

STUDIUL PARACETAMOLULUI ÎN LICHIDELE BIOLOGICE

Maria Costin¹ Tamara Cotelea,¹ Leonid Lîsîu²

¹Catedra Chimie farmaceutică și toxicologică USMF „N. Testemițanu”

²Catedra Biochimie și biochimie clinică USMF „N. Testemițanu”

Summary

Paracetamol Study in the Biological Liquids

We used Paracetamol physico-chemical methods in the pure substance for its analysis in the blood plasma. The identification FeCl₃ reaction, Nessler reagent, Liebermann. Chromatography on the thin layer in the ethylacetate-metanol-ammonia 25 % (85:10:5) there were used. FeCl₃ is used as an eluent, obtaining R_f = 4.5 cm. There was used UV spectrophotometric method in the hydroxide for identification obtaining maximum absorption on 244 and 258 wave lengths pH = 3,0 value of the extraction medium with chloroform organic extragent, as well as HPLC method was elaborated in order to determine the purity of substance.

The used methods where applied according to chemico-toxicological analysis conditions of Paracetamol in the biological liquids.

Rezumat

Am aplicat metode chimice și fizico-chimice de identificare a paracetamolului în substanță pură și plasmă sanguină. Am folosit reacțiile de identificare cu FeCl₃, r-vul Nessler, reacția Liebermann. Am aplicat cromatografia pe strat subțire în sistemele de solvenți etilacetat-metanol-amoniac 25% (85:10:5). Ca dezvoltant am folosit clorura de fier (III), obținând un R_f=4,5cm. Deasemenea am aplicat metoda spectofotometrică UV în acidul clorhidric și hidroxid de sodiu obținând maxime de absorbție la lungimea de undă 244 și 258 nm respectiv. S-a determinat valoarea pH=3,0 a mediului de extracție cu extragentul organic cloroform., precum și metoda HPLC de identificare în substanță.

Metodele folosite corespund condițiilor de analiză chimico-toxicologică a paracetamolului în lichidele biologice.

Actualitatea temei

Paracetamolul (*para-acetil-amino-fenol*) este un preparat cu acțiune analgezică, datorită inhibării sintezei prostaglandinelor și antipiretică, acționând la nivelul centrului termoreglării din hipotalamus. Posedând o excelentă biodisponibilitate după administrarea orală.

După administrare, 80-90% este metabolizat în ficat prin conjugare, rezultând glucurono- (cea mai mare parte) și sulfoconjuțați, excretați apoi în urină. O mică fracțiune ia calea citocromului P450 din mitocondriile hepatice, fiind sursa unui metabolit foarte toxic, deoarece implică formarea unui component intermediar, produs de oxidare (acetilimidoquinona) care este rapid inactivat prin conjugare cu glutatation și eliminat în urina.

În caz de supradozare căile de inactivare prin sulfo- și glucurono-conjugare se saturează și astfel se recurge la calea oxidativă a citocromului P450. Metabolitul intermediar, toxic datorită gradului mare de reactivitate este rapid conjugat cu glutatation. Rezervele hepatocelulare de glutatation se epuizează în intoxicațiile masive sau în cazul insuficienței hepatice, și astfel produsul intermediar N-acetilimidoquinona liberă difuzează în citoplasma hepatocitelor, ajungând să reacționeze ireversibil cu glicoproteinele membranare, ajungându-se la citoliză, cu necroză hepatică generalizată și implicit insuficiență hepatică (fig. 1).

Deci mecanismul de toxicitate a paracetamolului constă în epuizarea rezervelor hepatocelulare de glutatation care duce la citoliză cu necroză hepatică. Semnele unei intoxicații apar la doze foarte variate, începând cu 5-8 g, în cazul copiilor dozele periculoase pot fi mult mai mici. [4, 5, 6, 8]

Obiectivele lucrării

În legătura cu creșterea întrebuintării preparatelor medicamentoase, se mărește necesitatea aplicării metodelor mai informative în analiza acestora. Studiarea legităților repartizării substanțelor în organism deasemenea solicită metode de examinare rapide și sensibile.

Scopul lucrării constă în stabilirea metodelor de identificare și dozare a Paracetamolului (*Acetaminofen, para-acetil-amino-fenol*), precum și a metodelor de izolare a acestuia din materialul biologic.

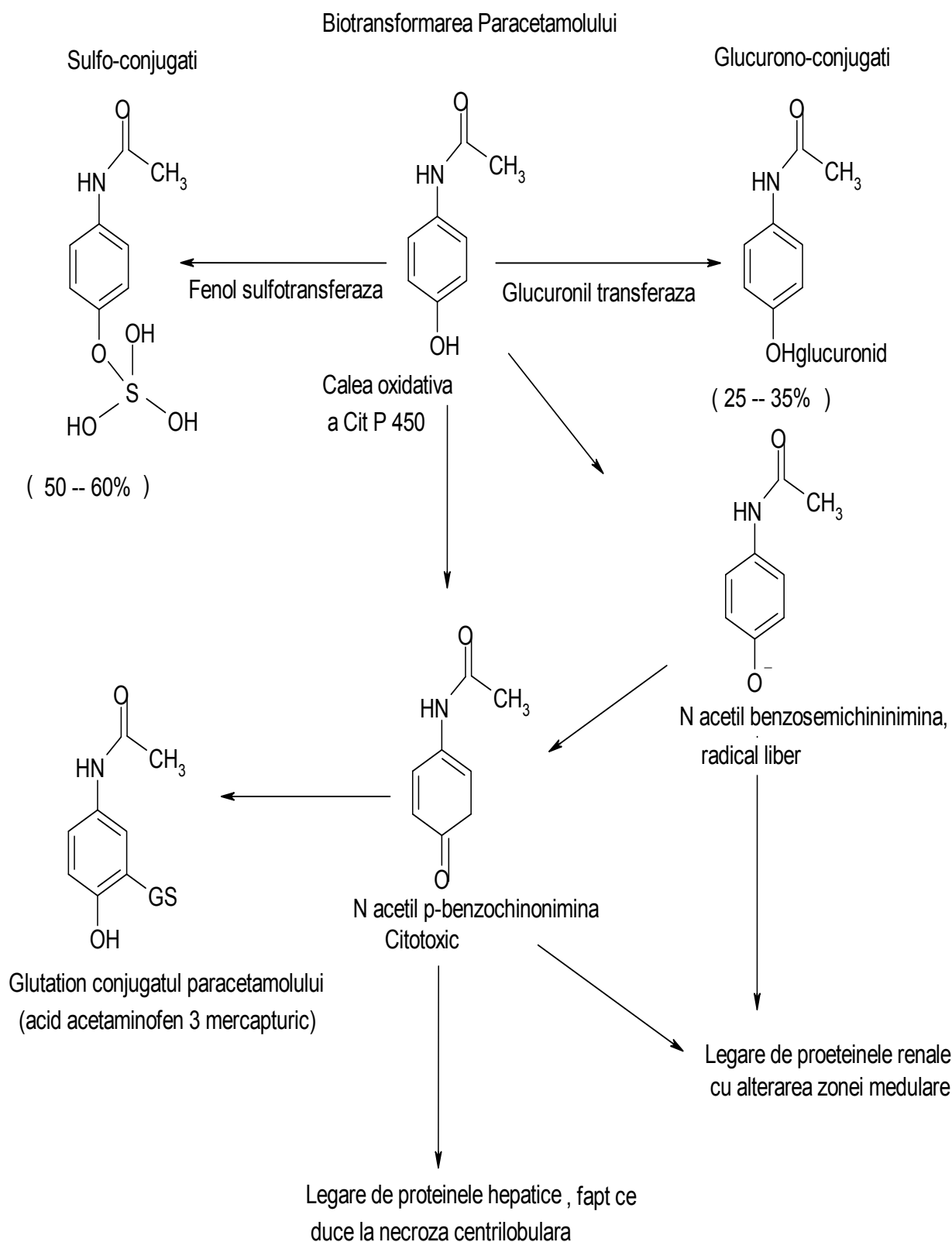


Fig.1. Biotransformarea Paracetamolului

Materiale și metode de cercetare

În cadrul cercetărilor s-a folosit paracetamol substanță pură, comprimate de 500 mg. A fost folosită plasma sanguină și urina ca lichide biologice. Au fost aplicate metode chimice de analiză. Rezultatele au fost prelucrate după criteriul student. În investigațiile experimentale ca reagenți s-au utilizat clorura de fier (III), formând o colorație albastră-violetă, r-vul Nessler, ce formează colorație galbenă, reactivul Liebermann – colorație violetă, etilacetat, metanol, amoniac 25% , acidul clorhidric, hidroxid de sodiu, cloroform care au fost cu grad de puritate „pur pentru analiză” și „chimic pur”. [1, 2]

Pentru identificarea paracetamolului am aplicat metoda CSS folosind plăci cromatografice cu conținut de silicagel G. S-a utilizat sisteme de solvenți etilacetat-metanol-amoniac 25% (85:10:5), metanol:amoniac 25% (100:1,5), pentru care s-a determinat valoarea $R_f = 4,5; 9,5$. Ca dezvoltant am folosit clorura de fier (III).

0,01 g de paracetamol se dizolvă în 100 ml cloroform (soluția A). Din soluția A luăm u1 ml și dizolvăm în 10 ml cloroform (soluția B). Pe linia de start a plăcii se aplică 2 μ l soluție B, placa se introduce în camera de cromatografiere și se cromatografiază ascendent în sistemul de solvenți corespunzător, când frontul de solvenți va parcurge 2/3 din lungimea totală a plăcii cromatografice, placa se scoate din vas se usucă la aer și se pulverizează cu soluție de clorura de fier (III). Spoturile de paracetamol se colorează în albastru-violet. Se determină valorile R_f . Sensibilitatea reției este de 10 μ g/ml. Sensibilitatea metodei ne dă posibilitate de a o aplica în extrasul organic din lichidul biologic cu conținut de paracetamol. [10]

Metodă de identificare și apreciere a substanțelor medicamentoase bazată pe compararea cu spectrele substanțelor de referință sub aspectul analizei structurale este spectrofotometria de absorbție în UV. Astfel pentru identificarea paracetamolului sau înregistrat maximele de absorbție la lungimile de undă 244 și 258 nm la valoarea $pH=3,0$ a mediului de extracție cu extragentul organic cloroform (fig. 2). [9]

Pentru identificarea paracetamolului în substanță am aplicat metoda spectroscopiei IR, care ne oferă posibilitatea să primim o informație completă despre structura și compoziția moleculelor în substanță. Prezența benzilor de absorbție caracteristice spectrului IR corespund oscilațiilor anumitor grupe funcționale.* În cele din urmă cu ajutorul aparatului „Specord 75” în intervalul $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ am obținut spectrul paracetamolului în suspensie de ulei de vaselină (KBr). Principalele benzi de absorbție au fost identificate în intervalul lungimilor de undă 1506, 1657, 1565, 1263, 1227, 1612, cm^{-1} (fig. 3). [7]

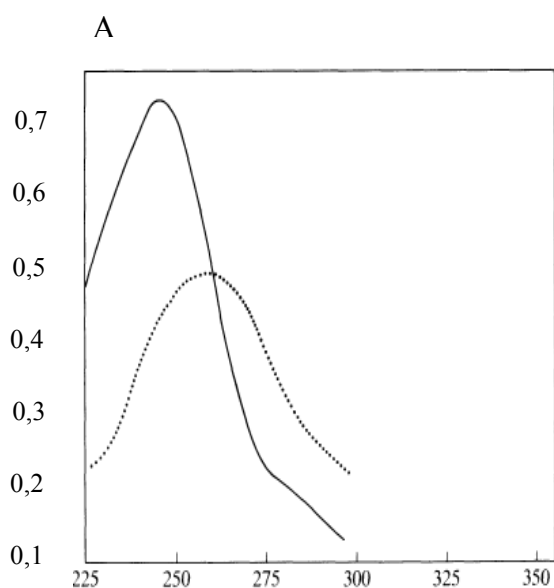


Fig. 2. Spectrul paracetamolului în UV

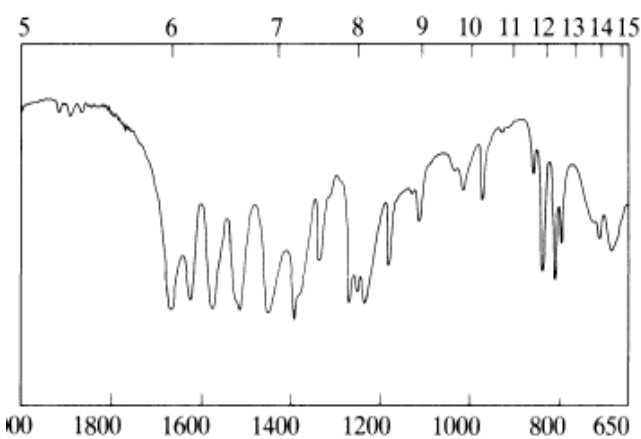


Fig.3 Spectrul paracetamolului în IR

Conform structurii chimice paracetamolul este un compus ionic, ne-am propus să folosim posibilitatea de analiză prin metoda cromatografiei lichide de înaltă performanță (HPLC), folosind o coloană Lichrosorb C18 RP (150 x 4,0mm), mărimea particulelor 3 μm; Am utilizat ca eluent amestecul faza mobilă – apă – acetonitril 50:50; t° 25° C; lungimea de undă 313 nm.

Izolarea și extragerea paracetamolului în lichide biologice (în vitro)

S-a studiat procesul de izolare al paracetamolului în lichide biologice cu apă acidulată cu acid sulfuric 10% și acid tricloracetic 30%.

La 4 ml plasmă sanguină se adaugă 3 ml soluție alcoolică de paracetamol 0,1 %, se lasă pe 24 ore. Apoi acidulăm cu soluție de acid sulfuric 10 % până la pH 2,0-2,5 (hârtia de indicator universală). Amestecul se lasă pe 1-2 ore, agitându-se periodic, apoi se adaugă 3 ml soluție de acid tricloracetic 30 %, se agită și se centrifughează timp de 10 min (5000 rot/min). Centrifugatul se separă, iar reziduul încă de 2 ori se prelucrează cu soluție de acid sulfuric 0,02 mol/l sub controlul pH 2,0-2,5 și din nou se centrifughează. Centrifugatele se unesc și se filtrează. Apoi se extrage cu cloroform de 3 ori câte 5 ml. Extracțiunile cloroformice se unesc și volumul se aduce până la 20 ml.

În extractul cloroformic se determină conținutul de paracetamol prin metoda spectrofotometriei UV. Pentru aceasta extrasul cloroformic se spectrofotometrează, citindu-se absorbanta soluției la lungimea de undă 265 nm în cuva cu drumul optic de 10 mm. În calitate de soluție de referință se utilizează cloroformul. Paralel se analizează proba cu soluție paracetamol standard.

Prepararea soluției standard 0,05 g (masa exactă) paracetamol, substanță de referință, se trece cantitativ într-un balon cotat cu capacitatea de 100 ml, se dizolvă într-un volum de 10 ml și se aduce la cotă cu același solvent (sol. A). 1 ml soluție A se plasează în alt balon cotat cu capacitatea de 50 ml și volumul se completează până la cotă cu același solvent (sol. B). 1 ml soluție B conține 10 μg paracetamol. [3]

Concluzii

S-a făcut o analiză bibliografică în ceea ce privește metabolismul medicamentelor în organismul uman. S-au determinat metodele chimice de identificare a 4-(Acetilamino)fenol în substanță pură și după extracție din materialul biologic. Aplicând metoda spectrofotometrii s-a stabilit maximul de absorbție al paracetamolului în acidul clorhidric și hidroxid de sodiu obținând maxime de absorbție la lungimea de undă 244 și 258 nm respectiv. S-au stabilit condițiile de identificare prin metoda CSS și HPLC. S-a determinat metoda de izolare și extragere a paracetamolului la pH 2,0-2,5.

Bibliografie

1. Babilev F. V. Chimie farmaceutică-Chișinău, Universitas, 1994 – 351p.
2. Bojiță Marius, Săndulescu Robert, Roman Liviu, Oprea Radu: Analiza și controlul Medicamentelor, Vol. 2 – Intelcredo DEVA 2003 – 768p.
3. Cotelea T. Teza de doctor „Investigații chimico-toxicologice asupra cinarizinei și clonidinei” Chișinău, 2002 – 208p.
4. Lester M., Md. Haddad, Michael W. Shannon, j Winchester, Judy Fletcher Editor), Lames P. Winchester: Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose
5. Matcovschi C., Procopișin V., Parii B. Ghid Farmacoterapeutic – Chișinău, 2006-986 p.
6. Matthew J. Ellenhorn, Seth Schonwald, Gary Ordog, Jonathan Wasserberger: Ellenhorn's Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning (Medical Toxicology), 2nd edition, 1997
7. Nakanishi KOL. Inf – red absorbtion Spectroscopy – Practical Holden Daf ine, Tokzo, 1964 – 216p.
8. Roman Vlaicu, Emilia Macavei, Ioan Mureșan: Practica urgențelor medicale, vol. 1, 1979
9. Приняжко Р. Н., Калинин Т. Г. Методы ИФ – спектроскопии в фармацевтическом анализе – Киев: Здоровье, 1976-126с.
10. Шварц В. Тонкослойная Хроматография – Москва: Медицина, 1976 – 276с.