

DETERMINAÇÃO INDIRETA DE N-ACETIL-L-CISTEÍNA POR INJEÇÃO EM FLUXO EMPREGANDO Ce(IV) E FERROÍNA

Heberth Juliano Vieira e Orlando Fatibello-Filho*

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, 13560-970 São Carlos - SP

Recebido em 23/6/04; aceito em 10/12/04; publicado na web em 13/4/05

INDIRECT FLOW INJECTION DETERMINATION OF N-ACETYL-L-CYSTEINE USING Cerium(IV) AND FERROIN. An indirect flow injection spectrophotometric procedure is proposed for the determination of N-acetyl-L-cysteine in pharmaceutical formulations. In this system, ferroin ($[\text{Fe(II)-(fen)}_2]^{2+}$) in excess, with a strong absorption at 500 nm, is oxidized by cerium(IV) yielding cerium(III) and $[\text{Fe(III)-(fen)}_2]^{3+}$ (colorless), thus producing a baseline. When N-acetyl-L-cysteine solution is introduced into the flow injection system, it reacts with cerium(IV) increasing the analytical signal in proportion to the drug concentration. Under optimal experimental conditions, the linearity of the analytical curve for N-acetyl-L-cysteine ranged from 6.5×10^{-6} to 1.3×10^{-4} mol L⁻¹. The detection limit was 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ and recoveries between 98.0 and 106% were obtained. The sampling frequency was 60 determinations per hour and the RSD was smaller than 1.4% for 2.2×10^{-5} mol L⁻¹ N-acetyl-L-cysteine.

Keywords: N-acetyl-L-cysteine; flow injection spectrophotometry; pharmaceutical formulations.

INTRODUÇÃO

N-acetil-L-cisteína (Acetilcisteína) é usada como agente mucolítico e em casos de superdosagem de paracetamol. Ademais, essa droga apresenta ação antioxidante e tem sido relatado que a mesma pode contribuir na prevenção de alguns tipos de câncer^{1,2}. A atividade mucolítica¹ é devida a sua ação sobre as mucoproteínas e sua atividade é máxima em valores de pH entre 7 e 9.

Vários métodos são descritos na literatura para sua determinação em formulações farmacêuticas, como titulométricos^{3,5}, espectrofotométricos^{6,7}, voltamétrico de redissolução⁸, amperométrico⁹, fluorimétrico¹⁰ e quimiluminescente¹¹. Há descritos também procedimentos empregando cromatografia líquida com detecção espectrofotométrica¹², detecção espectrofotométrica na região UV e detector de massa acoplado¹³ e amperométrica¹⁴.

Apenas dois trabalhos empregando sistemas de análise por injeção em fluxo para a determinação de acetilcisteína em formulações farmacêuticas foram descritos.

Sánchez-Pedreño *et al.*¹⁵ propuseram dois sistemas de análise por injeção em fluxo de linha única, com detecção espectrofotométrica, baseados na reação de complexação entre N-acetil-L-cisteína e o íon paládio(II), sendo o produto formado monitorado em 380 nm. A diferença entre esses dois procedimentos propostos está na forma de medida do sinal analítico. Um procedimento consiste na medida da altura do sinal transiente e o outro, na medida da largura do sinal transiente.

Um sistema de análise por injeção em fluxo para determinação indireta de N-acetil-L-cisteína baseado na detecção potenciométrica do íon iodeto produzido na reação de oxidação do analito por um fluxo de solução de iodo (I₂) foi proposto, utilizando um eletrodo de prata modificado para detecção do íon iodeto¹⁶.

Solução de Cério(IV) como reagente oxidante forte tem sido empregada na determinação de produtos farmacêuticos em análise por injeção em fluxo com detecção biampométrica¹⁷ e quimiluminescentes^{18,19}. Ademais, Cério(IV) tem sido determinado espectrofotometricamente empregando reagentes cromogênicos

(*eg.* Arsenazo²⁰ e Leuco Xileno Cianol²¹). No entanto, aumento da temperatura reacional e/ou extração com solventes orgânicos são normalmente requeridos nesses procedimentos.

Desenvolveu-se nesse trabalho um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica para a determinação indireta de acetilcisteína em formulações farmacêuticas, empregando solução de Cério(IV) como reagente oxidante e ferroína como reagente cromogênico.

PARTE EXPERIMENTAL

Equipamentos

Um diagrama do sistema de análise por injeção em fluxo é mostrado na Figura 1. Um espectrofotômetro FEMTO modelo 435 (São Paulo, Brasil) equipado com uma cela de fluxo de vidro de 1,00 cm foi usado para a detecção do complexo Fe(II)-ferroína em 500 nm. Os sinais transientes foram obtidos com um registra-

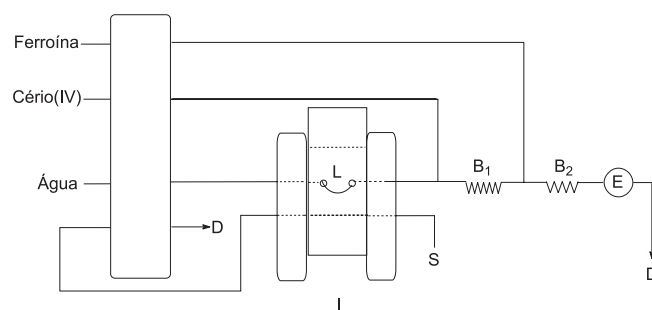


Figura 1. Diagrama de fluxo utilizado para a determinação espectrofotométrica de N-acetil-L-cisteína. BP, bomba peristáltica; I, injetor; Solução transportadora (H₂O) com vazão de 1,7 mL min⁻¹; L, alça de amostragem da solução de referência ou de amostra de 70 cm (350 µL); S, soluções de referência ou de amostra; B₁ e B₂, bobina helicoidal (ambas com 60 cm); Solução de sulfato de Cério ($6,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em H₂SO₄, $4,3 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) a 0,9 mL min⁻¹; Solução de ferroína ($2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) a 0,7 mL min⁻¹; E, espectrofotômetro ($\lambda = 500$ nm) e D, descarte

*e-mail: bello@dq.ufscar.br

dor Cole-Parmer (Chicago, IL, USA) modelo 1202-0000 de dois canais. As soluções foram propulsionadas empregando-se uma bomba peristáltica de 12 canais Ismatec (Zurique, Suíça) modelo IPC-12 e tubos de propulsão de Tygon® de diferentes diâmetros internos. As vazões de cada solução foram modificadas alterando-se o diâmetro interno de cada tubo de propulsão. As injeções das soluções de referência e de amostras foram realizadas com uso de um injetor-comutador²² tipo 2-3-2 construído de Perspex®. O sistema foi construído utilizando tubos de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno.

Titulações potenciométricas das amostras foram realizadas empregando-se um eletrodo de fio de ouro como indicador e um eletrodo de calomelano saturado Cole Parmer, modelo A-05990-50 como referência, como recomendado pela Farmacopéia Brasileira⁴.

Reagentes e soluções

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico e todas as soluções foram preparadas com água desionizada obtida de um sistema Milli-Q Millipore (Bedford, MA), modelo UV Plus ultra-baixo teor de substâncias orgânicas dissolvidas.

A solução estoque de N-acetil-L-cisteína $8,2 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se 666,0 mg do composto (Sigma) em um balão volumétrico de 50 mL com água desionizada. Soluções de referência de N-acetil-L-cisteína contendo de $6,5 \times 10^{-6}$ a $1,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ foram obtidas por diluição apropriada da solução estoque com água desionizada.

Para a determinação de N-acetil-L-cisteína em fluxo, preparou-se uma solução estoque de sulfato de Cério (IV) $1,1 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ dissolvendo-se 364,0 mg desse reagente (Sigma) em um balão volumétrico de 100 mL com solução de ácido sulfúrico 0,11 mol L⁻¹. A solução de trabalho foi obtida diluindo-se 6 mL da solução estoque em um balão volumétrico de 100 mL, com 4,0 mL de solução de ácido sulfúrico 0,9 mol L⁻¹ e água desionizada.

A solução de ferroína $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (Vetec, São Paulo) foi preparada diluindo-se 1,0 mL do reagente em um balão volumétrico de 100 mL com água desionizada.

Preparações das amostras

Para as amostras sólidas, os conteúdos de cinco envelopes foram pesados e pulverizados com o auxílio de um almofariz e pistilo. Uma massa exatamente pesada ou alíquotas de solução foram diluídas em balões volumétricos de 100 mL com água desionizada. As concentrações das soluções das amostras obtidas estavam dentro da faixa linear da curva analítica do procedimento proposto e foram injetadas diretamente com a ajuda do injetor-comutador, sendo as concentrações obtidas por interpolação, empregando-se a curva analítica obtida no mesmo dia de trabalho.

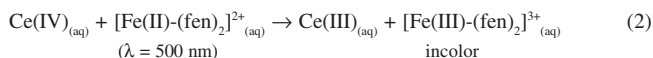
Procedimento comparativo

Como procedimento comparativo empregado para validar o procedimento em fluxo proposto, utilizou-se o procedimento volumétrico descrito na Farmacopéia Brasileira⁴, onde a solução de amostra foi titulada potenciométricamente com uma solução padrão de nitrato de mercúrio(II) 0,10 mol L⁻¹, empregando-se eletrodos de fio de ouro e de calomelano saturado, como eletrodos indicador e de referência, respectivamente.

Sistema de análise por injeção em fluxo

O sistema de análise por injeção em fluxo empregado para a

determinação de N-acetil-L-cisteína em formulações farmacêuticas é mostrado na Figura 1. Um volume de 350 µL (alça de 70 cm) da solução de referência ou amostra, contendo N-acetil-L-cisteína (N-acetil-CiSH), foi inserido na solução transportadora (H₂O, 1,7 mL min⁻¹) com ajuda do injetor-comutador. A solução injetada foi transportada até receber por confluência a solução Ce(SO₄)₂ $6,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (R₁) a uma vazão de 0,9 mL min⁻¹, sendo então oxidada ao dissulfeto da acetilcisteína (N-acetil-CiSSN-acetil_(aq)) (reação 1). Em seguida, a zona dispersa recebeu por confluência a solução de ferroína ([Fe(II)-(fen)₂]²⁺) $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (R₂) a uma vazão de 0,7 mL min⁻¹. Como na bobina helicoidal B₁ há uma diminuição da concentração de Cério(IV) proporcionalmente ao aumento da concentração de N-acetil-L-cisteína (reação 1) origina-se, assim, um sinal transiente devido ao excesso de ferroína (reação 2), que é então monitorada espectrofotometricamente em 500 nm.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

O procedimento em fluxo proposto baseia-se na oxidação da N-acetil-L-cisteína com Cério(IV). O Cério(IV) reage com uma solução de ferroína (complexo Fe(II)-fenantrolina) em excesso que é monitorada espectrofotometricamente em 500 nm sendo, então, o sinal analítico obtido proporcional à concentração de N-acetil-L-cisteína na amostra. Para otimizar o sistema proposto, investigaram-se os parâmetros químicos e físicos do sistema em fluxo empregando-se o método univariado, visando sempre a obtenção de maior sensibilidade e alta frequência analítica.

Efeito da concentração dos reagentes

Inicialmente foi avaliado o efeito da concentração de ácido sulfúrico de $1,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹ sobre o sinal analítico de uma solução de N-acetil-L-cisteína $1,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Verificou-se que o aumento da concentração desse ácido ocasionava um decréscimo acentuado e contínuo do sinal analítico. Selecionou-se uma solução de ácido sulfúrico $4,3 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ para os demais experimentos, uma vez que em concentrações menores desse ácido verificava-se a hidrólise da solução de Cério(IV).

O efeito da concentração da solução de Cério(IV) sobre o sinal analítico foi avaliado de $5,5 \times 10^{-4}$ a $1,9 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, em solução de H₂SO₄ $4,3 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, injetando-se um volume de 350 µL de solução de N-acetil-L-cisteína $4,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Verificou-se que o sinal analítico diminuiu com o aumento da concentração da solução de sulfato de Cério, devido à elevação da absorvância da linha de base. Então, considerando o aumento do sinal analítico e a economia de reagente, além da estabilidade da linha de base, selecionou-se a concentração de $6,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de solução de Cério(IV) para os demais experimentos.

O efeito da concentração da solução de ferroína sobre o sinal analítico de uma solução de N-acetil-L-cisteína $4,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ foi avaliado de $2,0 \times 10^{-4}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Houve um aumento linear do sinal analítico com o aumento da concentração da solução de ferroína. Selecionou-se a concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, levando-se em consideração o menor consumo do reagente, pois com essa concentração obteve-se uma absorvância que não comprometeu o desempenho analítico do sistema em fluxo proposto. Essas concentrações das soluções de reagentes selecionadas possibilitaram a obtenção de uma absorvância da linha de base em torno de

0,010 e maior linearidade da curva analítica na região de 0,01 a 0,7 de absorbância.

Estudo dos parâmetros do sistema em fluxo

O efeito do volume de amostra de 100 a 500 μL sobre o sinal analítico foi avaliado injetando-se uma solução padrão de N-acetil-L-cisteína $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. O aumento do volume de amostra resultou em um aumento do sinal analítico até o volume de 350 μL . Para volumes de amostras maiores, o sinal analítico permaneceu constante. Considerando-se a magnitude do sinal analítico, o volume da alça de amostragem de 350 μL foi selecionado para os demais experimentos.

Estudou-se o efeito do comprimento da bobina helicoidal B_1 de 50 a 150 cm sobre o sinal analítico, empregando uma solução de referência de N-acetil-L-cisteína $9,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Também foi investigado o efeito do comprimento da bobina helicoidal B_2 entre 65 a 150 cm sobre o sinal analítico, empregando a mesma solução de N-acetil-L-cisteína supramencionada. Verificou-se que não havia uma variação significativa do sinal analítico para esses comprimentos de bobinas avaliados, provavelmente devido à reação rápida (alta velocidade reacional) entre Cério(IV) e N-acetil-L-cisteína e também de Cério(IV) com Fe(II)-ferroína. Então, foi selecionado o comprimento de 60 cm para ambas as bobinas reacionais.

Os efeitos das vazões da solução transportadora e dos reagentes sobre o sinal analítico foram avaliados injetando-se 350 μL de solução de N-acetil-L-cisteína $5,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A vazão de cada solução foi controlada alterando-se o diâmetro interno dos tubos de propulsão de cada solução. Para verificar o efeito da vazão da solução de Cério(IV) entre 0,9 a 2,2 mL min^{-1} , fixaram-se as vazões da solução transportadora em 1,7 mL min^{-1} e da solução do complexo Fe(II)-ferroína em 1,1 mL min^{-1} . A vazão da solução que apresentou maior sinal analítico foi 0,9 mL min^{-1} . Selecionou-se, assim, a vazão de 0,9 mL min^{-1} para os demais experimentos. A vazão da solução de ferroína $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi avaliada entre 0,7 a 2,2 mL min^{-1} com a vazão da solução transportadora e da solução de Cério(IV) $6,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ constante em 2,2 e 0,9 mL min^{-1} , respectivamente. Verificou-se, dessa maneira, um aumento constante do sinal analítico com o aumento da vazão da solução de ferroína. Entretanto, considerando a estabilidade da linha de base, selecionou-se a vazão de 0,7 mL min^{-1} para os demais experimentos.

Finalmente, mantendo-se as vazões de Cério(IV) e de ferroína nas condições otimizadas, verificou-se o efeito da vazão da solução transportadora sobre o sinal analítico entre 1,1 a 2,2 mL min^{-1} . O maior sinal analítico foi obtido com uma vazão de 1,7 mL min^{-1} .

Estudo da seletividade e da recuperação de N-acetil-L-cisteína nas amostras

A seletividade do procedimento proposto foi determinada pelo estudo do efeito de excipientes, geralmente encontrados nas formulações farmacêuticas, pela comparação da resposta produzida por uma solução padrão de N-acetil-L-cisteína $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com aquela produzida por uma solução de N-acetil-L-cisteína juntamente com o interferente em potencial avaliado. A concentração tolerada do interferente foi aquela que promoveu uma variação do sinal transiente obtido não superior a $\pm 5\%$ (erro geralmente tolerado em análises farmacêuticas), quando comparado ao sinal transiente obtido da solução de referência. Dos possíveis interferentes estudados, indicados na Tabela 1, apenas o ácido cítrico causou uma interferência significativa, o que dificulta a determinação de N-acetil-L-cisteína em formulações farmacêuticas que contêm essa substância, geralmente produtos efervescentes e xaropes. Outros exci-

pientes como EDTA, cloreto de benzalcônio, sacarina e polivinilpirrolidona, que apresentaram percentagem de erros em torno de 5%, não interferem no procedimento proposto, uma vez que as concentrações empregadas nesse estudo estão acima daquelas encontradas nesses produtos farmacêuticos.

Tabela 1. Concentrações toleradas de alguns excipientes presentes nas formulações farmacêuticas na determinação de solução de N-acetil-L-cisteína

Interferente	Concentração tolerada/mol L ⁻¹	Erro/%
EDTA	$4,12 \times 10^{-4}$	4,8
Sacarose	$4,8 \times 10^{-3}$	-3,5
Cloreto de benzalcônio ^a	0,17	5,0
Sacarina	$5,3 \times 10^{-4}$	4,5
Acessulfame – K	$1,3 \times 10^{-3}$	-3,2
Polivinilpirrolidona ^a	$5,2 \times 10^{-3}$	4,7
Carbonato de sódio	$4,3 \times 10^{-3}$	2,5
Ácido cítrico	$1,4 \times 10^{-6}$	5,1

^a % m/v; concentração de N-acetil-L-cisteína $3,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Recuperações variando de 98 a 106% de N-acetil-L-cisteína para as amostras disponíveis no mercado local foram obtidas usando o procedimento em fluxo proposto (Tabela 2). Neste estudo, concentrações de soluções de referência de N-acetil-L-cisteína de $1,5 \times 10^{-5}$, $2,2 \times 10^{-5}$ e $2,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionadas a soluções de cada amostra e o resultado obtido foi comparado com a solução sem adição da solução de referência de N-acetil-L-cisteína. Pelos resultados obtidos, verificou-se que a matriz das amostras estudadas não causou interferência significativa no procedimento desenvolvido.

Tabela 2. Estudo de adição e recuperação de N-acetil-L-cisteína em amostras farmacêuticas

Amostras	Adicionado ($10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$)	Encontrado* ($10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
A	1,46	$1,52 \pm 0,04$	104
	2,18	$2,29 \pm 0,08$	105
	2,91	$3,09 \pm 0,05$	106
B	1,46	$1,50 \pm 0,10$	103
	2,18	$2,24 \pm 0,04$	103
	2,91	$3,08 \pm 0,05$	106
C	1,46	$1,43 \pm 0,02$	98
	2,18	$2,18 \pm 0,06$	100
	2,91	$3,03 \pm 0,04$	104

*n=3; média \pm desvio-padrão.

Curva analítica e aplicação

Para o sistema de análise por injeção em fluxo em condições otimizadas, a curva analítica foi linear na faixa de concentração de N-acetil-L-cisteína de $6,5 \times 10^{-6}$ a $1,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e pode ser descrita pela equação $A = 0,049 + 5.142,17 \times C$, onde A é absorbância e C, a concentração de N-acetil-L-cisteína em mol L^{-1} . O procedimento proposto apresentou um limite de detecção de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (3 vezes o desvio-padrão do branco/inclinação da curva analítica). O desvio padrão relativo para uma concentração de $2,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foi menor que 1,4% (n=10). O sistema proposto apresentou uma frequência de amostragem de 60 h^{-1} .

O sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica proposto foi aplicado na determinação de N-acetil-L-cisteína nas formulações farmacêuticas (sólidas e líquidas) disponíveis no mercado local (São Carlos – SP).

Os resultados das análises das amostras empregando o sistema proposto, bem como aqueles obtidos utilizando o método comparativo⁴ são apresentados na Tabela 3. Aplicando-se o teste-*t* pareado para os resultados obtidos utilizando os dois métodos, verificou-se que não há diferença significativa entre os resultados encontrados a um nível de 95% de confiança, indicando a exatidão do procedimento em fluxo desenvolvido.

Tabela 3. Determinação de N-acetil-L-cisteína em formulações farmacêuticas empregando o sistema em fluxo proposto e procedimento comparativo⁴

Amostras	N-acetil-L-cisteína mg/g			Erro(%)
	Rotulado	Comparativo*	FIA*	
A	20	20 ± 1	19,7 ± 0,8	-1,6
B	20	19,2 ± 0,9	20,4 ± 0,9	1,8
C	40	41 ± 2	40,9 ± 0,5	-0,2

*n=3; média ± desvio-padrão.

CONCLUSÕES

O sistema de análise por injeção em fluxo proposto é simples e permite a determinação de N-acetil-L-cisteína em formulações farmacêuticas com alta frequência analítica, quando comparado com os procedimentos em fluxo descritos na literatura^{15,16}. A determinação foi realizada em produtos farmacêuticos disponibilizados na forma granulada, pois em produtos efervescentes e xaropes contendo ácido cítrico, em concentração superior àquela tolerada (Tabela 1), a interferência desse excipiente foi um fator limitante. O sistema em fluxo proposto permitiu a detecção espectrofotométrica indireta desse fármaco sem a necessidade de uso de Arsenazo I, reagente cromogênico à base de arsênio para a detecção de Cério(IV), ou equipamentos de alto custo. Ademais, contorna o

problema existente nos procedimentos analíticos com detecção espectrofotométrica na região do ultra-violeta¹⁵, onde substâncias excipientes podem interferir de maneira significativa, exigindo o emprego de técnicas de separação, como a cromatografia líquida¹².

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do CNPq, da FAPESP e CAPES, bem como a bolsa de doutorado de H. J.Vieira (CAPES).

REFERÊNCIAS

- Goodman, L. S.; Gilman, A.; *Bases Farmacológicas de la Terapêutica*, 4ª ed., Interamericana: New York, 1974, p. 822.
- Estenden, R. D.; Levy, M.; Klopp, S. J.; *Cancer Lett.* **1999**, *147*, 109.
- Verma, K. K.; *Talanta* **1979**, *26*, 277.
- Farmacopéia Brasileira*, 3ª ed., Organização Andrei Editora: São Paulo, 1977, p. 71-72.
- Viñas, P.; Córdoba, M. H.; Sánchez-Pedreño, C.; *Analyst* **1990**, *115*, 757.
- Alvarez-Coque, M. C.; Medina-Hernández, M. J.; Villanueva-Camañas, R. M.; Fernández, C. M.; *Analyst* **1989**, *114*, 975.
- Raggi, M. A.; Cavrini, V.; Di Pietra, A. M.; *J. Pharm. Sc.* **1982**, *12*, 1384.
- Banica, F. G.; Moreira, J. C.; Fogg, A. G.; *Analyst* **1994**, *119*, 309.
- Inoue, T.; Kirchhoff, J. R.; *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5755.
- Al-Ghannam, Sh.M.; El-Brashy, A.M.; Al-Farhan, B.S.; *Farmaco* **2002**, *57*, 625.
- Du, J.; Li, Y.; Lu, J.; *Anal. Chim. Acta* **2001**, *448*, 79.
- United States Pharmacopeia; *The National Formulary XXII*, US Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD, 1985, p. 27.
- Toussaint, B.; Pitti, Ch.; Strel, B.; Ceccato, A.; Hubert, Ph.; Crommen, J.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *896*, 191.
- Rabenstein, D. L.; Saetre, R.; *Anal. Chem.* **1977**, *49*, 1036.
- Sánchez-Pedreño, C.; Albero, M. I.; García, M. S.; Rodenas, V.; *Analyst* **1992**, *117*, 925.
- Kolar, M.; Dobcnik, D.; *Pharmazie* **2003**, *58*, 25.
- Gálvez, A. M.; Mateo, J. V. G.; Martínez-Calatayud, J.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *396*, 161.
- Ouyang, J.; Baeyens, W. R.G.; Delanghe, J.; Van der weken, G.; Calokerinos, A. C.; *Talanta* **1998**, *46*, 961.
- Capitán-Vallvey, L. F.; Mirón, M. C. V.; Acosta, R. A.; *Talanta* **2000**, *51*, 1155.
- Ueno, K.; Imamura, T.; Cheng, L.; *Handbook of Organic Analytical Reagents*, 2nd ed., CRC Press: London, 1992.
- Revanasiddappa, H. D.; Kumar, T. N. K.; *Anal. Sci.* **2002**, *18*, 1275.
- Reis, B. F.; Bergamin-Filho, H.; *Quim. Nova* **1993**, *16*, 570.