

Chem. Listy 91, 487 - 490 (1997)

VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ZÓNOVÉ ELEKTROFORÉZY PRO ANALYTICKÉ HODNOCENÍ OPIOVÉ TINKTURY

IVAN JELÍNEK^a, BOHUSLAV GAŠ^b,
IVA ZUSKOVA^b, EVA NIKLÍČKOVÁ^c a IVAN BUBEN^c

^aKatedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 40 Praha 2, E-mail: Jelínek@prfdec.natur.cuni.cz, ^bKatedra fyzikální a makromolekulární chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 40 Praha 2, ^cStátní ústav pro kontrolu léčiv, Šrobárova 48, 100 41 Praha 10

Došlo dne 22. I. 1997

Úvod

Opiová tinktura je jedním z nejstarších známých farmaceutických preparátů používaných v humánní medicíně^{1,2}. Nutnost znalosti obsahu alkaloidů ve vlastním preparátu velmi záhy stimulovala vývoj analytických technik vhodných pro jejich stanovení. Nejstarší popsaná gravimetrická metoda je založena na extrakci morfinu do organické fáze a následném vážení odparku extraktu³. Je překvapující, že se tento původní, relativně primitivní způsob analytického hodnocení udržel v evropských lékopisech až do sedmdesátých let tohoto století⁴.

Intenzivní vývoj v oblasti separačních technik zcela změnil analytický přístup k hodnocení alkaloidů ve směsích. V současnosti je v moderních evropských lékopisech doporučována jako standardní metoda pro hodnocení obsahu majoritních alkaloidů obsažených v opiové tinktuře vysokoúčinná kapalinová chromatografie⁵ (HPLC). Charakteristické pro většinu analytických postupů využívajících HPLC je dosti složitá a pracná předúprava vzorku opiové tinktury s cílem redukovat spektrum látek dávko- vaných na kolonu a zjednodušit tak získaný chromatogram.

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je díky své obecně vysoké separační účinnosti úspěšně používána pro ana-

lytické hodnocení biologicky aktivních látek s nábojem v komplexních matricích, většinou bez zvláštních nároků na předúpravu vzorku. Pro účely separace nejrůznějších typů alkaloidů byla CZE úspěšně aplikována v módu tzv. micelární elektrokinetické chromatografie s využitím anionogenních tenzidů⁶. I přes publikované uspokojivé výsledky separace modelových směsí morfinu a jeho derivátů nebyla v literatuře doposud popsána aplikace CZE na hodnocení obsahu alkaloidů přímo ve vzorku opiové tinktury.

Cílem předkládané práce je studium možností využití CZE pro analytické hodnocení obsahu morfinu, kodeinu, thebainu a papaverinu ve vzorku opiové tinktury. V rámci optimalizace separace je sledován vliv přídavku neionogenních strukturních selektorů typu β -cyklodextrinu (P-CD), heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -cyklodextrinu (diMe- β -CD) a anionogenního 2-O-karboxymethyl- β -cyklodextrinu (CM- β -CD) do nosného elektrolytu.

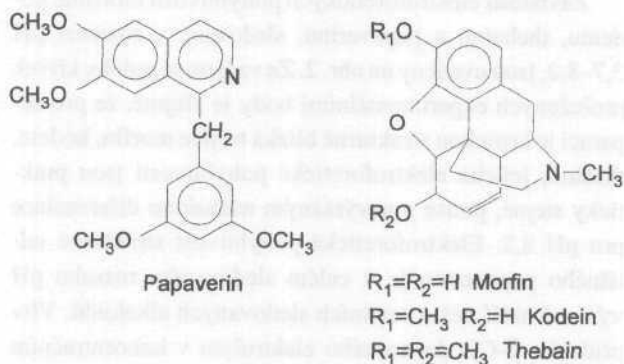
Pokusná část

Použité přístroje a chemikálie

Měření byla provedena na přístroji Crystal CE system fy ATI Unicam (Velká Británie) vybaveného UV detektorem Unicam 4225.

Chemikálie použité pro přípravu roztoků nosných elektrolytů byly čistoty p.a. fy Aldrich (USA). Složení roztoků je uvedeno v tabulce I.

Strukturní vzorce čtyř analyzovaných opiových alka-



Obr. 1. Strukturní vzorce a názvy analyzovaných alkaloidů

Tabulka I

Složení roztoků nosných elektrolytů (koncentrace všech složek byla 30 mmol.l⁻¹)

Složka 1	Složka 2	Aditivum	pH
Asparagová kyselina	β-alanin	β-CD, DiMe-β-CD, CM-β-CD (2–10 mmol.l ⁻¹)	3,7
Pivalová kyselina	Hexamylentetramin	–	5,1
4-morfolinoethansulfonová kyselina	Histidin	–	6,2
N[tris(hydroxymethyl)methyl]glycin	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	–	8,2

loidů jsou uvedeny na obr. 1. Zásobní roztoky standardů opiových alkaloidů byly připraveny rozpuštěním 100 mg substance chloridu morfinia, dihydrogenfosforečnanu kodeinia (seskvihydrát), chloridu thebainia a fosforečnanu papaverinia (Slovakofarma Hlohovec, Slovenská republika) ve 100 ml deionizované vody.

Zásobní roztok vzorku opiové tinktury (Slovakofarma Hlohovec, Slovenská republika) byl připraven rozpuštěním 0,4 g opiové tinktury ve 100 ml deionizované vody.

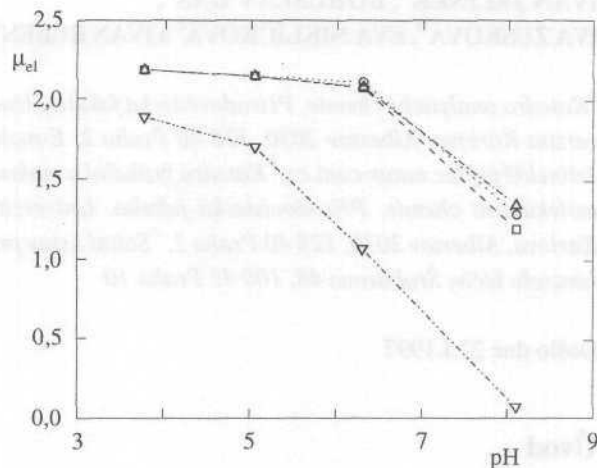
Pro určování rychlosti elektroosmotického toku byl použit vodný roztok řhiomočoviny (p.a. Lachema, Česká republika) o koncentraci 30 mmol.l⁻¹.

Podmínky měření

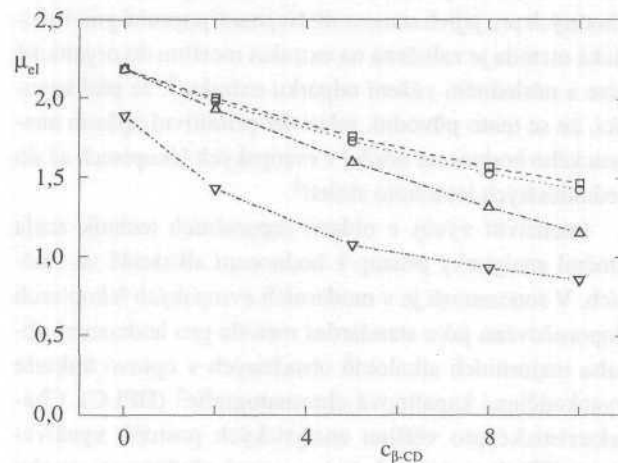
Měření v jednotlivých systémech byla prováděna za podmínek: křemenná kapilára 75 μm x 60 cm (k detektoru), 77 cm (celková), teplota termostatu 30 °C, tlakové dávkování 1 000 Pa/6 s, napětí 25 kV, UV detekce $X = 280$ nm.

Výsledky a diskuse

Závislosti elektroforetických pohyblivostí morfinu, kodeinu, thebainu a papaverinu, sledované v rozmezí pH 3,7–8,2, jsou uvedeny na obr. 2. Ze vzájemné polohy křivek proložených experimentálními body je zřejmé, že pro separaci je kritickou strukturně blízká trojice morfin, kodein, thebain, jejichž elektroforetické pohyblivosti jsou prakticky stejné, pouze s nevýrazným náznakem diferenciaci pro pH 8,2. Elektroforetická pohyblivost strukturně odlišného papaverinu je v celém sledovaném rozsahu pH výrazně nižší než u ostatních sledovaných alkaloidů. Vliv přidavku β-CD do nosného elektrolytu v koncentračním rozmezí 2–10 mmol.l⁻¹ na elektroforetickou pohyblivost sledovaných alkaloidů je dokumentován na obr. 3. Výrazný

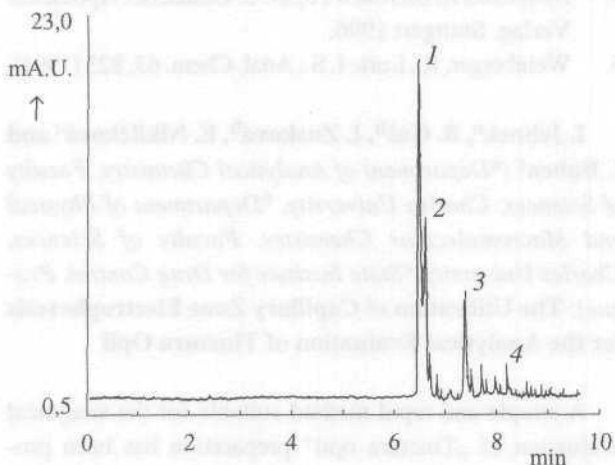


Obr. 2. Závislost elektroforetické pohyblivosti μ_{el} ($10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) morfinu (□), kodeinu (○), thebainu (A) a papaverinu (V) na pH



Obr. 3. Závislost elektroforetické pohyblivosti μ_{el} ($10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) morfinu (□), kodeinu (○), thebainu (A) a papaverinu (V) na koncentraci P-CD (mmol.l⁻¹) v elektrolytovém systému o pH 3,7

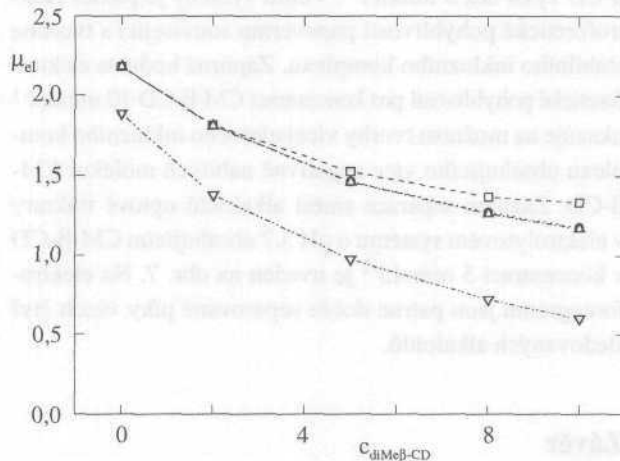
pokles elektroforetických pohyblivostí u všech sledovaných látek potvrzuje tvorbu stabilních inkluzních komplexů. S rostoucí koncentrací β -CD v nosném elektrolytu dochází k výrazné diferenciaci elektroforetických pohyblivostí kodeinu a thebainu, rozdíl pohyblivostí morfinu a kodeinu zůstává i pro nejvyšší použitou koncentraci β -CD poměrně malý. Elektroforeogram dokumentující kvalitu separace složek reálného vzorku opiové tinktury v elektrolytovém systému o pH 3,7 s přidávkem β -CD (10 mmol.l^{-1}) je uveden na obr. 4. Na záznamu jsou patrné



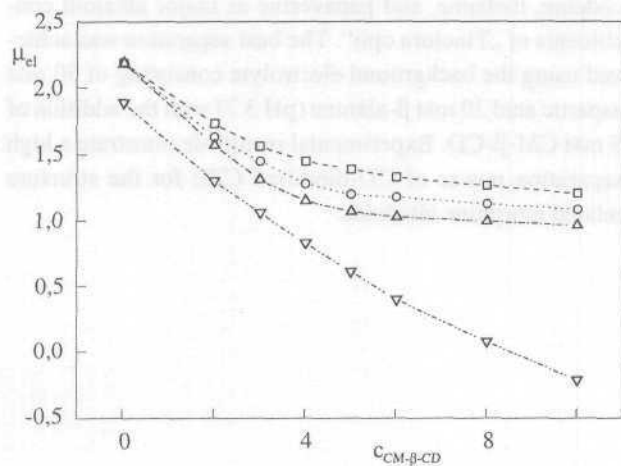
Obr. 4. Záznam separace složek opiové tinktury v elektrolytovém systému o pH 3,7 s přidávkem β -CD (10 mmol.l^{-1}); 1 - morfin, 2 - kodein, 3 - thebain, 4 - papaverin

částečně se překrývající píky morfinu a kodeinu a zcela oddělené píky thebainu a papaverinu.

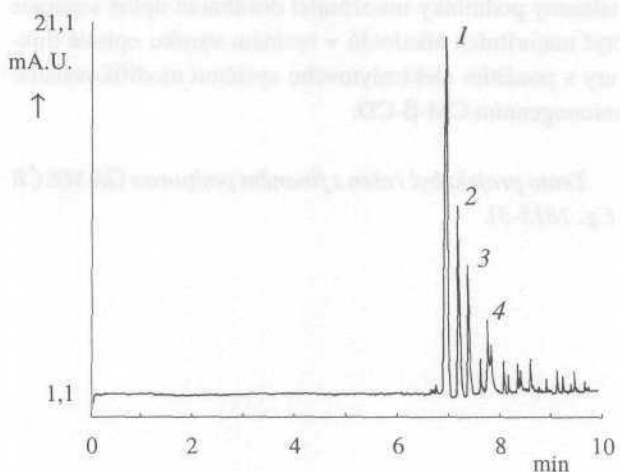
Přídavek diMe- β -CD do nosného elektrolytu vede ještě k výraznější retardaci všech sledovaných alkaloidů. Závislosti jejich elektroforetických pohyblivostí na koncentraci diMe- β -CD jsou uvedeny na obr. 5. Z uvedených křivek je zřejmé, že s rostoucí koncentrací diMe- β -CD výrazně roste rozdíl elektroforetických pohyblivostí morfinu a kodeinu, pro celý rozsah sledovaných koncentrací diMe- β -CD však nedochází k diferenciaci kodeinu od thebainu.



Obr. 5. Závislost elektroforetické pohyblivosti μ_{el} ($10^4 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) morfinu (□), kodeinu (○), thebainu (▲) a papaverinu (▼) na koncentraci diMe- β -CD (mmol.l^{-1}) v elektrolytovém systému o pH 3,7



Obr. 6. Závislost elektroforetické pohyblivosti μ_{el} ($10^4 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) morfinu (□), kodeinu (○), thebainu (▲) a papaverinu (▼) na koncentraci CM- β -CD (mmol.l^{-1}) v elektrolytovém systému o pH 3,7



Obr. 7. Záznam separace složek opiové tinktury v elektrolytovém systému o pH 3,7 s přidávkem CM-P-CD (5 mmol.l^{-1}); 1 - morfin, 2 - kodein, 3 - thebain, 4 - papaverin

Z hlediska možnosti dosažení úplné separace všech čtyř sledovaných alkaloidů je nejzajímavější vliv anionogenního CM-p-CD. Z tvaru a vzájemné polohy křivek závislosti elektroforetických pohyblivostí na koncentraci CM-P-CD v nosném elektrolytu (obr. 6) je zřejmé, že maximální diference elektroforetických pohyblivostí a tedy i optimální separace dvojice morfin a kodein je dosaženo v koncentračním rozmezí 4–6 mmol.l⁻¹, pro koncentrace vyšší se rozdíl elektroforetických pohyblivostí obou látek opět zmenšuje. Diference elektroforetických pohyblivostí kodeinu a thebainu zůstává prakticky konstantní pro koncentrace CM-P-CD vyšší než 5 mmol.l⁻¹. Velmi výrazný je pokles elektroforetické pohyblivosti papaverinu související s tvorbou stabilního inkluzního komplexu. Záporná hodnota elektroforetické pohyblivosti pro koncentraci CM-P-CD 10 mmol.l⁻¹ ukazuje na možnost tvorby vícejaderného inkluzního komplexu obsahujícího více negativně nabitých molekul CM-p-CD. Záznam separace směsi alkaloidů opiové tinktury v elektrolytovém systému o pH 3,7 obsahujícím CM-P-CD v koncentraci 5 mmol.l⁻¹ je uveden na obr. 7. Na elektroforeogramu jsou patrné dobře separované píky všech čtyř sledovaných alkaloidů.

Závěr

Získané experimentální výsledky dokumentují možnost separace čtyř majoritních opiových alkaloidů metodou kapilární elektroforézy v elektrolytových systémech modifikovaných p-CD a jeho syntetickými deriváty. Byly nalezeny podmínky umožňující dosáhnout úplné separace čtyř majoritních alkaloidů v reálném vzorku opiové tinktury s použitím elektrolytového systému modifikovaného anionogenním CM-P-CD.

Tento projekt byl řešen s finanční podporou GA MZČR (č. g. 1815-3).

LITERATURA

1. *Lexicon chymico-pharmaceuticum*, str. 400, Johannis Helfrici Jungken, Editio altera, Impenfiz Johannis Ziegeri, Francfurt ad Moenem 1709.
2. *Anleitung zur Untersuchung der Apotheken, vorzüglich aber zur Prüfung der Aechtheit und Gute der Arzneien*, str. 489. Wenzel W. Streinz, Prag 1825.
3. *Výklad ku Farmakopoei rakouské*, str. 329, August Bělohoubek, Editionis VIII-Bursík&Kohout, Praha 1906.
4. *Československý lékopis 3*, str. 1179. Academia, Praha 1970.
5. *Deutsches Arzneibuch 10*, sv. 3. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart 1996.
6. Weinberger, R., Lurie I. S.: *Anal. Chem.* 63, 823 (1991).

I. Jelínek^a, B. Gaš^b, I. Zusková^b, E. Nikličková^c and I. Buben^c (^aDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, Charles University, ^bDepartment of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Sciences, Charles University, ^cState Institute for Drug Control, Prague): **The Utilization of Capillary Zone Electrophoresis for the Analytical Evaluation of Tinctura Opii**

A simple and rapid method suitable for the analytical evaluation of „Tinctura opii” preparation has been proposed. Optimization of the conditions for capillary zone electrophoresis (CZE) was based mainly on the evaluation of the influence of β -cyclodextrin (P-CD) and its synthetic derivatives dimethyl- β -cyclodextrin and carboxymethyl- β -cyclodextrin (CM-p-CD) on the separation of morphine, codeine, thebaine, and papaverine as major alkaloid constituents of „Tinctura opii”. The best separation was achieved using the background electrolyte consisting of 30 mM aspartic acid 30 mM β -alanine (pH 3.7) with the addition of 5 mM CM-P-CD. Experimental results demonstrate a high separation power of CD-modified CZE for the structure related morphine alkaloids.