

RISCU DE INTOXICAȚIE CU AMINOFILINĂ ȘI CONDIȚIILE OPTIME DE ANALIZĂ CHIMICO-TOXICOLOGICĂ

Victoria Ciobanu,¹ Tamara Cotelea,¹ Leonid Lîsîi²

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

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

Summary

Contribution in studying chemical-toxicology of aminophylline in biotransformation process

The main idea of this work was to develop physical-chemical methods by investigation theophylline Isolation tests from biological liquids were affected in PH diversions.

Results confirmed by thin layer of chromatography application. Application of mobile phases of methanol-sol.ammonium 25% (100-1.5) with Rf 0.75, and UV spectrophotometry with maximum absorption by wave length 275 nm, IR spectroscopy (suspension in oil of Vaseline) with band absorption 1670, 1717, 1567, 715, 980 cm (KBr) Identification of theophylline was determined by HPLC method. This method implicates column C 18 Lichrospher 100-RP-18C with precolumn Lichrocort-124-4 in mobile phase trietilamine 146 μl, Phosphoric acid 750 μl, Water till 530 ml, PH-3,3 with NaOH solution 10% and apply Acetonitril till 750 ml. Current rate is 0.6 ml/min

Rezumat

Scopul lucrării a fost de a dezvolta metodele fizico-chimice de cercetare asupra teofilinei. Probele de izolare din lichidele biologice au fost efectuate la diverse pH-uri. Rezultatele s-au confirmat prin aplicarea cromatografiei pe strat subțire, aplicând fazele mobile metanol – sol. amoniac 25 % (100 : 1,5) cu valoarea Rf 0,75, și spectrofotometria UV cu maxim de absorbție la lungimea de undă 275 nm, spectroscopia IR (suspensie în ulei de vaselină) cu benzile de absorbție la 1670, 1717, 1567, 745, 980 cm⁻¹ (KBr). Identificarea teofilinei s-a determinat și prin metoda HPLC aplicând coloana C18 Lichrospher 100-RP-18 C cu precoloană Lichrocort 124-4 în faza mobilă trietilamină 146 μl, acid fosforic 750 μl, apă pînă la 530ml, se ajustează pH 3,3 cu soluție NaOH 10% și se aduce cu acetonitril la 750ml. Rata curentului 0,6 ml/min.

Actualitatea temei

În domeniul toxicologiei medicale studiul investigațiilor chimico-toxicologice a dobîndit în ultimii ani un interes deosebit. Metodele aplicate în cercetările actuale au permis cercetarea dezechilibrelor apărute în metabolismul preparatelor medicamentoase în cazul diferitor patologii.

Terapia bolii astmatice și hipertensive se confruntă în ultimii ani cu problema rezistenței organismului vis-a-vis de medicamentele propuse, diferă de la copil la adult de la om la om din cauza metabolismului compușilor medicamentoși, care este în dependență de sistemul microsomal al ficatului.

Aminofilina [1,3]-dimetilxantilxantino-[1,2]-etilendiamina se utilizează pe larg în practica medicală datorită acțiunii antiastmatice.

În cazul administrării aminofilinei la bolnavii afectați de hepatită cronică din cauza insuficienței microsomale; metabolismul ei nu se petrece complet; se întrerupe la formarea teofilinei și în cele din urmă la dozele repetate are loc acumularea metabolitului teofilina care este foarte toxic.

Obiectivele lucrării

Lucrarea își propune cercetarea chimico-toxicologică a aminofilinei în evaluarea unor aspecte biochimice privind metabolismul aminofilinei.

Materiale și metode de cercetare

În cadrul cercetărilor s-a folosit teofilină substanță pură. A fost folosită plasma sanguină al bolnavului afectat de hepatita cronică. În cazul administrării aminofilinei la bolnavii afectați de hepatită cronică din cauza insuficienței microsomale, metabolismul ei nu se petrece complet, se întrerupe la formarea teofilinei (1,3-dimetilxantina). Transformarea respectiva este relatată mai

jos (fig.1). La cumulara metabolitului 1,3- dimetilxantina se produce intoxicatie gravă. Acest proces se întâmplă din cauza inhibării enzimei Cyp 2E1. 1,3-dimetilxantina se cumulează în cantități mari și afectează sistemul de apărare antioxidant propriu al organismului. Mecanismul de intoxicare cu 1,3-dimetilxantina constă în epuizarea rezervelor hepatocelulare de glutation, carea duce la citoliză și urmată de necroză hepatică. Semne de intoxicatie apar în dependență de vârstă, gen, patologie.

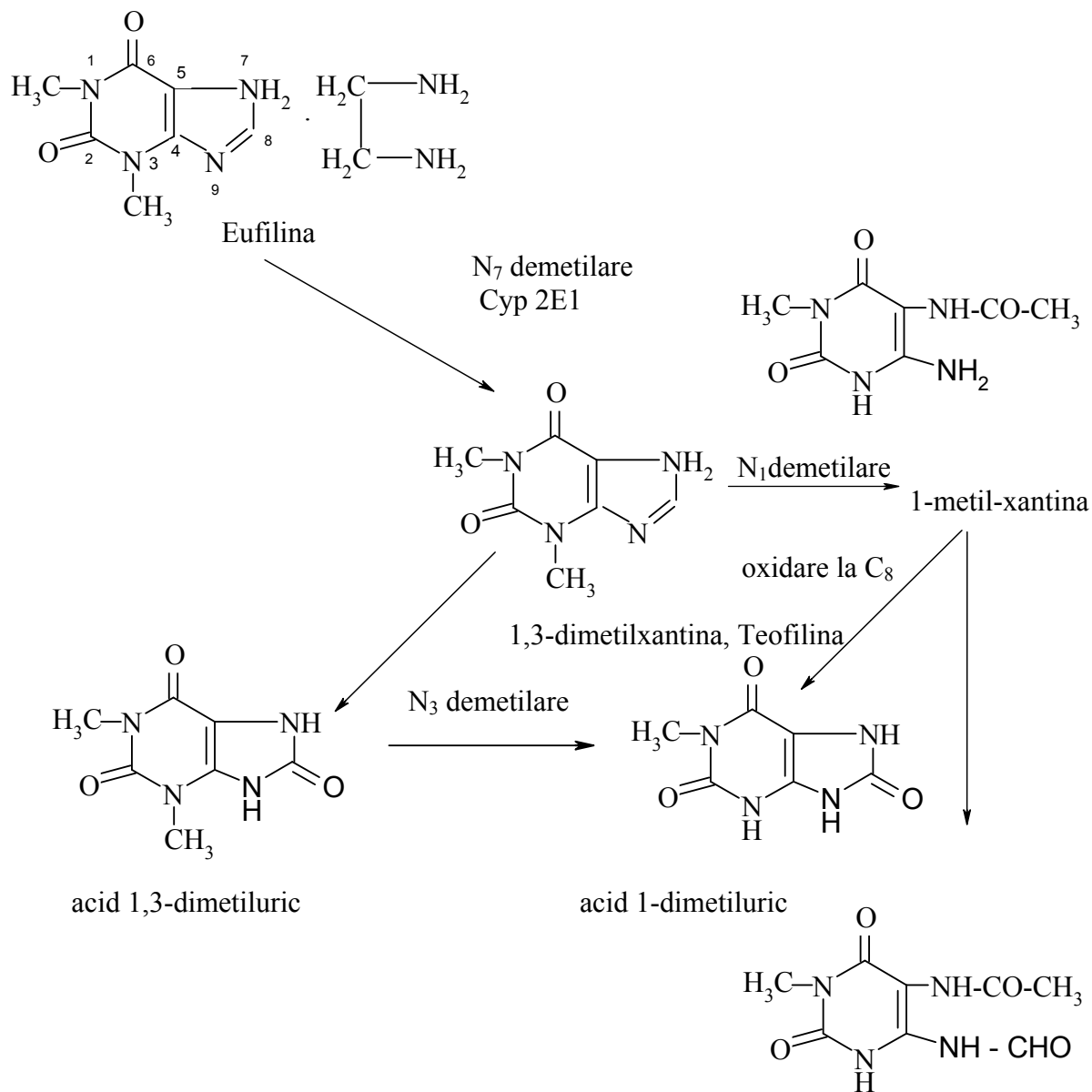


Fig.1 Schema metabolizării aminofilinei în organismul sănătos

Teofilina formează o serie de reacții particulare: la dizolvarea în soluția de amoniac și la interacțiunea acestei soluții cu sărurile de cobalt, se formează un precipitat alb cu nuanță roz de sare complexă; cu soluția de nitroprusiat de sodiu dă o colorație stabilă verde-intensă, care prin adăugarea unui surplus de acid, dispare. De asemenea formează sare de argint care prezintă un precipitat gelatinos. La încălzire cu NaOH intră în reacție de condensare și formează culoare roz-violet.

Aceste reacții se studiază mai întâi pe substanță pură, apoi se aplică în extrasul organic din materialul biologic.

Pentru identificarea teofilinei am aplicat metoda CSS folosind plăci cromatografice cu conținut de silicogel G. S-au utilizat 2 sisteme de solvenți: metanol-sol. amoniac 25%(100:1,5),

eter dietilic-etilacetat(8:2), pentru care s-a determinat valoarea Rf egală cu 0,75; 0,6. Ca relevanți s-au utilizat reactivul Dragendorff și HCl 20% cu cristale de KMnO_4 .

0.01g teofilină se dizolvă în 100 ml alcool etilic 96% (soluția A). 1 ml soluția A se plasează în balon cotate cu capacitatea de 10 ml și se aduce cu alcool etilic până la cotă (soluția B). Pe linia de start a plăcii se aplică cu capilarul de sticlă 2 μl soluție B placa se introduce în vasul cromatografic și se cromatografiază ascendent în sistemul de solvenți corespunzător. Când frontul de solvenți va parcurge 2/3 din lungimea totală a plăcii cromatografice, ultima se scoate din vas, se usucă la aer și se pulverizează cu reactivul Dragendorff sau se prelucrează cu vapori de iod.

Pentru identificarea 1,3-dimetilxantinei s-a înregistrat spectrul de absorbție în ulei de vaselină (0.05 g teofilină și 5 picături de ulei de vaselină), în intervalul lungimilor de undă 400-4000 cm^{-1} . S-au depistat următoarele benzi de absorbție: în regiunea 745, 980, 1567 1670 1717 cm^{-1} .

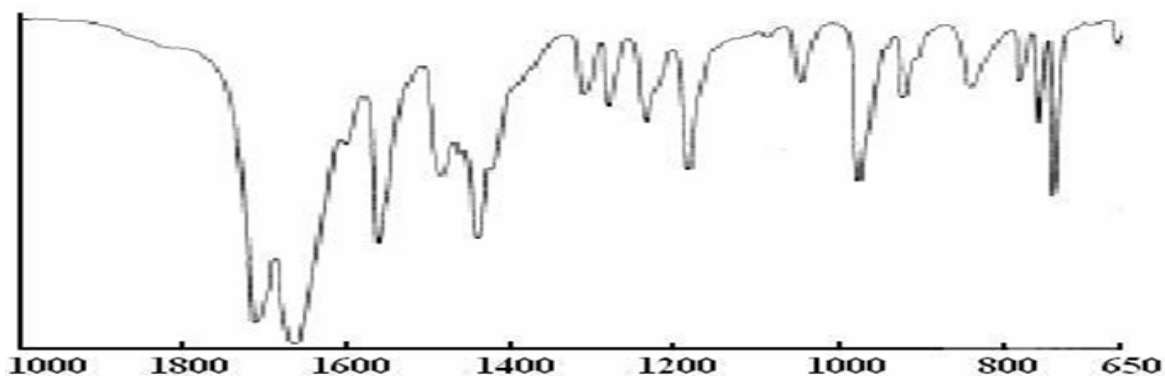


Fig.3.3 Spectrul de absorbție al soluției de 1,3-dimetilxantină în IR

Metoda 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. S-au înregistrat spectrele de absorbție în cloroform la lungimea de undă 275 nm.

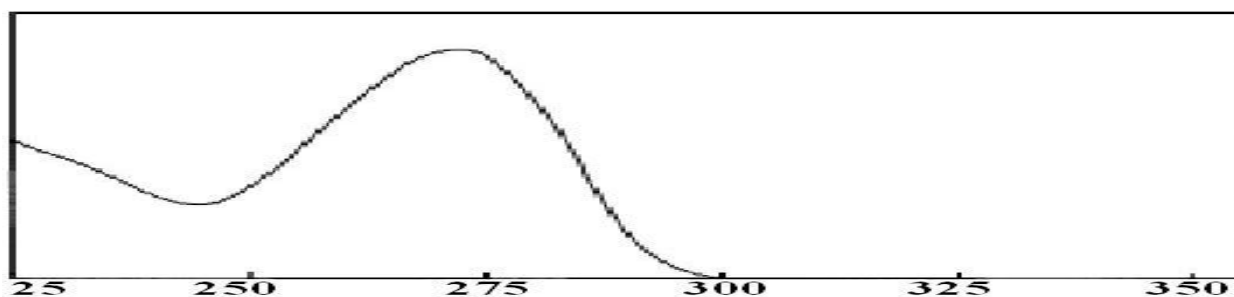


Fig.3.5 Determinarea maximului de absorbție al metabolitului 1,3-dimetilxantina în UV

În continuare am construit curba de etalonare: 0,02 g 1,3-dimetilxantină pulbere (masă exactă) se plasează într-un balon cotate cu capacitatea de 50 ml, se dizolvă în cloroform și se completează până la cotă (soluția A 0,04 %). 5 ml soluție A se plasează în alt balon cotate cu capacitatea de 50 ml și se aduce cu cloroform până la cotă (soluția B 0,004%). Concentrația soluției B este de 40 $\mu\text{g/ml}$. Din soluția B se pregătesc o serie de soluții cu concentrațiile corespunzătoare: 5; 10; 15; 20; 25; 30 $\mu\text{g/ml}$. Se citește absorbanta acestor soluții la lungimea de undă 275 nm, în cuva cu drumul optic de 10 mm. În calitate de soluție de referință se utilizează cloroformul.

Am stabilit condițiile de identificare a teofilinei prin metoda HPLC (cromatografia lichidă de înaltă performanță), obținând timpul de reținere egal cu 1,7min.

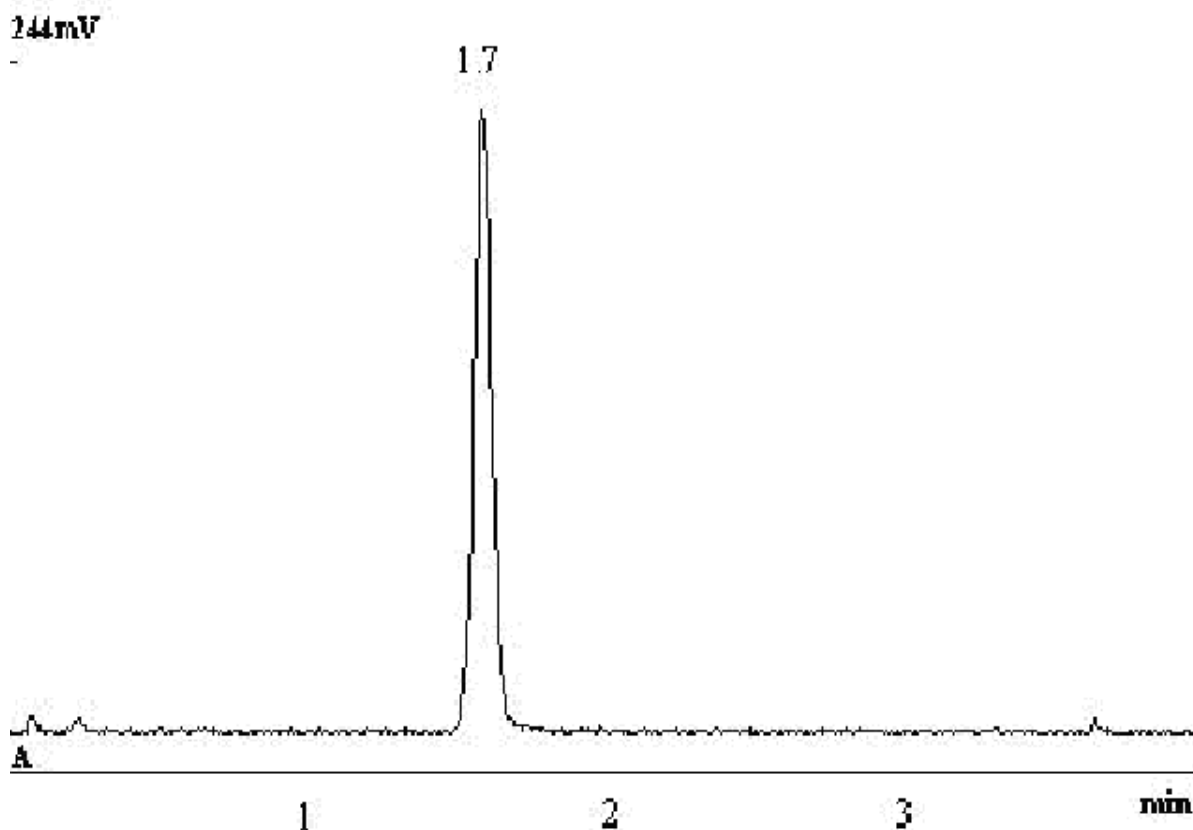


Fig 2. HPLC. Cromatograma 1,3-dimetilxantinei aplicând coloana LiChrospher 100RP18

Concluzii

S-a făcut o analiză a bibliografiei în ceea ce privește metabolismul medicamentelor în organismul uman. S-au determinat metodele chimice de identificare a 1,3-dimetilxantinei în substanță pură și după extracție din materialul biologic (pH 2,5). S-a determinat maximul de absorbție a 1,3-dimetilxantinei în cloroform (λ 275nm), timpul de retenție 1,7min (HPLC). S-a confirmat schema de lucru a analizei chimico-toxicologice a 1,3-dimetilxantinei pentru aplicarea în programul de studiu al chimiei toxicologice.

Bibliografie

1. Babilev F.V. Chimie farmaceutică-Chișinău, Universitas, 1994- 676 p.
2. Badescu M., Ciocoiu M. Compendiu de fiziopatologie specială. Ed. Vasiliana, Iași, 2001, 371 p.
3. C.Bălăescu, C. Cureau Controlul medicamentelor- București: Ed. Medicală și pedagogică.
4. Cotrău M. Popa L. Stan T. Preda N. Kincses, Ajtau M. Toxicologia- București, 1991, 243p.
5. Farmacopeea Română, Ed. A. X-a, Ed. Medicală, București, 1993
6. Guțu N. V. Toxicologie- Chișinău, Știința, 1995, 261 p.
7. Lîteanu C., Răca I., Teoria și metodologia statistică a analizei urinelor, Ed. Scrisul Românesc, Craiova, 1979.