

ANALIZA CHIMICO-TOXICOLOGICĂ A CARBAMAZEPINEI

Mariana Rîșcovaia¹, Natalia Marcova¹, Tamara Cotelea,¹ Efim Arama²

¹Catedra Chimie farmaceutică și toxicologică USMF "N. Testemișanu"

²Catedra Biofizică, Informatică și Fiziologia omului „N. Testemișanu”

Summary

Chemico-toxicological investigations of carbamazepine

We elaborated the TLC method of carbamazepine identification by using three developed systems, spectrophotometric method of quantitative determination for carbamazepine in capsule of 0.1g. Using the analytical methods elaborated by us over the artificial test there was extracted carbamazepine from biological liquids (plasma, urine). The output of carbamazepine from plasma was 51.18%; from urine- 43.50%

Having considered the elaborated methods as specific and reproductive they are recommended for the study of carbamazepine in biological liquids.

Rezumat

A fost elaborată metoda cromatografiei pe strat subțire de identificare a carbamazepinei, utilizând 3 sisteme de solvenți, metoda spectrofotometrică de dozare în capsule 0,1g. Aplicând metodele analitice elaborate de noi la probele biologice în „vitro” s-a efectuat extracția carbamazepinei din lichidele biologice. Randamentul carbamazepinei din plasma sanguină este de 51,18%, din urină - 43,50%. Dat fiind faptul, că metodele folosite sunt specifice și reproductive ele se recomandă pentru studierea carbamazepinei în lichidele biologice.

Actualitatea

Carbamazepina – 5H-dibenz[b,f]azepin-5-carboxamid.

Pentru prima dată carbamazepina a fost sintetizată în 1960 în Elveția de către W. Schidler ca analgezic. Prima indicație de utilizare a carbamazepinei a fost nevralgie de trigemen. Din 1965 carbamazepina este utilizată în tratamentul epilepsiei. După structură chimică carbamazepina este un derivat al dibenzazepinei. Datorită grupei funcționale carboxamide are activitatea anticonvulsivantă. Carbamazepina are un efect pronunțat antiepileptic și moderat antidepressiv. Mecanismul acțiunii farmacologice este legat cu blocarea canalelor de Na⁺ potential dependente ceea ce duce la stabilizarea membranelor neuronale și reducerea numărului de impulsuri sinaptice.

În pofida progreselor în neuropsihofarmacologie, carbamazepina este folosită și astăzi în tratamentul epilepsiei, nevralgie de trigemen și altor forme de nevralgii.

Potrivit diferitor autori, incidența hepatitei medicamentoase cauzată de carbamazepină variază 10 – 50%. Din aceste considerente prezintă și interesul deosebit asupra studiului carbamazepinei în lichidele biologice.

Obiectivele lucrării

De a efectua studiul în vederea determinării metodelor de izolare, extragere, identificare și dozare a acestui produs medicamentos extrase din lichidul biologic.

Materiale și metode

În cadrul cercetărilor s-a folosit carbamazepina activă pură, capsule 100 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. Ca reagenți s-au utilizat în investigațiile experimentale: alcool etilic 96%, hidroxidul de sodiu, laurilsulfat 0,1%, cloroformul, acid sulfuric, sarea Reineche, care au fost cu gradul de puritate “pur pentru analiză” și “chimic pur”.

Metoda chimică de identificare a metoclopramidei se apreciază prin reacțiile microcristaloscopice: cu acid sulfuric (cristale aciculare) și cu sarea Reineche (cristale prismatice); și de culoare: cu reactivul Mandelin – colorație verde, dar cu reactivul Frode - colorație albastru-verde. Cromatografia pe strat subțire se distinge prin avantaje remarcabile în

cea ce privește raporturile numărul de analize / masă și volumul aparatului folosit, numărul de analize / timp de răspuns sau numărul de analize /cost de amortizare a investigațiilor [2, 3, 6, 10, 13, 15]. Separarea substanțelor din proba analizată prin metoda CSS, se realizează prin reacția diferită a componentilor acesteia, în urma unor procese fizico-chimice, care se desfășoară la suprafața fazei staționare (solide), prin trecerea continuă a unei faze mobile (lichide), care poartă compușii respectivi. Fiecare component diferă, în comportarea sa față de granulele sorbentului fazei staționare și astfel, este reținut mai mult sau mai puțin la suprafața acestora, separându-se de ceilalți componenți, prezenți în amestecul inițial [1,5, 8].

În prezenta lucrare am folosit metoda de identificare a metoclopramidei aplicând metoda cromatografiei pe strat subțire pe plăci standarde de silicagel G [4, 7, 12, 13, 14]. În rezultatul cercetărilor preventive, pentru identificare se propun următoarele sisteme de solvenți: metanol - amoniac 25% (100 :1), cloroform - metanol (90:10); ciclohexan – toluen – dietilamida (75:15:10), pentru care s-a determinat valoarea R_f egală cu 0,60; 0,56; 0,40.

Spoturile de carbamazepină pe placa cromatografică fluoriscesc în razele UV în culoare albastră; cu soluție 0,5% de $K_2Cr_2O_7$ – culoare galbenă. Pentru aceasta 0,05 g substanță pură (m.e.) se trece într-un balon cotat cu volumul de 100 ml, se dizolvă în alcool etilic 96% și se aduce la cotă cu același solvent (sol.A). 1 ml sol. A se dizolvă în 10 ml de alcool etilic 96% (sol. B). 10 μ l soluție B se aplică pe linia de start a plăcii, placa se introduce în camera de cromatografie, 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 reactivele respective. Sensibilitatea reactivilor ne dă posibilitate să aplicăm această metodă pentru cercetarea carbamazepinei în extrasul organic din lichidul biologic.

Metodă de identificare și apreciere a substanțelor medicamentoase bazată pe compararea spectrelor substanțelor de referință sub aspectul analizei structurale este spectrofotometria de absorbție în UV. Pentru identificarea carbamazepinei s-au înregistrat spectrele de absorbție în alcool etilic 96%, cloroform, laurilsulfat 0,1%, hidroxid de sodiu 0,1 M la intervalul lungimilor de undă 220-350 nm. pentru aceasta 0,1g metoclopramidă se trece într-un balon cotat cu capacitatea 100 ml, se adaugă 60 ml alcool, cloroform, laurilsulfat sau hidroxid de sodiu 0,1 M până la dizolvarea completă și se aduce la cotă cu solventul corespunzător, (soluția A). Se ia 1ml soluție A și se trece în alt balon cotat cu volumul 100 ml se aduce cu solvent corespunzător până la cotă, (soluția B). Se spectrofotometrează în cuvă cu grosimea stratului de 1 cm în intervalul lungimii de undă 220-350nm.

Spectru de absorbție a soluției B cu concentrația 0.001 % este prezentat în figura 1.

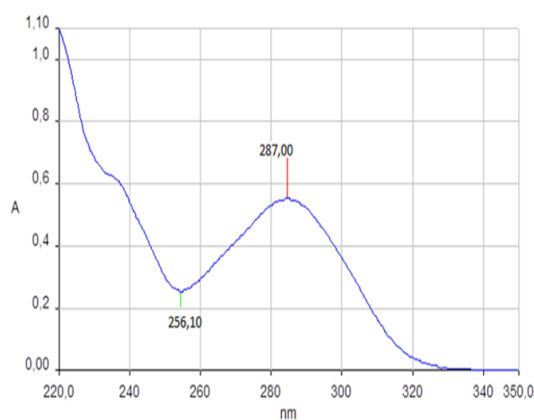


Fig.1 Spectrul de absorbție al soluției de carbamazepină în cloroform

Pentru lucru de mai departe s-a determinat curba de calibrare unde ca lungime de undă analitică s-a luat $\lambda=287$ nm. Din curba de etalonare a carbamazepinei reiese, că legea Bouguer

Lambert-Beer se respectă în intervalul de concentrație 2-30 $\mu\text{g/ml}$ carbamazepină. În această bază s-a elaborat tehnica de lucru pentru dozarea spectrofotometrică în capsule.

Pentru identificare carbamazepinei în substanță am aplicat metoda spectroscopiei în IR după care se poate deduce detalii de structură a preparatului. Din spectrul IR a metoclopramidei se disting următoarele benzi de absorbție la lungimile de undă: 1678, 1594, 800, 769, 787, 1298, 1075 cm^{-1} .

Cromatografia de lichide de înaltă performanță în prezent este cea mai populară metodă de analiză instrumentală în laboratoare de analiză și control în domeniul farmaceutic. Identificarea medicamentelor se face după timpul de retenție a fiecărui component. Dozarea se efectuează după aria picului, care este proporțională cu cantitatea de medicament în probă [6, 9, 11,]. În condițiile: coloana Zorbax eclipse XDB-C18 (4,6x 150mm) mărimea particulelor 5 μm ; rata curentului 1,5 ml/min, t° 30°C; lungimea de undă 280 nm pentru identificare carbamazepinei am obținut un pic cu timpul de retenție 7,05 min (fig2).

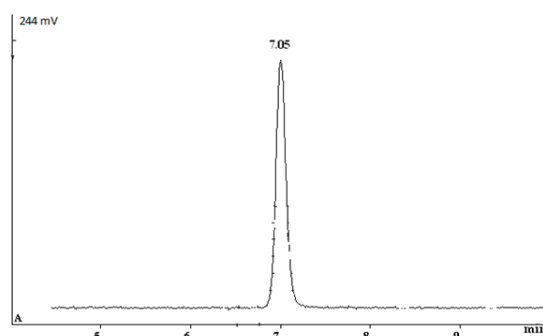


Fig.2 HPLC. Cromatograma carbamazepinei

Izolarea, extragerea și dozarea carbamazepinei din lichidele biologice(în vitro)

S-au studiat metode de izolare cu apa acidulată cu acid sulfuric în mediu pH 2,0 – 2,5 prin adaugare de acid tricloracetic 30%. La 4 ml plasmă se adaugă 2 ml soluție carbamazepină 0,02%, se lasă pe 24 ore, apoi am alcalinizează cu hidroxid de amoniu 50% pînă la pH 8,0 – 9,0. Amestecul se lasă pe 2 ore, se agită și se centrifughează timp de 10 minute (5000 rot/min). Centrifugatele se unesc și se filtrează. Se verifică valoarea pH-ului, care trebuie să fie pH 8,0 - 9,0 (hârtia indicator universală). Se extrage cu cloroform de 3 ori câte 5 ml, extracțiile cloroformice se unesc. În extractul cloroformic se determină conținutul de carbamazepină prin metoda spectrofotometriei UV. Pentru aceasta, 4 ml extract cloroformic se plasează într-un balon cotat cu capacitatea de 10 ml, volumul se aduce cu cloroform la cotă și se citește absorbanta la spectrofotometru, la lungimea de undă 287 nm, în cuva cu drumul optic de 10 mm.(fig.4) În calitate de soluție de referință se utilizează cloroformul. Paralel, se analizează proba cu soluție carbamazepină standard.

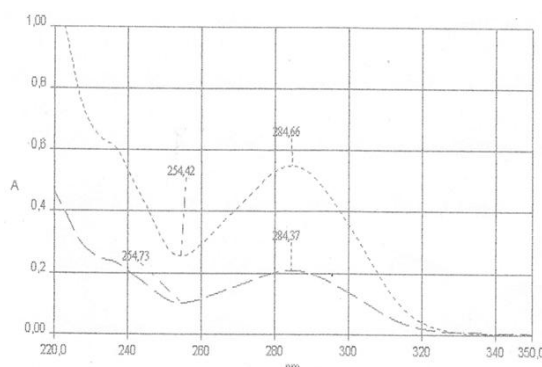


Fig.4 Spectrul de absorbție al carbamazepină extrasă din plasma sanguină

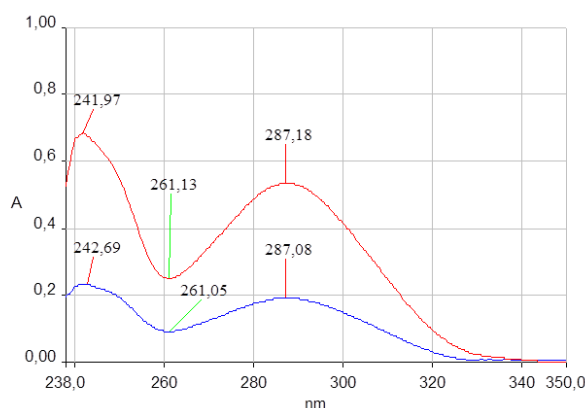


Fig.5 Spectrul de absorbție al soluției de carbamazepină extrasă din urină

Rezultatele obținute ne demonstrează că din plasmă cloroformul extrage 51,18%, iar din urină 43,50% metoclopramidă.

Concluzii

Aplicând metoda spectrofotometrică s-a stabilit maximul de absorbție al carbamazepinei la lungimile de undă 287 nm. S-au stabilit condițiile de identificare prin metoda cromatografiei pe strat subțire, spectroscopiei în IR și HPLC. S-a determinat metoda de izolare și extragere a carbamazepinei din lichidele biologice.

Bibliografie

1. Baloescu C., Curea E. Controlul medicamentelor- București: Ed. Didactică și pedagogică; 1983, p.129–130.
2. Br. J. Clin. Pharmac. 1981, 12, p.31-37.
3. Bogoda B., Maria Virginia Coman. Cromatografia pe strat subțire- București: Ed. Tehnică, 1995 p.160.
4. Clinic. Chem. 1980, 26, p. 499 – 501.
5. Clinic. Pharmacok. №3, p.128-143.
6. Daniela Lucia Muntean; Marius Bojiță; Controlul medicamentelor. (metodele spectrale, cromatografice și electrografice de analiză). Ed. Med. Univer. "Iuliu Hatiganu" Cluj-Napoca 2003 p.303.
7. J. Chromat. 1975, 107, p.149- 154.
8. J. Chromat. 1979, 15, p.421-425.
9. J. Chromat. 1980, 181 Biomed Appl 7, p.373-383.
10. J. Chromat. 1981, 222 Biomed Appl, 11, p.120-124.
11. Бауэр Г., Энгельгард Х., Хеншен А. и др. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии- Москва: Мир, 1988. с.688 .
12. Булатов М.Н. Калинин И.П. Практическое руководство по фотоколориметрическим методам анализа – Л. Химия, 1976 с.376.
13. Шварц В. Тонкослойная хроматография - Москва: Медицина, 1976 с.276.
14. Шемякин Ф.М., Применение хроматографии в фармации //Аптечное дело. – 1963- №3 с38.
15. Шталь Э. Хроматография в тонких слоях – Москва: Мир 1963 с.309