

مجله دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، شماره (۲)، بهار ۱۳۶۹

تعیین مقدار کدئین بروش اسپکتروفوتومتری جدیدی

دکتر فاضل شمس^{*}، دکتر فروزنده حقایی

دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

خلاصه

کدئین الکلوییدی از دسته فنانتین ها و مشتق متیله مرفین است، میزان آن در عصاره تریاک حدود ۵/۵ درصد می باشد. در میان الکلوییدهای تریاک، کدئین و مرفین مصارف درمانی بیشتری دارند. اثرات فارماکولوژیک کدئین مشابه مرفین بوده و اثر درمانی و نیز عوارض جانبی آن کمتر می باشد.

روش ارائه شده بر مبنای واکنش کدئین با معرف برم تیمول بلو می باشد. کدئین در PH مساوی ۵/۶ با معرف برم تیمول بلوکمپلکس زرد رنگ قابل استخراج با کلروفورم تشکیل می دهد. نسبت مولی بین کدئین و معرف در کمپلکس ۱:۱ است. محلول کلروفورمی کمپلکس دارای جذب ماکزیمم در طول موج ۴۲۰ نانومتر است و در غلظت ۲ تا ۱۴ میکروگرم کدئین در هر میلی لیتر کلروفورم از قانون بیر تبعیت می نماید.

تجزیه کدئین با این روش در حضور مواد شیمیایی و دارویی متعددی بدون خطای قابل توجه انجام پذیر است. این روش در حضور مرفین به میزان ۶۰ درصد کدئین قابل اجرا می باشد.

مقدمه

و با حساسیت بالا که از این نظر نسبت به روش های مشابه ارجحیت دارد.

بخش تجربی

دستگاهها: جذب محلولها توسط دستگاه اسپکترو- فوتومتر Bausch & Lomb مدل Spectronic 20 اندازه گیری شد. ترازوی مورد استفاده Sartorius Selecta بوده و برای تعیین pH محلولها از دستگاه pH متر مدل M 63 Digital استفاده شد.

محلولها:

الف - محلول استاندارد فسفات کدئین با غلظت 10^{-4} مولار:

۳۹/۷۳ میلی گرم فسفات کدئین را که به دقت توزین شده در یک بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری در آب مقطر

روش های مختلفی برای اندازه گیری کدئین پیشنهاد شده است. از میان این روشها می توان به تیتراسیون در محیط غیرمابی (۱)، روش های کروماتوگرافی (۲، ۳) روش HPLC (۴)، ایجاد کمپلکس رنگی توسط معرف های گوناگون (۵-۸) اشاره نمود.

اغلب این روشها بعلت پیچیدگی قابل استفاده در کارهای روزمره آزمایشگاهی نبوده و یا دارای حساسیت کافی نمی باشند. در روش های اسپکتروفوتومتری پیشنهادی اشکال بزرگ تعیین مقدار کدئین در فرآورده های دارویی در حضور سایر مواد می باشد.

بطور کلی برخی معرفهای اسید - باز مانند برم تیمول بلو، برم کریزول گرین و متیل اورانژ با ترکیبات حاوی ازت کواترنر کمپلکس های رنگی می دهند که در pH های معینی از قانون بیر - لامبرت پیروی می کنند.

روش اسپکتروفوتومتری جدید برای تعیین مقدار کدئین با استفاده از برم تیمول بلو روشی است ساده، سریع

بیشتر ترکیبات دارویی که معمولاً همراه با کدئین بکار برده میشوند در این روش مزاحمتی ایجاد نمیکنند. در مورد فرآورده های حاوی ازت کواترنر، ابتدا کدئین توسط کروماتوگرافی لایه نازک جدا نموده و سپس با استفاده از معرف برم تیمول بلو تعیین مقدار مینمایند.

با استفاده از روش ایزومولار ثابت میشود که کمپلکس مورد نظر از یک مولکول کدئین و یک مولکول معرف تشکیل یافته است. نتایج بدست آمده از روش اشباعی نشان میدهد که برای تشکیل کامل کمپلکس، مقدار مورد نیاز معرف، کمی بیش از ۲ برابر مقدار کدئین میباشد. حساسیت روش تا ۴ میکروگرم در ۱۰ میلی لیتر محلول میباشد.

برای تعیین مقدار کدئین در حضور مرفین با روش ارائه شده در این مطالعه و روش تیتراسیون غیرمائی که برای آنالیز کدئین در BP پیشنهاد شده، مقایسه ای صورت گرفته است. نتایج بدست آمده از این مقایسه نشان میدهد که در روش پیشنهادی حضور مرفین تا ۶۰ درصد مقدار کدئین مزاحمتی در تعیین مقدار ایجاد نمی کند، حال آنکه در روش تیتراسیون غیر مائی وجود همین مقدار مرفین باعث ایجاد حدود ۲۵ درصد خطا میشود.

بررسی تداخل مواد موجود در فرآورده های دارویی

برای بررسی احتمال تداخل مواد موجود در فرمولاسیون فرآورده های حاوی کدئین با روش پیشنهاد شده، آزمایشاتی انجام گرفت.

به ۵ میلی لیتر از محلول فسفات کدئین حاوی ۱۰۰ میکروگرم جسم مقادیر متفاوتی از مواد مورد نظر افزوده و سپس به روش عمومی کمپلکس را استخراج و جذب محلول کلروفورم می را می خوانیم و حداکثر مقداری را که باعث تغییر جذب کمپلکس نگردد تعیین می کنیم. نتایج حاصله بترتیب زیر است:

فنیل پروپانول آمین (۲ میکروگرم)، کلروفنیرآمین (۱۰

میکروگرم)، فنیل آفرین (۱۲۵ میکرو پی و پی (۵۰ میکرو)، گوا فنه زین (۴۰ میلی گرم)، آمونیوم کلراید (۲۰ میلی-گرم)، اسپرین (۱/۲۵ میلی گرم)، لاکتوز (۱۰ میلی گرم)، نشاسته (۲ میلی گرم)، کافئین (۲۰۰ میلی گرم)، الکل ۹۶ درجه (۳ میلی لیتر).

حل کرده و به حجم می رسانیم. محلولهای با غلظت کمتر بوسیله رقیق کردن محلول فوق با آب مقطر تهیه می شوند.

ب - محلول برم تیمول بلو با غلظت 10^{-4} مولار:

۶۶۸/۷۶ میلی گرم برم تیمول بلو را بدقت وزن نموده و به بالن ژوژه یک لیتری منتقل و به کمک ۵ میلی لیتر سود ۰/۱ نرمال کاملاً حل کرده و سپس با آب مقطر به حجم می رسانیم. محلول ۰/۰۰۱ مولار بدست می آید. ۱۰ میلی لیتر از محلول فوق را به بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری منتقل نموده و به حجم می رسانیم.

محلول معرف با غلظت 10^{-4} مولار بدست می آید.

ج - محلولهای بافر با pH استاندارد:

محلولهای بافر با $pH=2$ تا $pH=9$ به کمک راهنمای استاندارد موجود در BP تهیه می شوند.

روش عمومی

در یک آمپول دکانتاسیون ۱۰۰ میلی لیتری، ۵ میلی لیتر محلول بافر $pH = 5/6$ ، ۲۰-۱۴۰ میکروگرم فسفات کدئین و ۱۵ میلی لیتر محلول معرف BTB با غلظت 10^{-4} مولار منتقل نموده و مخلوط می کنیم تا کمپلکس کاملاً تشکیل گردد. کمپلکس حاصل را توسط ۲/۳، ۵ میلی لیتر کلروفورم بطور کامل استخراج نموده و در بالن ژوژه ۱۰ میلی لیتری جمع آوری کرده و توسط کلروفورم به حجم می رسانیم. جذب کمپلکس زرد رنگ حاصل را در طول موج ۴۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل بلانک می خوانیم.

" نتیجه و بحث "

در اثر واکنش بین کدئین و برم تیمول بلو در $pH = 5/6$ یک کمپلکس زرد رنگ قابل استخراج توسط کلروفورم بوجود می آید. مقادیری بین ۲۰ تا ۱۴۰ میکروگرم کدئین که جذبی بین ۰/۱ تا ۰/۷۲۲ را نشان میدهد از قانون بیر پیروی مینماید. ضریب خاموشی مولی کمپلکس برابر با $2/1 \times 10^4$ میباشد.

اثرات درجه حرارت، غلظت یون یدروژن و حضور مواد شیمیائی و دارویی مختلف بر تشکیل و استخراج کمپلکس بررسی شده اند. بهترین pH جهت تشکیل و استخراج کمپلکس ۵/۶ بوده است و تغییر درجه حرارت اثری بر تشکیل یا استخراج کمپلکس نداشته است.

چهار نمونه حاوی مقادیر متفاوت از کدئین و مرفین تهیه نموده و در مقدار کافی اسید استیک گلاسیال خل و بروش تیتراسیون غیرمائی تیترومی نمائیم. چهار نمونه دیگر نیز با مقادیر برابر با نمونه های قبل تهیه کرده، با آب مقطر به میزان کافی رقیق نموده بطوریکه هر میلی لیتر آن حاوی ۲۰ میکروگرم فسفات کدئین باشد. محلولهای حاصل را به روش پیشنهادی تجزیه نموده و نتایج بدست آمده در جدول شماره (۱) نشان داده شده است از جدول شماره (۱) چنین نتیجه می گیریم که مقدار ۲۴۰ میلی گرم سولفات مرفین برای ۴۰۰ میلی گرم فسفات کدئین (۶۰ درصد) مزاحمت ایجاد نمی شود هنگام تجزیه بروش پیشنهادی و لیکن موجب ۲۵ درصد خطا برای تیتراسیون غیرمائی می شود. لذا اگرچه هر دو روش تیتراسیون غیرمائی و تشکیل یون مزدوج با ازت فاقد خاصیت (specificity) میباشند و لیکن در این مورد بعلت تفاوت در حلالیت و یا ضریب توزیع دو ماده تا حدودی روش پیشنهادی مزیت دارد. همچنین می توان این روش را برای بررسی پیشرفت سنتز کدئین از مرفین بکار ببریم.

بررسی اثر حضور مرفین بر تجزیه کدئین
بروش پیشنهادی و روش تیتراسیون غیرمائی

در یک آمپول دکانتاسیون ۱۰۰ میلی لیتر، ۵ میلی لیتر بافر با $\text{PH} = 5/6$ و ۳۵-۲۴۵ میکروگرم سولفات مرفین و ۱۵ میلی لیتر محلول معرف 10^{-4} مولار را مخلوط نموده و کمپلکس زرد رنگ حاصل را توسط ۲۳،۵ میلی کلروفورم استخراج نموده و در بالن ژوژه ۱۰ میلی لیتری جمع آوری و جذب آنرا می خوانیم. مشاهده می شود که مقادیری بین ۳۵ تا ۲۴۵ میکروگرم سولفات مرفین جذبی بین ۰/۰۳ تا ۰/۲ را نشان می دهد. در مقایسه با کدئین که مقادیری بین ۲۰ تا ۱۴۰ میکروگرم جذب بین ۰/۱ تا ۰/۷۲ را نشان میدهد جذب سولفات مرفین ناچیز است. برای بررسی علل این مسئله آزمایشاتی انجام شد، از جمله تعیین توزیع سولفات مرفین و فسفات کدئین در فازمائی و فاز کلروفورمی در pH های متفاوت. همچنین تجزیه کدئین در حضور مرفین بروش پیشنهادی و روش تیتراسیون غیرمائی (۱) به ترتیب ذیل صورت پذیرفته است:

جدول شماره ۱: تعیین مقدار کدئین در مخلوط کدئین - مرفین بروش تیتراسیون غیر مائی و روش ایجاد کمپلکس با معرف BTB

کدئین بدست آمده					
مرفین (mg)	کدئین (mg)	روش غیر مائی		روش پیشنهادی	
		مقدار	%	مقدار	%
۸۰	۴۰۰	۴۳۷	۱۰۹/۳	۳۹۸/۵	۹۹/۶
۲۴۰	۴۰۰	۵۰۰	۱۲۵	۴۰۰	۱۰۰
۴۰۰	۴۰۰	۵۷۶	۱۴۴	۴۳۲	۱۰۸
۴۰۰	۳۲۰	۵۳۲	۱۶۶/۳	۴۱۲	۱۲۸/۸
۰	۴۰۰	۳۹۳	۹۸/۳	۴۰۰	۱۰۰

و $pH = 5/6$ و ۱۵ میلی لیتر معرف 10^{-4} مولار اضافه کرده و کاملاً مخلوط می‌نماییم. کمپلکس زرد رنگ تشکیل شده را توسط کلروفورم استخراج و در بالن ژوژه ۱۰ میلی لیتری جمع آوری نموده و جذب آنرا می‌خوانیم.

این آزمایش را عیناً در مورد ۱۷۵ میکروگرم سولفات مرفین تکرار می‌کنیم. نتایج هر دو آزمایش در جدول شماره (۲) منعکس گردیده است. مقایسه توزیع دو ماده در pH های مختلف نشان می‌دهد که سولفات مرفین بسختی وارد فاز کلروفورم می‌شود.

تعیین ضریب توزیع سولفات مرفین و فسفات کدئین بیسن کلروفورم و آب به روش استفاده از BTB

به هریک از هفت دکانتور ۱۰۰ میلی لیتری، ۱۰۰ میکروگرم فسفات کدئین، ۳ میلی لیتر با فراز $pH = 3$ تا $pH = 9$ اضافه نموده و پس از مخلوط کردن با ۳، ۲ و ۱ میلی لیتر کلروفورم استخراج می‌کنیم. لایه های کلروفورمی حاصل را به ۷ دکانتور دیگر منتقل نموده و ۵ میلی لیتر با

جدول شماره ۲: تعیین ضریب توزیع سولفات مرفین و فسفات کدئین بین کلروفورم و آب بر روش فوق.

درصد ضریب توزیع بین کلروفورم و آب

ماده	pH		
	کدئین	مرفین	
۳	۱۶	۶	۳
۴	۳۰	۸	۴
۵	۳۸	۸	۵
۶	۸۴	۹	۶
۷	۱۰۰	۱۶	۷
۸	۱۰۰	۲۶	۸
۹	۱۰۰	۳۵	۹

مذکور بطور مستقیم امکان پذیر نبوده و لازمست ابتدا کدئین را با کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) از دو ماده فوق جدا کرده و بعد با استفاده از معرف BTB تعیین مقدار نمود. مناسب ترین حلال برای جداسازی سه ماده مذکور اتانول ۹۶ درصد بوده و R_f های بدست آمده بصورت زیر میباشند:

کلرفنیرآمین (۰/۰۵) - کدئین (۰/۱۷) و فنیل پروپانول آمین (۰/۷)

۵ میلی لیتر از شربت اکسپکتورانت کدئین بمقدار مناسب رقیق نموده و معادل ۲۰۰ میکروگرم فسفات کدئین روی TLC لکه گذاری انجام داده و جداسازی در حضور اتانول ۹۶ درصد صورت پذیرفت. توسط UV محل لکه ها را مشخص و قسمت مربوط به کدئین را جدا کرده و با ۱۰ میلی لیتر

"تعیین مقدار کدئین در شربت اکسپکتورانت کدئین" شربت اکسپکتورانت - کدئین علاوه بر فسفات کدئین حاوی مواد موثره دیگری از قبیل کلرفنیرآمین مالئات، فنیل پروپانول آمین هایدروکلراید، کلروآمونیم و گوای فنه زین میباشد. میزان تحمل دو ماده اخیر توسط کمپلکس کدئین - BTB زیاد بوده و مزاحمتی در تعیین مقدار کدئین ایجاد نمی‌کنند. ولی فنیل پروپانول آمین هایدروکلراید و کلرفنیرآمین مالئات بعلت دارا بودن ازت کواترنر در شرایطی که آزمایشات انجام شده مزاحمت ایجاد می‌نمایند. میزان تحمل کلرفنیرآمین کمتر از ۱۰ میکروگرم و فنیل پروپانول آمین ۲ میکروگرم در برابر ۱۰۰ میکروگرم کدئین می‌باشد. به این ترتیب عمل تعیین مقدار کدئین در شربت

چونکه شربت اکسیکتورانت - کدئین دارای مواد مزاحم تجزیه کدئین است، لذا بروش فوق نمی‌توان آزمایش بازیابی را انجام داد. لذا بایستی از روش تعیین مقدار کدئین در اکسیکتورانت - کدئین که در قسمت قبلی ذکر شده استفاده کنیم. برای انجام آزمایش بازیابی بترتیب زیر عمل کردیم:

۱۰ میلی لیتر از شربت را که حاوی ۲۰ میلی گرم کدئین فسفات می‌باشد برداشت کرده و با آب مقطر رقیق می‌نمائیم. مقدار ۲۰ میلی گرم پودر خالص فسفات کدئین افزوده و توسط آمونیاک قلیایی و با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر می‌رسانیم. از محلول بدست آمده ۲ میلی لیتر به یک دکانتور منتقل نموده و دو بار هر بار با ۵ میلی لیتر کلروفورم استخراج می‌کنیم و در بالن ۱۰ میلی لیتری جمع آوری و با کلروفورم به حجم میرسانیم محلول کلروفورمی حاصل معادل ۸۰۰ میکروگرم فسفات کدئین در هر میلی لیتر دارا می‌باشد از این محلول بمقدار ۰/۲ میلی لیتر برای لکه گذاری روی TLC استفاده میشود. طبق روش تعیین مقدار کدئین در شربت اکسیکتورانت روش را ادامه می‌دهیم. جذب محلولها را در طول موج ۴۲۰ نانومتر می‌خوانیم و از روی جذب مقدار فسفات کدئین را محاسبه می‌کنیم. محاسبات نشان می‌دهد که مقدار فسفات کدئین بدست آمده معادل ۹۰ درصد مقدار اضافه شده می‌باشد. نتیجه این آزمایش در جدول شماره (۳) نشان داده شده است.

کلروفورم مخلوط و سپس صاف نمودیم. محلول را جهت تجزیه کدئین بروش BTB آزمایش نمودیم. مقدار حاصل ۹۰ درصد مقدار اصلی بوده است.

آزمایش بازیابی فسفات کدئین در فرآورده های دارویی

برای ارزیابی تعیین مقدار فسفات کدئین در فرآورده های دارویی به کمک BTB، مقدار مشخص از فسفات کدئین را به محلول فرآورده مورد آزمایش اضافه کرده و طبق روش کلی استخراج نموده و جذب لایه کلروفورمی را در طول موج ۴۲۰ نانومتر در مقابل بلانک خواندیم. فرآورده هایی که بترتیب فوق عمل شده اند عبارتند از قرص اسپیرین - کدئین و قرص استامینوفن - کدئین بوده اند. ۵ قرص را پس از ساعتی در آب مقطر حل نموده و پس از اضافه کردن مقدار مشخصی از پودر فسفات کدئین، به بالن ژوژه ۵۰۰ میلی لیتری منتقل و با آب مقطر به حجم می‌رسانیم. برای هر فرآورده یک نمونه سنتتیک نیز با توجه به مقادیر استفاده شده در فورمولاسیون اصلی تهیه کردیم. از هر نمونه به مقدار مناسب نمونه برداری و به دکانتور منتقل می‌کنیم. مطابق روش عمومی کمپلکس تشکیل شده را استخراج و جذب آنرا می‌خوانیم. از جذب بدست آمده مقدار فسفات کدئین را محاسبه می‌نمائیم. نتیجه این آزمایش در جدول (۳) نشان داده شده است.

* جدول شماره (۳) بازیابی کدئین فسفات در فرآورده های دارویی مختلف *

نام فرآورده	مقدار فسفات کدئین (ug)		مقدار فسفات کدئین (ug)		بازیابی (%)
	نمونه برداری شده	افزافه شده	پیش‌بینی شده	بدست آمده	
قرص اسپیرین - کدئین	۳۰	۷۰	۱۰۰	۱۰۱	۱۰۱/۴
قرص استامینوفن - کدئین	۳۰	۷۰	۱۰۰	۹۹/۵	۹۹/۳
قرص اسپیرین - کدئین *	۴۵	۷۰	۱۱۵	۱۱۶	۱۰۱/۴
قرص استامینوفن - کدئین *	۴۵	۷۰	۱۱۵	۱۱۴	۹۸/۶
شربت اکسیکتورانت	۴۰	۴۰	۸۰	۷۶	۹۰

* نمونه ساخته شده در آزمایشگاه

ارزشیابی دقت و صحت روش پیشنهادی: برای
 ارزشیابی صحت و دقت روش ۱۰ نمونه فسفات کدئین حاوی
 ۴۰ میکروگرم و ۱۰ نمونه حاوی ۱۴۰ میکروگرم را به روش
 عمومی مورد تجزیه قرار میدهیم براساس آنالیز آماری صحت
 روش بین ۹۹/۱ تا ۹۹/۴ و دقت روش ۹۸/۸ درصد
 میباشد.

منابع

- 1- British pharmacopeia. Her Majesty's Stationary Office: London, 1980; pp 122
- 2- Studer, B. ; Mueller , K.H. Pharm. Acta Helv. 1982,57(7),181 corresponding to C.A. 97: 115387b
- 3- Hendriks , H.; Batterman, S.; Smith , D., Dtsch. Apoth. Ztg. 1982,122(36),1800- corres. to C.A. 97 : 188366 d
- 4- Posey , B.L. ; Kimble , S.N. J. Anal. Toxicol.,1983, 7(5), 241- 245.
- 5- Rao , N.V.R.; Tandon , S.N. Indian J. Chem., Sec.A, 1978, 16A(11), 1000-1001.
- 6- Ganescu ,I.; Popescu ,A. Rev. Chim (Bucharest), 1973, 24(7),558-559. corres.to C.A. 80 : 100234z
- 7- Taha , A.M.; El-Shabouri, M.S.R. ; Rageh , A.I. Pharmazie 1982, 37 (7) 489-491. corres. to C.A. 97 : 169012c.
- 8- Salman , S. ; Bayrakdar ,N. Eczacilik Bul., 1983,25 (2), 30-33. corres. to C.A. 99: 164092b

بوضیحات

این پژوهش با استفاده از اعتبارات شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران بشماره ۱۸۷۷-۳۲۰ انجام گردیده

است.

Title : A New Sensitive Procedure for the Determination of Codeine in Pharmaceutical Preparations.

Authors : FAZEL SHAMSA and FUROOZANDEH HAKKI

Address: College of Pharmacy, Medical Sciences University of Tehran, Tehran
14, Iran.

Abstract

A spectrophotometric procedure for the determination of codeine based on the reaction with bromthymol blue was developed. A yellow complex forms and is easily extractable by chloroform at PH 5.6. The mole ratio of bromthymol blue in the complex is 1:1. The absorbance of the complex obeys Beer's law over the concentration range of 2-14 ug of codeine per ml of chloroform. This procedure can be carried out in the presence of many common excipients without interference. In the presence of morphine to the extent of 60% of codeine present the analysis of codeine could be carried out without interference.