase gasosa ¹². Ainda, LIGHTBOWN & ROSSI⁹ estudaram a separação da bacitracina, polimicina B e neomicina, usando electroforese em ágar-gel. BRAMMER & HEMSON² usaram, para separar polimicina B e neomicina, electroforese em acetato de celulose com tampão barbitúrico 0,07 M (pH 8,6).

Uma técnica simples de separação da neomicina por cromatografia em camada delgada também é descrita, técnica essa onde não há preocupação na separação das diferentes neomicinas, por não apresentar qualquer interesse neste caso: o cromatograma é desenvolvido com butanol — ácido acético — água — trietanolamina 30% (30:22:38:10). O sulfato de neomicina é eluído com água.

MATERIAL E MÉTODO

Material

Foram utilizados:

Ninhidrina p. a.

Cloreto de sódio * p.a.

Glicerina p.a.

Sílica gel para cromatografia em camada delgada **

Hidróxido de sódio p.a.

Sulfato de neomicina p.a.

* Backer

** Merck

Solvente

Butanol — ácido acético — água — trietanolamina 30% (30:22:38:10)

Equipamento para cromatografia em camada delgada — espectrofotômetro Beckmann DU

Reagente

Ninhidrina	1g
NaCl	26,5 g
NaOH (0,4%)	10 ml

Diluir a 100 ml com glicerina 60%.
Acertar o pH = 7,9 com NaOH diluído.
Guardar em geladeira.

Método

a) Curva padrão

Dissolva 20 mg de sulfato de neomicina, exatamente pesados, em 100 ml de água; 1 ml dessa solução contém 200 µg de sulfato de neomicina. A partir dessa solução, prepare diluições convenientes com até 20 µg de sulfato de neomicina por ml.

Reação: em tubos de ensaio, adicione 1 ml do padrão a 1 ml do reagente; esfrie em banho de gelo; adicione 3 ml de água, homogeneíze. Leia em espectrofotômetro a 570 nm.

b) Aplicação em medicamentos

No caso de forma medicamentosa líquida, dilua em água uma alíquota da amostra de maneira que a solução final contenha ao redor de 100 µg de neomicina por ml; em se tratando de pomadas, transfira uma alíquota da amostra para balão volumétrico, junte água, agite fortemente por alguns minutos, complete o volume, homogeneíze e filtre. Em ambos os casos, transfira 1 ml da solução para o tubo de ensaio e continue como em *curva padrão*, a partir do ponto: 1 ml do reagente. Dos resultados de absorvância obtidos, calcule a concentração com o auxílio da curva padrão.

c) Cromatografia em camada delgada

Cromatografe em placas de 20 x 20 cm, com camadas de sílica gel de 0,400 cm secadas ao ar por 30 minutos e ativadas em estufa a 105°C, por 2 horas.

Transfira para a placa exatamente 50 μ l do padrão e uma alíquota da amostra que contenha teoricamente 10 μ g do antibiótico e desenvolva o cromatograma com butanol — ácido acético — água — trietanolamina 30% (30:22:38:10), até a altura de 10 cm da base, seque ao ar. Revele com ninhidrina, 0,4% em acetona 95%. Aqueça em estufa a 105°C por 30 minutos, mancha azul a um Rf de 0,56. Raspe as camadas de sílica gel da placa e elua separadamente, em exatamente 2 ml de água, por contacto, durante 30 minutos. Filtre, lave o resíduo com exatamente mais 2 ml de água, recolhendo o filtrado e água de lavagem em frasco apropriado.

Leia a absorbância de ambas as soluções a 570 nm, usando como branco água previamente tratada com sílica.

Cálculo

$$\frac{Aa \times 100}{Ap} = \% \text{ do sulfato de neomicina no produto}$$

Aa = absorbância da amostra

Ap = absorbância do padrão

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método é simples, reproduzível, realizável em qualquer laboratório.

A Lei de Beer é obedecida nas condições estabelecidas no método (conforme fig. 1).

Cuidado especial deve ser tomado, na preparação do reagente, em relação ao NaCl; diversas marcas foram testadas e o único NaCl que funcionou satisfatoriamente foi o Backer p.a.

Os experimentos feitos com o reagente preparado somente com água não deram

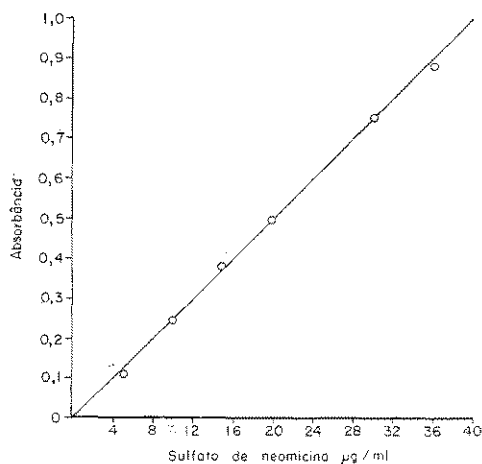


Fig. 1 — Curva padrão para determinação da neomicina

resultados satisfatórios, por apresentar o reagente pouca sensibilidade e os resultados não serem reproduzíveis.

A figura 2 mostra o espectro de absorção do produto final da reação, usando reagente com e sem glicerina. Dois máximos são sempre observados: um, a 570 nm e outro, a 400 nm. Nossas leituras foram sempre feitas a 570 nm.

Experimentos foram feitos com variação de pH 5,0 e 9,0. A reação funcionou perfeitamente em pH = 7,9.

A cromatografia em camada delgada é simples e prática: diversos solventes descritos na literatura e por nós elaborados foram testados, destacando-se, entre eles, n-butanol — ácido acético — água — piridina (30:22:38:6)¹⁴; amônio 3% — acetona (160:40)⁶; n-butanol — ácido acético — água — trietanolamina (30:20:30:20); n-butanol — ácido acético — água — trietanolamina (30:20:39:1); etanol 80%. Nenhum destes se revelou tão atisfatório como o usado e descrito.

A cromatografia em papel ascendente, usando n-BuOH — água — ácido acético (30:13:8)¹⁴, também não apresentou resultados satisfatórios.

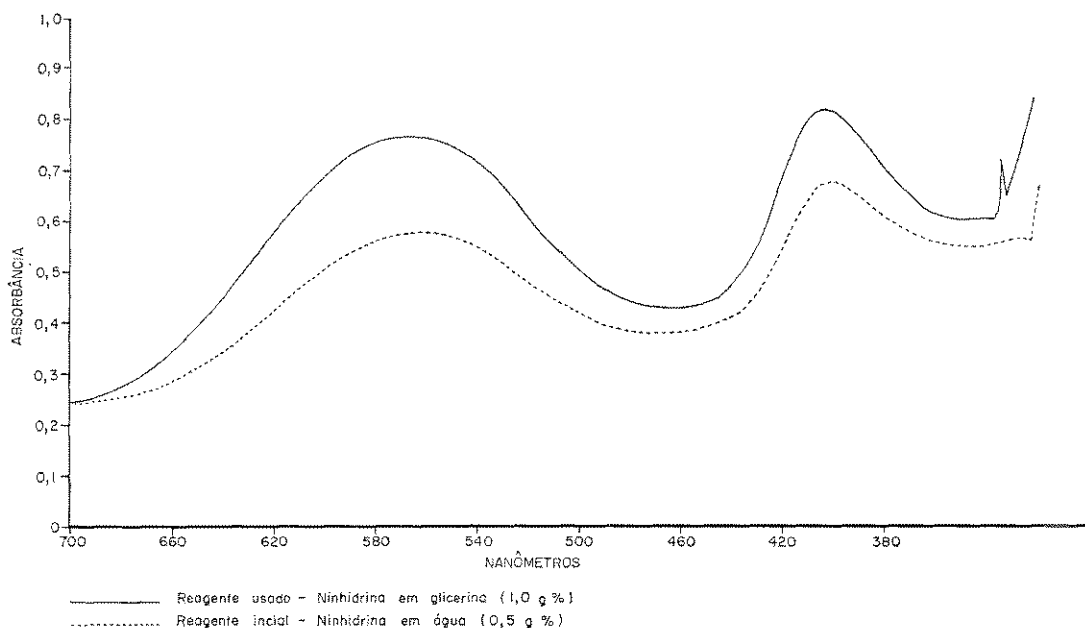


Fig. 2 — Espectro de absorção da neomicina

O método foi testado em medicamentos na forma líquida e de pomadas contendo, além do sulfato de neomicina, outras subs-

tâncias, tais como antibióticos, vasoconstritores e conservadores; os resultados encontram-se na tabela:

Análise quantitativa de sulfato de neomicina em medicamentos por espectrofotometria

Medicamentos	Forma farmacêutica	Quantidade teórica mg/ml ou g	Quantidade encontrada mg/ml ou g
A	pomada	25	24,8
B	"	30	29,0
C	"	25	24,8
D	"	50	48,0
E	líquido	1	0,95
F	"	1	1,15
G	"	0,1	0,98
H	"	1	1,05
I	"	0,1	0,101
J	"	0,5	0,47

Testes de recuperação do sulfato de neomicina foram feitos, usando-se, como suporte, medicamentos isentos de neomicina, a que se adicionaram 100 mg de sulfato de

neomicina por 100 ml. A média em 25 determinações foi 99%, sendo o resultado maior de 102% e o menor de 95%.

RIAL-A/398

FREGNOLATTO, W. & SABINO, M. — Spectrophotometric determination of neomycin sulfate in pharmaceuticals by thin-layer chromatography. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34: 41-46, 1974.

SUMMARY: The contents of neomycin in a given pharmaceutical product can be promptly verified through the reaction of neomycin with ninhydrin in glycerinic medium and under certain pre-established conditions.

The method herein described is based on the reaction of neomycin with the ninhydrin reagent containing glycerin. Under such conditions the reaction becomes more perceptible and its results reproducible. Beer law applies to this case in a range between 4 to 40 μg neomycin sulfate per ml.

Some interfering agents were studied as well. In cases where the neomycin was to be separated prior to the reaction, a thin-layer chromatography method was used.

DESCRIPTORS: neomycin sulfate, determination in pharmaceuticals; thin-layer chromatography and spectrophotometry to determine neomycin.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOROWIECKA, B. — Colorimetric assay of neomycin in pharmaceuticals. *Dissnes pharm.* (Warsz.), 17 (3): 313-8, 1965 apud *Chem. Abstr.*, 65: 571f, 1966.
2. BRAMER, K.W. & HEMSON, L.J. — An electrophoretic method for the detection and estimation of microgramme quantities of neomycin in serum protein solutions. *J. Chromat.*, 19: 456-8, 1965.
3. BRODASKY, T.F. — Thin-layer chromatography of the mixed neomycin sulfates on carbon plates. *Analyt. Chem.*, 35: 343-5, 1963.
4. BURNS, D.T.; LLOYD, G.H. — Colorimetric determination of neomycin. *Lab. Pract.* (Eng.), 17 (4): 448-9, 1968 apud *Chem. Abstr.* 69: 5239u, 1968.
5. DESHMUKH, P.V.; MEHTA, S.I. & VAIDYA, MADHUBARB, G. — Separation of neomycins by paper and thin-layer chromatography. *Hindustan antibiot. Bull.*, 12: 2-3, 68-70, 1969 apud *Chem. Abstr.* 73: 69890q, 1970.
6. FOPPIANO, R. & BROWN, B.B. — Quantitative analysis of neomycin sulfate by thin-layer chromatography. *J. pharm. Sci.*, 54: 206-8, 1965.
7. HOODLESS, R.A. — The assay of neomycin — *Analyst* (Lond.), 91: 333-4, 1966.
8. LARBRE, M.S. & DORCHE, M.J. — Reactions for identifying neomycin. *Bull. Trav. Soc. Pharm.* (Lyon), 6 (2): 61-2, 1962 apud *Chem. Abstr.* 58: 6648g, 1963.
9. LIGHTBOWN, J.W. & ROSSI, P. — The identification and assay of mixtures of antibiotics by electrophoresis in agar gel. *Analyst*, 90: 89-98, 1965.
10. MAEHR, H. & SCHAFFNER, C.P. — Resolution of neomycin and catenulin antibiotic complexes by ion exchange resin chromatography. *Anal. Chem.*, 36: 104-8, 1964.
11. MAJUMDAR, M.K. & MAJUMDAR, S.K. — Separation and quantitations of neomycins as free base by paper chromatography. *Appl. Microbiol.*, 17: 763-4, 1969.
12. MARGOSIS, M. & TSUJI, K. — Optimum conditions for GLC analysis of neomycin. *J. pharm. Sci.*, 62: 1836-8, 1973.

PREGNOLATTO, W. & SABINO, M. — Determinação espectrofotométrica do sulfato de neomicina em medicamentos, diretamente e após separação por cromatografia em camada delgada *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **34**: 41-46, 1974.

13. MORGAN, J.W.; HONIG, A.B.; WARREN, A.T. & LEVINE, S. — Spectrophotometric assay for neomycins B and C in pharmaceutical preparations. *J. pharm. Sci.*, **50**: 668-71, 1961.
14. STRETTON, R.J.; CARR, J.P. & WATSON-WALKER, J. — The separation of neomycin sulphate, polymyxin B sulphate and zinc bacitracin. *J. Chromat.*, **45**: 155-8, 1969.

Recebido para publicação em 17 de maio de 1974.