

SEPARACE NĚKTERÝCH LOKÁLNÍCH ANESTETIK KAPILÁRNÍ ZÓNOVOU ELEKTROFORÉZOU ZA PŘÍTOMNOSTI POLYETHYLENGLYKOLU

PAVEL ADAMOVSKÝ a ZDENĚK STRÁNSKÝ

Katedra analytické chemie, Univerzita Palackého v Olomouci, Tř. Svobody 8, 771 46 Olomouc
padamovsky@svuol.cz, stransky@prfnw.upol.cz

Došlo 25.7.07, přepracováno 10.4.08, přijato 18.5.08.

Klíčová slova: CZE separace, lokální anestetika, polyethylenglykol

Úvod

Poly(ethylenglykol) (PEG) s vysokou molekulovou hmotností je silný selektor při separaci organických sloučenin, stejně tak jako anorganických iontů. Byly postulovány čtyři základní pochody při separaci v jeho přítomnosti¹:

1. kationizace PEG a tvorba komplexu s anorganickými nebo organickými kationty,
2. distribuce mezi objemnou vodnou fází a PEG pseudofází,
3. vodíková vazba PEG s H-donory,
4. síťový efekt vysokomolekulárního PEG nebo neiontových tenzidů.

První efekt – kationizace a tvorba komplexů podobných crownovým komplexům – se nejvýrazněji uplatňují při separaci kationtů. Tyto pochody byly velmi úspěšně použity při dělení anorganických kationtů izotachoforézou (ITP)² nebo CZE^{3–5}. Vliv PEG je dán uspořádáním PEG řetězce kolem kationtu, podobně jako u crownových komplexů⁶. Tvorba komplexu je založena na principu „kationizace“ etherových atomů kyslíků v polyethylenovém řetězci, jež je již dlouho známa⁷. Tyto produkty s proměnlivou stechiometrií bývají označovány jako pseudocrownové komplexy⁸.

Řetězec poly(ethylenglykolu) tvoří smyčky kolem kationtu kovu podle jeho velikosti⁹ a stabilita pseudocrownových komplexů koresponduje s velikostí náboje, symetrií a rozložením náboje na povrchu kationtu. Stabilita pseudocrownových komplexů organických kationtů je obecně menší, větší je u kationtů se symetricky delokalizovaným nábojem v důsledku mezomerního efektu. Proto např. separační pořadí lididinu a chinolinu může být změněno rostoucí koncentrací PEG v základním elektrolytu (BGE)^{10,11}.

Rozdělení mezi vodu a pseudofázi PEG je velmi účin-

ný jev při separaci velkých molekul. Jako známý příklad může být uvedena separace motilinů lišících se pouze v jednom aminokyselinovém zbytku¹². Zde hraje důležitou roli velikost a hydrofilně-lipofilní rovnováha.

Třetí efekt, vodíková vazba s H-donory, může být využit spíše při separaci kyselých látek a byl aplikován např. pro rozlišení chlorfenolů izotachoforézou¹³ nebo separaci derivátů benzoové kyseliny CZE¹⁴.

Konečně síťový efekt umožňuje separaci polyaniontů včetně oligonukleotidů¹⁵; PEG se přitom chová jako gelová fáze.

Tento článek demonstuje užitečnost PEG při rozlišování relativně velkých molekul – lokálních anestetik, které jsou rozdílné struktury nejen chemickým typem (estery, amidy, karbamáty), ale také okolím protonizovaného dusíku. Pouze první a druhý separační efekt je navržen pro studované sloučeniny, tedy tvorba komplexu a distribuce mezi vodou a PEG pseudofází.

Obě metody, ITP a CZE, byly použity při kontrole farmaceutických preparátů obsahujících lokální anestetika^{16,17}, při určení jejich pohyblivosti^{18,19}, při jejich separaci v modelové směsi²⁰, při stanovení lokálních anestetik a jejich metabolitů v krevní plazmě nebo moči^{21,22} a při separaci enantiomerů za přítomnosti cyklodextrinů²³.

Experimentální část

Chemikálie

Kyselina fosforečná a PEG ($M_r = 2000$) byly analytické čistoty (E. Merck, Darmstadt, Německo), hydroxid sodný a oktan-1-ol rovněž (Lachema, Brno, ČR). Lokální anestetika – amylokain, bupivakain, diperodon, β -eukain, fomokain, kokain, leucinokain, lidokain, mesokain (trimekain), prokain, psikain, tetrakain a tropakokain byly standardní vzorky získané ze Státního ústavu pro kontrolu léčiv, Praha.

Jako základní elektrolyt sloužil 0,05 M fosfátový pufr o pH 2,5. Elektrolyty s 12,5, 25, 30 a 33 hm.% PEG 2000 byly připraveny smícháním 0,2 M fosfátového pufru s deionizovaným 50% vodným roztokem PEG 2000 a deionizovanou vodou. Koncentrace fosfátu byla konstantní (0,05 mol l⁻¹). Roztok PEG (50%) byl deionizován vsádkově směsným ionexem, jak bylo popsáno dříve¹⁰. Zásobní roztoky lokálních anestetik o koncentraci 0,02 mol l⁻¹ byly připraveny z jejich hydrochloridů (leucinokain byl methylsulfát) a pak byly dohromady smíchány na výslednou koncentraci anestetika 5·10⁻⁴ mol l⁻¹. Připravená směs lokálních anestetik byla dávkována pro modelovou separaci.

Přístroje

Byl použit systém SpectraPHORESIS 100 s rychle skenujícím UV-VIS detektorem. Jako optimální byla zvolena vlnová délka 230 nm. Separace byly provedeny v křemenné kapiláře (bez pokrytí) 72 cm × 75 μ m s efek-

tivní délkou 45 cm. Před každou sadou měření byla kapilára promývána vodou, 0,1 M hydroxidem sodným, vodou a BGE (vždy 5 min). Před následující analýzou byla kapilára kondicionována 10 min základním elektrolytem pod separačním napětím a promyta vodou a základním elektrolytem (vždy 5 min). Konstantní napětí během měření bylo 25 nebo 30 kV, dávkování bylo prováděno vakuem po dobu 0,5 s. Analyty byly identifikovány metodou standardních přídavek a srovnáním UV spekter. Měření pH bylo provedeno skleněnou elektrodou kalibrovanou vodnými roztoky pufrů s použitím pH metru Pracitronic MV 870 (Dresden, Německo). Voda byla deionizována na zařízení ELGA (Buchs, UK). Distribuční konstanty byly měřeny spektrofotometricky v UV oblasti spektrofotometrem Philips PU 8750 (Philips, Nizozemí).

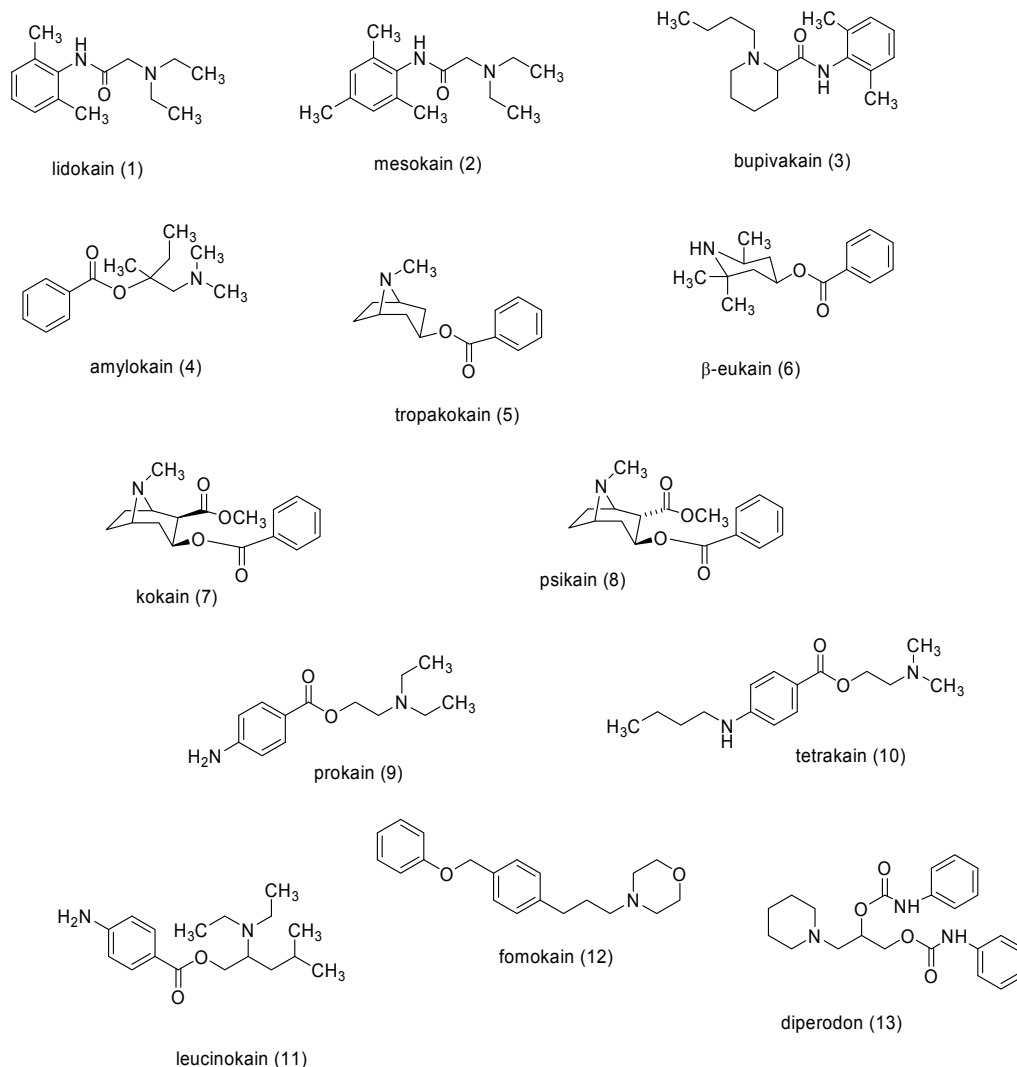
Měření rozdělovacích konstant

Přibližně $10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ roztok hydrochloridu anestetika ve fosfátovém pufru o pH 2,5 byl extrahován stejným objemem oktan-1-olu. Absorbance vodní vrstvy byla měřena při 230 nm před a po extrakci. Pro estery 4-amino-benzoových kyselin (prokain, tetrakain, leucinokain) byla absorbance měřena v intervalu 290 až 310 nm. Distribuční konstanta byla počítána podle rovnice $K_D = c_{\text{okt}}/c_{\text{voda}}$.

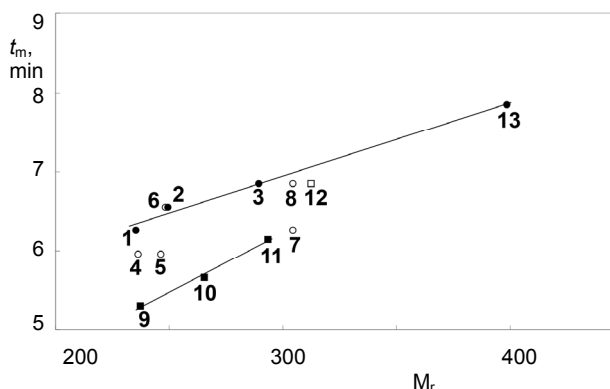
Výsledky a diskuse

Separace vybrané řady lokálních anestetik může být ovlivněna:

- strukturou analytu (hydrofobností),



Obr. 1. Struktury lokálních anestetik



Obr. 2. Závislost migračního času na relativní molekulové hmotnosti dělených látek; migrační čas t_m byl měřen v 0,05 M fosfátovém pufru o pH 2,5. Napětí 25 kV, UV detekce při 230 nm. 1 – lidokain; 2 – mesokain; 3 – bupivakain; 4 – amylokain; 5 – tropakokain; 6 – β -eukain; 7 – kokain; 8 – psikain; 9 – prokain; 10 – tetrakain; 11 – leucinokain; 12 – fomokain; 13 – dipiperodon. ● amidy, ○ estery benzoové kyseliny, ■ estery 4-aminobenzoové kyseliny, □ ethery

- molekulovou hmotností,
- stupněm disociace (protonizací – bazicitou),
- podmínkami separace (pH, protiiontem, teplotou, napětím)

a v přítomnosti PEG dále:

- tvorbou pseudocrownových komplexů,
- hydrofobními interakcemi mezi analytem a PEG pseudofází,
- koncentrací PEG, která ovlivňuje čtyři uvedené efekty.

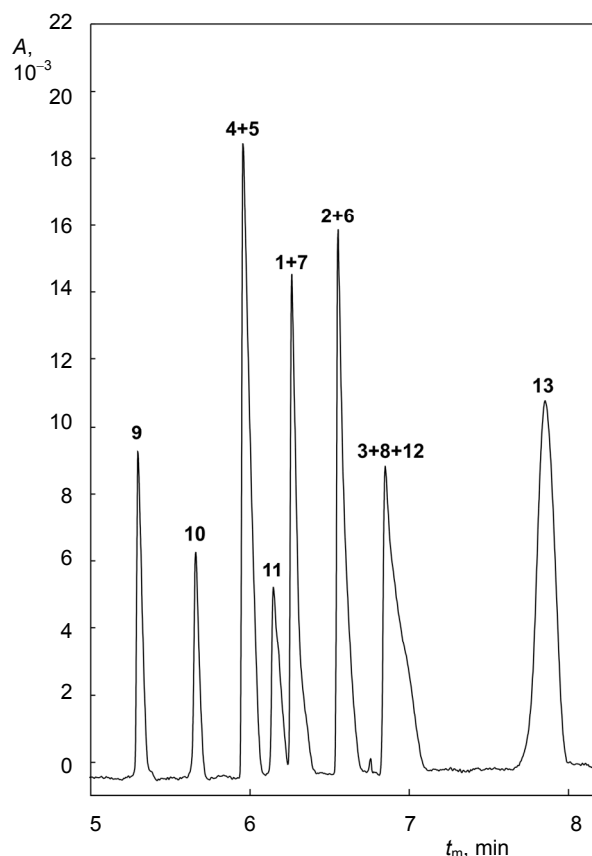
Struktura třinácti lokálních anestetik je zobrazena na obr. 1. Sloučeniny 1, 2 a 3 jsou amidy, sloučeniny 4–8 estery kyseliny benzoové. Látky 9–11 jsou estery 4-aminobenzoové kyseliny. Látka 12 je ether a 13 je karbamát.

Pro běžné organické molekuly s podobnou strukturou můžeme použít jednoduchý vztah mezi pohyblivostí a molekulovou hmotností²⁴

$$\mu_i = \frac{a \cdot z_i}{M_r} + b \quad (1)$$

kte z_i je efektivní nábojové číslo, M_r je relativní molekulová hmotnost, a , b jsou empirické konstanty. Elektroosmotický tok (EOF) byl zanedbatelný při pH 2,5 v základním elektrolytu bez PEG. Migrační čas je tedy přímo úměrný molekulové hmotnosti separovaných úplně protonizovaných bází (nebo úplně disociovaných kyselin). Na obr. 2 je zobrazen vztah mezi M_r a migračním časem t_m pro jednotlivé strukturální typy v pufru o pH 2,5 bez přídavku PEG.

Z tohoto obrázku je patrné, že amidy (včetně karbamátu) a estery 4-aminobenzoové kyseliny splňují rovnici (1), ale estery kyseliny benzoové nikoliv. Rozpor mezi oběma stereoisomery kokainu a psikainu je velice význam-



Obr. 3. Separace lokálních anestetik v pufru bez přídavku PEG; 0,05 M fosfátový pufr; koncentrace anestetika $5 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹. Separací napětí 25 kV, UV detekce při 230 nm

ný, tvorba kruhu s bazickým dusíkem je příčinou neregulárnosti v chování těchto esterů. Pohyblivosti 4-aminobenzoátů 9, 10 a 11 jsou značně vyšší než ostatní. Tento fakt je evidentně způsoben dvoustupňovou protonizací obou bazických dusíků. Z rovnice (1) lze snadno spočítat, že stupeň protonizace 4-aminobenzoátů leží mezi 1,15 a 1,20, za předpokladu, že $z_i = 1$ pro ostatní lokální anestetika. Celková disociace (protonizace) alifatických nebo alicyklických dusíků vyplývá z jejich disociačních konstant, které jsou uvedeny v tabulce I společně s dalšími významnými konstantami.

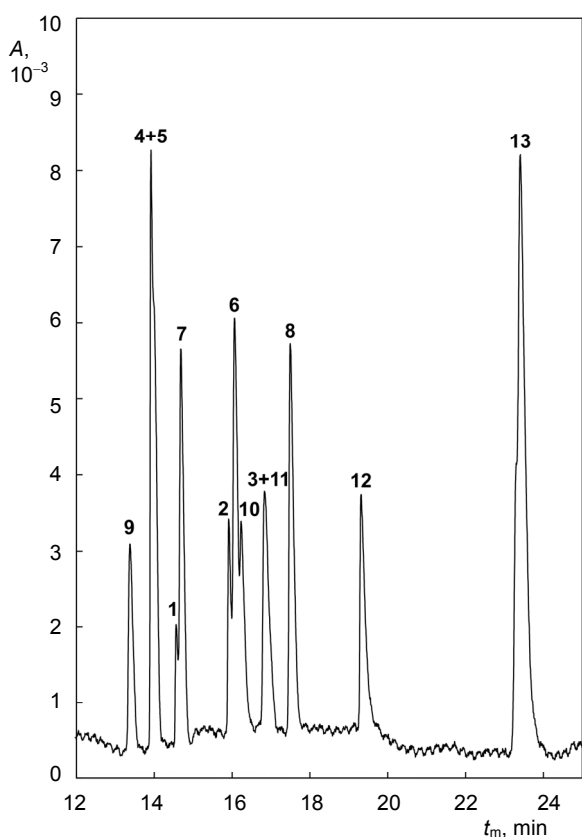
Z tab. I a obr. 3 je zřejmé, že v kyselém pufru bez aditiv existují některé neseparované páry (amylokain–tropakokain; lidokain–kokain; mesokain– β -eukain) a jedna neseparovaná trojice (bupivakain–psikain–fomokain). Separace v zásaditém pufru není možná kvůli srážení některých slabých bází při pH mezi jejich konstantami kyselosti (pH 7–9). Separace v oblasti pH od 2,5 do 5 nezlepšovala účinnost, navíc nad pH 4 vystupuje významná role EOF. Proto byl testován poly(ethylenglykol) jako aditivum jen při pH 2,5.

Rostoucí koncentrace PEG umožňuje separovat

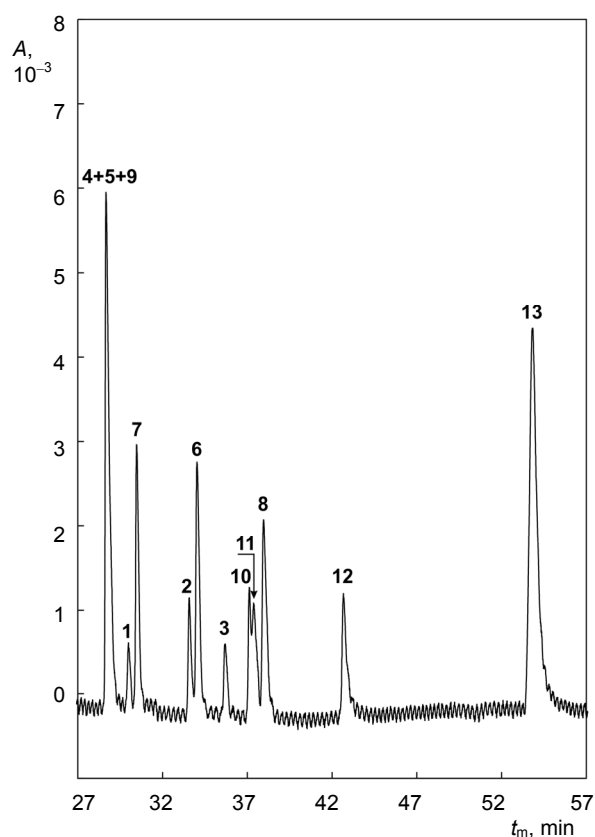
Tabulka I
Základní vlastnosti lokálních anestetik

Č.	Název sloučeniny	M_r^a	$pK_a^{[18]}$	K_D^b	$u_i^c [10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}]$
1	lidokain	235,3	7,85	0,08	35,9
2	mesokain	249,4	7,95	0,14	34,4
3	bupivakain	289,4	8,19	0,21	32,8
4	amylokain	236,3	7,96	0,08	37,8
5	tropakokain	246,3	9,36	0,02	37,8
6	β -eukain	248,3	9,50	0,14	34,4
7	kokain	304,4	8,69	0,02	35,9
8	psikain	304,4	8,54	0,45	32,8
9	prokain	237,3	9,01 (pK_1)	® 0	42,5
10	tetrakain	265,4	8,29 (pK_1)	0,20	39,8
11	leucinokain	293,4	9,21 (pK_1)	0,08	36,6
12	fomokain	312,4	-	0,74	32,8
13	diperodon	398,5	6,97	3,42	28,6

^a Relativní molekulová hmotnost protonizované sloučeniny, ^b distribuční (rozdělovací) koeficient mezi oktán-1-olem a 0,05 M fosfátovým pufrům pH 2,5, ^c mobilita ve fosfátovém pufru pH 2,5 bez přídavku PEG



Obr. 4. Separace lokálních anestetik v pufru s 12,5 % PEG; 0,05 M fosfátový pufr obsahující 12,5 % PEG 2000. Ostatní viz obr. 3



Obr. 5. Separace lokálních anestetik v pufru s 25 % PEG; 0,05 M fosfátový pufr obsahující 25 % PEG 2000. Ostatní viz obr. 3

všechny kritické páry (obr. 4–6). Nejhůře separovatelný pár amylokain–tropakokain vyžaduje koncentraci PEG vyšší než 30 %.

Jak bylo uvedeno výše, rostoucí koncentrace aditiva může podporovat tvorbu komplexu, hydrofobní interakce a rovněž měnit stupeň protonizace. Efekt tvorby pseudocrownových komplexů lze ilustrovat na migraci velice podobných molekul, např. homologů s blízkou polaritou. Takovým párem derivátů je lidokain a mesokain. Účinek zvýšení koncentrace PEG na rozlišení jmenovaného páru a všech kritických párů je zobrazen na obr. 7. Rostoucí rozlišení páru lidokain–mesokain naznačuje, že tvorba pseudocrownových komplexů hraje nezanedbatelnou roli v separačním mechanismu. Zároveň s touto možností hydrofobnost mesokainu roste směrem k lidokainu; vyšší rozpustnost v PEG pseudofázi musí rovněž zvyšovat rozlišení.

K určení, zda se uplatňuje hydrofobní efekt, byla měřena distribuční konstanta mezi oktán-1-olem a vodným roztokem pufru. Analyty byly separovány jako kationty, ale soli objemných iontů se přitom mohou chovat jako iontový pár rozpustný v organické poly(ethylenglykolové) pseudofázi.

Ze zkušenosti ze soudních analýz je známo, že hydrochloridy objemnýchází léčiv jsou částečně extrahova-

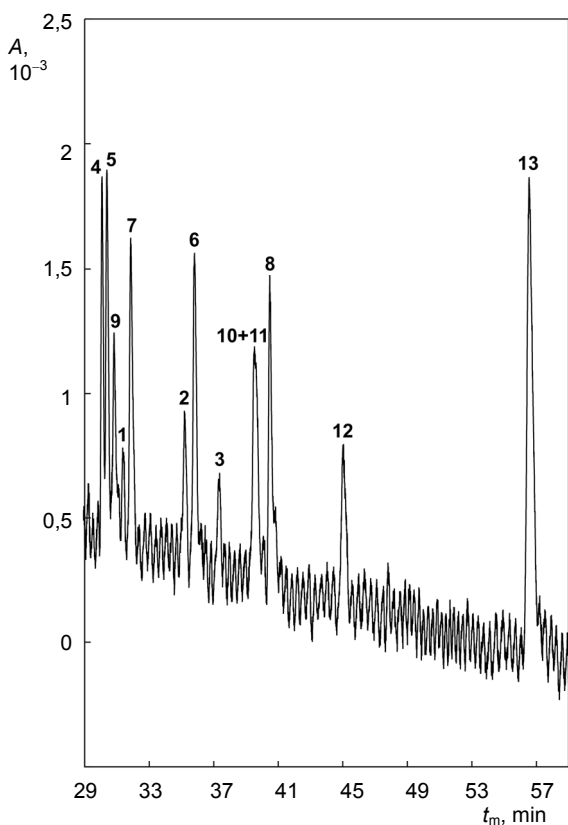
telné do organických rozpouštědel v pořadí jejich hydrofobnosti. Z naměřených rozdělovacích konstant (tab. I) je vidět, že tři hydrochloridy jsou značně extrahovány do oktán-1-olové fáze, a to diperonon, fomokain a psikain. Hydrofobní interakce s PEG pseudofází je charakterizována rozdílným prodloužením migračních časů s rostoucí koncentrací PEG. To je v soulahu s rychle rostoucím poměrem migračního času mezi základním elektrolytem s přísadkou a bez přísadky PEG (tab. II).

Diperonon, fomokain a psikain migrují nejpomaleji ve všech elektrolytických systémech a diperonon jako látka s největší distribuční konstantou se vyznačuje maximálním přírůstkem poměru migračních časů. Relativní hydrofobnost může být vyjádřena porovnáním migračních časů s migračním časem nejhydrofobnější sloučeniny – diperononu. Rozdělení trojice bupivakain–fomokain–psikain (obr. 3) je umožněno hydrofobními interakcemi s PEG pseudofází, jak je zřejmé z obr. 8. Největší pokles reprezentuje nejnižší hydrofobnost.

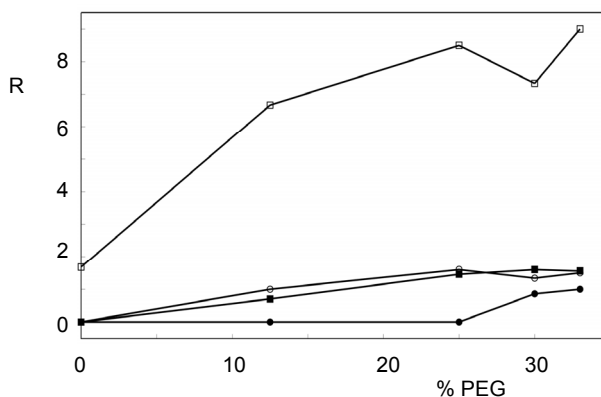
Skupina esterů 4-aminobenzoové kyseliny vykazuje vysoký poměr migračních časů. Přírůstek migračního času je srovnatelný s fomokainem nebo diperononem. Tento efekt není výsledkem nepolárnosti nebo hydrofobnosti, ale je způsoben potlačením disociace (protonizace). Organické rozpouštědlo a přísadka organické pseudofáze oslabuje, jak známo, kyseliny i báze a protonizace do druhého stupně vůbec neprobíhá.

Závěr

Rozdíly v migračních časech organickýchází, jako jsou lokální anestetika, mohou být využity k identifikaci individuů nebo složek ve směsi. Ve vybrané sadě 13 lokálních anestetik bylo dosaženo dokonalé separace využitím tří systémů – vodný roztok pufru, pufr s 25 % a s 33 % PEG 2000. Kvůli vysoké viskozitě, dlouhému času analý-



Obr. 6. Separace lokálních anestetik v pufru s 33 % PEG; 0,05 M fosfátový pufr obsahující 33 % PEG 2000; koncentrace anestetika $5 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1} ; separační napětí 30 kV, UV detekce při 230 nm

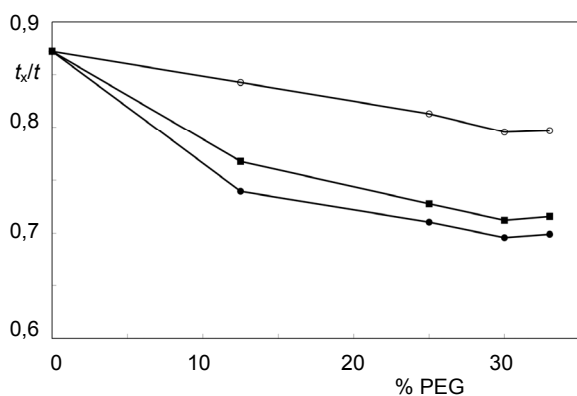


Obr. 7. Vliv rostoucí koncentrace PEG na rozlišení lokálních anestetik; ● amylokain + tropakokain, ○ lidokain + kokain, ■ mesokain + β -eukain, □ lidokain + mesokain

Tabulka II
Vliv koncentrace PEG na migrační časy lokálních anestetik

Sloučenina	t_m^0 ^a [min]	t_m/t_m^0 ^b			
		12,5 % PEG	25 % PEG	30 % PEG	33 % PEG
Lidokain	6,26	1,56	3,09	4,39	5,01
Mesokain	6,55	1,62	3,28	4,71	5,37
Bupivakain	6,85	1,64	3,33	4,78	5,45
Amylokain	5,96	1,58	3,12	4,43	5,05
Tropakokain	5,96	1,58	3,12	4,47	5,10
β-Eukain	6,55	1,64	3,34	4,79	5,46
Kokain	6,26	1,58	3,14	4,47	5,09
Psikain	6,85	1,71	3,53	5,17	5,91
Prokain	5,30	1,71	3,51	5,08	5,82
Tetrakain	5,66	1,95	4,17	6,11	6,98
Leucinokain	6,15	1,83	3,84	5,62	6,43
Fomokain	6,85	1,87	3,95	5,77	6,58
Diperodon	7,86	1,94	4,23	6,33	7,20

^a Migrační čas ve fosfátovém pufru, ^b poměr migračního času ve fosfátovém pufru s přidavkem PEG k migračnímu času v pufru bez PEG



Obr. 8. Závislost poměru migračních časů anestetik k času diperodonu na obsahu PEG v základním elektrolytu; ● bupivakain, ○ fomokain, ■ psikain

zy a rovněž rostoucímu šumu základní linie jsou ke kvantifikaci vhodné pouze systémy obsahující méně než 25 % PEG.

Distribuce mezi vodou a PEG pseudofází určuje mechanismus separace v systému s přidavkem PEG. Tvorba pseudocrownových komplexů není významným příspěvkem k separaci vzhledem k lokalizovanému stericky stíněnému kladnému náboji. Molekuly PEG nejsou schopny obklopit velké kationtové molekuly s lokalizovaným nábojem. Druhý stupeň protonizace aromatické skupiny u analogů prokainu může být využit pro jejich separaci a zkrá-

cení doby analýzy v kyselém pufru s minimálním obsahem PEG.

LITERATURA

1. Bednář P., Stránský Z., Barták P., Adamovský P.: *ITP '98: 11th International Symposium on Capillary Electroseparation Techniques, Lido of Venice, 4-7 October 1998*, Book of Abstracts (bez editora), str. 58.
2. Kaniansky D., Zelenský I., Valášková I., Marák J., Zelenská V.: *J. Chromatogr.* 502, 143 (1990).
3. Ito K., Hirokawa T.: *J. Chromatogr., A* 742, 281 (1996).
4. Sathakis C., Cassidy R. M.: *Analyst* 121, 839 (1996).
5. Thornton M. J., Fritz J. S.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 20, 653 (1997).
6. Stover F. S.: *J. Chromatogr.* 298, 203 (1984).
7. Wurzschnitt B.: *Z. Anal. Chem.* 130, 105 (1950).
8. Stránský Z.: *Analytika, chemie a technologie tensidů a detergentů, Ostrava, 23.-24. listopadu 1976*. Sborník referátů (bez editora), str. 149, Dům techniky ČVTS, Ostrava 1976.
9. Bednář P., Stránský Z., Barták P., Adamovský P.: *ITP '98: 11th International Symposium on Capillary Electroseparation Techniques, Lido of Venice, 4-7 October 1998*. Book of Abstracts (bez editora), str. 57.
10. Bednář P., Stránský Z., Barták P., Adamovský P.: *J. Chromatogr., A* 838, 89 (1999).
11. Bednář P., Barták P., Adamovský P., Stránský Z.: *J. Chromatogr., A* 917, 319 (2001).
12. Matsubara N., Terabe S.: *Chromatographia* 34, 493 (1992).

13. Praus P., Dombek V.: *Anal. Chim. Acta* 283, 917 (1993).
14. Esaka Y., Goto M., Haraguchi H., Ikeda T., Kano K.: *J. Chromatogr., A* 711, 305 (1995).
15. Auriola S., Jaaskelainen I., Regina M., Uriti A.: *Anal. Chem.* 68, 3907 (1996).
16. Klein H.: *Drug Res.* 32, 795 (1982).
17. Fanali S., Foret F., Boček P.: *J. Chromatogr.* 330, 436 (1985).
18. Polášek M., Gaš B., Hirokawa T., Vacík J.: *J. Chromatogr.* 596, 265 (1992).
19. Bednář P., Stránský Z., Ševčík J., Dostál V.: *J. Chromatogr., A* 831, 277 (1999).
20. Chmela Z., Čížmárik J., Stránský Z.: *Pharmazie* 40, 731 (1985).
21. Stránský Z., Chmela Z., Peč P., Šafařík L.: *J. Chromatogr.* 342, 167 (1985).
22. Schieferecke M. A., McLaughlin K. J., Faibushevich A. A., Lunte C. E.: *Electrophoresis* 19, 2997 (1998).
23. Amini A., Jäverfalk E., Bastami S., Westerlund D.: *Electrophoresis* 20, 204 (1999).
24. Fujishita O., Higuchi S., Yoshikawa M., Aoyama T., Horioka M.: *Chem. Pharm. Bull.* 31, 2134 (1983).

P. Adamovský and Z. Stránský (*Department of Analytical Chemistry, Palacký University, Olomouc*): **Separation of Some Local Anesthetics by Capillary Zone Electrophoresis in the Presence of Poly(ethylene glycol)**

Separations of inorganic cations and organic compounds by capillary zone electrophoresis (CZE) can be favourably influenced by addition of poly(ethylene glycol) (PEG) to the background electrolyte. Local anesthetics, organic bases, were selected as models for testing the influence of PEG on migration and resolution of analytes.