

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

VYUŽITÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY PRO ANALÝZU EFEDRINU A PSEUDOEFEDRINU V DOPLŇCÍCH VÝŽIVY

IVAN JELÍNEK

Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 40 Praha 2 e-mail: ijelinek@mail.natur.cuni.cz

Došlo dne 4.III. 1999

Klíčová slova: kapilární elektroforéza, doplňky výživy, efedrin, pseudoefedrin

Úvod

Užívání doplňků výživy je součástí běžné dietetické praxe vrcholových sportovců. Rada preparátů, uplaňujících se nedávna výhradně v silových disciplínách, našla s rostoucími nároky na výkonnost cestu do většiny ostatních sportů. Tyto preparáty běžně obsahují složky vysloveně medicínálního charakteru. Příkladem může být právě efedrin a pseudoefedrin, které se do příslušných produktů dostávají nejčastěji jako součást extraktů z rostlinného materiálu (např. *Ephedra sinica* Mahuang). Obě látky stimulují centrální nervový systém a zlepšují ventilaci plic. Jejich podání před sportovním výkonem pozitivně ovlivňuje okamžitou výkonnost a zpožďuje projevy kyslíkového dluhu, a tím i svalové únavy, při intenzivní fyzické zátěži. Pro své výrazné stimulační účinky se oba alkaloidy dostaly na seznam zakázaných dopingových látek¹.

Většina renomovaných výrobců potravinových doplňků pro sportovce na obsah zakázaných látek výslovně upozorňuje a hodnoty jejich obsahu uvádí, v některých případech se však přítomnost těchto látek skrývá v obecném názvu rostlinného extraktu. Výsledkem užívání takovýchto preparátů pak mohou být obtížně vysvětlitelné dopingové aféry. Jedinou skutečně systémovou možností řešení tohoto v současnosti aktuálního problému je důsledná analytická kontrola veškerých používaných preparátů na přítomnost zakázaných látek.

Vývoji analytických metod zaměřených na stanovení alkaloidů efedrinového typu byla věnována značná pozornost. V rámci separačních metod se uplatnila kapalinová chromatografie^{2,3}, která byla validována a v současnosti je doporučována pro kontrolu obsahu alkaloidů efedrinového typu v potravinových doplňcích. Kapilární elektroforéza má veškeré předpoklady pro uplatnění v této oblasti. Byly vyvinuty a v literatuře popsány postupy pro separaci enantiomerů efedrinu s využitím micelárních systémů a fází cyklodextrinového typu^{4,6}.

Předmětem tohoto sdělení je optimalizace separace efedrinu a pseudoefedrinu metodou kapilární elektroforézy se zaměřením na hodnocení jejich obsahu v potravinových doplňcích pro sportovce. Vypracovaná metodika je využita pro

stanovení obsahu těchto alkaloidů v devatenácti vybraných, komerčně dostupných preparátech.

Pokusná část

Použité přístroje a chemikálie a podmínky měření

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

Chemikále použité pro přípravu roztoků nosných elektrolytů byly nejvyšší dostupné čistoty (Sigma-Aldrich, Steinheim). Složení roztoků a experimentální podmínky měření jsou uvedeny v tabulce I. Analyzované standardy a reálné vzorky doplňků výživy pro sportovce jsou specifikovány v tabulce II.

Zásobní roztoky standardů chloridu efedrinia a pseudoefedrinia byly připraveny rozpuštěním příslušné substance v deionizované vodě (18,5 MΩ cm) na výslednou koncentraci 0,5 mg.ml⁻¹. Kalibrační roztoky o koncentracích 0,05; 0,1; 0,25 a 0,33 mg.ml⁻¹ byly připraveny naředěním zásobních roz-

Tabulka I
Podmínky měření a použité nosné elektrolyty

Parametr	Poznámka
Kapilára	křemenná s polyimidovým potahem a neupraveným vnitřním povrchem 75 μm x 61 cm (41 cm do detektoru) (Composite Metal Services Ltd., UK)
Teplota termostatu	30 °C
Dávkování	tlakové 20 mbar/6s
Separací napětí	25 kV
Proud	12-25 μA v závislosti na použitém nosném elektrolytu
Detekce	UV X = 200 nm
Nosné elektrolyty	1. 30 mM glycin + 25 mM kyselina malonová pH 2,9; heptakis-(2,6-di-O-methyl)-p-cyklodextrin(diMe-(3-CD) 0-10 mmol.l ⁻¹) 2. 30 mM β-alanin + kyselina asparagová pH 3,6; diMe-P-CD 0-10 mmol.l ⁻¹ 3. 30 mM kyselina 6-aminokapronová + 30 mM kyselina adipová pH 4,2; diMe-β-CD 0-10 mmol.l ⁻¹ 4. 20 mM hexamethylentetramin + 20 mM kyselina pivalová pH 5,0; diMe-β-CD 0-10 mmol.l ⁻¹ 5. 30 mM histidin + 30 mM kyselina morfolinoethansulfonová pH 6; diMe-p-CD 0-10 mmol.l ⁻¹

Tabulka II

Analyzované standardy a reálné vzorky

Název	Výrobce
Efedrin báze (99 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Chlorid efedrinia (99 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Pseudoefedrin báze (98 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Chlorid pseudoefedrinia (98 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Vitahh	Amerifit (USA)
Cytomax	Champion Nutrition (USA)
Ripped Fuel	Twinlab (USA)
Ripped Fuel capsules	Twinlab (USA)
GH Fuel	Twinlab (USA)
Thermodrol	Champion Nutrition (USA)
Diet Fuel	Twinlab (USA)
Herba Fuel	Twinlab (USA)
Metabolol II	Champion Nutrition (USA)
Pro-Score 100	Champion Nutrition (USA)
Hydra Fuel	Twinlab (USA)
Power Fuel	Twinlab (USA)
Metabolol Met-Max	Champion Nutrition (USA)
Metabolol-Endurance	Champion Nutrition (USA)
Heavy Weight Gainer 900	Champion Nutrition (USA)
Mega Monster Mass	Champion Nutrition (USA)
Metabolism Booster	Champion Nutrition (USA)
Anabolic Muscle Growth	M-L-O Products (USA)
Youthinol	Neways Products (USA)

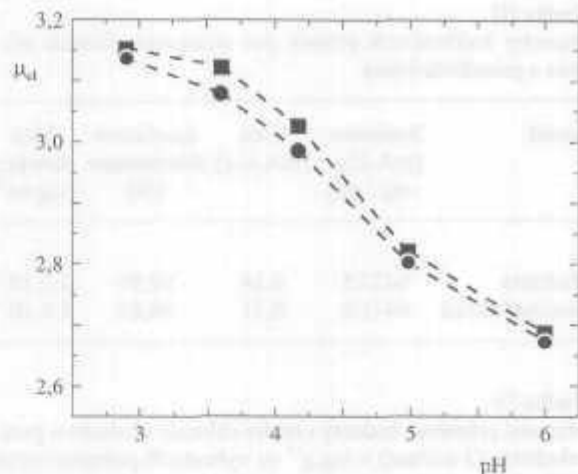
toků deionizovanou vodou. Modelový roztok, připravený mísením 1 ml zásobních roztoků, obsahoval jednotlivé komponenty vždy v koncentracích $0,25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Rychlost elektroosmotického toku byla sledována s použitím 30 mM vodného roztoku thiomocoviny (p.a. Lachema, Brno). Pro extrakci vzorků potravinových doplňků pro sportovce byl použit 5 mM vodný roztok kyseliny chlorovodíkové (p.a. Lachema, Brno).

Zpracování výsledků

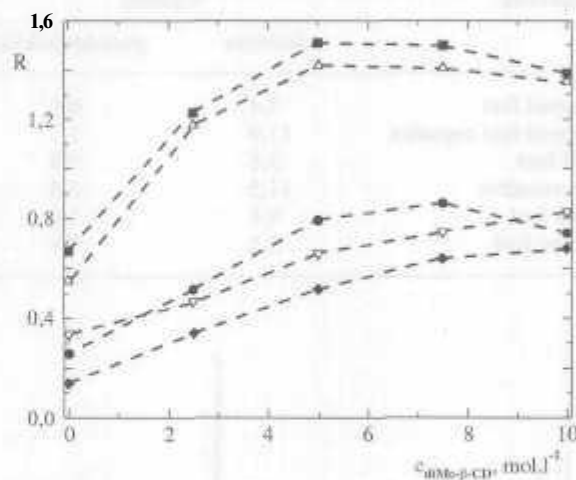
Pro odečtení migračních časů a ploch a šířek píků bylo použito programové vybavení UNICAM 4880 (ATI Unicam, Velká Británie). Pro vyhodnocení kalibračních závislostí a základní statistické hodnocení byl použit program Origin v. 4.1 (Microcal Software, USA).

Výsledky a diskuse

Závislosti efektivních elektroforetických pohyblivostí efedrinu a pseudoefedrinu korigovaných na rychlost elektroosmotického toku (dále jen efektivní elektroforetická pohyblivost) v rozmezí pH 2,9-6,0 v nosných elektrolytech 1-5 bez přídavku heptakis-(2,6-di-O-methyl)- β -cyklodextrinu (diMe- β -CD) jsou uvedeny na obr. 1. Ze vzájemné polohy obou křivek je zřejmé, že částečného rozlišení obou diastereoizomerů je možno dosáhnout v nosném elektrolytu 2 a 3 v rozmezí pH 3,6-4,2, kde rozlišení R přesahuje hodnotu 0,5. Zlepšení separace je možno dosáhnout přídavkem diMe- β -CD do nosného



Obr. 1. Závislost efektivní elektroforetické pohyblivosti μ_{cl} ($10^4 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) efedrinu (•) a pseudoefedrinu (◐) na pH



Obr. 2. Závislost rozlišení R píků efedrinu a pseudoefedrinu na koncentraci diMe- β -CD v nosném elektrolytu; nosný elektrolyt 1, pH 2,9 (•); nosný elektrolyt 2, pH 3,6 (◐); nosný elektrolyt 3, pH 4,2 (◑); nosný elektrolyt 4, pH 5,0 (◒); nosný elektrolyt 5, pH 6,0 (◓)

elektrolytu. Jak vyplývá z tvaru křivek na obr. 2, optimální separace je dosaženo v elektrolytovém systému 2 s přídavkem 5 mM diMe- β -CD. Za těchto podmínek je možno dosáhnout u modelového roztoku úplné separace obou komponent.

Parametry kalibračních závislostí chloridu efedrinia a pseudoefedrinia v koncentračním rozmezí $0,05\text{-}0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (nosný elektrolyt pH 3,6; 5 mM diMe- β -CD) jsou včetně vypočtených detekčních limitů uvedeny v tabulce III. Z hodnot koeficientů determinace je zřejmé, že získané kalibrační závislosti jsou ve sledovaném koncentračním rozsahu lineární. Statisticky nevýznamné úseky na osách pořadnic potvrzují, že stanovení obou látek není zatíženo systematickou chybou.

Pro převedení efedrinu, pseudoefedrinu a ostatních ve vodě rozpustných složek reálných vzorků doplňků výživy do roztoku byl zvolen následující extrakční postup. Asi 40 mg homogenizované substance bylo po dobu 5 minut extrahováno 2 ml 5 mM vodného roztoku HCl v ultrazvukové lázni. Po usazení nerozpustného zbytku byl odebrán 1 ml roztoku, pře-

Tabulka III

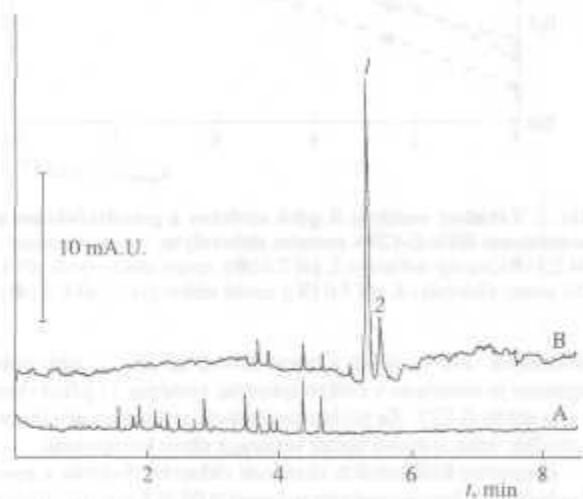
Parametry kalibračních přímků pro stanovení chloridu efedrina a pseudoefedrina

Chlorid	Směrnice [mA.U.s. .mg ⁻¹ .ml]	Usek [mA.U.s]	Koeficient determinace [%]	Mez detekce [mg.ml ⁻¹]
efedrina	6427,5	0,24	99,90	1,2.10 ⁻³
pseudoefedrina	6441,8	0,31	99,89	1,6.10 ⁻³

Tabulka IV

Stanovené průměrné hodnoty obsahu chloridu efedrina a pseudoefedrina (3 měření) v mg.g⁻¹ ve vybraných potravinových doplňcích

Přípravek	Chlorid	
	efedrina	pseudoefedrina
Ripped fuel	7,4	0,6
Ripped fuel capsules	11,9	1,7
GH fuel	3,8	0,8
Thermodrol	11,5	3,3
Diet fuel	8,8	1,4
Herba fuel	3,5	7,8



Obr. 3. Ukázkové elektroforegramy přípravku (A) Heavy Weight Gain, bez přítomnosti efedrinu a pseudoefedrinu a (B) Ripped Fuel capsules, 1 efedrin, 2 pseudoefedrin; nosný elektrolyt 2 (pH 3,6; 5 mM diMe- β -CD)

filtrován (filtr Whatman 0,10 μ m) a přímo dávkován do přístroje. Výtěžek extrakčního postupu (recovery r [%]) byl ověřen na modelovém experimentu, kdy do substance reálného vzorku, u níž nebyla na základě předběžných experimentů prokázána přítomnost obou alkaloidů (Heavy Weight Gain), byl přidán chlorid efedrina a pseudoefedrina v množství 15 mg na 1 g vzorku. Pro 6 opakovaných měření (zvolená

hladina významnosti $\alpha = 0,05$) byla pro chlorid efedrina vypočtena hodnota $r = 97 \pm 3$ % a pro chlorid pseudoefedrina $r = 94 \pm 3$ %. Poněkud nižší, stále však uspokojivý výtěžek byl zjištěn při obdobném experimentu s přidavkem báze efedrinu a pseudoefedrinu (6 opakovaných měření, $\alpha = 0,05$, efedrin $r = 92 \pm 2$ %; pseudoefedrin $r = 92 \pm 4$ %). Z uvedených výsledků je zřejmé, že navržený extrakční postup zajišťuje prakticky úplné převedení obou alkaloidů do roztoku jak ve formě hydrochloridů, tak i volných bází.

Ze souboru devatenácti hodnocených reálných vzorků byla přítomnost efedrinu a pseudoefedrinu prokázána u šesti preparátů. Výsledky stanovení, přepočtené na obsah chloridu efedrina a pseudoefedrina, jsou uvedeny v tabulce IV. Na obr. 3 jsou uvedeny ukázkové elektroforegramy přípravku „Heavy Weight Gain“ (A), u něhož nebyla prokázána přítomnost obou alkaloidů, a přípravku „Ripped Fuel Capsules“ s nejvyšším prokázaným obsahem efedrinu a pseudoefedrinu.

Z uvedených výsledků je zřejmé, že kapilární elektroforéza je metodou vhodnou pro stanovení efedrinu a pseudoefedrinu v komplexních vzorcích potravinových doplňků. Dosažitelná mez detekce zaručuje, že oba alkaloidy je možno selektivně stanovit v koncentracích hluboko pod předpokládanou fyziologicky významnou koncentrací. Navržený postup analýzy s minimální předúpravou vzorku je dostatečně rychlý, metoda je vhodná pro rychlou laboratorní kontrolu přípravků tohoto typu. Nezanedbatelné jsou i minimální náklady na analýzu, zejména ve srovnání s kapalinovou chromatografií.

LITERATURA

1. Lékařská komise MOV: *Seznam dopingových tříd a metod*. Lausanne, březen 1993.
2. Hurlbut J. A., Carr J. R., Singleton E. R., Faul K. C., Madson M. R., Storey J. M., Thomas T. L.: *J. AOAC Int.* 81, 1060 (1998).
3. Gurley B. J., Wang P., Gardner S. F.: *J. Pharm. Sci.* 87, 1547 (1998).
4. Lurie I. S., Odeneal N. G., McKibben T. D., Casale J. F.: *Electrophoresis* 19, 2918 (1998).
5. Scarcella D., Tagliaro F., Turrina S., Manetto G., Nakahara Y., Smith F. P., Marigo M.: *Forensic Sci. Int.* 89, 33 (1997).
6. Issaq H. J.: *Electrophoresis* 18, 2438 (1997).

I. Jelínek (Department of Analytical Chemistry, Faculty of Natural Science, Charles University, Prague): The Use of Capillary Zone Electrophoresis for Analysis of Ephedrine and Pseudoephedrine in Food Supplements

A simple method based on capillary zone electrophoresis was proposed for the analysis of ephedrine and pseudoephedrine in various commercial food supplements. The proposed method is suitable for a rapid identification and determination of ephedrine and pseudoephedrine in complex matrix of analyzed samples. The described extraction into 5 mM aqueous HCl proved right for a complete release of ephedrine and pseudoephedrine from the analyzed substance. An acidic carrier electrolyte (pH 3.6) containing β -alanine, aspartic acid and heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin is the method of choice for complete resolution of both alkaloids.