

EASY, RAPID AND SENSITIVE DETERMINATION OF SALICYLATES IN FOODSTUFFS USING ELECTROANALYTICAL TECHNIQUES

JEDNODUCHÁ, RYCHLÁ A SENZITIVNÍ DETEKCE SALICYLÁTŮ V POTRAVINÁCH POMOCÍ ELEKTROANALYTICKÝCH TECHNIK

Šupálková V.¹⁾, Petřek J.¹⁾, Vítěček J.¹⁾, Havel L.¹⁾, Petrlová J.²⁾, Mikelová R.^{2,3)}, Adam V.^{2,4)}, Potěšil D.^{2,4)}, Babula P.⁵⁾, Zehnálek J.²⁾, Kizek R.²⁾

¹⁾Department of Plant Biology, and ²⁾Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic

³⁾Department of Theoretical and Physical Chemistry, and ⁴⁾Department of Analytical Chemistry, Masaryk University Faculty of Science, Kotlarska 2, 611 37 Brno, Czech Republic

⁵⁾Department of Natural Drugs, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic

E-mail: vevek@centrum.cz, kizek@sci.muni.cz

ABSTRACT

Salicylates, particularly acetylsalicylic acid (AcSA), or aspirin was introduced in the late 1890s and has been used to treat a variety of inflammatory conditions; however, the antiplatelet activity of this agent was not recognized until almost 70 years later. The aim of this work was to study the electrochemical behaviour of salicylic acid (SA) and AcSA on the surface of carbon paste electrode (CPE) and of graphite pencil electrode (GPE) by square wave voltammetry (SWV) and to determine the compounds of interest in foodstuffs (e.g. beverages) and pharmaceutical drug. We found out that the pharmaceutical drug contained about 3 – 5 % of SA. The detection limit of the SA was 1,3 ng/ml. In addition, we suggested the method for indirect determination of AcSA and applied it on analysis of the drug. The determined amount of AcSA in the drug was in good agreement with the declared amounts. Finally, we used GPE for determination of SA in different willow species. The highest content of SA was observed in bark of *S. laponum* (2986 µg/g FW).

Keywords: Salicylic acid; Acetylsalicylic acid (Aspirin); Plants; Pharmaceutical drug; Weeping willow (*Salix*); Electrochemical determination; Voltammetry; Carbon electrodes.

ABSTRAKT

Salicyláty, konkrétně kyselina acetylsalicylová (AcSA, aspirin) je používána již od roku 1890 pro léčbu různých zánětlivých nemocí. Její protisrážlivý efekt byl objeven o 70 let později. Cílem této práce bylo studovat elektrochemické chování kyseliny salicylové (SA) a acetylsalicylové AcSA na povrchu uhlíkové pastové elektrody (CPE) a na uhlíkové tužkové elektrodě (GPE) pomocí square wave voltametrie (SWV) a stanovit studované sloučeniny v potravinách (např. nápoje) a farmaceutickém přípravku. Zjistili jsme, že analyzované léčivo obsahuje 3 – 5 % SA. Získaný detekční limit pro SA byl 1,3 ng/ml. Dále jsme navrhli metodu pro nepřímé stanovení AcSA a aplikovali jsme ji pro analýzu farmaceutického přípravku.

Stanovené množství AcSA bylo v dobré shodě s deklarovaným množstvím. Na závěr jsme použili GPE pro stanovení SA v různých druzích vrb. Nejvyšší obsah SA byl objeven v kůře *S. laponum* (2986 µg/g svěží hmotnosti).

Klíčová slova: Salicylová kyselina; Acetylsalicylová kyselina (Aspirin); Rostliny; Farmaceutický přípravek; Vrba smuteční (*Salix*); Elektrochemické stanovení; Voltametrie; Uhlíkové elektrody.

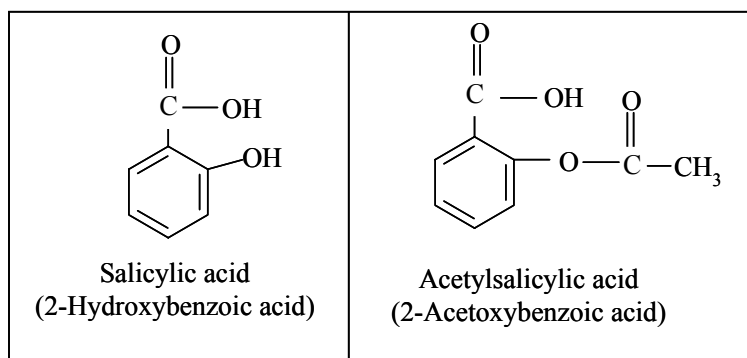
ÚVOD

Salicyláty (kyselina salicylová SA, kyselina acetylsalicylová AcSA, Obr. 1) byly používány jako analgetikum ve formě kůry z vrb již v dobách Hippokrata [1] a jejich protihorečkový efekt byl rozpoznán před více než 200 lety [2]. Konkrétně AcSA (nebo také aspirin) je používána od roku 1890 pro léčbu různých zánětlivých onemocnění [3,4]. Její protisrážlivé účinky jsou známy již 70 let [5-7]. Byl také prokázán příznivý terapeutický vliv aspirinu při různých kardiovaskulárních chorobách [6-12]. A navíc bylo nedávno popsáno, že salicyláty jsou schopny inhibovat růst bakterií *Helicobacter pylori* [13] a *Staphylococcus aureus* [14].

Kromě výše popsaného účinku salicylátů na lidských organismus je těchto sloučenin dále hojně využíváno v řadě nápojů a potravinách jako konzervační přísady [15,16], kde však vyšší koncentrace mohou být na druhou stranu toxické nebo vyvolávat alergické reakce [17].

Mnoho analytických metod a postupů průtoková injekční analýza [18-23] a vysokoúčinná kapalinová chromatografie [1,24-30] spojená s různými druhy detektorů bylo využito pro stanovení SA a jejich derivátů.

Obr. 1 Vzorce kyseliny salicylové a acetylsalicylové.



Cílem této práce bylo studovat elektrochemické chování kyseliny salicylové (SA) a acetylsalicylové (AcSA) na povrchu uhlíkové pastové elektrody (CPE) a na uhlíkové tužkové elektrodě (GPE) pomocí square wave voltametrie (SWV). Metodu následně využít pro stanovení SA a AcSA v potravinách a nápojích (např. pivo), farmaceutickém přípravku a kůře různých druhů vrb.

MATERIÁL A METODIKA

Chemikálie

Všechny použité chemikálie byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Zásobní roztoky studovaných látek o koncentraci 50 mg.ml^{-1} byly připravovány pomocí methanolu a uchovávány v temnu při teplotě -20°C . Pracovní roztoky se připravovali denně, ředěním zásobních roztoků. pH bylo měřeno pomocí WTW inoLab (Weilheim, Německo) řízeným počítačovým programem (MultiLab Pilot; Weilheim, Německo).

Příprava karbonové pastové elektrody a uhlíkové tužkové elektrody

Jako pracovní elektroda byla použita uhlíková pastová elektroda (složení pasty: 70 % uhlíkového prášku (Sigma-Aldrich, USA) a 30 % minerálního oleje (Sigma-Aldrich, USA). Použito bylo teflonové tělo s průměrem aktivní elektrodové plochy 2,5 mm; povrch elektrody byl leštěn před každým měřením jemným filtračním papírem (určeným pro analýzu). Uhlíková tužková elektroda (průměr = 500 μm , délka = 60 mm) byla zakoupena od Kohinor (České Budějovice, Česká republika).

Elektrochemická analýza

Elektrochemické měření pomocí square wave voltametrie byla prováděna na přístroji AUTOLAB Analyser (EcoChemie, Nizozemí) spojeného s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Byl použit tříelektrodový systém a skládal se z karbonové pastové/uhlíkové tužkové elektrody jako pracovní elektrody s plochou $0,4 \text{ mm}^2$, Ag/AgCl/ 3 mol.l^{-1} KCl elektrody jako referenční elektrody a uhlíkové elektrody jako pomocné. GPES software (EcoChemie, Nizozemí) byl aplikován na zpracování hrubých dat za použití úrovně 4 Savitzky and Golay filtru. Experimenty byly prováděny při laboratorní teplotě. Měření bylo prováděno v potenciálovém rozsahu od 0.7 V do 1.5 V. Ostatní parametry byly optimalizovány. Britton-Robinson pufr skládající se z 0,4 M H_3PO_4 , 0,4 M CH_3COOH a 0,4 M H_3BO_3 byl použit jako základní elektrolyt.

Příprava rostlinných vzorků

Vzorky kůry a letorostů jedinečných vzorků vrb (*Salix lapponum*, *S. planifolia*, *S. foetida*, *S. foetida* x *hastata*, *S. x "Aegma Brno"*, *S. purpurea* cv. Nana, *S. reinii*, *S. repens*, *S. x erythrotoflexuosa*, *S. caterii*, *S. fragilis*, *S. triandra* a *S. viminalis*) byly nasbírány v červenci 2005 v Botanické zahradě Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity. Odebrané vzorky (0,5 – 2 g) byly umístěny do polyetylenových nádobek spolu s 15 ml 99.999% metanolu. Poté byly vzorky homogenizovány třepáním na Vortex–2 Genie (400 rpm, Scientific Industries, USA) při 4°C po dobu 72 h [31].

Příprava farmaceutického přípravku

Farmaceutický přípravek (Acylpyrin, Slovakofarma, Medicamenta, Česká republika) byl použit v našich experimentech. Tablety byly homogenizovány mlýnkem 11 basic IKA (IKA-Werke GmbH a Co. KG, Staufen, Německo). Homogenizované vzorky (10 mg) byly rozpuštěny v 1 ml metanole a analyzovány (10 μ l).

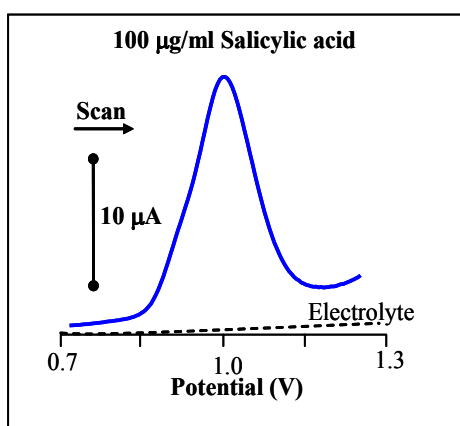
Příprava vzorku piva

Vzorky piva byly zakoupeny v běžném obchodě a uchovány při 4 °C do doby analýzy. Před analýzou byly vzorky 100 $\times$ zředěny.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Elektrochemické chování kyseliny salicylové na uhlíkové pastové elektrodě

V naší práci jsme studovali salicylovou kyselinu (SA) na pracovní uhlíkové pastové elektrodě (CPE) pomocí square wave voltammetry (SWV) v pufovaném prostředí. SWV voltamogram 100 μ g/ml SA v Britton-Robinson pufru o pH 2.3 je ukázán na Obr. 2.



Obr. 2 Square wave voltammogram SA (100 μ g/ml) měřený pomocí uhlíkové pastové elektrody v prostředí Britton-Robinson pufru (pH 2.3).

V naší předešlé práci bylo prokázáno, že pro dosažení maximální senzitivity je nezbytné studovat vliv frekvence, amplitudy a potenciálového kroku na získaný elektrochemický signál [32]. Ze získaných experimentálních výsledků jasně vyplývá, že nejvhodnější nastavení elektroanalytické metody byla frekvence 260 Hz, amplituda 50 mV a potenciálový krok 10 mV. V případě, že byly zvoleny všechny nejvhodnější podmínky stanovení SA na CPE byla studována koncentrační závislost SA. Signály SA se lineárně zvyšují s rostoucí koncentrací ($y = 0,2407x + 0,0231$; $R^2 = 0,9993$) asi do koncentrace SA 80 μ M. Poté je již změna signálu SA velmi pozvolná a pravděpodobně souvisí s plným pokrytím pracovní elektrody a tvorbou polymerního filmu. Detekční limit stanovení SA pomocí SWV byl 1,3 ng/ml.

Přímé stanovení kyseliny salicylové ve farmaceutickém přípravku a pivu

Při syntetické přípravě kyseliny acetylsalicylové (AcSA) je tato látka vždy znečištěna příměsí kyseliny salicylové. AcSA neposkytuje na CPE žádný elektrochemický signál. Proto jsme se nejdříve rozhodli pro jednoduché přímé stanovení příměsí SA ve farmaceutickém přípravku. Zjistili jsme, že připravený farmaceutický preparát ($n = 4$) obsahuje kolem 3-5 % SA (R.S.D. 5 %).

Dále jsme tuto techniku aplikovali pro analýzu vzorků piva. Ze získaných výsledků vyplývá, že vzorek piva obsahoval SA v množství $0,89 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Nepřímé stanovení kyseliny acetylsalicylové hydrolyzou na kyselinu salicylovou

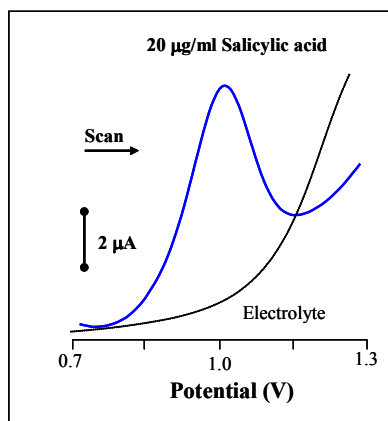
AcSA je elektroneaktivní látka a z toho důvodu ji nelze stanovit přímou detekcí. Proto jsme použili metodu nepřímého stanovení pomocí detekce SA, která vzniká její hydrolyzou. AcSA byla hydrolyzována v prostředí Britton-Robinson pufru (pH 1.81) při 90°C po dobu jedné hodiny. Konverzi AcSA na SA jsme tedy využili pro analýzu obsahu AcSA v farmaceutickém přípravku. Tablety jsme homogenizovali rozdrcením v třecí misce a převedli do alkalického pufru (pH 10) a zahřívali 30 min při teplotě 90°C a 450 rpm. Poměrná část ($100 \mu\text{l}$) získaného extraktu byla přidána do základního elektrolytu (Britton-Robinson, pH 1.8) a přímo změřena.

Zjištěný obsah AcSA ve farmaceutických přípravcích byl ve velmi dobré shodě s množstvím deklarovaným výrobcem se zjištěnou chybou kolem 5 %. Koncentrace byla zjištěna odečtem z kalibrační křivky a kontrolována metodou standardního přídávku. Pozorovaná návratnost se pohybovala od 98 – 105 %.

Stanovení kyseliny salicylové pomocí uhlíkové tužkové elektrody v rostlinných pletivech

Vývoj nových senzorů pro analýzu biologicky významných sloučenin představuje velmi významný směr v současné analytické chemii. Miniaturizace detektoru pak usnadňuje studium změn biologicky významné látky přímo v tělech organismů. Z tohoto důvodu jsme se pokusili analyzovat SA na uhlíkové tužkové elektrodě (GPE) s poloměrem $500 \mu\text{m}$.

Při použití výše posané elektroanalytické techniky SA poskytla na GPE velmi dobře reprodukovatelný a symetrický oxidační signál při potenciálu 1 V (Obr. 3). SWV signál SA se lineárně měnil v závislosti na koncentraci SA ($y = 0.178x + 0.2414$; $R^2 = 0.9908$). Limit detekce $1,7 \text{ ng/ml}$ byl určen jako 3 S/N.



Obr. 3 SWV voltammogram SA (20 µg/ml) měřený pomocí uhlíkové tužkové elektrody v prostředí Britton-Robinson pufru (pH 1.8).

Navíc bylo uhlíkové mikroelektrody využito pro studium obsahu SA v rostlinných pletivech. Vysoký obsah SA byl pozorován u rostlin druhu vrba (*Salix*). Jednotlivé vzorky, kůra a dvouletá větvíčka, byly po homogenizaci extrahovány do methanolu (více podrobností viz. Materiál a Metodika). Je známo, že zvýšený obsah organické sloužky je nepříznivý pro elektrochemickou analýzu [33-35]. Pro analýzu jsme použili vždy 60 µl extraktu ve 2 ml Britton-Robinson pufru (pH 1.81). Získané signály byly následně využity pro odečtení obsahu SA ve vzorku. Množství SA bylo stanoveno pomocí kalibrační křivky a ověřeno metodou standardního přídávku (pozorovaná relativní chyba stanovení kolísala kolem 1,5 – 3,5 %). Zjistili jsme, že průměrný obsah SA v extraktech vrby byl u dvouletých větvíček 750 µg/g svěží hmotnosti a v kůře 560 µg/g svěží hmotnosti. Nejvyšší obsah SA byl pozorován v kůře *S. laponum* (2986 µg/g svěží hmotnosti) a letorostech *S. purpurea* cv. *Nana* (2095 µg/g svěží hmotnosti) a *S. planifolia* (2168 µg/g svěží hmotnosti). Je zajímavé, že hybrid (*S.* cv. *Aegma* Brno) vyšlechtěný v Brně vykazoval velmi nízké obsahy SA (průměrný obsah SA 85 µg/g FW).

ZÁVĚR

Elektrochemické techniky, konkrétně použitá square wave voltametrie, představují vysoce selektivní a nepříliš drahý analytický nástroj pro stanovení kyseliny salicylové na uhlíkových elektrodách. Navržený postup SWV analýzy SA je možné využít pro analýzu obsahu SA v rostlinných extraktech a nápojích. Navíc bylo možné pomocí nepřímého stanovení určit obsah AcSA ve farmaceutických přípravcích.

Poděkování:

Práce na tomto projektu byla podporována granty: GAČR 525/04/P132, IGA FaF VFU IG342012, VV352003/2005 a IGA MZLU 2348/F4a.

LITERATURA

- [1] R. Pirker, C.W. Huck, M. Popp and G.K. Bonn Simultaneous determination of gentisic, salicylic and salicylic acid in human plasma using solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chrom. B* 809 (2004) 257-264.
- [2] E. Stone An account of the success of the bark of the willow tree in the cure of agues, *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 53 (1763) 195-200.
- [3] J.R. Vaneke, R.J. Flower and R.M. Botting History of aspirin and its mechanism of action, *Stroke* 21 (1990) 12-23 Suppl. S.
- [4] M.J. Thun, S.J. Henley and C. Patrono Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: Mechanistic, pharmacologic, and clinical issues, *J. Natl. Cancer Inst.* 94 (2002) 252-266.
- [5] H.J. Weiss and L.M. Aledort Impaired platelet-connective-tissue reaction in man after aspirin ingestion, *Lancet* 2 (1967) 495-497.
- [6] E.H. Awtry and J. Loscalzo Aspirin, *Circulation* 101 (2000) 1206-1218.
- [7] S. Wong, M. Appleberg, C.M. Ward and D.R. Lewis Aspirin resistance in cardiovascular disease: A review, *Eur. J. Vasc. Endovasc.* 27 (2004) 456-465.
- [8] C. Patrono Aspirin as an antiplatelet drug, *New Engl. J. Med.* 330 (1994) 1287-1294.
- [9] V. Fuster, M.L. Dyken, P.S. Vokonas and C. Hennekens Aspirin as a therapeutic agent in cardiovascular disease, *Circulation* 87 (1993) 659-675.
- [10] C.H. Hennekens Aspirin in the treatment and prevention of cardiovascular disease, *Ann. Rev. Pub. Health* 18 (1997) 37-49.
- [11] J.E. Manson, M.J. Stampfer, G.A. Colditz, W.C. Willet, B. Rosner, F.E. Speizer and C.H. Hennekens A prospective-study of aspirin use and primary prevention of cardiovascular-disease in women, *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 266 (1991) 521-527.
- [12] I.A.G. Reilly and G.A. Fitzgerald Aspirin in cardiovascular-disease, *Drugs* 35 (1988) 154-176.
- [13] W.H. Wang, W.M. Wong, D. Dailidienė, D.E. Berg, Q. Gu, K.C. Lai, S.K. Lam and B.C.Y. Wong Aspirin inhibits the growth of *Helicobacter pylori* and enhances its susceptibility to antimicrobial agents, *Gut* 52 (2003) 490-495.
- [14] L.I. Kupferwasser, M.R. Yeaman, C.C. Nast, D. Kupferwasser, Y.Q. Xiong, M. Palma, A.L. Cheung and A.S. Bayer Salicylic acid attenuates virulence in endovascular infections by targeting global regulatory pathways in *Staphylococcus aureus*, *J. Clin. Invest.* 112 (2003) 222-233.
- [15] K. Herrmann Salicylic acid and other hydroxybenzoic acids and their naturally occurring compounds in food, *Ernährungs-Umschau* 37 (1990) 108-112.
- [16] P.L.T.M.K. Janssen, P.C.H. Hollman, D.P. Venema, W.A. van Staveren and M.B. Katan Salicylates in foods, *Nutr. Rev.* 54 (1996) 357-359.
- [17] E. Paul, H.M. Gall, I. Muller and R. Moller Dramatic augmentation of a food allergy by acetylsalicylic acid, *J. Allergy Clin. Immunol.* 105 (2000) 844-844.
- [18] L. Rover, C.A.B. Garcia, C.D. Neto, L.T. Kubota and F. Galembeck Acetylsalicylic acid determination in pharmaceutical samples by FIA-potentiometry using a salicylate-sensitive tubular electrode with an ethylene-vinyl acetate membrane, *Anal. Chim. Acta* 366 (1998) 103-109.
- [19] J.M.P.J. Garrido, J.L.F.C. Lima and C.D. Matos Flow injection determination of acetylsalicylic acid in pharmaceutical preparations with an amperometric detector, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 65 (2000) 954-962.
- [20] M.S.M. Quintino and L. Angnes Bia-amperometric quantification of salbutamol in pharmaceutical products, *Talanta* 62 (2004) 231-236.

- [21] M.D.M. Quintino, D. Corbo, M. Bertotti and L. Angnes Amperometric determination of acetylsalicylic acid in drugs by batch injection analysis at a copper electrode in alkaline solutions, *Talanta* 58 (2002) 943-949.
- [22] L.K. Shpigun and V.K. Lunina Modified glassy-carbon electrodes for the flow-injection determination of inorganic tin species by stripping voltammetry, *J. Anal. Chem.* 58 (2003) 1078-1084.
- [23] R.I.L. Catarino, A.C.L. Conceicao, M.B.Q. Garcia, M.L.S. Goncalves, J.L.F.C. Lima and M.M.C. dos Santos Flow amperometric determination of pharmaceuticals with on-line electrode surface renewal, *J. Pharmaceut. Biomed.* 33 (2003) 571-580.
- [24] L. Diez, M.H. Livertoux, A.A. Stark, M. Wellman-Rousseau and P. Leroy High-performance liquid chromatographic assay of hydroxyl free radical using salicylic acid hydroxylation during *in vitro* experiments involving thiols, *J. Chrom. B* 763 (2001) 185-193.
- [25] J.T. Franeta, D. Agbaba, S. Eric, S. Pavkov, M. Aleksic and S. Vladimirov HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and phenobarbital in tablets, *Farmaco* 57 (2002) 709-713.
- [26] J.F. Jen, Y.Y. Tsai and T.C. Yang Microdialysis of salicylic acid from viscous emulsion samples prior to high-performance liquid chromatographic determination, *J. Chrom. A* 912 (2001) 39-43.
- [27] J. Engelberth, E.A. Schmelz, H.T. Alborn, Y.J. Cardoza, J. Huang and J.H. Tumlinson Simultaneous quantification of jasmonic acid and salicylic acid in plants by vapor-phase extraction and gas chromatography-chemical ionization-mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 312 (2003) 242-250.
- [28] S.M. Wilbert, L.H. Ericsson and M.P. Gordon Quantification of jasmonic acid, methyl jasmonate, and salicylic acid in plants by capillary liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 257 (1998) 186-194.
- [29] I.M. Scott and H. Yamamoto Mass spectrometric quantification of salicylic acid in plant tissues, *Phytochemistry* 37 (1994) 335-336.
- [30] G.G. Duthie, J.A.M. Kyle, A.M. Jenkinson, S.J. Duthie, G.J. Baxter and J.R. Paterson Increased salicylate concentrations in urine of human volunteers after consumption of cranberry juice, *J. Agr. Food Chem.* 53 (2005) 2897-2900.
- [31] C.H. Deng, X.M. Zhang, J. Zhang, J. Qian and W.M. Zhu Rapid determination of salicylic acid in plant materials by gas chromatography-mass spectrometry, *Chromatografia* 58 (2003) 225-229.
- [32] J. Vacek, Z. Andrysik, L. Trnkova and R. Kizek Determination of azidothymidine - an antiproliferative and virostatic drug by square-wave voltammetry, *Electroanalysis* 16 (2004) 224-230.
- [33] R. Kizek, M. Masarik, K.J. Kramer, D. Potesil, M. Bailey, J.A. Howard, B. Klejdus, R. Mikelova, V. Adam, L. Trnkova and F. Jelen An analysis of avidin, biotin and their interaction at attomole levels by voltammetric and chromatographic techniques, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 1167-1178.
- [34] B. Klejdus, R. Kizek, J. Vacek, J. Zehnalek, L. Trnkova and V. Kuban Determination of Isoflavones in soybean food and human urine using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr. B* 806 (2004) 101-111.
- [35] D. Potesil, J. Zelena, J. Petrlova, V. Adam, J. Vacek, B. Klejdus, J. Zehnalek, L. Trnkova, L. Havel and R. Kizek Simultaneous femtomole determination of cysteine, reduced and oxidized glutathione, and phytochelatin in maize (*Zea mays L.*) kernels using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr. A* 1084 (2005) 134-144.