

DIE POLAROGRAPHISCHE UND OSZILLOPOLAROGRAPHISCHE STUDIE DES PHYSOSTIGMINS

V. PARRÁK, E. RADĚJOVÁ

Staatliches Institut für Arzneimittelkontrolle in Bratislava

Pri oscilografickej polarografii fyzostigmínu v alkalickom prostredí získaný kapacitný zárez postupne mizne. Vymiznutie zárezu je zapríčinené hydrolyzou fyzostigmínu. Priebeh celej reakcie sa sledoval oscilopolarograficky. Súčasne sa vypracovala metóda na polarografické stanovenie fyzostigmínu.

Es wurde die Geschwindigkeit der Zersetzung des Physostigmins studiert und eine Methode zu seiner Bestimmung vorgeschlagen.

Die Prüfung der Stabilität verschiedener pharmazeutischer Präparate ist für die Industrie, wie auch für die Kontrollpraxis von grosser Bedeutung. Schon früher wurde auf die Möglichkeit die Spaltung der Alkaloide oszillopolarographisch zu verfolgen [1, 2] hingewiesen. Diesmal befassten wir uns mit Physostigmin (Eserin), welcher in der Therapie noch häufig eingesetzt wird.

Dieses Alkaloid ist eine monoacide, ditertiäre Base mit drei $-NCH_3$ -Gruppen; in alkalischem Milieu spaltet es sich, wobei Eserolin [3], welches nur zwei $-NCH_3$ -Gruppen besitzt, entsteht. Aus den Degradationsprodukten wurde die Struktur des Eserolins geklärt und die Konstitution durch Synthesen [4-6] bestätigt; so wurde eigentlich die Anwesenheit des Indolsystems im Molekül festgestellt, was auch durch das UV-Spektrum bewiesen wurde.

In der vorliegenden Arbeit versuchten wir einerseits unsere auf dem Wege der Papierchromatographie, Photokolorimetrie und Spektrophotometrie schon vorgenommenen Studien weiter zu vertiefen [7, 8], ferner eine Methode auszuarbeiten, welche auch die quantitative Auswertung dieses Alkaloides ermöglichen könnte indem es auf eine polarographisch aktive Verbindung, welche auf der Quecksilbertropfelektrode reduzierbar wäre, umgewandelt wird.

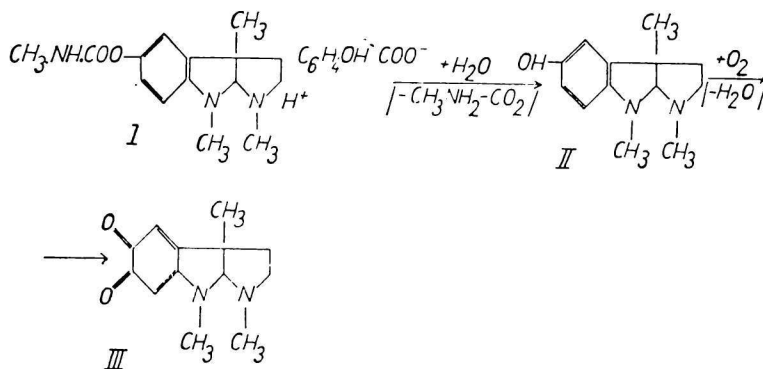
Experimenteller Teil

Apparatur und Chemikalien

Die polarographischen Arbeiten wurden auf dem Polarograph Heyrovský Typ LP 55 durchgeführt. Die Konstanten der Glaskapillaren bei einer Höhe des Quecksilberreservoirs von 45 cm waren: $t = 2,4$ sec.; $m = 3,75$ mg/sec. Wir haben mit Gefässen nach Kalousek und mit einer gesättigten Kalomelektrode als Anode gearbeitet. Die oszillopolarographischen Messungen wurden auf dem Polaroskop P 576 vorgenommen. Standardlösungen von Physostigmin wurden so hergestellt, dass die entsprechenden Mengen des Alkaloids im frisch destillierten Wasser aufgelöst wurden.

Ergebnisse

Die oszillographische Polarographie erwies sich als eine der vorteilhaftesten Methoden zum Verfolgen der alkalischen Hydrolyse und darauffolgenden Oxydation des Physostigmins, welche besonders nach 10, 14, 18 und 24 Stunden gut bemerkbar ist. Laut Literaturangaben entsteht bei der alkalischen Hydrolyse des Physostigmins (I), Methylamin, Kohlendioxyd, Wasser und Eserolin (II), ferner durch die darauffolgende Oxydation der phenolischen Gruppen im Eserolin-Molekül bildet sich Rubreserin (III), welches chinoiden Charakter hat.



Das Degradationsprodukt Methylamin bietet in 2 M-H₂SO₄ auf dem kathodischen Ast der Kurve eine Verweilung bei Q 0,46 (Abb. 1a). Dagegen in 2 M-NaOH erhalten wir auf dem kathodischen Ast einen Einschnitt mit einem Q -Wert von 0,8 (Abb. 1b). Auf der Abb. 2 zeigen wir wie sich die Einschnitte des Physostigmins in Abhängigkeit von der Zeit verändern. Der Kapazitätseinschnitt bei Q 0,66 verkleinert sich mit der Zeit und es bilden sich zwei reversible Einschnitte mit Q -Werten von 0,18 und 0,26, von welchen der zweite Einschnitt tiefer ist. Auf dem Wege der klassischen Polarographie haben wir ein reversibles chinoides Redox-System bestätigt; es ist anzunehmen, dass es sich um das Degradationsprodukt Rubreserin, welches rot gefärbt ist, handelt.

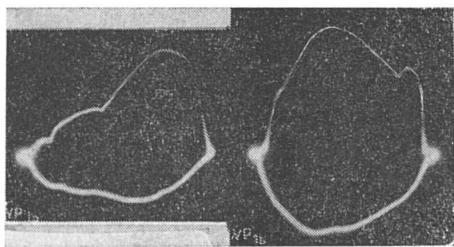


Abb. 1. $dE/dt = f_1(E)$ -Kurve von Methylamin.

Konzentration $2,5 \cdot 10^{-5}$ M:
 a) 2 M-H₂SO₄; b) 2 M-NaOH.

Arbeiten wir im alkalischen Milieu bei erhöhter Temperatur, so erfolgt eine schnellere Zersetzung des Physostigmins (Abb. 3).

Durch Einfluss eines Gemisches von Salpetersäure mit anderen starken Säuren (Schwefelsäure, Perchlorsäure) gelang es uns dieses Alkaloid auf eine polarographisch aktive Verbindung unzuwandeln. Die wässrigen Lösungen des Physostigmins wurden mit solchen Mengen verdünnter Salpetersäure und Schwefelsäure versetzt, dass auf einen Mol des Alkaloides 2 Mole Salpetersäure zugegeben wurden. Dann wurde 20 Minuten lang bei 90 °C erhitzt und nach dieser Zeitdauer wurde der weitere Verlauf der Reaktion mit einem Zusatz von 2 M-NaOH unterbrochen. Darauf wurden die Lösungen mit Zitratpuffer gemischt und das polarographische Verhalten studiert (Abb. 4a, b). Für analytische

Zwecke erwiesen sich Aufnahmen bei pH 3,0 am besten ($E_{1/2} = -0,22$ V). Bei nitrierten Produkten verläuft die Reduktion prinzipiell in zwei Stufen, wobei die erste einer 4-Elektronenreduktion des Hydroxylamins bis auf Amin entspricht. Die intermediäre Reduktionsstufe auf eine Nitrosoverbindung ist auf der polarographischen Kurve nicht bemerkbar.

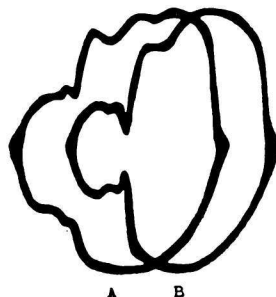
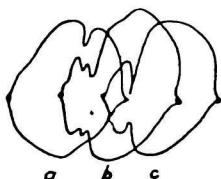


Abb. 2. Die Spaltung des Physostigmins in 2 M-LiOH. Konzentration $2,3 \cdot 10^{-4}$ M: a) sofort nach der Mischung; b) nach 5 Minuten; c) nach 24 Stunden. — Abb. 3. Die Temperaturabhängigkeit der Einschnitte des Physostigmins. Konzentration $4,8 \cdot 10^{-4}$ M in 2 M-NaOH: A bei 20 °C; B. nach dem Erhitzen bis zum Siedepunkt.

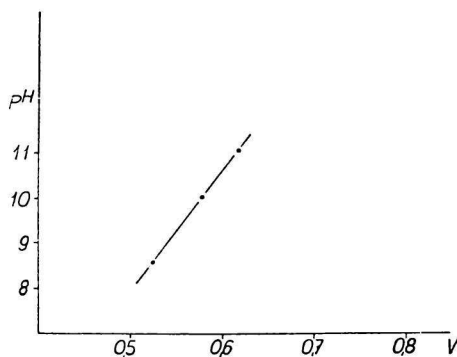
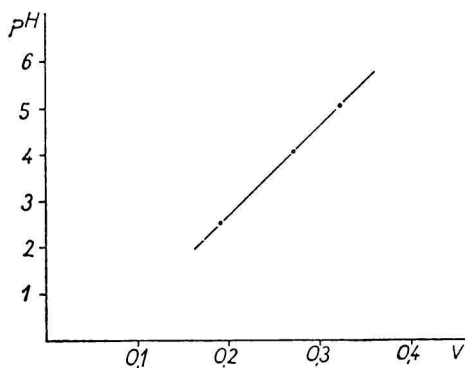


Abb. 4. Die pH-Abhängigkeit des Halbstufenpotentials des Physostigmins nach der Reaktion mit der Nitrierlösung; $T = 20$ °C. a) pH Bereich von 2,5—6; b) pH Bereich von 8—11.

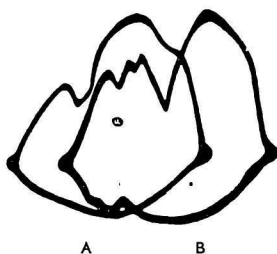


Abb. 5. Die Temperaturabhängigkeit der Einschnitte des Physostigmins nach der Behandlung mit einem Gemisch verdünnter HNO_3 mit HClO_4 . Nach 15 Minuten langen Erhitzen auf pH: a) 2,5; b) 9,0 eingestellt.

Aus den oszillographischen Messungen geht hervor, dass wir nach einem 15 Minuten langen Einwirken der verdünnten Salpetersäure auf Physostigmin, kathodische Einschnitte von Q 0,27; 0,35 und 0,78 erhalten. Dagegen beim Übergang ins alkalische Milieu (pH 9) erhalten wir auf dem kathodischen Ast vier Einschnitte von Q -Werten 0,26; 0,36; 0,43 und 0,61 von welchen besonders die zwei letzten markanter sind. Auf den oszillographischen Aufnahmen erhalten wir in diesem Falle keine reversible Einschnitte.

Nach einer Reaktion des Physostigmins

(Abb. 5) mit einem Gemisch von Salpetersäure und Perchlorsäure bildet sich auf dem kathodischen Ast nur ein Einschnitt, dessen Q -Wert 0,35 ist. Der Einschnitt mit dem Q -Wert 0,78 verschwand gänzlich. Beim Übergang ins alkalische Milieu erhalten wir zwei gegenüber liegende Einschnitte mit Q -Werten 0,24 und weiter negativere mit Q -Werten 0,33 und 0,48. Die Tabelle 1, in welcher die Q -Werte der oszillopolarographischen Aufnahmen des Physostigmins nach der Reaktion mit dem Nitrierungsagens angeführt sind, zeigt, dass der reversible Elektrodenvorgang schon bei pH 6 vergeht und bleibt auch bei höheren pH-Werten unverändert.

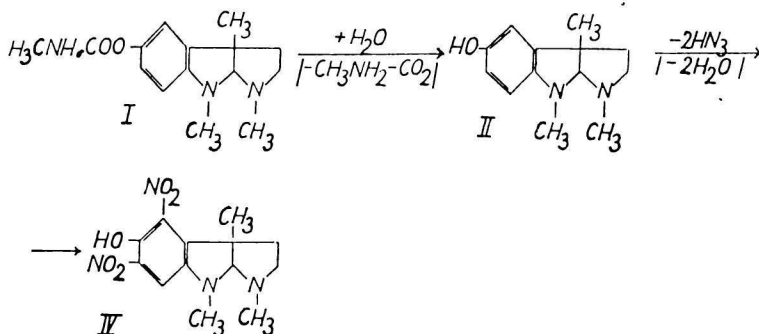
Tabelle 1

pH \ Q	Kathodischer Einschnitt						Anodischer Einschnitt		
	2,5	0,34						0	
6,1	0,24		0,42		0,48		0,52	0,24	
7,2	0,24		0,42		0,48		0,54	0,24	
8,1		0,22		0,44		0,52		0,22	0,24
9,0		0,24		0,33		0,60		0,24	
10,5		0,22		0,44		0,5		0,22	0,24
10,9	0,08		0,28		0,42		0,48	0,08	0,1 0,24

Q -Werte des aus Physostigmin nach der Reaktion mit dem Nitrierungsagens entstandenen Produktes bei 20 °C gemessen.

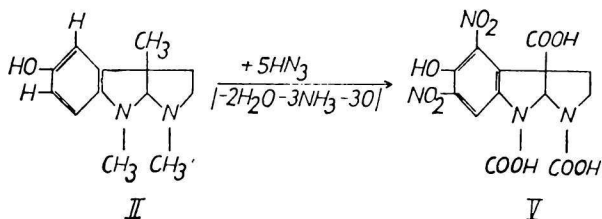
Diskussion

Auf ein merkwürdiges Verhalten des Physostigmins im alkalischen Bereich machte R. Kalvoda [9] aufmerksam. Wir stellten fest, dass das Degradationsprodukt Methylamin oszillopolarographisch aktiv ist. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der kolorimetrischen, spektrophotometrischen und chromatographischen liegt darin, dass sie den ganzen Verlauf der Zersetzung in Abhängigkeit von der Zeit und Temperatur zu verfolgen



gestattet. Wir verfolgten ähnlich wie in den Arbeiten [10—12] polarographisch und oszillopolarographisch die Reaktion des Physostigmins mit Salpetersäure und Schwefelsäure und fanden, dass durch Bildung des Nitroderivates eine sehr empfindliche und selektive polarographische Bestimmung des Physostigmins möglich sei.

Das entstandene Nitroderivat des Physostigmins ist ziemlich stabil, da wir bei wiederholter Analyse nach 15, 30, 45 und 60 Minuten dieselben polarographischen Kurven erhielten. Der Verlauf der Nitration des Physostigmins (I) wäre bei normalen Bedingungen folgend (IV). Bei drastischeren Bedingungen könnte höchstwahrscheinlich nach der Nitrierung eine Oxydation der $-\text{CH}_3$ -Gruppen auf Carboxylgruppen (V) erfolgen. Da



dieses Alkaloid als Salizylat, Hydrobromid und Sulphat verwendet wird, empfehlen wir bei der polarographischen Bestimmung als Standard das betreffende Salz des Physostigmins zu verwenden.

Im Hinblick auf die Arbeiten mancher Autoren [13—15], welche feststellen, dass das Chinon in der klassischen Polarographie bei gewissen optimalen Bedingungen einen Kondensat mit Aminosäuren bildet, überprüfen wir das Verhalten des Zersetzungsderivates von Physostigmin, welcher auch chinoiden Charakters ist. Wir haben mit einem Überschuss von Thiourea gearbeitet. In unserer experimentellen Arbeit stellten wir fest, dass Hydrochinon allein im sauren, sowie auch im alkalischen Milieu keine interessanten Ergebnisse in der oszillographischen Polarographie bietet.

Schliesslich eluierten wir die chromatographisch getrennten Substanzen in Wasser und in 0,1 M-HCl und registrierten ihr Absorptionsspektrum [7]. Als ein optisches Gegen-

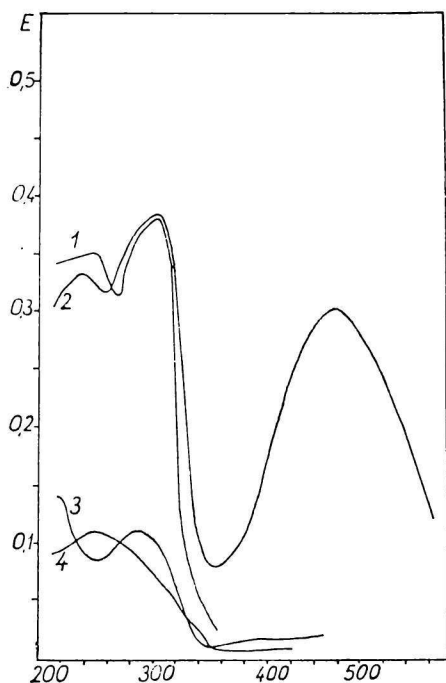


Abb. 6. UV-Absorptions-Spektrum chromatographisch getrennter Substanzen in 0,1 N-HCl eluiert.

Spektrum 1 — Physostigmin-Base; 2 — Rubreserin durch alkalische Oxydation des Physostigminsulphates gewonnen ($R_F = 0,70$); 3 — Degradationsprodukt aus 3 %-iger Injektionslösung des Physostigminsulphates ($R_F = 0,30$); 4 — Degradationsprodukt mit $R_F = 0,24$. Universal Spektrophotometer Carl Zeiss, Jena, Küvetten 0,5 cm, Q.

gewicht verwendeten wir ein Eluat aus dem Chromatogramm, damit wir einem eventuellen Fehler vorbeugen, der durch die Verwendung von destilliertem Wasser als Vergleichslösung auftreten könnte. Das eluierte Rubreserin gab in UV-Gebiet zwei Maxima und ein weiteres im sichtbaren Teil des Spektrum (Abb. 6). Die Eluate weiterer Zersetzungsprodukte gaben schon gänzlich deformierte Kurven.

Praktische Anwendung

Zu 1 ml Physostigminlösung (Konzentration des Alkaloides 3—7 mg/ml) werden 0,5 ml konzentrierter Salpetersäure $D = 1,4$ und 0,5 ml Schwefelsäure $D = 1,8$ zugefügt. Um die Nitrierung zu beschleunigen, kann auch ein Gemisch von gleichen Mengen von Perchlorsäure und Salpetersäure verwendet werden. Nach einem 15 Minuten langen Erhitzen der Lösung auf dem Wasserbade und darauffolgendes Abkühlung wird die Lösung mit 3 ml 2 M-NaOH versetzt, dann das pH 3,0 durch Zitratpuffer eingestellt und in Stickstoffatmosphäre polarographiert; das Halbstufenpotential beträgt $-0,22$ V (g. GKE). Physostigmin (Eserin) kann nach dieser Methode in Kolyrien und Injektionslösungen bestimmt werden.

Für das Durchsehen des Manuskriptes und die kritische Bemerkungen erlauben wir uns Herrn L. Molnár, C. Sc., aus der SAV Bratislava unseren Dank auszusprechen.

Zusammenfassung

Die Geschwindigkeit des Verschwindens des Kapazitätseinschnittes von Physostigmin bei Q 0,66 ist durch die Geschwindigkeit der alkalischen Hydrolyse gegeben. Man kann oszillopolarographisch den ganzen Verlauf der Reaktion beobachten. Ausserdem wurde eine empfindliche und selektive polarographische Bestimmung des Physostigmins ausgearbeitet.

ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКОЕ И ОСЦИЛЛОПОЛЯРОГРАФИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФИЗОСТИГМИНА

В. ПАРРАК, Е. РАДЕЙОВА

Государственный институт испытания лекарственных веществ в Bratislave

Было найдено, что скорость исчезновения емкостного зубца физостигмина при Q 0,66 дана скоростью щелочного гидролиза. Оциллополярографическим путем можно наблюдать все течение реакции, следовательно, гидролиз и следующее за ним окисление (продукт окисления рубрезерин).

Кроме того, было разработано чувствительное и селективное полярографическое определение физостигмина.

LITERATUR

1. Parrák V., J. pharm. de Belg. 9—10, 357 (1960). — 2. Parrák V., Janíková E., Farmácia 29, 277 (1960). — 3. Staněk J., *Alkaloidy*, Praha 1957. — 4. Stedmann J., J. Chem. Soc. 125, 1373 (1924). — 5. C. A. 22, 3163 (1928). — 6. Späth E., Brunner O.,

Ber. 58, 518 (1925). — 7. Parrák V., Machovičová F., Mohelská O., Pharm. Zentralhalle 100, 503 (1961). — 8. Machovičová F., Mohelská O., Parrák V., Čs. farm., im Druck. — 9. Kalvoda R., Čs. farm. 3, 124 (1954). — 10. Kalvoda R., Čs. farm. 3, 300 (1954).

11. Dušínský G., Acta Chim. Acad. Sci. Hung 16, 351 (1958). — 12. Dušínský G., Čs. farm. 10, 181 (1961). — 13. Wintera J., *Disertace*, Karlova universita, Praha 1950. — 14. Wiesner K., Chem. listy 36, 313 (1942). — 15. Poupe F., Collection 12, 225 (1947).

Dr. PhMr. Vojtech Parrák, PhMr. Eva Radějová, Bratislava, Kvetná 11, Štátny ústav pre kontrolu liečív.