

KININ FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS MEGHATÁROZÁSA ÜDÍTŐITALOKBÓL

Csiba András és Lombai György

Budapest Fővárosi Állat-egészségügyi és Élelmiszer-ellenőrző Állomás

Érkezett: 1993. június 10.

A tonik típusú üdítőitalok keserű ízét kinintartalmuk biztosítja. A megfelelő ízérzet kialakításához a kininnek bizonyos minimális koncentrációt a termékben meg kell haladnia. Ez a gyártmány jellegétől, egyéb ízkomponenseitől függően természetesen változik, de általában a néhányszor 10 mg/l nagyságrenddel jellemezhető. Ugyanakkor a kinin és sói biológiailag hatékonyak. Évszázadok óta ismertek és használtak malária-ellenes szerként, de kisebb adagokban is kifejezett az uterotonikus hatásuk, azaz elsősorban a terhes méh izomzatának tónusát képesek egészen a görcsös állapotig, illetve a vetélésig fokozni. A nemkívánatos túladagolás elkerülésére az üdítőital kininkoncentrációjának maximumát is elő kell írni. Az élelmiszer-adalékokra vonatkozó MSZ 14476 szabvány szerint a gyártók kötelessége, hogy feltüntessék, deklarálják a kizserelési egységen a termék kinin (kininszulfát) koncentrációját, aminek értéke nem haladhatja meg a 60, illetve különleges esetekben a 80 mg/litert. 1 liter tonik elfogyasztását feltételezve viszont a felvett kinin mennyisége már összemérhető az egyszeri minimális dózissal. Erre tekintettel több országban a kinint tartalmazó üdítőitalokon a mennyiség mellett azt is kötelező feltüntetni, hogy terhes nők számára napi 3000 ml-nél többnek a fogyasztása nem ajánlott. Mindezek rávilágítanak a hatósági ellenőrzés fontosságára, illetve kellően érzékeny és pontos kinin-mérési módszer szükségességére.

Hatályos előírásaink közül a tonik-félék kinintartalmával a már említett adalékanyagokat szabályozón felül a alkoholmentes üdítőitalok fizikai és kémiai vizsgálati módszereit tárgyaló MSZ 213338/3 szabvány foglalkozik. Ennek spektrofotometriás módszere két extrakciós lépést tartalmaz: először a minta lúgosítása után kloroformba háromszoros kivonást kell végezni, majd onnan híg kénsav oldatba kininszulfátként visszaextrahálni. A kalibráció kininszulfát koncentráció-sorozattal kell végezni, amikor 250 nm hullámhosszon spektrofotometrálni állapítható meg a savas abszorbanciája. Annak ellenére, hogy analitikai szempontból makromennyiséget kell meghatározni, a többszörös extrakció nagy hibát eredményezhet a belső standard hiánya és a kivonási viszonyok nehezen megismételhető volta miatt.

A gyógyszeranalitikai módszerek az utóbbi évtizedekben igen sokat fejlődtek, amit a gyógyszereszköz monitorozás igénye kényszerített ki. A kinin esetében azonban mégsem próbálkoztak más mérési megközelítéssel. Ez a szer ugyanis az orvosi terápiából kiszorulóban van, ezért ha gyógyszerészeti mérésének szükségessége egyáltalán felmerül, még ma is Brodie és Udenfriend (1943) extrakciós eljárásával végzik.

Módszerük szerint a biológiai folyadékmintát meglúgosítják és a kinint benzolba extrahálják. Az elkülönített benzolos fázishoz izopentilalkoholt adnak és híg kénsavoldatba vonják vissza a kinint szulfát formájában. Az extraktumot spektrofluorimétrálják 350 nm gerjesztési és 450 nm emissziós hullámhosszon. Ezzel az eljárással a kinin még 1,0 ng/ml koncentrációjában is meghatározható. A módszer hibáját ebben az esetben is az extrakció okozhatja.

A fenti ismeretek alapján célul tűztük ki a kinin meghatározását üdítőitalokból közvetlen spektrofluorimetriával, majd annak hibáit kiküszöbölendő nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával.

Tekintettel arra, hogy a kinint tartalmazó tonik-félék közül sok az optikailag tiszta megjelenésű, megkíséreltük a hígítás utáni közvetlen spektrofluorimétrálást. Ez a vizsgálati lehetőség azonban nem bizonyult elfogadhatónak, aminek okát abban látjuk, hogy a kinint kísérő összetevők koncentrációja nem lehet garantáltan minden mintában azonos. Mivel azok koncentrációja is szórást mutat, a quenching hatás miatt a kinin mérésében hatványozott pontatlanságok keletkeznek. A kinin meghatározásának is legcélravezetőbb módja a folyadékkromatográfia. Erre nézve viszont elérhető irodalmi utalást - nyilvánvalóan a terápiából történt kiszorulás miatt és a kinidinnel ellentétben - nem találtunk. Ennek ellenére megkíséreltük (a klasszikus eljárások ismeretében) a folyadékkromatográfiás meghatározást, aminek lényege, hogy vizes kénsavas metanollal eluálunk, és az alkalmazott kolonnát (C₁₈-as szilika oszlopot) megoszlásos extraktornak értelmezzük.

Kísérleti rész

Felhasznált anyagok:

- Metanol, HPLC minőségű, Cod. no. 412532, Carlo Erba
- Kénsav, 96 %-os analitikai minőségű, Cod. no. 410301, Carlo Erba
- Kinin bázis standard, Cod. no. 1878, Sigma
- Kétszer desztillált víz

Készülékek:

Waters folyadékkromatográfiás rendszer, amely W-501 típusú nagynyomású pumpából, W-490E típusú fluorimetriás detektorból és a Baseline 810 jelzetű kiértékelő szoftver-rendszer működtetését végző NEC PowerMate SX/16 típusú PC-ből, valamint a csatlakoztatott NEC P6200 printerből áll.

Módszer

Kinin bázis standard oldat készítése

Kristályos kinin bázisból 1,0 mg/ml koncentrációjú törzsoldatot készítünk, azaz 100,0 mg mennyiségét mérőlombikban metanollal 100 ml térfogatúra oldjuk. Az oldat hónapokig bomlás nélkül jégszekrényben tárolható.

Mintaelőkészítés

Ultrahanggal széndioxid-mentesített üdítőital 5,0 ml mennyiségét kromatográfiás eluensével mérőlombikban 50 ml-re (tízszerezése) hígítjuk. A hígítmányt közvetlenül injektáljuk kromatográfiás rendszerünkbe.

Folyadékkromatográfia (HPLC)

- Oszlop: Radial-Pak 5NVC18 4 cartridge (Waters)
- Mobil fázis (eluens): 0,16 M vizes kénsav és metanol (50:50) (A vizes kénsav összetevő úgy készül, hogy 2,25 ml 96 %-os kénsavat kétszer desztillált vízzel 1 literre hígítjuk.) Az eluenst szobahőmérsékletűre kondicionáljuk és felhasználás előtt ultrahanggal buborékmentesítjük.
- Áramlási sebesség: 1,0 ml/perc (pumpanyomás 3000 PSI)
- A fluorimetriás detektor
 - nem változtatott paraméterei:
 - attenuation: 1
 - gerjesztési hullámhossz: 350 nm
 - emissziós hullámhossz: 450 nm
 - változtatott paramétere (a mérendő tartománytól függően)
 - 40-200 mg/l koncentráció tartományban: X = 1-szeres
 - 5- 40 mg/l koncentráció tartományban: X = 10-szeres
 - 1- 5 mg/l koncentráció tartományban: X = 100-szoros
(ahol az X = az erősítési tényező)
- Computer integrátor paraméterei:
 - szűrőablak pontokban = 13; durva és finom érzékenység = 500
- Injektált térfogat: 20 µl

Eredmények és értékelésük

Kalibráció

Tekintettel arra, hogy a fluorimetria csak viszonylag kis koncentráció-tartományokat képes adott műszerbeállítás mellett értékelni, a kalibrációt három koncentráció-tartományban vettük fel.

Ezekben az összefüggések egyenessel jellemezhetők.

A meghatározásokhoz a standardból három-három párhuzamos sorozatban 40; 80; 120; 160; és 200 mg/liter, 5; 10; 20; 30 és 40 mg/liter, valamint 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 és 5,0 mg/liter kinin bázis koncentrációkat állítottunk elő, és a sorozat minden tagját kromatografáltuk. Célszerűen adott térfogatú (kininmentes) üdítőitalba kevertük kinin bázis standardunk aliquot mennyiségét. A három párhuzamos hígítási sorozat kromatográfiás mérési eredményeinek alapsokaságát matematikai-statisztikai módszerekkel elemeztük. A különböző koncentrációkhoz tartozó kalibrációs regressziós egyenesek egyenlete mellett feltüntetett szórásértékek ismeretében interpretálhattuk eredményeinket.

A kalibráció során a standard kinin bázis koncentrációtól függő kromatográfiás integrátorjeleit (V_{sec}) értékeltük. A regressziós összefüggéseket személyi számítógéppel analizáltuk.

A csúcsterület átlagokból szerkesztett regressziós (kalibrációs) egyeneseket az 1., a 2. és a 3. ábrán mutatjuk be.

A 4. ábrán példaként bemutatjuk az 1,0 mg/liter koncentrációjú (tízszeres hígítású kininmentes üdítőitalban oldott) kinin bázis kromatogramját, amelynek paraméterei:

- kromatografálás ideje = 3,0 perc
- kromatografálás hőmérséklete = 26 °C
- t (retenciós idő) = 1,5 perc
- t_b (sávszélesedés ideje) = 1,2 perc
- k (nem fluorimetriásan mért kapacitási tényező) = 1,1
- N (elméleti tányérszám) = 36
- N_{eff} (effektív tányérszám) = 9,87

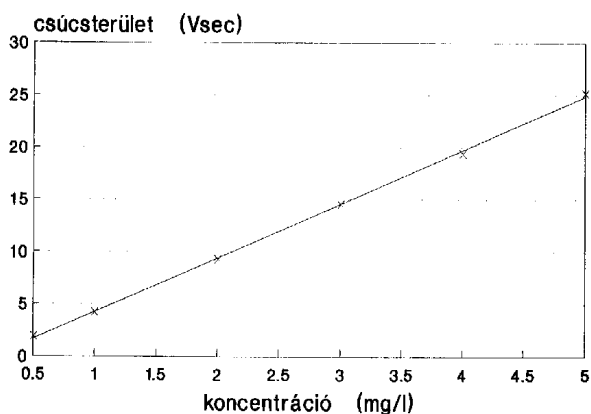
Adatok a módszer validálásához

Specifitás

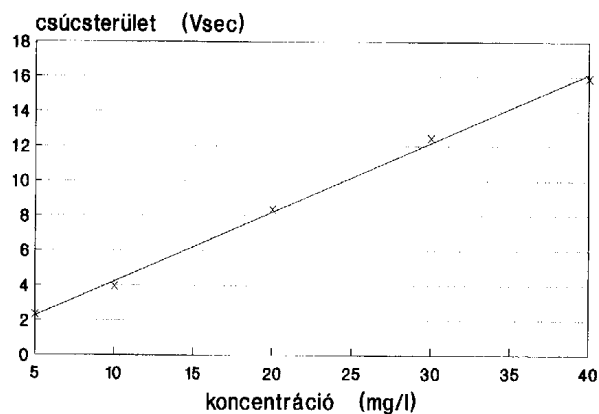
A 4. ábrán látható, hogy az üdítőitalban nem fordul elő olyan komponens vagy szennyezés, amely a kinin bázis (az eluátumban kininszulfát) fluorimetráható jelét zavarná.

Linearitás

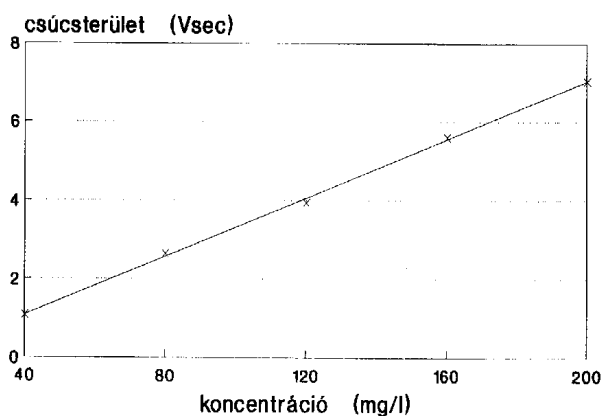
Az alkalmazott eluenssel 10-szeresére hígított üdítőitalból a kinin-bázis a 0,5 - 5,0 mg/liter, az 5,0 - 40,0 mg/liter és a 40,0 - 200,0 mg/liter koncentráció tartományban (a kalibrációk alapján) lineáris összefüggésekkel határozható meg. Az összefüggések korrelációs koefficiensei az előbbi sorrendben: $r = 0,997$; $r = 0,994$ és $r = 0,999$.



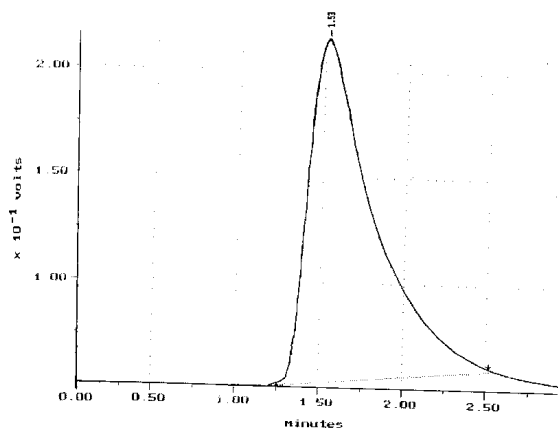
1. ábra: Kinin-bázis kalibrációs egyenese hígított üdítőitalból alacsony koncentráció tartományban



2. ábra: Kinin-bázis kalibrációs egyenese hígított üdítőitalból közepes koncentráció tartományban



3. ábra: Kinin-bázis kalibrációs egyenese hígított üdítőitalból magas koncentráció tartományban



4. ábra: Kinin-bázist 1,0 mg/liter koncentrációban tartalmazó hígított üdítőital kromatogramja

A kalibrációs regressziós egyenesek egyenletei:

$$Y = 5,15 X - 0,91$$

$$0,5 \text{ mg/l} \leq X \leq 5,0 \text{ mg/l}$$

$$Y = 0,40 X + 0,25$$

$$5,0 \text{ mg/l} \leq X \leq 40,0 \text{ mg/l}$$

$$Y = 0,04 X - 0,41$$

$$40,0 \text{ mg/l} \leq X \leq 200,0 \text{ mg/l}$$

ahol: Y = az integrátor csúcsterület jele (Vsec)

X = a kinin-bázis koncentrációja (mg/liter)

Pontosság és ismételhetőség

A pontosság, az ismételhetőség és a visszanyerés adatait a 1. táblázatban foglaltuk össze. Méréseink alapján a variációs koefficiensek jellemzően 15 % alatt maradnak.

1. táblázat: Kinin-bázis mérések pontosságának és ismételhetőségének statisztikai értékelése 6 párhuzamos esetén

Kinin koncentrációja		Szórás	Ismételhetőség %	Pontosság %	Erősítés a műszernél
Tényleges mg/liter	Mért mg/liter				
0,500	0,537	0,001	0,17	7,40	100
2,000	1,97	0,002	0,11	-1,60	100
5,000	5,13	0,013	0,26	2,52	100
5,000	4,90	0,257	5,23	-1,98	10
20,00	20,5	0,878	4,28	2,57	10
40,00	41,5	6,51	15,7	3,84	10
40,00	40,3	2,84	7,03	0,83	1
120,0	118,2	8,54	7,22	1,53	1
200,0	200,6	6,69	3,33	0,30	1

$$\text{Ismételhetőség \%} = \frac{\text{szórás}}{\text{várható érték}} \times 100$$

$$\text{Pontosság \%} = \frac{\text{mért koncentráció} - \text{tényleges koncentráció}}{\text{tényleges koncentráció}} \times 100$$

Érzékenységi határ

A validálási eljárás nemzetközi gyakorlatából ismert, hogy érzékenységi határnak azt a koncentrációt kell tekintenünk, amelynél a bekevert és a mérésből a kalibráció alapján számított (visszanyert) szubsztancia mennyiségek variációs koefficiense 20 %-ot mutat. Természetesen ebben az esetben legalább hat párhuzamos mérés értékeléséről van szó. Kalibrációs mérési tartományainkban jóval az így számított érzékenységi határ fölött dolgozunk.

Az érzékenységi határ a növekvő fluoriméter erősítéseknél: X = 1-szeresnél 0,4 mg/liter, X = 10-szeresnél 0,05 mg/liter, illetve X = 100-szorosnál 0,005 mg/liter.

Itt kell megjegyeznünk, hogy a mérési tartományok elhagyása esetén a variációs koefficiensek rohamos növekedése miatt az érzékenység drasztikus romlása várható!

Néhány gyakorlati vizsgálati eredmény

Különböző eredetű tonik mintákat vizsgáltunk, azok esetenkénti három párhuzamosból számított kinin koncentráció átlagát és szórási eredményét foglaltuk össze a 2. táblázatban. Feltűnő, hogy a viszonylag kis mintaszámú vizsgálati anyagban hat esetben találtunk a megengedett elérő vagy meghaladó kinin-koncentrációt.

2. táblázat: Tonik mintákban mért kinin-bázis koncentrációk

Kinin-bázis		Kinin-bázis	
koncentráció (mg/l)	szórás (%)	koncentráció (mg/l)	szórás (%)
57,8	3,1	60,7	4,7
59,4	4,3	49,9	10,6
42,7	7,6	55,6	9,5
72,5	11,4	71,1	12,1
75,3	8,2	65,6	7,4

A módszer értékelése

Az általunk kifejlesztett folyadékkromatográfiás módszer alkalmas a kinin üdítőitalokból történő meghatározására. A minta egyszerű előkészítést, csupán hígítást igényel, így nincs szükség a veszteséges extrakciós eljárásokra. A mérési eredmények jól ismételhetőek, a variációs koefficiensek jóval 20 % alattiak. A kalibrációs tartományok és összefüggések lehetővé teszik a kinin tág koncentráció határok közötti mérését.

IRODALOM

MSZ 21338/3-80 Alkoholmentes üdítőital. Fizikai és kémiai vizsgálati módszerek

Brodie, B. B. and Udenfriend, S.: The estimation of quinine in human plasma with a note on the estimation of quinidine;
J. Pharmacol. Exp. Ther. **78** (1943), 154-160

Kinin folyadék-kromatográfiás meghatározása üdítőitalokból

Csiba A. és Lombai Gy.

Ezideig nem ismertett módszert dolgoztak ki a kinin folyadék-kromatográfiás meghatározására. A módszer lényege, hogy a kinintartalmú oldatot kénsavval savanyított metanol eluenssel kromatografálják Nucleosil típusú C_{18} oszlopon. Spektrofluorimetrián 350 nm-es gerjesztés és 450 nm emisszió mellett mérnek különböző műszererősítésekhez tartozó (viszonylag szűk) koncentráció tartományokban. Adatokat szolgáltatnak módszerük validálásához.

Liquid Chromatographic Determination of Quinine in Soft Drinks

Csiba, A. and Lombai, Gy.

A method not described till now has been developed for the liquid chromatographic determination of quinine. The basis of the method is chromatography of the quinine-containing solution on a Nucleosil type C_{18} column using methyl alcohol eluent acidified with sulphuric acid. The measurement is carried out by spectrofluorometry with an excitation at 350 nm and emission at 450 nm, in a relatively narrow concentration range, belonging to different amplifications of the instrument. Data are published for the validation of the given method.

Flüssigkeitschromatographische Bestimmung von Chinin in Erfrischungsgetränken

Csiba, A. und Lombai, Gy.

Es wurde ein bisher nicht beschriebenes Verfahren zur flüssigkeitschromatographischen Bestimmung von Chinin ausgearbeitet. Das Prinzip der Methode besteht darin, daß die chininhaltige Lösung an einer C_{18} Säule vom Typ Nucleosil mit einem durch Schwefelsäure gesäuerten Methanoleluent chromatographiert wird. Die spektrofluorimetrischen Messungen wurden mit einer Induktion 350 nm und einer Emission von 450 nm in zu verschiedenen Instrumentenverstärkungen gehörenden (verhältnismäßig kleinen) Konzentrationsbereichen durchgeführt. Daten zur Validierung ihrer Methode wurden zur Verfügung gestellt.