

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Chem. Listy 91, 369 - 372 (1997)

VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ZÓNOVÉ ELEKTROFORÉZY PRO ANALYTICKÉ HODNOCENÍ VYBRANÝCH DERIVÁTŮ AKRIDINU

IVA KOŠŤÁLOVÁ^a, IVAN JELÍNEK^a,
NAĎA ZIMOVÁ^a a JACQUES BARBE^b

^aKatedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 40 Praha 2, ^bGerctop Vra CNRS 1411, Faculté de Pharmacie, 27, bd Jean-Moulin, 133 85 Marseille Cedex 5

Došlo dne 1.XII.1996

Úvod

Deriváty akridinu patří do skupiny farmaceuticky významných chemoterapeutik, u nichž byl prokázán antibakteriální, antimykotický a antimalarický účinek. Jsou úspěšně používány v humánní i veterinární medicíně pro léčbu onemocnění, jejichž původcem jsou protozoa, konkrétně *Trypanosoma species*, *Leishmania species*, *Trypanosoma cruzi* a *Plasmodium falciparum*^{1,2}.

Z chemického hlediska se jedná o látky odvozené od struktury dibenzopyridinu, nesoucí ve své molekule minimálně jeden dusíkový atom jako součást aromatického cyklu. Vlastní akridin se chová ve vodném roztoku jako slabá báze ($pK_b = 8,4$). Zachování bazických vlastností je možno předpokládat i u syntetických derivátů a jejich degradačních produktů, s jen nevýraznou změnou disociační konstanty danou povahou a polohou substituentů³.

Pro zkoušky totožnosti a kontrolu čistoty substancí derivátů akridinu je standardně využívána a doporučována technika vysokoúčinné kapalinové chromatografie⁴. Díky zmíněné bazicitě těchto látek je však možno předpokládat i úspěšnou aplikaci elektromigračních

metod, zejména kapilární zónové elektroforézy (CZE). Tato moderní technika se v současnosti velmi dobře uplatňuje jako alternativní metoda při analýzách farmaceuticky významných látek⁵⁻⁶. Přes množství publikovaných aplikací CZE s farmaceutickým zaměřením se v literatuře konkrétní odkaz na analýzu akridinu a jeho derivátů doposud neobjevil.

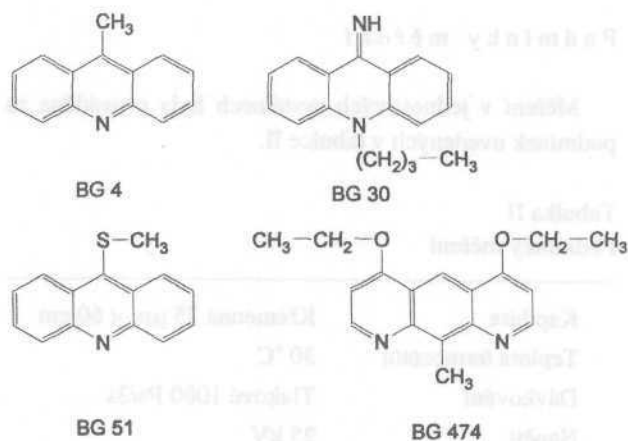
Předmětem tohoto sdělení je optimalizace separace nově syntetizovaných derivátů akridinu pomocí kapilární elektroforézy a posouzení možnosti uplatnění techniky CZE pro kontrolu totožnosti a čistoty připravených substancí.

Pokusná část

Použití 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.



Obr. 1. Strukturální vzorce a kódová označení analyzovaných derivátů akridinu

Tabulka I

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

Složka 1	Složka 2	pH
Asparagová kyselina	β-alanin	3,73
Octová kyselina	6-aminokapronová kyselina	4,52
4-Morfolinoethansulfonová kyselina	Histidin	6,15
N[tris(hydroxymethyl)-methyl]glycin	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	8,24

Strukturální vzorce a kódová označení čtyř analyzovaných derivátů akridinu, syntetizovaných na farmaceutické fakultě v Marseille (Francie), jsou uvedeny na obr. 1. Zásobní roztoky vzorků analyzovaných látek o koncentraci 0,5 mg.ml⁻¹ byly připraveny rozpuštěním 1 mg odpovídající substance ve 300 μl 0,1 M-HCl a doplněním deionizovanou vodou na výsledný objem 2 ml. Kalibrační roztoky o koncentracích 0,001; 0,005; 0,025 a 0,125 mg.ml⁻¹ byly připraveny naředěním zásobních roztoků deionizovanou vodou. Modelový vzorek, připravený smísením 0,5 ml zásobních roztoků, obsahoval jednotlivé substance v koncentracích 0,125 mg.ml⁻¹.

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

Podmínky měření

Měření v jednotlivých systémech byla prováděna za podmínek uvedených v tabulce II.

Tabulka II

Podmínky měření

Kapilára	Křemenná 75 μm x 60 cm
Teplota termostatu	30 °C
Dávkování	Tlakové 1000 Pa/3s
Napětí	25 kV
Detekce	UV, λ = 256 nm ^a

^a Absorpční maximum pro všechny sledované deriváty

Zpracování výsledků

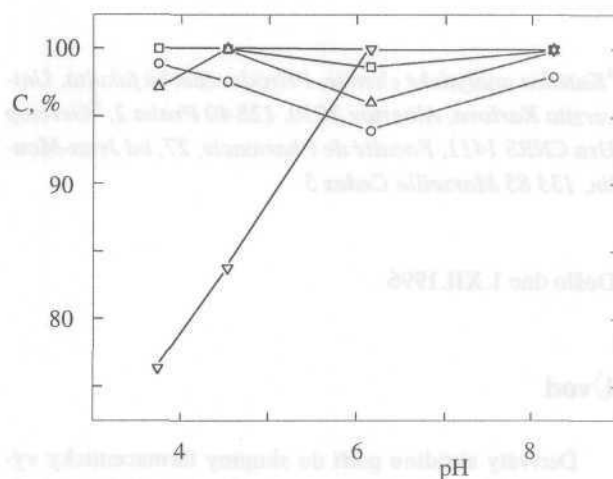
Pro hodnocení čistoty sledovaných substancí byly ze získaných elektroforeogramů odečteny hodnoty migračních časů a plochy píků.

Pro objektivní hodnocení kvality separace sledovaných látek byly vypočteny hodnoty chromatografické optimalizační funkce⁷ tvaru:

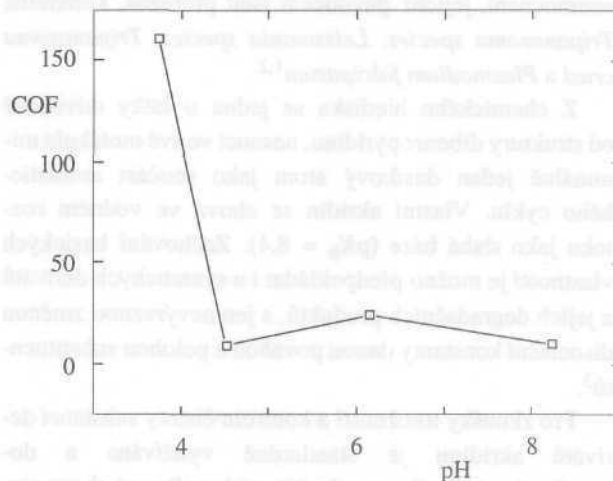
$$COF = \sum \alpha \left(\frac{R_i}{R_0} \right) + \beta (t_{eom} - t_{efmp})$$

R_i – rozlišení

R_0 – standardní rozlišení 100 %



Obr. 2. Závislost vypočtených hodnot procentuálního obsahu látek (C) BG 4 □, BG 30 ○, BG 51 Δ a BG 474 ▽ v substancích na pH použitého nosného elektrolytu



Obr. 3. Závislost hodnot chromatografické optimalizační funkce (COF) pro látky BG 4, BG 30, BG 51 a BG 474 na pH použitého nosného elektrolytu

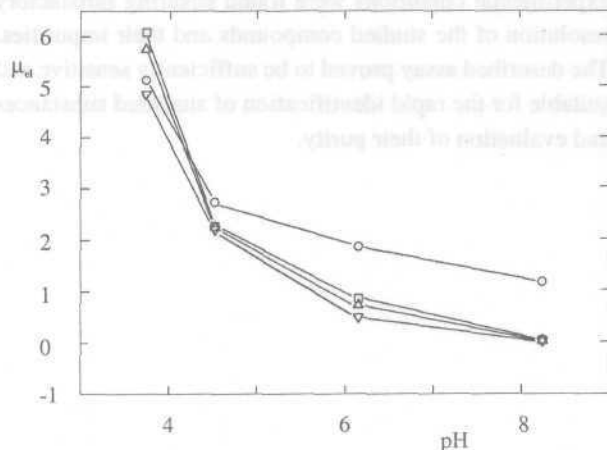
a, (3 - koeficienty významnosti = 1

t_{eom} - elektroosmotická mobilita thiomochoviny

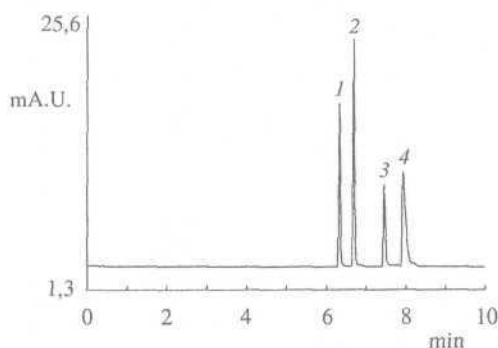
t_{efmp} - elektroforetická mobilita nejpomalejší komponenty směsi

Výsledky a diskuse

Pro určení procentuálního obsahu sledovaných derivátů akridinu v substancích z ploch detegovaných píků byla použita metoda vnitřní normalizace. Hodnoty procentuálních obsahů, vynesené v závislosti na pH nosného elektrolytu, jsou uvedeny na obr. 2. Za optimální je možno považovat nosný elektrolyt zajišťující oddělení maximálního počtu doprovodných nečistot a tím poskytující nejnižší výsledky pro stanovovanou látku. Z průběhu závislosti na



Obr. 4. Závislost elektroforetických pohyblivostí μ_{el} ($10^2 \text{ mm}^2/\text{Vs}$) látek BG 4 □, BG 30 ○, BG 51 △ a BG 474 ▽ na pH použitého nosného elektrolytu



Obr. 5. Záznam separace čtyř derivátů akridinu v elektrolytovém systému o pH 3,75.

1 - BG 4 ($t_m = 6,3$ min); 2 - BG 51 ($t_m = 6,7$ min); 3 - BG 30 ($t_m = 7,4$ min); 4 - BG 474 ($t_m = 8,0$ min)

obr. 2 je zřejmé, že jediný nosný elektrolyt nemůže současně zajistit uspokojivou separaci nečistot ve všech sledovaných substancích. Pro hodnocení čistoty látek BG 4, BG 30 a BG 51 se jako nejvhodnější jeví nosný elektrolyt o pH 6,15, separace nečistot látky BG 474 je optimální v nejkyseljším použitém elektrolytovém systému o pH 3,73. Zjištěné hodnoty minimálního procentuálního obsahu stanovované látky se pro jednotlivé substance dosti liší. Z hlediska čistoty se jako nejproblematictější jeví látka BG 474 obsahující 24 % procent doprovodných látek.

Kritériem pro posouzení kvality vzájemné separace analyzovaných derivátů akridinu v jednotlivých nosných elektrolytech byl průběh závislosti hodnot COF na pH elektrolytového systému (obr. 3). Křivka proložená experimentálními body vykazuje nevýrazné maximum pro pH 6,15 a velmi výrazně roste pro hodnoty $\text{pH} < 4,52$. Průběh závislosti je v souladu s předpokládanou slabě bazickou povahou sledovaných látek. Zhoršující se kvalitu separace v alkalické oblasti je možno vysvětlit rychle klesajícími hodnotami elektroforetických pohyblivostí pro $\text{pH} > 7$ (obr. 4). Lokální maximum pro pH 6 dobře koresponduje s optimální hodnotou pH pro hodnocení čistoty substancí BG 4, BG 30 a BG 51. Elektroforeogram dokumentující uspokojivou separaci všech čtyř sledovaných derivátů akridinu při pH 3,73 je uveden na obr. 5.

Parametry kalibračních závislostí analyzovaných látek (koncentrační rozsah $0,001\text{--}0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, nosný elektrolyt - pH 3,73) jsou uvedeny v tabulce III. Z hodnot koeficientů determinace je zřejmé, že získané závislosti jsou ve sledovaném koncentračním rozsahu lineární. Statisticky nevýznamné úseky na osách pořadnic potvrzují, že stanovení není zatíženo systematickou chybou. Hodnoty poměru signál/šum pro nejnižší měřené koncentrace ukazují na velmi dobrou citlivost metody. Pro všechny čtyři látky je možno předpokládat, že mez stanovitelnosti bude nižší než $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Tabulka III

Parametry kalibračních závislostí analyzovaných látek ($N = 5, \alpha = 0,05$)

Úsek [mA.U.]	0,7±0,9	1,11±1,3	0,3±0,6	0,9±1,1
Směrnice [mA.U. s $\text{mg}^{-1} \text{ ml}$]	277±6	191±8	412±12	375±14
Koef. determinace	0,998	0,996	0,999	0,998
s/n^a ($c = 1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	8,2	5,3	12,7	6,0

^a Poměr signál/šum

Závěr

Práce popisuje metodu stanovení čtyř farmaceuticky významných derivátů akridinu metodou kapilární elektroforézy. Byly nalezeny experimentální podmínky měření zajišťující dobrou separaci vlastních látek a jejich doprovodných nečistot. Navržené stanovení je dostatečně citlivé, vhodné pro identifikaci i hodnocení čistoty analyzovaných substancí. ("Department of Analytical

Tato práce byla podpořena finančními prostředky GA UK143.

LITERATURA

1. Modr Z.: *Remedia* 2, 821(1994).
2. Barbe J.: *Bulletin 1st Acrival Meeting on Chemotherapy of Trypanosomatidae*, pp. 63. Marseille, France 1992. The described assay proved to be sufficiently sensitive and suitable for the rapid identification of analyzed substances and their purity.
3. Kováč J., Kováč Š.: *Organická chemia*. SNTL, Praha 1977 and evaluation of their purity.

4. Jurlina J. L., Paxton J. W.: *J. Chromatogr. BA*, 342, 431 (1985).
5. Altria K. D.: *J. Chromatogr. A*, 735, 43 (1996).
6. Lloyd D. K.: *J. Chromatogr. A*, 735, 29 (1996).
7. Churáček J. a kol.: *Analytická separace látek*. SNTL, Praha 1990.

I. Košťálová^a, I. Jelínek^a, N. Zimová^a and J. Barbe^b
Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, ^bGerctop Ura CNRS 1411, Faculté de Pharmacie, Marseille, France): Utilization of Capillary Zone Electrophoresis for the Analytical Evaluation of Some Acridine Derivatives

The proposed simple method is based on the utilization of capillary zone electrophoresis and is suitable for the analytical evaluation of acridine derivatives. Optimum experimental conditions were found ensuring satisfactory resolution of the studied compounds and their impurities.

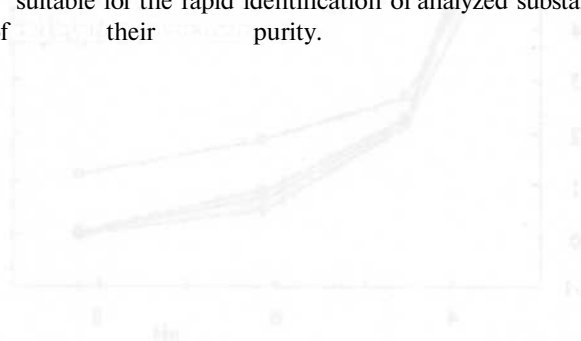


Fig. 1. Dependence of the resolution factor on the applied voltage for the separation of acridine derivatives.



Fig. 2. Chromatogram of the separation of acridine derivatives. The peaks correspond to the compounds: 1 - 6-aminocaproic acid, 2 - 6-aminocaproic acid, 3 - 6-aminocaproic acid, 4 - 6-aminocaproic acid.