



UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA
Facultatea de Chimie și Tehnologie Chimică
Departamentul Chimie industrială și ecologică
„Academician Gheorghe Duca”

Maria GONȚA

Biofarmacia și farmacocinetica

Îndrumar
pentru lucrările de laborator

Aprobat de
Consiliul Calității al USM

Chișinău 2025

Biofarmacia și farmacocinetica

CZU 615.015(075.8)(076.5)

G 69

Recomandat de Consiliul Facultății de Chimie și Tehnologie Chimică

Recenzenți:

Livia UNCU, dr. hab., conf. univ., Facultatea de Farmacie, USMF

Elena TUTOVAN, dr., conf. univ., Facultatea de Chimie și
Tehnologie Chimică, USM

Descrierea CIP a Camerei Naționale a Cărții din Republica Moldova

GONȚA, Maria

Biofarmacia și farmacocinetica. Îndrumar pentru lucrările de laborator. Universitatea de Stat din Moldova, Facultatea de Chimie și Tehnologie Chimică, Departamentul Chimie industrială și ecologică „Academician Gheorghe Duca”. – Chișinău : [S. n.], 2025 (CEP USM). – 169 p.: fig., tab.

Bibliogr.: pp. 167-168 (16 tit.). – 50 ex.

ISBN 978-9975-62-852-5.

© GONȚA Maria, 2025

© Editura CEP USM, 2025

ISBN 978-9975-62-852-5.

CUPRINS

Prefață.....	5
Abrevieri.....	9
CAPITOLUL 1. PROPRIETĂȚILE FIZICO-CHIMICE ALE SUBSTANȚELOR MEDICAMENTOASE	10
Lucrarea de laborator Nr. 1. Determinarea coeficientului de partiție și a constantei de disociere.....	10
Lucrarea de laborator Nr. 2. Verificarea legii dizolvării lui Noyes Whitney.....	18
Lucrarea de laborator Nr. 3. Studiul cinetic privind dizolvarea SM...30	
Lucrarea de laborator Nr. 4. Dizolvarea <i>in vitro</i> a comprimatelor de paracetamol și determinarea procentului de eliberare cumulativă a substanțelor medicamentoase.....	37
Lucrarea de laborator Nr. 5. Dizolvarea <i>in vitro</i> a comprimatelor de diclofenac cu eliberare prelungită.....	44
Lucrarea de laborator Nr. 6. Efectul pH-ului asupra comportamentului de dizolvare a SM.....	54
Lucrarea de laborator Nr. 7. Determinarea vitezei de eliberare a substanțelor active din supozitoare și a timpului de deformare completă a acestora.....	64
CAPITOLUL 2. ABSORBȚIA SUBSTANȚELOR ACTIVE ÎN TRACTUL GASTROINTESTINAL	72
Lucrarea de laborator Nr. 8. Efectul intensificatorilor de permeație asupra permeabilității intestinale a SM.....	72
Lucrarea de laborator Nr. 9. Absorbția percutanată a substanțelor medicamentoase din unguent cu diferite baze.....	81
Lucrarea de laborator Nr. 10. Studiu de pătrundere <i>in vitro</i> a DCF in unguent utilizând celula de difuzie Franz.....	90

CAPITOLUL 3. STUDIU PRIVIND LEGAREA SUBSTANȚELOR MEDICAMENTOASE DE PROTEINE97

Lucrarea de laborator Nr. 11. Studiu privind legarea SM de
proteine prin utilizarea metodei de dializă la echilibru.....97

CAPITOLUL 4. FARMACOCINETICA SUBSTANȚELOR MEDICAMENTOASE.....108

Lucrarea de laborator Nr. 12. Modelarea eliminării plasmatice
după o perfuzie de bolus intravenos108

Lucrarea de laborator Nr. 13. Simularea eliminării plasmatice și a
excreției urinare după o doză de bolus intraenos.....116

Lucrare de laborator Nr. 14. Calcularea diverșilor parametri
farmacocinetici după injecția cu bolus intravenos.....132

Lucrarea de laborator Nr. 15. Calcularea constantelor de viteză a
excreției urinare și a constantelor de eliminare.....138

Lucrarea de laborator Nr. 16. Calcularea ariei de sub curba
dependenței concentrației plasmatice în funcție de timp după regula
trapezoidală.....147

Lucrarea de laborator Nr. 17. Calcularea constantei vitezei de
absorbție prin metoda rezidurilor.....151

Lucrarea de laborator Nr. 18. Calcularea constantei vitezei de
absorbție prin metoda Wagner-Nelson.....157

Lucrarea de laborator Nr. 19. Studiarea unor parametri
farmacocinetici ai curcuminei...164

Lucrarea de laborator Nr. 20. Determinarea volumului de
distribuție a capsaicinei în mediu lipidic.....165

Bibliografia.....167

Prefață

Rolul disciplinei *Biofarmacia și farmacocinetica* în formarea competențelor specifice este determinat de studiul conceperii medicamentelor prin prisma influenței factorilor farmaceutici de formulare asupra biodisponibilității și bioechivalenței medicamentelor pentru asigurarea unui răspuns terapeutic maxim cu efecte secundare minime. Îmbunătățirea parametrilor farmacocinetici permite crearea unei forme de dozare optime, care s-ar distinge printr-un grad și o viteză optimă de absorbție, caracteristici de distribuție, căi metabolice și de excreție.

Deoarece studiul farmacocinetic pe sisteme reale (voluntari, bioteste) este dificil, deseori se recurge la modele farmacocinetice *in vitro*. Prin aceste modele se pot studia procesele de dizolvare, absorbție, distribuție și eliminare a substanțelor medicamentoase (SM). Reieșind din aceste considerente îndrumarul cuprinde patru capitole ce se referă la aceste etape farmacocinetice.

În primul capitol se prezintă studiul proceselor de dizolvare. Condiția principală pentru absorbția SM este prezența lor în stare dizolvată în fluidul de la locul de absorbție.

Coefficientul de solubilitate și viteza de dizolvare a SM din forma farmaceutică influențează în principal absorbția și, respectiv, biodisponibilitatea. La fel, asupra comportamentului de dizolvare influențează și valoarea pH-ului. Astfel, lucrările de laborator în acest capitol se referă la studiul parametrilor ce caracterizează viteza de eliberare a SM din formele farmaceutice. La administrarea extravasculară (orală, rectală, transdermală, transmucozală, intramusculară etc.) procesul de dizolvare poate fi factorul de limitare a absorbției.

În capitolul doi al Îndrumarului sunt prezentate lucrările ce se referă la studiul absorbției substanțelor medicamentoase. O bună biodisponibilitate perorală există atunci, când substanța medicamentoasă are o permeabilitate și solubilitate maximă la locul de absorbție. Așadar, gradul de absorbție al substanței active (SA) ar

putea fi prezis în baza permeabilității și măsurării solubilității. Prin urmare, permeabilitatea intestinală reprezintă o parte esențială în predicția de biodisponibilitate perorală. Intestinul subțire de pui poate fi un model util pentru studiul absorbției intestinale. Datele de permeabilitate intestinală pot fi utilizate în studiile de preformulare a SM pentru a evalua efectele diversilor excipienți farmaceutici asupra absorbției substanțelor medicamentoase. O serie de metode *in vitro* au fost dezvoltate pentru evaluarea permeabilității intestinale a unei anumite substanțe active. Studiile de absorbție (permeabilitate) se efectuează în mod obișnuit pe bază de saci intestinali izolați. Una dintre abordările de îmbunătățire a permeabilității substanțelor medicamentoase cu absorbție joasă din TGI este administrarea de intensificatori de absorbție, inclusiv agenți tensioactivi, săruri biliare, acizi grași, unele mucoadezive și polimeri. În procesele de absorbție percutanată eliberarea SA din formele de dozare depinde direct și de proprietățile fizico-chimice ale transportatorului și ale substanțelor medicamentoase folosite.

Studiul experimental al proceselor de legare a substanței active cu proteinele plasmatică a fost prezentat în **capitolul trei**. Substanța activă se poate lega de alți constituenți ai sistemului biologic, cum ar fi proteinele plasmatică (de exemplu, albumina, lipoproteinele cu densitate mare și globulinele). În rezultat se pot forma complexe de dimensiuni mari, care nu pot traversa membranele biologice. Natura și amploarea interacțiunii SM cu proteinele influențează în mod semnificativ activitatea biologică a unei substanțe medicamentoase prin influența asupra farmacocineticii și a performanței farmacodinamice. Experimentul *in vitro* a inclus utilizarea în acest scop a albuminei din ou.

În capitolul patru sunt incluse lucrările cu privire la calcularea parametrilor farmacocinetici. Se prezintă simularea eliminării plasmatică și a excreției urinare după o doză de bolus intravenos (IV) în baza experimentului cu permanganatul de potasiu. Din graficul semilogaritm al datelor privind dependența

Biofarmacia și farmacocinetica

concentrației post-perfuzie de timp se determină constanta vitezei de eliminare (K) și timpul de înjumătățire ($t_{1/2}$), volumul de distribuție, clearance-ul, aria de sub curbă.

În îndrumarul pentru lucrările de laborator *Biofarmacia și farmacocinetica* se conțin lucrări cu date teoretice privind concentrația plasmatică în funcție de timp, obținute după administrarea unei doze de bolus intravenos. Se calculează, la fel, diferiți parametri farmacocinetici, utilizând în acest scop diferite metode: metoda reziduurilor, metoda Wagner-Nelson și altele.

Studiul farmacocinetic al noilor substanțe farmacologic active este o etapă obligatorie în cercetarea, dezvoltarea și implementarea lor în practica medicală. Eficacitatea substanței medicamentoase depinde direct de procesele de absorbție, distribuție și excreție a SM din organism.

Ca rezultat al realizării lucrărilor de laborator, studenții obțin cunoștințe privind principiile de preformulare și formulare a medicamentelor sub aspect biofarmaceutic, formarea concepțiilor despre influența factorilor biofarmaceutici asupra farmacocineticii. Se formează abilități de evaluare biofarmaceutică și farmacocinetică și se dezvoltă abilități de înțelegere a principiilor de cedare din formele farmaceutice, absorbție, distribuție, eliminare.

O caracteristică importantă este biodisponibilitatea, care determină parametrii farmacocinetici ai SM, influențați de tehnologia fabricării diferitelor preparate farmaceutice. Studenții capătă informații referitoare la utilizarea principiilor biofarmaceutice în cercetarea, dezvoltarea și elaborarea de noi substanțe medicamentoase și forme farmaceutice.

Lucrarea **Biofarmacia și farmacocinetica** este destinată studenților anului III de la Facultatea de Chimie și Tehnologie Chimică, specialitatea Tehnologia produselor cosmetice și medicinale, în cadrul cursului de BF și FC din semestrul V. La fel, acest Îndrumar se adresează studenților de la specialitatea *Chimia biofarmaceutică*, contribuind la aprofundarea cunoștințelor în elaborarea

Biofarmacia și farmacocinetica

medicamentelor noi, deoarece eficacitatea lor depinde direct de procesele de absorbție, distribuție și excreție a SM din organism. Este un suport pentru cadre didactice și studenți în elaborarea tezelor de licență și master, care studiază obținerea de noi medicamente.

Competențele asigurate de această disciplină conform standardului includ competențe generale și competențe profesionale.

Competențe generale formate de această disciplină conform standardului de competențe sunt:

CG 1. Utilizarea în activitatea profesională a legităților de bază definite de științele fundamentale.

CG 4. Asigurarea calității și siguranței producției chimice, alimentare, agricole, farmaceutice, cosmetice, medical-veterinare.

Rolul disciplinei în formarea **competențelor profesionale** este determinat de studiul conceperii și elaborării medicamentelor prin prisma influenței factorilor farmaceutici de formulare și a influenței lor asupra *biodisponibilității* și *bioechivalenței* medicamentelor pentru asigurarea unui efect terapeutic maxim cu efecte secundare minime.

Competențe profesionale formate de această disciplină conform standardului de competențe sunt:

CP 10. Aplicarea metodelor de verificare a calității.

CP 11. Conceperea produselor noi.

ABREVIERI

AB – acid benzoic

AS – acid salicilic

ASC – aria totală de sub curbă

BD – biodisponibilitate

Bolus IV – bolus intravenos

CCMD – cantitatea cumulativă de SM difuzată

$C_{(0)}$ – concentrația plasmatică la momentul $t=0$

Cl – clearance

DCF – diclofenac de sodiu

ER – coeficient de amplificare

HPMC – hidroxipropil metilceluloza

K_a – constantă de disociere

K – constanta vitezei de eliminare

K_u – constanta vitezei de excreție

K_a – constanta vitezei de absorbție

LSS – lauril sulfat de sodiu

MTD – metronidazol

PC – coeficient de partiție

PC_l – coeficient aparent de partiție

PAC – ftalatul acetatului de celuloză

PVAP – polivinil acetofalat

Panta – tangenta trigonometrică a unghiului

SM – substanță medicamentoasă

TGI – tractul gastrointestinal

$t_{1/2}$ – timpul de înjumătățire

Vd – volum aparent de distribuție

**CAPITOLUL 1. PROPRIETĂȚILE FIZICO-CHIMICE ALE
SUBSTANȚELOR MEDICAMENTOASE**

Lucrarea de laborator Nr. 1.

**Determinarea coeficientului de partiție și a constantei de
disociere**

Majoritatea substanțelor medicamentoase (SM) sunt acizi slabi sau baze slabe. Distribuția acestor substanțe în organism se face prin difuziunea pasivă a formei neionizate. Concentrația ionilor de hidrogen (pH-ul sanguin) influențează proprietățile fizico-chimice ale substanțelor medicamentoase (solubilitatea, coeficientul de partiție lipide/apă). Fiecare substanță medicamentoasă are o constantă de disociere specifică (K_a). În cazul substanțelor ce se comportă ca acizi slabi, creșterea pH-ului determină creșterea fracției ionizate a SM. În cazul bazelor slabe, scăderea pH-ului determină creșterea fracției ionizate a substanței medicamentoase. Numai forma neionizată este suficient de liposolubilă și poate traversa membranele celulare. Raportul dintre forma ionizată și cea neionizată a unei substanțe medicamentoase este dependent de pH și de constanta de disociere (K_a). În funcție de pK_a specifică pentru SM, repartiția sa va fi diferită în mediul intracelular (mai acid) și în mediul extracelular (mai neutru).

Scopul lucrării constă în determinarea K_a , pK_a și a coeficientului de partiție (PC) pentru acidul salicilic. În figura 1.1 sunt prezentate formulele de structură a acidului salicilic și a acidului acetil salicilic.



Figura 1.1. Formulele de structură:

a) acidul salicilic și b) acidul acetil salicilic

Obiective:

1. să se determina coeficientul de partiție (PC) și pKa a acidului salicilic;
2. să se realizeze extracția acidului salicilic din tampon apos în solvent organic;
3. să se explice relația dintre valorile pKa și pH.

Generalități

Ponderea parțială a ipotezei a fost prezentată de Brodie și al., care afirmă că SM sunt absorbite din tractul gastrointestinal prin difuzie pasivă în funcție de fracțiunea de substanță medicamentoasă nedisociată la pH-ul intestinului. Astfel, procesul de absorbție este determinat de:

1. constanta de disociere (pKa) a substanței medicamentoase;
2. solubilitatea lipidică a substanței medicamentoase ionizate (PC);
3. pH-ul la locul de absorbție.

pKa și pH-ul gastrointestinal

pKa este o măsură a tăriei unui acid sau a unei baze și este definit ca logaritmul negativ al constantei de echilibru (Ka) a formelor nedisociate și ionizate ale unui compus. Calculul pKa permite să se estimeze proporția de specii neutre și ionizate la orice pH, precum și proprietățile bazice sau acide ale compusului studiat.

Cu cât pKa a unei substanței medicamentoase acide este mai scăzută, cu atât mai mare este proporția formei ionizate la un anumit pH. Cu cât pKa a unei substanței medicamentoase bazice este mai ridicată, cu atât baza este mai slabă. Astfel, din cunoașterea pKa a SM și a pH-ului la locul de absorbție, cantitatea relativă de substanță medicamentoasă ionizată și neionizată în soluție la un anumit pH și gradul de ionizare (procentul de substanță medicamentoasă ionizată) la acest pH pot fi determinate prin ecuația Henderson-Hasselbalch:

Pentru acizi slabi:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \lg \frac{[\text{SM}]_{\text{ionizate}}}{[\text{SM}]_{\text{neionizate}}} \quad (1.1)$$

$$\% [SM]_{\text{ionizată}} = \frac{10^{\text{pH}-\text{pK}_a}}{1+10^{\text{pH}-\text{pK}_a}} \cdot 100 \quad (1.2)$$

Pentru baze slabe:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \lg \frac{[SM]_{\text{neionizate}}}{[SM]_{\text{ionizate}}} \quad (1.3)$$

$$\% [SM]_{\text{ionizată}} = \frac{10^{\text{pK}_a-\text{pH}}}{1+10^{\text{pK}_a-\text{pH}}} \cdot 100 \quad (1.4)$$

Lipofilicitatea și absorbția substanței medicamentoase

Coefficientul de partiție sau distribuție (PC) al unei substanțe medicamentoase este o măsură a distribuției substanței între o fază lipidică (ulei) și o fază apoasă; astfel, este definit ca raportul dintre concentrația SM într-un solvent organic și concentrația compusului în fază apoasă:

$$\text{PC} = \frac{[SM]_{\text{în faza organică}}}{[SM]_{\text{în faza apoasă}}}$$

Dacă substanță medicamentoasă există predominant în forma ionizată, aceasta va fi slab absorbită dacă are o solubilitate lipidică slabă. În mod ideal, pentru o absorbție optimă, o substanță medicamentoasă trebuie să aibă o solubilitate suficientă în soluțiile apoase pentru a se dizolva în fluide la locul de absorbție și o solubilitate lipidică suficient de mare pentru a facilita transportul substanței medicamentoase în biomembrana lipoidală și în circulația sistemică.

Solubilitatea lipidică a unei substanțe medicamentoase este determinată din valoarea PC (ulei/apă). PC este o măsură a gradului de distribuție a substanței medicamentoase între unul dintre solvenții organici nemiscibili în apă, lipofili, cum ar fi n-octanol, cloroform, n-heptan etc. și o fază apoasă (apă sau soluție tampon corespunzătoare). În general, valoarea coeficientului de distribuție în octanol/ soluție tampon pH 7,4 în intervalul de la 1 la 2 a unei substanțe medicamentoase este suficientă pentru a prezice absorbția pasivă prin membranele lipidale.

Principiul metodei

Acidul salicilic este un compus relativ polar, puțin solubil în apă. Sarea lui este totuși destul de solubilă în apă. Prin modificarea pH-ului soluției-tampon apoase se poate modifica raportul dintre forma ionizată și cea neionizată a acidului salicilic. Deoarece forma nedisociată este extrasă în faza organică, concentrația fracției extrase va varia în funcție de pH-ul soluției apoase. Formula de calcul a constantei de ionizare (K_a) poate fi redată prin următoarele expresii:

În soluția-tampon apoasă

$$K_a = \frac{[H^+] \cdot [A^-]}{[HA]} \text{ sau } [A^-] = \frac{K_a \cdot [HA]}{[H^+]} \quad (1.5)$$

Partiția dintre tamponul organic și cel apos poate fi descrisă printr-un coeficient de partiție real, PC (ec. 1.6), unde HA - acid salicilic.

$$PC = \frac{[HA\text{-organic}]}{[HA\text{-apos}]} \text{ sau } [HA\text{-organic}] = PC \cdot [HA\text{-apos}] \quad (1.6)$$

În laborator, se măsoară **un coeficient de partiție aparent**, PC^I , care va varia în funcție de pH sau $[H^+]$. Acest coeficient aparent de partiție este dat de relația (1.7):

$$PC^I = \frac{[HA\text{-organic}]}{[HA] + [A^-]} \quad (1.7)$$

Dacă înlocuim $[HA\text{-organic}]$ din ecuația 1.6 și $[A^-]$ din ecuația 1.5 obținem:

$$PC^I = \frac{[PC] \cdot [HA]}{\left[1 + \frac{K_a}{[H^+]}\right] \cdot [HA]} \quad (1.8)$$

$$PC^I = \frac{PC}{\left[1 + \frac{K_a}{[H^+]}\right]} \quad (1.9)$$

Obținem o ecuație pentru PC^I în funcție de $[H^+]$ cu doi parametri necunoscuți, PC și K_a . Această ecuație poate fi transformată în ecuația unei drepte prin obținerea mărimii inverse a ambelor părți ale ecuației. Prin urmare:

$$\frac{1}{PC^I} = \frac{[H^+]}{PC \cdot [H^+]} + \frac{K_a}{PC \cdot [H^+]} \quad (1.10)$$

$$\frac{1}{PC'} = \frac{1}{PC} + \frac{K_a}{PC \cdot [H^+]} \quad (1.11)$$

Deci, reprezentarea grafică a dependenței $1/PC'$ în funcție de $1/[H^+]$ este o linie dreaptă cu o panta egală cu K_a/PC și o intersecție pe ordonată egală cu $1/PC$ (Fig. 1.2).

PC' poate fi estimat prin determinarea concentrației de acid salicilic distribuit în fază organică. Acidul salicilic prezent în faza organică este determinat prin utilizarea soluției de nitrat de fier (III). Reacția acidului salicilic cu nitratul de fier (III) produce un complex intens colorat, a cărui absorbție maximă poate fi determinată spectrofotometric la lungimea de unda 540 nm.

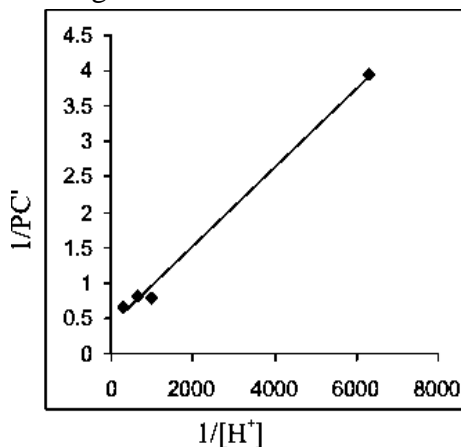


Figura 1.2. Reprezentarea grafică a dependenței $1/PC'$ în funcție de $1/[H^+]$

Prerechizite

1. Conceptul de pH și pKa.
2. Ipoteza partiției pH-ului.
3. Conceptul de absorbție a substanțelor medicamentoase.

Materiale și reagenți:

Veselă chimică: baloane cotate (50, 100 mL), pipete gradate (5 mL), eprubete (20 mL) etc.

Reagenți chimici: acid salicilic, acid clorhidric, ftalat de potasiu, solvent organic (hexan/acetat de etil), nitrat de fier (III)/clorură de fier (III), acid azotic (0,4 M).

Echiptamente: balanță analitică, spectrofotometru UV-VIS.

Modul de lucru

1. Se prepară 100 mL de soluție-tampon cu pH-ul: 2,5; 2,8; 3,0; 3,5; 3,8 și 4,0.
2. Se cântărește 10 mg de acid salicilic cu precizie de 0,0001, care se transferă în balon cotat de 50 mL și se ajustează volumul cu soluția-tampon pH 2,5.
3. Se prepară în mod asemănător soluțiile de 0,02% de acid salicilic cu următoarele soluții-tampon cu pH-ul 2,8; 3,0; 3,5; 3,8 și 4,0.
4. Din soluția pregătită cu pH-ul 2,5 se iau 4 mL și se adaugă 1 mL de soluție de clorură de fier (III) de 0,55%. După formarea culorii se măsoară absorbanta la 540 nm folosind spectrofotometrul UV-VIS. Aceasta este absorbția (A_1);
5. Apoi, iarăși se iau 5 mL din soluția cu pH-ul 2,5 și se adaugă 5 mL de solvent organic (hexan/acetat de etil). Se agită eprubeta timp de 5 min pentru a se realiza extracția. Se lasă să se separe cele două faze, se îndepărtează 4 mL din faza apoasă, se adaugă 1 mL soluție de clorură de fier (III) (0,55% de clorură de fier (III) în acid clorhidric de 0,4 M) pentru a forma culoarea și pentru a măsura absorbanta la $\lambda = 540$ nm. Aceasta este absorbanta a doua (A_2). Folosind cele două mărimi ale absorbției, se calculează coeficientul aparent de partiție, PC^I :

$$PC^I = \frac{[HA-organic]}{[HA-apos]} \quad (1.12)$$

unde, $[HA-organic] = A_1 - A_2$ și $[HA-apos] = A_2$

$$\text{Prin urmare, } PC^I = \frac{(A_1 - A_2)}{A_2} \quad (1.13)$$

6. Se repetă experimentul cu soluții-tampon de pH 2,8; 3,0; 3,5; 3,8 și 4,0. Se reprezintă grafic dependența $1/PC^I$ față de $1/[H^+]$ și se calculează PC , Ka și pKa ;
7. Se calculează concentrația de ioni H^+ cu ajutorul ecuației $pH = -\lg [H^+]$. Datele obținute se introduc în tabelele 1.1, 1.2.

Tabelul 1.1. Coeficientul aparent de partiție (PC^l) al acidului salicilic

Nr.	pH	Absorbanța A ₁	Absorbanța A ₂	Extracția AS (A ₁ -A ₂)	PC ^l = (A ₁ -A ₂)/ A ₂
1	2,5				
2	2,8				
3	3,0				
4	3,5				
5	3,8				
6	4,0				

Tabelul 1.2. Valorile [H⁺] și PC^l ale acidului salicilic

Nr.	pH	[H ⁺]	1/[H ⁺]	PC ^l	1/PC ^l
1	2,5				
2	2,8				
3	3,0				
4	3,5				
5	3,8				
6	4,0				

Calculule

1. Concentrația H⁺ la pH-ul dat

$$\text{pH} = -\lg [\text{H}^+]$$

$$[\text{H}^+] = 10^{-\text{pH}}$$

2. Coeficientul aparent de partiție (PC^l)

$$\text{PC}^l = (A_1 - A_2)/A_2$$

3. Coeficientul de disrtibuție (PC)

Se construiește graficul dependenței 1/PC^l față de 1/[H⁺].

Se obține o linie dreaptă cu o pantă $m = K_a/\text{PC}$ și o întretăiere cu ordonata $c = 1/\text{PC}$. Se calculează segmentul c și se determină $\text{PC} = 1/c$.

4. Constanta de disociere a acidului, K_a

Se înlocuiește valoarea pantei (m) și a PC-ului în formula:

$$K_a = m \cdot PC$$

5. Logaritmul negativ al constantei de echilibru (K_a), pK_a .

$$pK_a = - \lg(K_a)$$

Rezultatele experimentale

1. Extracția acidului salicilic în stratul organic la pH 2,5 a fost _____.
2. S-a constatat că coeficientul de partiție (PC) al acidului salicilic este _____.
3. S-a constatat că pK_a a acidului salicilic este _____.

Concluzii

Valoarea pK_a indică despre ionizarea substanței medicamentoase la pH-ul dat, în timp ce coeficientul de partiție, PC-ul, indică solubilitatea sa lipidică la pH-ul dat. Astfel, substanța medicamentoasă existentă în formă neionizată, cu o lipofilitate mai mare la pH-ul dat, este asigurată de absorbție. Pe măsură ce pH-ul continuă să crească, extracția acidului salicilic în stratul organic continuă să crească.

Aplicații

1. Determinarea pK_a

Se poate calcula cantitatea relativă a formei neionizate (absorbabile) și a celei ionizate (neabsorbabile) ale substanței medicamentoase și prognoza gradul de absorbție la un pH dat al tractului gastrointestinal, dacă pK_a este cunoscută.

2. Determinarea coeficientului de partiție

Se poate prezice gradul de absorbție cunoscând liposolubilitatea, deoarece liposolubilitatea ridicată facilitează partiția substanței medicamentoase în biomembrana lipoidală și în circulația sistemică. Cunoașterea valorii pK_a și a PC-ului unei substanțe medicamentoase particulare va fi utilă pentru proiectarea formei de dozare adecvată pentru o biodisponibilitate optimă.

Sarcini pentru evaluare și autoevaluare

1. Definiți noțiunile de PC, pKa și pH.
2. Explicați utilizarea valorilor pKa și PC ale substanței medicamentoase în timp ce se proiectează sinteza unei SM.
3. Calculați ce procent din acid va fi ionizat la pH 6,0, dacă un acid are pKa egal cu 5,2.
4. Luați în considerare caracteristica următorilor compuși:

Compuși	Tip	pKa
Acid toluen-4-sulfonic	Acid	-1,3
Acid benzoic	Acid	4,2
Tiopental	Acid	7,6
Codeină	Bază	8,2
Atropină	Bază	10,0

- a) Explicați care din substanțele prezentate în tabel va fi cel mai bine absorbită în stomac (pH = 2).
 - b) Explicați care din substanțele prezentate în tabel va fi cel mai bine absorbită în intestinul subțire (pH = 4,2).
- (Să presupunem că coeficienții de partiție ai compușilor sunt identici).

Lucrarea de laborator Nr. 2.

Verificarea legii dizolvării a lui Noyes și Whitney

Scopul lucrării: verificarea legii dizolvării a lui Noyes și Whitney folosind bastonașe de acid benzoic.

Obiective:

1. să se studieze și să se înțeleagă conceptul legii lui Noyes și Whitney cu privire la dizolvare;
2. să se verifice legea lui Noyes - Whitney la dizolvare folosind bastonașe de acid benzoic (AB).

Generalități

Atunci când o substanță medicamentoasă este administrată pe cale orală sub formă de comprimat, capsulă sau suspensie, viteza de absorbție este controlată de viteza de dizolvare a SM în fluide la locul de absorbție. Prin urmare, viteza de dizolvare este adesea etapa de limitare a vitezei de adsorbție.

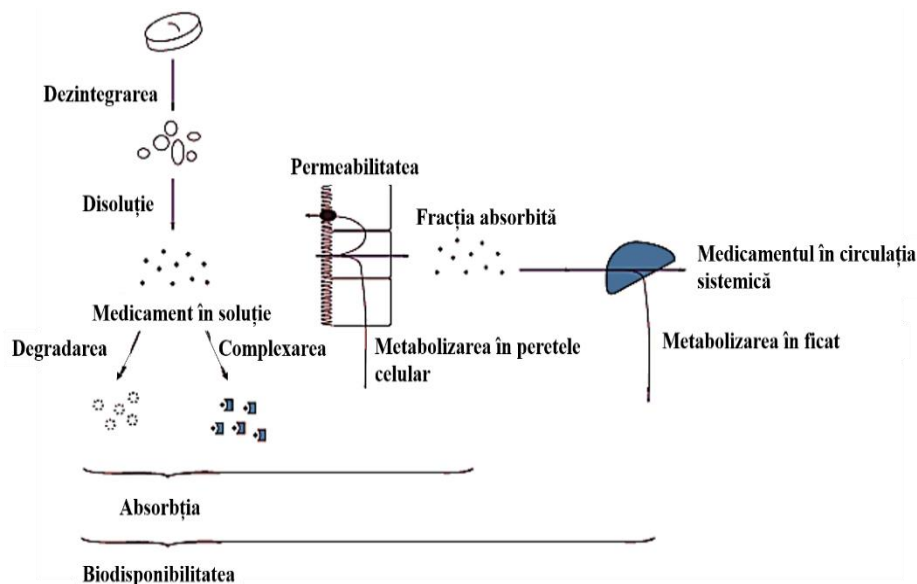


Figura 2.1. Schema de dizolvare a comprimatului și de absorbție a substanței medicamentoase

Când dizolvarea este etapa care controlează viteza întregului proces, se consideră că absorbția este etapa limitativă a vitezei de dizolvare. Absorbția din soluție se desfășoară mai rapid decât dintr-o formă de dozare solidă. În cazul substanțelor medicamentoase solubile, absorbția nu depinde de procesul de dizolvare, în timp ce substanțele medicamentoase puțin solubile tind să conducă la o absorbție limitată în procesul de dizolvare.

Dizolvarea unei substanțe solide într-un lichid implică transferul de masă dintr-o fază solidă în faza lichidă. Procesul de transfer global poate fi considerat ca fiind compus din două etape

consecutive. Prima etapă implică o reacție la interfață, care are drept rezultat eliberarea moleculelor dizolvate din faza solidă, urmată de transportul moleculelor dizolvate la suprafața de separare a fazelor sub influența difuziei sau convecției. Ca orice reacție complex, care implică etape consecutive, viteza globală a transferului de masă la dizolvare va fi determinată de stadiul cel mai lent. Dacă vitezele a două etape consecutive sunt comparabile ca mărime, atunci ambele etape vor influența viteza globală de transfer a SM.

În 1897, Noyes și Whitney au descris analiza cantitativă care corelează timpul necesar pentru dizolvarea unei substanțe medicamentoase din particule solide. Legea lui Noyes - Whitney afirmă că viteza cu care o substanță solidă se dizolvă în soluție este proporțională cu diferența dintre concentrația soluției respective și concentrația soluției saturate. Expresia matematică a legii Noyes - Whitney este:

$$\frac{dc}{dt} = K \cdot (C_s - C_t) \quad (2.1)$$

unde, dc/dt - viteza de dizolvare, C_s - solubilitatea substanței la saturație, C_t - concentrația la expirarea timpului t și K - constanta vitezei de dizolvare.

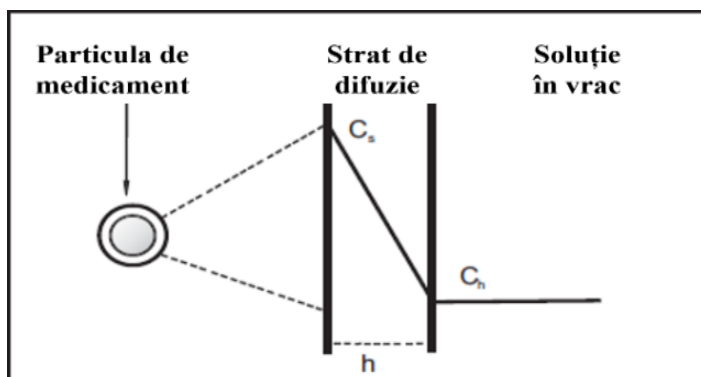


Figura 2.2. Schema de dizolvare a unui substanțe medicamentoase conform modelului stratului de difuzie

Versiunea actuală a ecuației este ușor modificată față de

original, dar rămâne bazată pe modelul stratului de difuzie a dizolvării substanței medicamentoase dintr-o particulă într-un mare exces de mediu de dizolvare (Fig. 2.2).

Viteza de dizolvare depinde de suprafața solidului, care, la rândul său, depinde de gradul de dispersie a substanței medicamentoase. De asemenea depinde de energia și starea energetică din cristalele substanței medicamentoase. O relație generală a procesului de dizolvare descendent a fost mai întâi observată de Mayer Whitney. Ecuația Noyes - Whitney modificată este prezentată în ec. (2.2).

$$\frac{dc}{dt} = K \cdot S \cdot (C_s - C_t) \quad (2.2)$$

unde **S** - suprafața solidului dizolvat, **C_s** - concentrația la saturație a substanței medicamentoase (concentrația în stratul de difuzie),

C_t - concentrația substanței medicamentoase în mediul de dizolvare la momentul t.

K - constanta vitezei de dizolvare, este egală cu raportul dintre coeficientul de difuzie și grosimea stratului de difuzie (**D/h**, unde **D** - coeficientul de difuzie al soluției, **h** - grosimea stratului de difuzie) asemănător cu stratul de apă nemiscibil în intestin și este prezentat sub forma unui strat staționar subțire de soluție adiacentă la suprafața solidului. Stratul este saturat cu substanța medicamentoasă. Astfel, concentrația SM în strat este egală cu **C_s**. Expresia **C_s-C_t** reprezintă gradientul de concentrație dintre stratul de difuzie și volumul soluției. În expresia vitezei de dizolvare **C_t** este neglijabilă. Astfel, ecuația (2.2) se reduce la ecuația (2.3).

$$\frac{dc}{dt} = \frac{D \cdot S \cdot C_s}{h} \quad (2.3)$$

Ecuația lui Noyes și Whitney presupune că viteza transferului de masă depinde de viteza cu care substanța dizolvată difuzează din stratul subțire limitat (film) în volumul soluției. Prin urmare, **K** va depinde de coeficientul de difuzie al soluției și de grosimea stratului de difuzie și va fi influențat de factorii de care depinde coeficientul de

difuzie și grosimea filmului de lichid.

Dacă suprafața este menținută constantă, atunci:

$$K \cdot S = K^1 \quad (2.4)$$

Prin urmare, ecuația (2.2) poate fi redusă la ecuația (2.5):

$$\frac{dc}{dt} = K^1 \cdot (C_s - C_t) \quad (2.5)$$

Prin integrarea ecuației de mai sus obținem:

$$\lg \frac{C_s}{C_s - C_t} = \frac{K_1 \cdot t}{2,303} \quad (2.6)$$

Viteza de dizolvare pentru o anumită substanța medicamentoasă într-un anumit solvent poate fi calculată din ecuația (2.7):

$$K = \frac{K_1}{S} = \frac{2,303}{St} \cdot \lg \frac{C_s}{C_s - C_t} \quad (2.7)$$

Eliberarea SM din forma de dozare depinde de natura și cantitatea de excipienți, gradul de dispersie a unei substanțe, solubilitatea acesteia, pH-ul mediu și de alți factori. Viteza și complexitatea eliberării unei substanțe medicamentoase este determinată de valoarea constantei $K_{\text{eliberare}}$. Această constantă este cea care precedă procesul de absorbție, adesea îl limitează, mai ales dacă SM este sub formă de comprimate, capsule, drajeuri, spansule, suspensii, pulberi, supozitoare etc. Cu o creștere a $K_{\text{eliberare}}$, adică cu creșterea cantității de substanță eliberate din forma de dozare în soluție, mai complet va fi procesul de absorbție a SM.

Condiția principală pentru absorbția SM este prezența lor în stare dizolvată în fluidul de la locul de absorbție. Coeficientul de solubilitate și viteza de dizolvare a SM din forma farmaceutică influențează în principal absorbția și, respectiv, biodisponibilitatea. La administrarea extravasculară (orală, rectală, transdermală, transmucozală, intra-musculară etc.) procesul de dizolvare poate fi factorul de limitare a absorbției.

Pentru substanțele **ușor solubile în apă**, fiind administrate sub formă de soluții sau dizolvate după eliberarea din forma farmaceutică

(suspensie, pulbere, comprimate, capsule etc.), biodisponibilitatea este influențată în special de viteza și gradul de absorbție prin mucoasa biologică și gradul de biotransformare (hepatică și gastrointestinală).

La substanțele **greu solubile în apă** biodisponibilitatea este influențată în special de viteza de dizolvare. **Creșterea suprafeței efective** a particulelor solide de SM (micșorarea dimensiunilor particulelor) va mări viteza de dizolvare și deci absorbția. Aceasta se poate realiza prin:

- **micronizarea** în mori coloidale (transformarea unui corp solid în particule ce au dimensiuni de ordinul micronului, 15-20 μm);
- **aplicarea de nanotehnologii** (particule cu dimensiuni de 100 și 200 nm).

Prin micșorarea mărimii particulelor biodisponibilitatea crește. Cu cât dimensiunea particulelor este mai mică și cu cât suprafața lor este mai mare, cu atât mai repede această substanță trece în soluție și va fi disponibilă pentru absorbție. Substanțele necristalizate (amorf) sunt instabile din punct de vedere terapeutic și posedă adesea solubilități mai mari decât forma cristalină, deoarece la dizolvare nu este nevoie să se „învingă” energia rețelei cristaline. Cu creșterea hidratării se micșorează viteza de dizolvare în apă, astfel fiind limitată și **biodisponibilitatea**.

Principiul lucrării

Principiul acestui experiment se bazează pe faptul că constanta vitezei de dizolvare rămâne aceeași, chiar dacă suprafața bastonașelor de acid benzoic variază. Constanta vitezei de dizolvare a acidului benzoic se calculează utilizând ecuația (2.7). Solubilitatea la saturație (C_s) a acidului benzoic (AB) poate fi calculată prin dizolvarea unei cantități în exces de AB în apă, în timp ce concentrația de acid benzoic (C_t) în soluție la momentul dat (t) poate fi, de asemenea, estimată. Constanta vitezei de dizolvare pentru bastonașele de acid benzoic **A**, **B** și bastonașul **C** rămâne aceeași, chiar dacă suprafețele acestor bastonașe sunt diferite. Astfel, legea Noyes și Whitney poate fi verificată folosind bastonașe de acid benzoic.

Materiale și reagenți

Veselă chimică: pahare (200 mL), 2 cilindre Nessler (100 mL), tuburi de testare, baghete de sticlă, biuretă de 10 mL, balon conic de

100 mL, pipete gradate de 10 mL.

Reagenți chimici: acid benzoic, hidroxid de sodiu de 0,05 N, acid oxalic, fenolftaleină și parafină moale.

Ustensile: riglă.

Modul de lucru

1. Standardizarea soluției de hidroxid de sodiu 0,05 M

Într-un balon conic se introduc 10 mL de acid oxalic de 0,05 M (se dizolvă 315 mg de acid oxalic în 100 mL de apă distilată) și se adaugă 2 picături de fenolftaleină. Se titrează conținutul balonului cu soluție de hidroxid de sodiu până se obține o culoare roz deschis. Se repetă titrarea pentru a obține valori concordante.

2. Prepararea soluției saturate de acid benzoic (AB)

Se prepară soluție saturată de acid benzoic în 100 mL apă prin utilizarea în exces a acidului benzoic. Soluția rezultată se agită folosind agitatorul magnetic timp de 2 ore și se filtrează. Se extrag 10 mL de soluție saturată, care se filtrează și se determină cantitatea de acid benzoic prin titrarea cu soluție de 0,05 M NaOH (se obține valoarea Cs).

3. Prepararea bastonașelor de acid benzoic

1. Se plasează cantitatea necesară de cristale pure de acid benzoic într-un pahar și se încălzește până se topește (încălzirea nu trebuie să fie atât de puternică încât acidul benzoic să se decoloreze).
2. Se ia o baghetă de sticlă și o eprubetă. Se amplasează un capăt al baghetei de sticlă în eprubetă și se pune pe un suport de testare vertical.
3. Se ține bagheta de sticlă în centrul eprubetei de testare și se toarnă cu grijă acidul benzoic topit. Se umple la 9-10 cm înălțime. Se ține bagheta în centru până când acidul începe să se solidifice.
4. După răcirea la temperatura camerei, se răcește eprubeta în baie cu

gheață timp de 10 până la 15 min. Datorită răcirii ulterioare, acidul benzoic se va solidifica și se va desprinde de pe suprafața eprubetei de testare.

5. După răcirea completă, se scoate bagheta de sticlă împreună cu cilindru de acid benzoic. Se taie cu o lamă la o lungime de la 6 până la 8 cm. Se măsoară lungimea exactă și diametrul cu ajutorul riglei.
6. Se unge cu parafină moale două suprafețe opuse ale bastonașului (cilindru), pentru a preveni dizolvarea suprafețelor. Excesul de parafină moale trebuie evitat, deoarece difuzează în bastonul de acid benzoic și modifică suprafața circulară.
7. Se pregătesc bastoane de acid benzoic cu lungimi diferite și se marcează ca Stick A, Stick B și Stick C.

4. Studiul de dizolvare a bastonașelor de acid benzoic

1. două cilindre de măsurare Nessler se împlu cu 100 mL de apă distilată. Apoi, bastonașul de acid benzoic se introduce în cilindru și se notează timpul inițial. Se deplasează vertical bastonașele de AB timp de 10 min. Apoi se îndepărtează 10 mL de soluție și se titrează cu NaOH 0,05 N utilizând fenolftaleină ca indicator pentru analiza sării de acid benzoic.
2. Se mențin condiții constante de dizolvare a bastonașului de AB în apă.
3. Se determină în mod similar concentrația de acid benzoic după 20, 30 și 40 de min.
4. Se efectuează titrarea martor a eșantionului, excluzând stickul de AB, se scad datele din titrările menționate anterior și se prezintă rezultatele.

5. Construirea graficului $\lg(C_s/C_s - C_t)$ funcție de timp (t)

Se construiește graficul dependenței $\lg(C_s/C_s - C_t)$ funcție de timp (t).

Tabelul 2.1. Standardizarea soluției de NaOH de 0,05 M

Nr.	Volumul de 0,05 M _{1/2} soluție de acid oxalic (mL)	Volumul de NaOH utilizat (mL)	Concentrația molară

Biofarmacia și farmacocinetica

1	10		
2	10		
3	10		

Tabelul 2.2. Parametrii stickurilor A, B și C

Nr.	Bagheta	Diametru (cm)	Lungimea (cm)	Suprafața (S) (cm ²)
1	Stickul A			
2	Stickul B			
3	Stickul C			

Soluția saturată a acidului benzoic în apă (C_s) = _____ g / L.

Tabelul 2.3. Tabelul de observație pentru stickul A

Timp, min	10	20	30	40
Volumul de NaOH utilizat (a-b) * (mL)				
Concentrația molară a echivalentului NaOH				
Conc. AB (bagheta A)				
$\frac{C_s}{C_s - C}$				
$lg \frac{C_s}{C_s - C}$				
Panta				
$K^l = \text{Panta} \cdot 2.303$				
$K = K^l / S$				

* **a** - este volumul de NaOH utilizat pentru titrarea acidului benzoic, **b** - este volumul de NaOH utilizat pentru titrarea probei martor, adică fără acid benzoic.

Tabelul 2.4. Tabelul de observație pentru stickul B

Timp, min	10	20	30	40
Volumul de NaOH utilizat (a-b) * (mL)				
Concentrația molară a echivalentului NaOH				
Conc. AB (B)				
$\frac{C_s}{C_s - C}$				
$\log \frac{C_s}{C_s - C}$				
Panta				
$K^l = \text{Panta} \cdot 2.303$				
$K = K^l / S$				

***a** -volumul de NaOH utilizat pentru titrarea acidului benzoic, **b** - volumul de NaOH utilizat pentru titrarea probei martor, adică fără acid benzoic.

Tabelul 2.5. Tabelul de observație pentru stickul C

Timp, min	10	20	30	40
Volumul de NaOH utilizat (a-b) * (mL)				
Concentrația molară a echivalentului NaOH				
Conc. AB (C)				
$\frac{C_s}{C_s - C}$				
$\lg \frac{C_s}{C_s - C}$				
Panta				
$K^l = \text{Panta} \cdot 2.303$				
$K = K^l / S$				

***a** - volumul de NaOH utilizat pentru titrarea acidului benzoic,
b - volumul de NaOH utilizat pentru titrarea probei martor, adică fără acid benzoic.

1. Calcularea concentrației molare echivalente a soluției de NaOH

$$N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2$$

unde: N_1 - concentrația molară a echivalentului NaOH, V_1 - volumul de NaOH utilizat, N_2 - concentrația molară echivalentă a acidului benzoic (AB),

V_2 - volumul de acid benzoic utilizat.

2. Calcularea concentrației soluției saturate de acid benzoic (Cs)

$$N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2$$

$$\text{NaOH} \quad \text{AB}$$

Concentrația soluției AB este egală cu $N_2 \cdot$ masa molară a AB = $N_2 \cdot 122,1$ g/mol. Solubilitatea la saturație - $N_2 \cdot 122,1$ g/mol.

3. Calcularea suprafeței stickului (S)

$$S = D \cdot L$$

unde, D - diametrul, L - lungimea.

4. Calcularea concentrației acidului benzoic (C) la timpul t

$$N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2$$

$$(\text{NaOH}) \quad (\text{AB})$$

Concentrația soluției AB este egală cu $N_2 \cdot$ masa molară a AB = $N_2 \cdot 122,1$ g/mol

5. Calcularea constantei vitezei de dizolvare (K)

Se construiește graficul:

$\lg(C_s/C_s - C_t)$ în funcție de timp. Se calculează din grafic K^1 :

$$K^1 = \text{panta} \cdot 2.303$$

$$K = D/h = K^1 / S$$

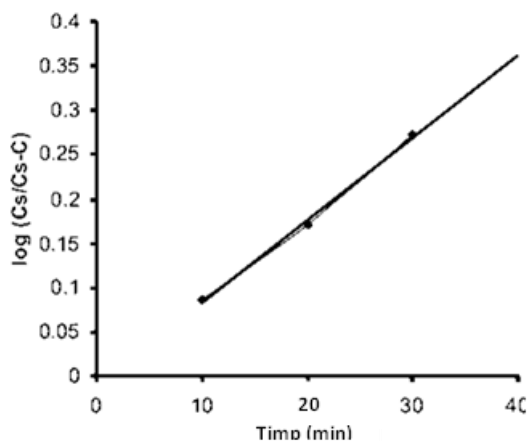


Figura 2.3. Dependența $\lg (C_s/C_s - C_t)$ în funcție de timp

Rezultate experimentale

Constanta vitezei de dizolvare pentru stickul de acid benzoic este egală cu

Concluzii

Din acest experiment se poate concluziona că constanta vitezei de dizolvare "K" rămâne constantă pentru SM dată în condiții date și, prin urmare, legea lui Noyes și Whitney de dizolvare este respectată.

Aplicații

1. Testele de dizolvare sunt utilizate în industria farmaceutică pentru controlul calității și pentru a facilita determinarea bioechivalenței SM.
2. Testul de dizolvare oferă informații utile în mai multe etape ale dezvoltării medicamentului.
3. Testul de dizolvare poate fi folosit ca instrument de prognostic al absorbției orale a substanței medicamentoase.
4. Dizolvarea poate fi, de asemenea, un instrument esențial pentru dezvoltarea și evaluarea formulărilor cu eliberare susținută.
5. Testul de dizolvare poate fi un instrument de corelare a substanței medicamentoase.

Sarcini pentru evaluare și autoevaluare

1. Definiți noțiunea de solubilitate și explicați metoda de determinare a solubilității la saturație.
2. Definiți noțiunea de dizolvare a SM.
3. Explicați influența diferitor factori asupra vitezei de dizolvare a substanțelor medicamentoase.
4. Evaluați evenimentele secvențiale în timpul transferului din tractul gastrointestinal în circulația sistemică a unei substanțe medicamentoase sub formă de dozare solidă.

Lucrarea de laborator Nr. 3.

Studiul cinetic privind dizolvarea substanțelor medicamentoase

Scopul lucrării: studierea cineticii dizolvării aspirinei (acidului acetilsalicilic) și determinarea constantei vitezei de dizolvare.

Obiective:

1. studiul cineticii dizolvării substanțelor solide prin metoda lui Guggenheim;
2. corelarea datelor obținute pentru determinarea constantei vitezei de dizolvare.

Generalități

Dizolvarea substanțelor solide este unul dintre procesele eterogene care apar la suprafața de separare dintre două faze, numită interfață. Evident, una dintre faze este solidă, de aceea reacția are loc pe suprafața solidă și procesul poate fi împărțit în următoarele faze:

1. difuzia substanțelor reactante la suprafață;
2. adsorbția pe suprafață;
3. reacția la suprafață;
4. desorbția de pe suprafață;
5. difuzia produsului de pe suprafață.

Viteza totală a reacției procesului eterogen este controlată de viteza celei mai lente etape, iar în cazul sistemelor solid/lichid, etapa determinantă a vitezei sunt procesele legate de difuzie.

În sistemele biologice apa reprezintă cel mai frecvent mediu lichid-solvent. În procesul de dizolvare a compușilor solizi cristalini în soluție apoasă, etapele de mai sus sunt suplimentate cu hidratarea suprafeței și a produselor de dizolvare. Dizolvarea substanței solide este controlată de cea mai lentă etapă de reacție, care este difuzia compusului dizolvat și hidratat de pe suprafața solidă. În procesul de difuzie se transportă substanța dizolvată printr-un strat subțire de difuzie h , unde concentrația substanței dizolvate scade continuu de la concentrația soluției saturate (C_s) la suprafața solidă până la nivelul de concentrație (C) din volumul soluției. Forța motrice a difuziei este gradientul de concentrare spațială în conformitate cu Legea lui First Fick:

$$\frac{dn}{dt} = -D \cdot S \cdot \frac{dc}{dx} \quad (3.1)$$

unde: dn - cantitatea de substanță dizolvată în intervalul de timp dt , D - coeficientul de difuzie, S - suprafața totală (la interfața) a solidului dizolvat și în final dc/dx - gradientul de concentrație.

Când amestecarea este eficientă, stratul de difuzie este foarte subțire (0,02-0,05 nm), iar gradientul de concentrație poate fi înlocuit cu o singură aproximare liniară.

$$\frac{dc}{dx} = \frac{(C - C_s)}{h} \quad (3.2)$$

Pentru a calcula cantitatea de substanță dizolvată, dn , putem scrie:

$$Dn = V \cdot dc \quad (3.3)$$

unde: V - volumul total al soluției și dc - creșterea concentrației.

Forma finală a ecuației Nernst este:

$$\frac{dc}{dx} = \frac{D \cdot S}{V \cdot h} (C_s - C) \quad \text{sau} \quad \frac{dc}{dx} = K \cdot (C_s - C) \quad (3.4)$$

unde K - constanta vitezei de dizolvare.

După separarea variabilelor și integrare obținem următoarea ecuație, care reprezintă ecuația pentru cinetica reacției de ordinul I:

$$C = C_s \cdot (1 - e^{-k \cdot t}) \quad (3.5)$$

Cinetica chimică poate fi definită ca un studiu cantitativ privind modificările concentrației (sau presiunii) în timp, produse de o reacție chimică. Cu alte cuvinte, cinetica chimică investighează vitezele diferitor reacții chimice. Viteza de reacție este variația concentrației a unuia dintre reactanți pe o unitate de timp. Constanta de viteză este o măsură a vitezei unei reacții chimice date în condiții specificate (presiune, temperatură). Aceasta poate fi definită ca viteza variației concentrației reactantului sau a produsului în timp pentru o reacție în care toți reactanții sunt exprimați în aceleași unități de concentrație, sau este viteza specifică, când concentrațiile reactanților sunt egale cu 1 mol/L; $v = k$. Ordinul de reacție este, de obicei, un număr întreg mic, dar, în cazuri speciale, poate avea o valoare fracționară sau poate fi egal cu zero. Este definit, în mod formal, ca suma termenilor puterilor concentrațiilor care apar în ecuația cinetică a vitezei de reacție. Dacă reacția chimică are loc într-o serie de etape succesive, atunci viteza de reacție este limitată de stadiul cel mai lent. Această etapă este denumită etapă determinantă a vitezei de reacție.

Principiul metodei

Măsurările cinetice sunt, de obicei, efectuate pentru determinarea vitezei de reacție sau a ordinului de reacție în condițiile date. Procesul de dizolvare a substanțelor ionice poate fi studiat prin măsurarea modificărilor de conductivitate în timp:

$$G(t) = G_s \cdot (1 - e^{-k \cdot t}) \quad (3.6)$$

unde: $G(t)$ - conductivitatea la momentul t , G_s - conductivitatea soluției saturate. Se presupune că modificările de suprafață ale substanței dizolvate sunt neglijabile. În cazul compușilor organici mai puțin stabili, determinarea precisă a conductivității soluției saturate este imposibilă din cauza reacțiilor secundare (de exemplu, acidul acetilsalicilic hidrolizează în acid acetic și salicilic). Astfel, conductivitatea soluției saturate G_s este tratată ca o mărime necunoscută și la fel trebuie determinată.

Se va folosi metoda lui Guggenheim de evaluare a constantei de viteză, deoarece concentrația finală este necunoscută. Esența

metodei poate fi caracterizată după cum urmează: există câteva serii de măsurători în cadrul experimentului, în care variația timpului între serii rămâne constantă. Datele privind concentrația sunt înregistrate la momentul t și $t + \delta t$ (δt este variația timpului). Folosind metoda lui Guggenheim, ecuația cinetică (3.6) poate fi scrisă ca ec. (3.7):

$$\ln[G(t + \delta t) - G(t)] = A - e^{-k \cdot t} \quad (3.7)$$

$$\text{unde: } A = \ln[G_s \cdot (1 - e^{-k \cdot t})] \quad (3.8)$$

Ultima ecuație este utilizată pentru determinarea conductivității soluției saturate necunoscute. Seriile nu trebuie luate de la începutul și sfârșitul procesului de măsurare, deoarece erorile experimentale sunt mai mari în aceste puncte.

Prerechizite

1. Teoria dizolvării
2. Cinetica chimică

Materiale și reagenți

Vesală chimică: vas de 400 mL.

Reagenți chimici: acid acetilsalicilic pur.

Echipeamente: conductometru, electrod pentru conductivitate, agitatoare electromagnetice, cronometru.

Materiale: stativ de laborator, suport pentru electrozi, tub de testare cu perforație, 4 comprimate de acid acetilsalicilic (solubilitate maximă 2,5 g /L la 15 °C).

Mod de lucru

1. Se plasează paharul cu 200 mL de apă dublu distilată pe agitatorul electromagnetic.
2. Se utilizează un stativ de laborator, se fixează tubul de testare perforat și celula de conductivitate în paharul de laborator.
3. Se setează viteza de amestecare la 800 rpm, care este constantă pentru tot experimentul (rețineți că nu este necesară încălzirea).
4. Se determină conductivitatea apei pure bidistilate (trebuie să fie mai mică de 2 μS). Se pun comprimatele în tubul de testare și se pornește cronometrul. Se înregistrează datele de conductivitate în

fiecare minut, iar din minutul 5 la fiecare 5 minute. Se repetă determinările de conductivitate timp de 85 de minute.

5. După terminarea măsurătorilor, se oprește agitatorul și conductometrul și se clătește celula conductometrică cu apă distilată.
6. Se construiește graficul funcției $G = f(t)$ pentru a caracteriza evoluția generală a dizolvării în timp. Se selectează două serii din datele de conductivitate măsurate, care diferă în timpul de reacție printr-o schimbare constantă ($t = 40$ min). Se calculează apoi mărimea corespunzătoare: $\ln[G(t + \delta t) - G(t)]$.
7. Setul de date este dat de conductivitățile la timpul de reacție t : 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 min. Al doilea set de date este definit secvențial ($t + \delta t$): 45, 50, 55, 60, 70, 75.
8. Utilizând metoda celor mai mici pătrate se determină parametrii pentru următoarea funcție liniară: În $[G(t + \delta t) - G(t)] = A - k \cdot t$, unde panta reprezintă $-k$. Panta este valoarea negativă a constantei vitezei de dizolvare la o temperatură dată; se poate utiliza varianta alternativă: $\lg [G(t + \delta t) - G(t)] = \lg A - k \cdot t / 2,303$; panta = $-k / 2.303$.

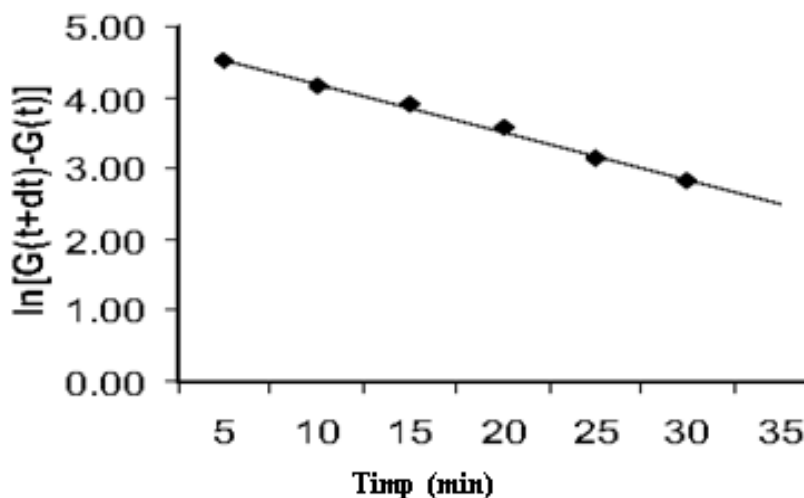


Figura 3.1. Dependența $\ln [G(t + \delta t) - G(t)]$ în funcție de timp

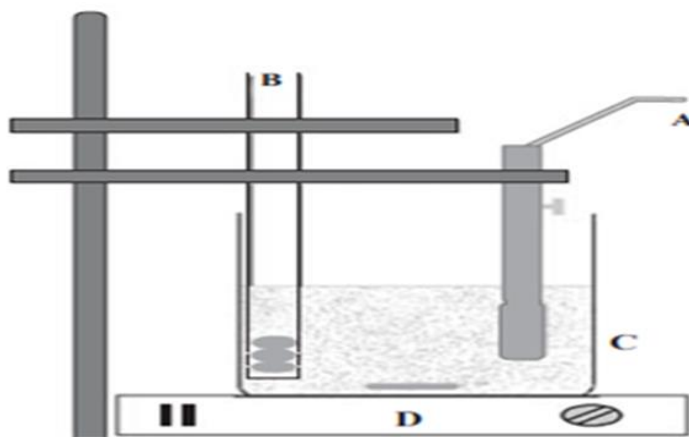


Figura 3.2. Designul instalației

A - electrod, B - tub cu perforație, C - pahar chimic, D - agitator magnetic

Rezultate experimentale

Tabelul 3.1. Datele variației conductivității în funcție de timp

Timp, min	Conductivitate $G(t)$, μS
1	
2	
3	
4	
5	
10	

Tabelul 3.2. Datele pentru determinarea constantei de viteză după metoda lui Guggenheim

t, min	$G(t)$, μS	$(t+\delta t)/min$	$G(t+\delta t)$, μs	$G(t+\delta t)-G(t)$	$\ln[G(t+\delta t)-G(t)]$
5		45			
10		50			
15		55			
20		60			
25		65			

Constanta vitezei de dizolvare a comprimatei de aspirină, determinată prin metoda lui Guggenheim s-a dovedit a fi egală cu:

.....

Deduceți concluzii

Aplicații

Metoda lui Guggenheim pentru evaluarea constantelor de viteză se dovedește a fi aplicabilă într-o gamă largă de domenii, care sunt de interes farmaceutic. Acestea includ:

1. cinetica reacției în care din același reactant se formează mai multe produse;
2. reacții consecutive de ordinul întâi;
3. dizolvarea urmată de separarea într-o fază lipidă;
4. utilizarea cineticii de dizolvare pentru a determina solubilitatea substanței medicamentoase;
5. analiza substanțelor medicamentoase prin metoda cinetică.

Sarcini pentru evaluare și autoevaluare

1. Enumerați aplicațiile proprietății de conductanță a substanțelor medicamentoase în domeniul farmaceutic.
2. Definiți noțiunea de viteză a reacțiilor chimice, constantă de viteză și ordin de reacție.
3. Indicați parametrul ce se determină experimental în lucrarea dată pentru determinarea constantei de viteză.
4. Explicați principiul metodei ce este utilizat pentru calcularea constantei de viteză.

Exercițiu: studiați cinetica de dizolvare a oricărei SM slab bazice.

Lucrarea de laborator Nr. 4.

Dizolvarea *in vitro* a comprimatelor de paracetamol și determinarea procentului de eliberare cumulativă a substanței medicamentoase

Scopul lucrării: studiul *in vitro* a eliberării substanței medicamentoase din comprimatul de paracetamol.

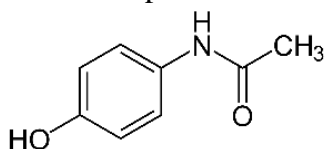


Figura 4.1. Formula de structură a paracetamolului

Obiective:

1. înțelegerea modului de funcționare a aparatelor de testare în procesul dizolvării substanțelor medicamentoase;
2. evaluarea procesului de dizolvare a unui comprimat de paracetamol fără film.

Generalități

Dizolvarea este procesul prin care o substanță solidă se dispersează într-o soluție. În industria farmaceutică, dizolvarea poate fi definită ca cantitatea de substanță medicamentoasă care se dispersează în soluție într-o unitate de timp în condiții standardizate ale interfeței lichid/solid: temperatură și compoziția solvenților.

Dizolvarea este considerată unul dintre cele mai importante teste de control al calității efectuate pe forme medicamentoase și în prezent se transformă într-un instrument pentru prognozarea biodisponibilității, iar în unele cazuri înlocuiește studiile clinice pentru determinarea bioechivalenței.

Comportamentul de dizolvare a substanțelor medicamentoase are un efect semnificativ asupra activității lor farmacologice. De fapt, a fost demonstrată o relație directă între viteza de dizolvare *in vitro* a multor substanțe medicamentoase și biodisponibilitatea lor, care este

denumită, în general, corelația *vitro-in vivo*.

Formele solide ale medicamentelor după administrarea orală se pot dezintegra sau nu se supun dizolvării/dezintegrării la interacțiunea cu lichidul gastrointestinal, în funcție de designul acestora (Fig. 4.2).

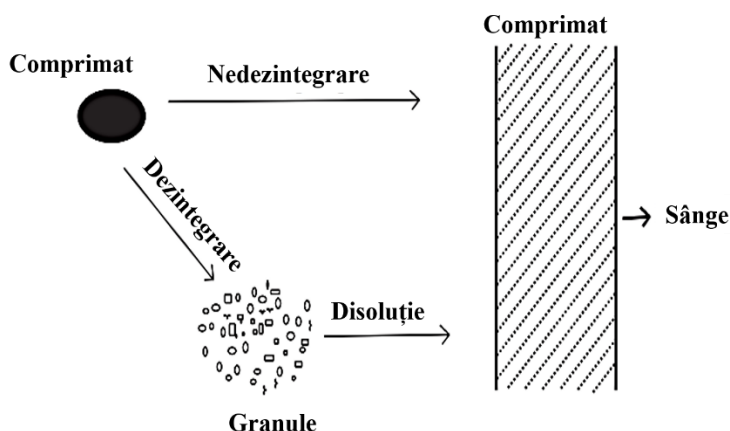


Figura 4.2. Prezentarea schematică a procesului de dizolvare

Cinetica de dizolvare este importantă în determinarea biodisponibilității unei substanțe medicamentoase. Viteza de dizolvare determină viteza de acumulare a anumitor substanțe medicamentoase în fluxul sanguin. S-a stabilit, astfel, că cinetica de dizolvare *in vitro* oferă informații utile despre disponibilitatea substanțelor medicamentoase și efectele lor terapeutice ulterioare *in vivo*. În diferite farmacopei se conțin specificații privind cerințele de dizolvare a diferitor substanțe medicamentoase. O varietate de modele ale aparatelor de dizolvare au fost propuse și testate, variind de la un pahar simplu cu agitator la sisteme complexe cu faze lipide și barieră lipidică, în care se încearcă imitarea mediului biologic.

Alegerea aparatelor ce sunt potrivite pentru utilizare depinde în mare măsură de proprietățile fizico-chimice ale formei farmaceutice. Comprimatele sunt forme farmaceutice solide, obținute prin presarea directă a substanțelor medicamentoase, fie prin granulare umedă sau granulare uscată. Ele pot fi utilizate pentru acțiune locală în tractul

gastrointestinal sau pentru acțiune sistemică. Dacă comprimatele sunt utilizate pentru a exercita acțiune locală, acestea sunt formulate astfel ca să fie puțin solubile în apă, selectând excipienți cu dizolvare lentă și astfel asigură acțiune locală pentru o perioadă lungă de timp, de exemplu: antiacide și adsorbanti. Substanțele medicamentoase care produc acțiune sistemică au o anumită solubilitate în apă și sunt concepute pentru a se dezintegra și a se dizolva rapid, astfel încât substanța activă să poată fi absorbită rapid și să producă acțiune sistemică.

În general, un ingredient farmaceutic activ prezintă o anumită biodisponibilitate în funcție de clasa biofarmaceutică, care se bazează pe solubilitatea în apă și permeabilitatea prin membrana gastro-intestinală. Acești parametri pot fi modificați prin selecția adecvată a excipienților și a procesului tehnologic.

Procesul de dezagregare prezintă o deosebită importanță în asigurarea și optimizarea biodisponibilității substanțelor active din formele farmaceutice solide. Eliberarea substanțelor active din medicamente în soluție model este influențată de diverse variabile: temperatura, compoziția și cantitatea de solvent, intensitatea amestecării, echipamentele utilizate etc., care sunt standardizate pentru obținerea de rezultate reproductibile. Eliberarea substanței active are loc, în principal, prin procesul de difuzie. Pentru toate formele de dozare (forme tari și moi) la baza metodelor de determinare a eliberării substanței active stă principiul dezintegrării (distrugere mecanică, înmuiere, topire etc.) cu difuzia ulterioară a ceea ce se conține în ele într-un mediu de dizolvare. În calitate de mediu de dizolvare este folosită apa, soluția fiziologică, sucii gastrici intestinali sau artificiali.

Mai des, determinarea cineticii de eliberare a SM se efectuează utilizând echipamente convenționale de dezintegrare a formelor farmaceutice și se determină cantitatea de SM, care difuzează într-un anumit volum de lichid (mediu de dizolvare) la intervale de timp stabilite.

Dispozitivele reprezintă recipiente, umplute cu solvent, care sunt termostate la 37 °C, cu diverse agitatoare (dispozitive cu elice, mixere cu trei palete și alte tipuri, cu coș balansoar, cu eprubete fixate pe un disc rotativ). Ca solvent se folosește apă, soluții acide, acid clorhidric, soluții tampon cu diverse valori de pH etc.



Figura 4.3. Aparate pentru testul de dizolvare cu palete (a) și cu coș rotativ (b)

Proba de testare (comprimatul sau capsula) se pune într-un coș uscat, care se coboară în solvent, astfel încât distanța până la fundul vasului să fie de (20 ± 2) mm. După timpul specificat, se ia o probă din soluție, care se filtrează printr-un filtru cu un diametru al porilor de $0,45 \mu\text{m}$. În filtrat se efectuează determinarea cantitativă a substanței active. Pentru fiecare formă de dozare se calculează cantitatea de substanță activă transferată în soluție (în % din doza în comprimat sau capsulă, care este luată ca 100%).

Materiale și reagenți:

Veselă chimică: pahare (500 mL), baloane cotate (10, 50, 100, 200, 1000), pipete gradate (2, 5 și 10 mL), eprubete de 20 mL, pâlnie (20 mL).

Reagenți chimici: paracetamol pur, hidroxid de sodiu, dihidrogenofosfat de potasiu.

Echipamente: aparat de testare a dizolvării, spectrofotometru UV-Vis, balanță analitică, ultratermostat.

Materiale: comprimate de paracetamol, termometru, tub perforat.

Prepararea soluțiilor

1. **Prepararea soluției de dihidrogenofosfat de potasiu 0,2 M:** se cântăresc 27,22 g de dihidrogenofosfat de potasiu și se trec cantitativ într-un balon cotate de 1000 mL, se aduce la cotă cu apă distilată.
2. **Prepararea soluției de hidroxid de sodiu 0,2 M:** se cântăresc 8 g de hidroxid de sodiu și se trec cantitativ într-un balon cotate de 1000 mL, se aduce la cotă cu apă distilată.
3. **Prepararea soluției tampon fosfat cu pH 5,8:** se transferă 50 mL soluție dihidrogenofosfat de potasiu 0,2 M într-un balon cotate de 200 mL și se adaugă 3,6 mL soluție hidroxid de sodiu 0,2 M și apoi se aduce la cotă cu apă distilată.

Curba de etalonare pentru determinarea concentrației paracetamolului

1. **Prepararea soluției standard:** se cântăresc cu precizie de 0,0001 g 100 mg de paracetamol pur și se transferă într-un balon cotate de 100 mL, se aduce până la cotă (**Stoc I**, 1 mg/mL). Se transferă 10 mL soluție **stoc I** într-un alt balon cotate de 100 mL, se aduce până la cotă, astfel se obține soluția **Stoc II** cu concentrația de 100 $\mu\text{g/mL}$.
2. **Prepararea soluției de lucru:** din soluția **stoc II** se introduc 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mL (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 și 2,5 mL) în balonul cotate 10 mL (25 mL) și se aduce volumul până la cotă pentru a obține o concentrație în intervalul 2-10 $\mu\text{g/mL}$.
3. **Măsurarea absorbanței:** se măsoară absorbanta soluțiilor respective la $\lambda = 243 \text{ nm}$, folosind spectrofotometrul UV-VIS. Se construiește graficul dependenței absorbanței soluțiilor de paracetamol față de concentrația paracetamolului, utilizând Microsoft (MS) Excel și se determină panta și intercepta pe ordonată.

Modul de lucru:

1. se fixează tubul perforat cu ajutorul cleștelui;
2. se umple vasul pentru dizolvare cu 360 mL solvent (soluție tampon fosfat pH 5,8);
3. se conectează cablul de alimentare la sursa de alimentare (220 V);
4. se setează parametrii precum timpul, temperatura de testare (37 °C);
5. se monitorizează temperatura mediului din vas prin introducerea termometrului;
6. odată ce temperatura mediului din vas ajunge la 37 °C, se introduce un comprimat de paracetamol în fiecare tub perforat și se pornește cronometrul;
7. se prelevează probe la un interval de timp prestabilit;
8. se filtrează proba, se diluează, dacă este necesar, și se analizează spectrofotometric la $\lambda = 243 \text{ nm}$;
9. din valorile absorbanței obținute pentru probele analizate se determină concentrația ($\mu\text{g/mL}$) și procentul de eliberare a SM;
10. se construiește graficul dependenței procentului de SM dizolvată funcție de timp utilizând Microsoft Excel .

➤ **Setul de parametri pentru trasarea curbei de etalonare:**

1. Intervalul pentru legea Beer-Lambert: 2-10 $\mu\text{g/mL}$;
2. solvent: soluție tampon fosfat pH 5,8;
3. maximul de absorbție pentru paracetamol: $\lambda = 243 \text{ nm}$.

➤ **Setul de parametri pentru procesul de dizolvare:**

1. comprimat: paracetamol;
2. doza substanței active în comprimat: (200 mg) 500 mg;
3. viteza de rotație: 50 rpm;
4. timp de testare: 30 min;
5. mediu de dizolvare: soluție tampon fosfat pH 5,8;
6. volumul mediului de dizolvare: (360 mL) 900 mL.

Tabelul 4.1. Datele pentru curba de etalonare a paracetamolului

Concentrația, $\mu\text{g/mL}$	Absorbanța la $\lambda = 243 \text{ nm}$
2	
4	
6	
8	
10	
Parametrul	Valoarea
Panta	
Intercepta	

Tabelul 4.2. Dizolvarea *in vitro* a paracetamolului

Timpul, min	Procentul de eliberare cumulativă a SM din comprimate (3 încercări)			
	I	II	III	Media
10				
20				
30				

Calcul:

1. Determinarea concentrației substanței medicamentoase dizolvate ($\mu\text{g/mL}$) $y = mx + c$, unde: y - absorbanța, m - panta, x - concentrația SM ($\mu\text{g/mL}$, c - intercepta pe ordonată.

2. Cantitatea de substanță medicamentoasă eliberată (mg)

Cantitatea de substanță medicamentoasă eliberată = [Concentrația ($\mu\text{g/mL}$) \cdot (volumul mediului de dizolvare) \cdot (factorul de diluție)]/1000

3. Factorul de diluție

Factorul de diluție - volumul probei diluate (mL)/volumul de probă prelevat (mL)

4. Procentul de eliberare cumulativă a substanței medicamentoase

Procentul de eliberare cumulativă a substanței medicamentoase = (cantitatea de SM eliberată) \cdot 100/cantitatea substanței active în

comprimat.

Rezultate

Din datele obținute s-a constatat că _____ % din substanța medicamentoasă au fost eliberate în 30 minute.

Deduceți concluziile

Sarcini pentru evaluare și autoevaluare

1. Comparați și evaluați diferența dintre aparatele de dizolvare de tip I și de tip II.
2. Descrieți părțile principale și principiul de funcționare a aparatului de dizolvare de tip I.
3. Determinați parametrii ce influențează eliberarea în soluție a substanțelor active din medicamente.
4. Explicați ce se utilizează în calitate de mediu de dizolvare pentru eliberarea SM.

Exercițiu

Efectuați studii de dizolvare a unui comprimat fără strat enteric al oricărui medicament slab bazic.

Lucrarea de laborator Nr. 5.

Dizolvarea *in vitro* a comprimatelor cu eliberare prelungită

Scopul lucrării: studierea dizolvării *in vitro* a medicamentelor cu eliberare prelungită.

Obiective

Studierea dizolvării unui comprimat de diclofenac sodic cu eliberare prelungită.

Generalități

Scopul principal în formularea acestor comprimate este eliberarea lentă a substanței medicamentoase pe o durată lungă după administrarea unui singur comprimat.

Utilizarea pe scară largă a acestui tip de comprimat este în principal determinată de îmbunătățirea confortului pacientului. Pe

măsură ce frecvența de utilizare a dozelor este redusă, pacientul poate avea un somn liniștit pe timp de noapte. De asemenea, este benefic pentru pacienții cu boli psihiatrice, care uită să-și ia în mod regulat comprimatele, iar efectele secundare și toxicitatea dozei sunt reduse. Orice adjuvant care poate modifica viteza de absorbție a apei, caracteristicile de umflare și gelifiere a agenților din matrice, poate modifica viteza de eliberare a SM, de exemplu, electroliții în comprimatul cu matrice de hidroxipropilmetilceluloză (HPMC). Substanțele medicamentoase slab bazice prezintă o solubilitate bună la pH scăzut, în timp ce substanțele medicamentoase mai puțin solubile se solubilizează mai eficient în condiții de pH ridicat, ceea ce poate duce la eliberarea incompletă a SM pentru formulările cu eliberare susținută. Eliberarea substanței medicamentoase poate fi modificată prin stabilirea unui pH corespunzător pentru micro-mediul din comprimat (de exemplu, polimer acid, acid succinic etc). În mod similar, includerea polimerilor alcalini conduce la eliberarea dorită a substanței active din medicamentele acide. Abordările clasice se bazează, de obicei, pe adaptarea fie a tehnologiilor prin acoperire cu filme, fie a celor multe particulare, sau a celor care implică matrice cu eliberare lentă, care sunt discutate mai jos:

Forme farmaceutice cu eliberare modificată

Clasificarea formelor farmaceutice cu diferite moduri de cedare a SM:

1. rapidă (fast release);
2. prelungită (prolonged release);
3. susținută (sustained release);
4. repetată (repeat release);
5. întârziată (delayed release);
6. controlată (controlled release).

Formele farmaceutice cu cedare rapidă, în mod obișnuit, sunt comprimate cu dezagregare și dizolvare rapidă (până la 1 minut) în cavitatea bucală (comprimate cu dizolvare/dezintegrare rapidă, sau comprimate orodispersabile).

Sunt caracterizate prin biodisponibilitate sporită, micșorează efectul primului pasaj hepatic datorită absorbției preponderente în regiunea pre-gastrică și sunt accesibile pentru administrare la pacienții din pediatrie, geriatrie și psihiatrie.

Formele farmaceutice cu cedare prelungită eliberează treptat doza de substanță activă în cantitate necesară, pentru realizarea unor concentrații terapeutice pe o perioadă cât mai îndelungată de timp.

Formele farmaceutice cu cedare susținută conțin o doză terapeutică de substanță activă, care este eliberată imediat și o doză cedată progresiv pe o perioadă lungă de timp. Deseori această doză este cedată cu o viteză caracteristică a unui proces de ordinul *zero*, care nu depinde de cantitatea de substanță în forma farmaceutică. În alte cazuri, cedarea substanței poate fi transformată dintr-un proces de ordinul zero în proces de cedare de ordinul unu, care în continuare va depinde de cantitatea de substanță aflată în forma farmaceutică.

Formele farmaceutice cu cedare repetată sunt o alternativă a formelor cu cedare susținută, care conțin multiple doze de substanță activă și sunt eliberate eșalonat în timp pe tot parcursul TGI.

Formele farmaceutice cu cedare întârziată conțin două fracțiuni ale dozei unitare - una cu dizolvare rapidă în stomac și alta cu acoperire gastrorezistentă, enterosolubilă, cu cedare și absorbție în intestin, sau o doză unitară cu cedare pulsatilă, localizată în colon.

Formele farmaceutice cu cedare controlată prevăd o eliberare a substanței active din forma farmaceutică cu o viteză controlată în unitate de timp, realizând astfel o concentrație terapeutică stabilă pe o durată de timp bine definită.

1. Tehnologii de acoperire

În aceste tehnologii se combină acoperirile semipermeabile și nucleele osmotice ale comprimatelor pentru a dezvolta tehnologia „eliberare de ordinul zero”. Atenția se concentrează, de asemenea, asupra asigurării eliberării substanței medicamentoase în momentul critic de timp, de exemplu, pentru a obține eliberarea substanței

medicamentoase cu 1-2 h înainte ca pacientul să se trezească. Există tehnologii numite „*Ringcap*”, care reprezintă un comprimat, de preferință filmat, acoperit parțial cu o serie de inele a căror grosime permite de a controla viteza la care substanța medicamentoasă este eliberată din forma dozată finală.

2. Tehnologia *matrix*

În mod clasic, produsele cu matrice prezintă caracteristici de eliberare a substanței medicamentoase după ordinul I. Pentru a obține caracteristici de eliberare de ordinul zero, este necesar să se utilizeze materiale sau strategii special concepute, care urmăresc să manipuleze structura sau geometria comprimatului. Combinarea tehnologiei convenționale cu matricea superioară și inferioară ajută la moderarea eliberării substanței medicamentoase prin creșterea suprafeței cu reducerea concomitentă a concentrației substanței medicamentoase în interior. Eliberarea substanței medicamentoase poate urma diferite mecanisme.

3. Difuzia limitează viteza de eliberare a SM

Difuzia este un proces în care mișcarea moleculelor de SM are loc, datorită unei concentrații ridicate în comprimat, spre o concentrație mai scăzută în fluidele intestinale, gastrointestinale. Această mișcare depinde de suprafața expusă la fluidul gastric, calea de difuzie, gradientul concentrației substanței medicamentoase și de coeficientul de difuzie al sistemului. În practică, putem urma oricare dintre cele două metode:

1. substanța medicamentoasă este formulată într-o matrice insolubilă; fluidul gastric pătrunde în forma farmaceutică, dizolvă substanța medicamentoasă și o eliberează prin difuzie;
2. particulele de substanța medicamentoasă sunt acoperite cu polimer de grosime definită astfel, încât o parte de substanța medicamentoasă să difuzeze încet prin polimer pentru a menține nivelul constant al substanței medicamentoasă în sânge.

4. Procesul de dizolvare limitează viteza

Substanțele medicamentoase cu solubilitate scăzută în apă

după natura lor sunt forme cu eliberare susținută. În timp ce pentru substanțele medicamentoase solubile în apă este posibil să se încorporeze un purtător insolubil în apă pentru a reduce dizolvarea particulelor de SM. În acest caz comprimatele sunt acoperite cu diferite materiale (de ex., polietilenglicol). Se poate omite utilizarea agentului de dezintegrare pentru a promova eliberarea întârziată.

5. Presiunea osmotică limitează viteza

Osmoza este un fenomen în care trecerea fluxului de lichid are loc de la o concentrație mai mică la o concentrație mai mare printr-o membrană semipermeabilă, care permite numai transferul de lichid. Substanța medicamentoasă este acoperită cu o membrană semipermeabilă, cu o gaură la capătul comprimatului, realizată de un fascicul laser. Fluidul gastric pătrunde prin membrană, solubilizează substanța medicamentoasă și mărește presiunea internă, care pompează soluția de substanță medicamentoasă și o eliberează în mediul gastric. Viteza de livrare este constantă, cu condiția ca excesul de SM să fie prezent în interiorul comprimatului. Dar, scade la zero odată ce concentrația scade sub saturație.

6. Eliberarea SM este controlată de schimbul de ioni

Rășinile schimbătoare de ioni sunt materiale insolubile în apă ce conțin grupări anionice sau cationice care formează săruri. În timpul fabricării soluția SM este amestecată cu rășină și uscată pentru a forma comprimate perlate. Eliberarea substanței medicamentoase depinde de concentrația ridicată de ioni încărcăți în tractul gastrointestinal, unde moleculele de SM sunt schimbate și difuzate din rășină în fluidul din jur. Acest mecanism se bazează pe mediul ionic al rășinii și nu pe o enzimă la locul de absorbție.

Comprimate cu acțiune întârziată

Comprimatul cu acoperire enterică este un exemplu de comprimat cu acțiune întârziată. Această formulare este preferată atunci când:

1. SM irită mucoasa gastrică (de exemplu, aspirină sau electroliții puternici).
2. SM care produc greață și vomă.

3. SM este sensibilă la nivelul scăzut de pH (de exemplu, eritromicina).
4. Când este necesar să se elibereze substanța medicamentoasă nediluată (de exemplu, agenți antibacterieni intestinali, antiseptici etc).

Capsulele cu acoperire enterică sunt realizate prin adăugarea de materiale polimerice medicinale speciale în învelișul capsulei sau prin tratament special, astfel încât să fie insolubile în sucul gastric, doar să se dezintegreze și să se dizolve în sucul intestinal. Capsula nu va fi dizolvată în mediul acid din stomac și nici măcar în apa clocotită. Ea trebuie să se întâlnească cu lichidul alcalin din intestine pentru a se dizolva. Dacă capsula acoperită enteric este dizolvată în stomac, aceasta poate provoca leziuni ale stomacului.

Agenții de acoperire utilizați în mod obișnuit sunt: acetat ftalat de celuloză, ftalat de hidroxietilpropil, ftalat de acetat de polivinil, Eudragit® etc. Această formă de dozare este destinată să se hidrateze și să se dizolve în duoden (pH de la 4 la 6) sau în intestinul subțire, unde pH-ul crește de la 7 până la 8. Prezența esterazelor sau sărurilor biliare ca agenți activi de suprafață joacă un rol important în eliberarea substanței medicamentoase.

Materiale și reagenți:

Veselă chimică: vas de dizolvare (900 mL), baloane cotate (1000, 100, 25 mL), pipete gradate (2, 5, 10 mL), eprubete (20 mL), pâlnie.

Reagenți chimici: clorură de sodiu, hidroxid de sodiu, acid clorhidric, dihidrogenofosfat de potasiu (KH_2PO_4), diclofenac de sodiu, metanol.

Echipamente: aparat pentru dizolvare, balanță analitică, spectrofotometru UV-VIS, ultratermostat.

Prepararea soluțiilor

1. **Soluție tampon de pH 1,2:** se dizolvă 2 g de clorură de sodiu și 7 mL de HCl concentrat în cantitate suficientă de apă pentru a obține 1000 mL.

- 2. Prepararea soluției tampon fosfat cu pH 6,8:** se introduc 50 mL de soluție dihidrogenofosfat de potasiu de 0,2 M în balon cotate de 200 mL, se adaugă 22,4 mL de hidroxid de sodiu 0,2 M și se completează volumul cu apă distilată.

A. Pregătirea soluțiilor pentru construirea curbei de etalonare

Pregătirea soluției standard: se transferă 100 mg de diclofenac sodic în balon cotate de 100 mL. Se adaugă 30 mL de metanol pentru dizolvarea substanței medicamentoase. Se aduce volumul până la 100 mL (stoc I). Se extrag 10 mL de soluție stoc I și se transferă în alt balon cotate de 100 mL și se aduce volumul până la 100 mL cu metanol (stoc II).

- 1. Prepararea soluțiilor de lucru:** din stocul II se introduc 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 și 3,5 mL în șapte flacoane volumetrice de 25 mL și se ajustează volumul cu soluția tampon (tampon acid (pH 1,2) sau tampon fosfat (pH 6,8)) pentru a obține o concentrație în intervalul de la 2 până la 14 $\mu\text{g/mL}$.
- 2. Determinarea absorbanței:** se măsoară absorbanta respectivelor soluții la $\lambda = 276 \text{ nm}$, utilizând spectrofotometrul UV-VIS. Se trasează graficul dependenței absorbanței soluțiilor de diclofenacul sodic în funcție de concentrație, utilizând MS Excel și se determină panta și intercepta.

B. Modul de lucru

Se scoate unul din vasele de dizolvare și se umple rezervorul acrilic cu apă distilată până la marcajul de nivel. Se plasează vasul de dizolvare înapoi.

1. Se umple vasul de dizolvare cu solvent (soluție tampon acidă) până la valoarea de 900 mL.
2. Se conectează cablul de alimentare la rețeaua de alimentare (220 V). Se instalează comutatorul de rețea, comutatorul încălzitorului și comutatorul motorului.
3. Se coboară jos platforma și se instalează capacul pe fiecare vas.
4. Se setează parametrii, cum ar fi temperatura, numărul de

rotații, timpul de încercare.

5. Odată ce temperatura vaselor ajunge la 37 °C, se introduc trei comprimate de diclofenac sodic (cu doza de 75 mg) în 3 recipiente și se începe dizolvarea (o comprimată într-un recipient).
6. Se extrag 2 mL de eșantion la intervale prestabilite de timp, se filtrează, se diluează și se analizează prin metoda spectroscopică la $\lambda = 276$ nm. Se înlocuiește această cantitate cu mediu de dizolvare proaspăt.
7. După 2 ore, se înlocuiește mediul de dizolvare cu tampon fosfat și se continuă dizolvarea încă timp de 10 ore.
8. Din curba de etalonare se determină concentrația substanței medicamentoase ($\mu\text{g/mL}$) și se calculează apoi procentul de eliberare a SM.

C. Parametrii stabiliți pentru construirea curbei de etalonare

- 1) Diapazonul legii Lambert-Beer: 2-14 $\mu\text{g/mL}$.
- 2) Solvent: tampon acid, pH 1,2 /tampon fosfat, pH 6,8.
- 3) λ max pentru diclofenac: 276 nm.

D. Parametrii stabiliți pentru procesul de dizolvare

1. Comprimat: diclofenac sodic.
2. Doza SM în comprimat: 75 mg.
3. Aparat de dizolvare de Type I.
4. Viteza de rotație: 50 rpm.
5. Timp de încercare: 12 ore.
6. Mediu de dizolvare: tampon acid (pH 1,2)/tampon fosfat (pH 6,8).
7. Volumul mediului de dizolvare: 900 mL.

Tabelul 5.1. Datele pentru curba de etalonare a diclofenacului de sodiu (soluție tampon acidă)

Concentrații, $\mu\text{g/mL}$	Absorbanța, $\lambda = 276$ nm
2	
4	
6	

Biofarmacia și farmacocinetica

8	
10	
12	
14	
Parametrul	Valoarea
Panta	
Intercepta	
Coeficient de corelație	

Tabelul 5.2. Datele pentru curba de etalonare a diclofenacului de sodiu (soluție tampon fosfată)

Concentrații, $\mu\text{g/mL}$	Absorbanța, $\lambda = 276 \text{ nm}$
2	
4	
6	
8	
10	
12	
14	
Parametrul	Valoarea
Panta	
Intercept	
Coeficient de corelație	

Tabelul 5.3. Profilul eliberării diclofenacului sodic din comprimat

Timp, ore	Procentul de eliberare a SM				CDR %
	1	2	3	Media	
	Soluție tampon acidă				
0,5					
1					
1,5					
2					
	Soluție tampon fosfat				

Biofarmacia și farmacocinetica

3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					

% CDR - Procentul de eliberare cumulativă a SM

Calculare

1. Determinarea concentrației de diclofenac sodic ($\mu\text{g/mL}$)

$$y = mx + c$$

unde: y - absorbția, m - panta, x - concentrația ($\mu\text{g/mL}$), c - intercepta.

2. Cantitatea de substanță medicamentoasă eliberată (mg)

Cantitatea de substanță medicamentoasă eliberată = [concentrația ($\mu\text{g/mL}$) \cdot (volumul mediului de dizolvare) \cdot (factor de diluție)]/1000

3. Factor de diluare

Factorul de diluare = volumul probei diluate (mL)/volumul eșantionului eliminat (mL)

4. Procentul de eliberare cumulativă a substanței medicamentoase

Procentul eliberării cumulative a substanței medicamentoase = Cantitatea de substanță medicamentoasă eliberată \cdot 100 /doza SM din comprimat.

Rezultate

Eliberarea *in vitro* a substanței medicamentoase din comprimatul de diclofenac de sodiu cu eliberare prelungită a fost egală cu _____% la _____ ore.

Deduceți concluzii

Aplicații

- a. Se poate studia dizolvarea *in vitro* a comprimatelor cu eliberare prelungită.
- b. Forma de dozare cu eliberare prelungită reduce frecvența dozajului de primire a preparatului, îmbunătățind astfel respectarea regimului de tratament al pacientului.
- c. Se poate studia comportamentul comprimatelor în fluide cu diferite pH-uri.

Sarcini de evaluare și autoevaluare

1. Descrieți ce reprezintă capsulele cu acoperire enterică și cu ce scop se folosesc.
2. Explicați cum are loc eliberarea SM din formele farmaceutice cu eliberare prelungită și susținută.
3. Descrieți agenții utilizați pentru obținerea capsulelor cu acoperire enterică.
4. Explicați în ce mod este calculată concentrația și procentul de eliberare a DFC din comprimat în funcție de timp.
5. Explicați procedeele de obținere a comprimatelor cu eliberare modificată.

Lucrarea de laborator Nr. 6.

Efectul pH-ului asupra comportamentului de dizolvare a substanțelor medicamentoase

Scopul lucrării: studiul efectului pH-ului asupra comportamentului de dizolvare a comprimatelor diclofenacului sodic cu acoperire enterică (disponibile comercial).

Obiective

1. Studiul efectului pH-ului asupra dizolvării unui medicament.
2. Formarea abilităților de utilizare a legii rădăcinii cubului Hixon și Crowell pentru determinarea constantei vitezei de dizolvare.

3. Compararea dizolvării diclofenacului sodic la diferit pH.
4. Evaluarea procesului de dizolvare a diferitor mărci comerciale de diclofenac sodic la același pH.

Generalități

Formele de dozare acoperite enteric (cu o barieră polimerică aplicată pe medicația orală, care împiedică dizolvarea sau dezintegrarea acestuia în mediul sucului gastric) se dizolvă și își eliberează conținutul la pătrunderea în intestinul subțire. Factorii responsabili pentru acest lucru includ diferența de pH a fluidelor gastrice și intestinale. În cazul în care acoperirile enterice sunt funcțional acide, atunci ele rămân intacte în mediul gastric cu pH scăzut (pH 1-4). Aceste filme enterice se ionizează și astfel se dezintegrează în fluidele intestinale, unde pH-ul poate varia de la 5 în duoden la aproximativ 7,4 mai jos în tractul intestinal. Alți factori responsabili pentru pierderea integrității filmului includ hidratarea și prezența esterazei în lichidul intestinal, care sunt responsabili de scindarea legăturii esterice prezente în unele tipuri de filme enterice.

Cinetica dizolvării poate fi influențată la fel de caracteristicile fizico-chimice ale substanței medicamentoase și de factorii de formulare. În acest caz, cei mai probabili parametri pot fi tipul de materiale utilizate pentru acoperire, grosimea materialului de acoperire, cantitatea de plastifiant utilizat și vechimea filmului de acoperire.

Pentru a facilita comparațiile formelor farmaceutice testate, constantele vitezei de dizolvare pentru fiecare marcă comercială la diferite pH-uri pot fi calculate utilizând legea rădăcinii cubice Hixon și Crowell. Ecuația Hixon și Crowell ia în considerare schimbarea suprafeței moleculei ce se dizolvă. Forma matematică a legii rădăcinii cubice Hixon și Crowell este dată după cum urmează:

$$[W_0]^{1/3} - [W]^{1/3} = k \cdot t \quad (6.1)$$

unde: W_0 - cantitatea inițială de substanță medicamentoasă, în grame, W - cantitatea de substanță medicamentoasă rămasă pentru dizolvare, k - rădăcina cubică a constantei vitezei de dizolvare.

Pentru calcularea „k”, procentul de diclofenac sodic dizolvat este scăzut din 100% pentru a obține procentul de substanță medicamentoasă care rămâne nedizolvată. Procentul de diclofenac sodic nedizolvat este apoi convertit în grame (W) și utilizat pentru a calcula „k” utilizând ecuația (6.2):

$$1 - [W]^{1/3} = k \cdot t \quad (6.2)$$

În baza constantelor vitezei de dizolvare a diferitor mărci comerciale de SM se poate constata că marca cu cea mai mică constantă a vitezei de dizolvare are cea mai scăzută biodisponibilitate.

Principiul metodei

Pe măsură ce pH-ul din tractul gastrointestinal crește, stratul enteric se dizolvă, iar viteza de dizolvare a diclofenacului crește. Eliberarea substanței medicamentoase din comprimatele acoperite enteric este foarte dependentă de pH-ul soluției tampon.

La un anumit pH, diferența vitezelor de dizolvare între diferite mărci comerciale de SM se poate datora utilizării diferitor materiale de acoperire de la diferiți producători. Materialele de acoperire enterică utilizate în mod obișnuit sunt: derivați ai acetatului de celuloză, cum ar fi ftalatul acetatului de celuloză, hidroxipropilmetilceluloza și cele două tipuri de ftalat de hidroxipropilmetilceluloză (HP-50 și HP-55), polimeri polimetacrilati (Eudragit L și Eudragit S, care sunt copolimeri anionici formați din acid metacrilic și acrilat de etil și sunt ionizați la $\text{pH} > 5,5$), polivinil acetofthalat (PVAP). Toate acoperirile enterice utilizate în prezent posedă grupe acide ionizabile, de obicei carboxilice. Echilibrul dintre polimerul insolubil neionizat și polimerul solubil ionizat va fi determinat de pH-ul mediului și de pKa a polimerului.

Pe măsură ce pH-ul mediului de dizolvare crește, materialele de acoperire se ionizează, încep să se dezintegreze și să se dizolve, ceea ce determină eliberarea substanței medicamentoase. La pH mai mic polimerul rămâne intact și integritatea filmului este menținută. pKa a filmului enteric și natura polimerului sunt doi factori cei mai importanți care determină variații în comportamentul de dizolvare al

polimerului filmului. Materialele de acoperire enterică, în ceea ce privește rezistența lor la mediile de dizolvare în sucul gastric, sunt după cum urmează: PAC> PVAP> HP55> HP50.

Numeroși alți factori pot influența comportamentul de eliberare a substanței medicamentoase. Acești factori includ grosimea filmului, plastifiantii adăugați la materialul de acoperire și cantitatea utilizată de solvent.

Materiale și reagenți

Veselă chimică: 2 vase pentru dizolvarea SM (balon cu fundul rotund de 700 mL), pâlnie, pipete gradate (2, 5, 10 mL), baloane cotate de 25 și 100 mL, cilindru Nessler (50 mL).

Reagenți chimici: diclofenac de sodiu pur, alcool etilic, apă distilată, acid citric, hidrogenofosfat de sodiu (Na_2HPO_4),

Materiale: două mărci comerciale de comprimate perorale entersolubile (gastrorezistente) de diclofenac sodic cu compoziția filmului diferită (doza SM de 50 mg).

Echipamente: aparat de testare a dizolvării, spectrofotometru UV-VIS, agitator magnetic, stativ, termometru, ultratermostat, balanță analitică.

Tester de dizolvare /Tester de dezintegrare

Diferite modelele de testere au specificații tehnice diferite, dar toate îndeplinesc aceleași funcții.



Figura 6.1. Modele ale testerelor de dizolvare

Mod de lucru

1. **Trasarea curbelor de etalonare pentru diclofenac sodic:** se fac diluții ale soluțiilor standard de diclofenac sodic pur în soluții tampon citrat-fosfat pH 3,0; 4,0; 6,0; 7,0 în intervalul 1-10 $\mu\text{g/mL}$ și se notează absorbanta lor la $\lambda = 276 \text{ nm}$, iar în baza rezultatelor se trasează curbele de etalonare la diferit pH.
2. **Pregătirea soluțiilor standard:**
 - **prepararea soluției standard (stoc I):** se transferă 100 mg de diclofenac sodic în balon cotat de 100 mL, se adaugă 30 mL de alcool etilic și se aduce la cotă cu apă distilată;
 - **prepararea soluției standard (stoc II):** se extrag 10 mL de soluție (stoc I) și se transferă în alt balon cotat de 100 mL, unde se aduce la cotă cu soluția tampon citrat-fosfat corespunzătoare.
3. **Prepararea soluțiilor de lucru:** din stocul II se transferă a câte 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL; 2,5 mL în cinci baloane cotate de 25 mL și se ajustează volumul la 25 mL cu soluția tampon citrat-fosfat pentru a obține o concentrație în intervalul de la 2 până la 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$.
4. Se pregătesc în mod similar diluțiile de diclofenac sodic în tampon citrat-fosfat pentru toate pH-urile menționate, se măsoară absorbanta la 276 nm și se trasează curbele de etalonare la pH-uri diferite.
5. Se introduc 500 mL de solvent în balonul cu fundul rotund.
6. Se menține temperatura mediului de dizolvare la 37 °C și viteza de rotație la 50 rpm.
7. Se introduc trei comprimate de marcă **A** și trei comprimate de marcă **B** în diferite vase de dizolvare.
8. Se extrag probe de 10 mL din vasul pentru dizolvare la intervale de timp prestabilite (0, 15, 30, 60, 90 și 120 min) și se adaugă același volum de mediu proaspăt de dizolvare pentru a menține condițiile de scufundare a SM.
9. Se analizează spectrofotometric probele la $\lambda = 276 \text{ nm}$ și se

Biofarmacia și farmacocinetica

determină procentul de eliberare cumulativă a diclofenacului sodic utilizând curba de etalonare.

10. Se repetă experimentul în medii intestinale simulate (tampon fosfat mixt) la pH 3,0; 4,0; 6,0; 7,0 timp de 120 de minute.
11. Se prepară soluții de acid citric și hidrogenofosfat de sodiu: pentru acid citric cu C de 0,1 M, ($M=192,12$ g/mol) se cântăresc 19,21 g la 1L; $C(\text{Na}_2\text{HPO}_4)$ de 0,2 M, ($M=141,98$ g/mol) se cântăresc 28,40 g la 1L; $C(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ de 0,2M, ($M=178,05$ g/mol) se cântăresc 35,61 g la 1L. Pentru a prepara soluțiile tampon cu diferite pH-uri se utilizează datele din tabelul 6.1.

Tabelul 6.1. Prepararea a 100 mL soluție tampon citrat-fosfat cu diferite pH-uri (de la 2,6 până la 7,0)

pH	x mL 0,1 M acid citric	y mL 0,2 M Na_2HPO_4
2,6	89,10	10,90
2,8	84,15	15,85
3,0	79,45	20,55
3,2	75,30	24,70
3,4	71,50	28,50
3,6	67,80	32,20
3,8	64,50	35,50
4,0	61,45	38,55
4,2	58,60	41,40
4,4	55,90	44,10
4,6	53,25	46,75
4,8	50,70	49,30
5,0	48,50	51,50
5,2	46,40	53,60
6,0	36,85	63,15
6,2	33,90	66,10
6,4	30,75	69,25
6,6	27,25	72,75
6,8	22,75	77,25
7,0	17,65	82,35

12. Se determină constantele vitezei de dizolvare pentru fiecare marcă comercială la pH-uri diferite utilizând legea rădăcinii cubice Hixon și Crowell. Se trasează graficul dependenței $[W_0]^{1/3} - [W_t]^{1/3}$ în funcție de timpul t . Panta liniei este egală cu constanta vitezei de dizolvare.
13. Se construiește graficul dependenței constantei vitezei de dizolvare a SM funcție de pH-ul mediului de dizolvare.
14. Se determină efectul pH-ului mediului de dizolvare asupra constantei vitezei de dizolvare.

A. Parametrii setați pentru reprezentarea curbei de etalonare

1. Diapazonul pentru legea Beer-Lambert: 1-10 $\mu\text{g/mL}$.
2. Solvent: tampon citrat-fosfat (pH 3,0; 4,0; 4,5; 5,0;5,5; 6,0; 6,5; 7,0).
3. Maximul de absorbție pentru diclofenacul de sodiu: $\lambda = 276 \text{ nm}$.

B. Parametrii stabiliți pentru dizolvare

1. Comprimat: diclofenac sodic.
2. Doza de substanță activă a comprimatului: 50/75/100 mg.
4. Viteza de rotație: 50 rpm.
5. Timp de testare: 120 min.
6. Mediu de dizolvare: soluție tampon citrat- fosfat (pH 3,0; 4,0; 4,5; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0).
7. Volumul mediului de dizolvare: 500 mL.

Tabelul 6.2. Datele pentru curba de etalonare a diclofenacului de sodiu

pH (soluție tampon fosfat)	Pantă	Intercepta
pH 3,0		
pH 4,0		
pH 6,0		
pH 7,0		

Tabelul 6.3. Procentul de eliberare cumulativă pentru substanța medicamentoasă a mărcii comerciale A

Timp, min	pH 3,0	pH 4,0	pH 6,0	pH 7,0
15				
30				
60				
90				
120				

Tabelul 6.4. Procentul de eliberare cumulativă pentru substanța medicamentoasă a mărcii comerciale B

Timp, min	pH 3,0	pH 4,0	pH 6,0	pH 7,0
15				
30				
60				
90				
120				

Calculare

1. Determinarea concentrației substanței medicamentoase dizolvate ($\mu\text{g/mL}$)

Se trasează graficul absorbantei funcție de concentrația DCF și se determină panta și intercepta.

$$y = mx + c$$

unde: y - absorbantă, m - pantă, x - concentrație ($\mu\text{g/mL}$), c - intercepta

2. Cantitatea de substanță medicamentoasă eliberată (mg)

Cantitatea de substanță medicamentoasă eliberată = [concentrația ($\mu\text{g/mL}$) \cdot (volumul mediului de dizolvare) \cdot (factor de diluție)]/1000

3. Factorul de diluare

Factorul de diluție = volumul probei diluate (mL)/volumul probei prelevate (mL)

4. Procentul de eliberare cumulativă a substanței

medicamentoase Procentul de eliberare cumulativă de SM = (cantitatea de substanță medicamentoasă eliberată) · 100 /doza din comprimat.

5. Determinarea constantei vitezei de dizolvare

$$[W_0]^{1/3} - [W_t]^{1/3} = k \cdot t$$

unde: W_0 - cantitatea inițială de SM, în grame,

W_t - cantitatea de SM eliberată la **momentul t**, în grame.

Se construiește graficul dependenței $[W_0]^{1/3} - [W_t]^{1/3}$ **în funcție de timp**, și se calculează panta liniei ca constantă a vitezei de dizolvare.

Rezultate

1. Dizolvarea SM din mărcă comercială A variază de la ____ % la ____ % pe măsură ce pH-ul crește de la 3,0 la 7,0.
2. Dizolvarea SM din mărcă comercială B variază de la ____ % la ____ % pe măsură ce pH-ul crește de la 3,0 la 7,0.
3. Constanta vitezei de dizolvare a mărcii A este **scăzută/ridicată** în comparație cu marca B la pH=7,0. Prin urmare, marca A este dizolvată **mai mult/ mai puțin** în timpul dat.

Deduceți concluzii

Se poate concluziona că stratul enteric este puternic influențat de modificările pH-ului mediului de dizolvare.

Pe măsură ce pH-ul mediului de dizolvare crește, dizolvarea devine rapidă și pe măsură ce pH-ul scade, dizolvarea devine lentă.

De asemenea, se poate concluziona că variația comportamentului de dizolvare a mărcilor comerciale testate se poate datora oricăruia dintre astfel de factori, cum ar fi materialul utilizat pentru acoperire, grosimea peliculei, solventul utilizat etc.

Aplicații

1. Comparația diferitor mărci comerciale de diclofenac sodic în ceea ce privește biodisponibilitatea.
2. Studiarea influenței pH-ului mediului de dizolvare asupra diversilor parametri, cum ar fi materialul de acoperire, grosimea filmului, plastifianți sau solvenți utilizați în

acoperirea comprimatelor.

3. Studiarea eliberării substanței medicamentoase din comprimatele acoperite enteric pe tot parcursul tractului gastrointestinal.
4. Estimarea constantei vitezei de dizolvare.

Sarcini pentru evaluare și autoevaluare

1. Explicați care este necesitatea pentru acoperirea enterică a diclofenacului sodic.
2. Enumerați unele substanțe medicamentoase care necesită acoperire enterică.
3. Determinați factorii ce influențează procesul de ionizare și dizolvare a materialelor de acoperire la comprimatele enterice.
4. Explicați prin ce metodă se determină concentrația diclofenacului de sodiu în lucrare.

Exerciții

În mod similar, studiați efectul pH-ului asupra comportamentului de dizolvare a produselor disponibile comercial (de exemplu, comprimat de domperidonă).

1. Analizați comportamentul de dizolvare a produselor pentru mediul cu HCl 0,1 N și soluție tampon fosfat cu pH de 6,8.
2. Corelați pH-ul mediului și viteza de dizolvare a domperidonei.

Lucrarea de laborator Nr. 7.

Determinarea vitezei de eliberare a substanțelor active din supozitoare și a timpului de deformare completă a acestora

Scopul lucrării: evaluarea calității supozitoarelor în conformitate cu viteza de eliberare a substanțelor medicamentoase din aceste forme farmaceutice.

Obiective

Studierea procesului de eliberare a substanțelor active din supozitoare și determinarea timpului de deformare completă a acestora.

Tehnologia farmaceutică modernă oferă următoarele teste pentru a evalua calitatea supozitoarelor:

- viteza de eliberare a substanțelor medicamentoase din forma de dozare;
- viteza de dizolvare a substanțelor medicamentoase din forma de dozare. Primele două teste se referă la disponibilitatea farmaceutică sau metoda de determinare a biodisponibilității „in vitro”;
- studiul absorbției substanțelor medicamentoase *in vivo* (disponibilitatea biologică).

Metodele biofarmaceutice de evaluare a calității medicamentelor nu exclud metodele și standardele de calitate pentru supozitoare conform FR (aspect, culoare, miros, formă, greutate medie, timpul de deformare completă a supozitoarelor, conținutul cantitativ al substanței medicamentoase etc.). Eficacitatea terapeutică a supozitoarelor depinde nu doar de conținutul de substanțe active din ele, ci și de disponibilitatea biologică și farmaceutică. Principalii factori farmaceutici care afectează disponibilitatea supozitoarelor sunt:

- proprietățile fizico-chimice ale substanțelor medicamentoase și starea lor fizică;

- gradul de dispersie a substanțelor medicamentoase introduse în bazele supozitoarelor;
- sortimentul și cantitatea bazelor din supozitoare;
- metoda de introducere a substanțelor medicamentoase în bază;
- metoda de obținere a supozitoarelor etc.

Modificarea vitezei și gradului de eliberare a substanțelor active din supozitoare și, prin urmare, activitatea lor terapeutică, poate avea loc la orice etapă a procesului tehnologic ce includ diverse operațiuni tehnologice.

Biodisponibilitatea farmaceutică și biologică sunt determinate prin următoarele metode:

1. **„in vitro”** sau disponibilitatea farmaceutică – după viteza și eliberarea completă a substanței medicamentoase din forma de dozare;;
2. **„in vivo”** – după conținutul cantitativ al substanței medicinale din biofluidele organismului la diferite intervale de timp după administrarea supozitoarelor. Asupra cineticii eliberării sulfatului de streptomycină influențează agenții tensioactivi introduși în baza supozitoarelor. Tween 80, introdus în untul de cacao, creează timp de patru ore concentrații terapeutice de antibiotic în sânge și îi asigură acțiunea anti-tuberculoză.

Pe calea rectală de administrare, unele dintre substanțele medicamentoase pătrund în fluxul sanguin, ocolind ficatul și nu sunt expuse acțiunii chimice a enzimelor, precum și a sucului gastric, bilei și sucului pancreatic. Puterea efectului medicamentului este mai mare, deoarece absorbția se observă după 7 minute, comparativ cu cazul administrării orale (după 30 min).

În ciuda faptului că studiul „in vivo” oferă o informație mai completă a absorbției substanțelor medicamentoase din supozitoare, acestea nu pot fi utilizate pentru evaluarea în masă a calității lor din cauza unui experiment dificil. Biodisponibilitatea caracterizează adecvarea terapeutică a substanțelor medicamentoase. Concentrația unei substanțe medicamentoase în biofluide poate fi influențată de

factori precum greutatea corporală, vârsta pacientului, diferențele genetice în metabolismul substanțelor medicamentoase, administrarea concomitentă a altor substanțe în organism (medicamente, compoziția și cantitatea de alimente etc.). Biodisponibilitatea unei substanțe medicinale din supozitoare, adică perioada de acțiune și gradul de absorbție, este influențată semnificativ de natura eliberării acestei substanțe din supozitor.

Procesul de eliberare este un factor care reglează viteza și completitudinea absorbției substanțelor medicamentoase în sânge, în special în cazurile în care este sub formă de dozare în stare solidă.

Eliberarea substanțelor medicamentoase din supozitoare are loc prin dizolvarea și distribuția substanței active în conținutul mucusului din rect sau din vagin.

Pentru evaluarea în masă a calității supozitoarelor, metoda „*in vitro*” este disponibilă și potrivită. Evaluarea vitezei de eliberare a substanțelor medicinale din supozitoare în experimente „*in vitro*”, de obicei, se analizează după viteza de difuzie a substanței medicamentoase incluse în supozitoare printr-o membrană semipermeabilă cu determinarea ulterioară a concentrației acestei substanțe în mediul de dializă. Mediul de dializă este selectat experimental, ținându-se cont de proprietățile fizico-chimice ale substanței medicamentoase, natura bazei supozitoarelor, pH-ul rectului etc. individual pentru fiecare medicament.

Reacția rectală la indivizii sănătoși are pH de 7,6-8,0. La pacienții cu inflamația rectului, reacția membranei mucoase este acidă (pH de 6,3-6,5), în timp ce modificările neoplasmice determină alcalinizarea mediului (pH de 7,8-8,4).

Supozitoare studiate:

1. Supozitoare cu Procaina (novocaină) - 0,30 g
2. Supozitoare cu sintomicină - 0,25 g
3. Supozitoare cu diclofenac sodic - 0,10 g

Raportul trebuie să indice numele eșantionului de testare, producătorul, numărul lotului.

Timpul deformării complete a supozitoarelor

Când un supozitor este introdus în rect, simultan cu topirea (sau dizolvarea) începe deformarea supozitorului; forma se schimbă, suprafața masei supozitoare, ce contactează cu suprafața membrane mucoase, crește treptat. Datorită acestor fenomene, difuzia substanței medicamentoase în biofluidul corpului este accelerată.

Timpul de deformare completă a supozitoarelor se determină în dispozitivul lui L. Kravchinsky. Supozitorul este plasat într-un tub cu capătul ascuțit în jos. Toate părțile dispozitivului sunt termostate la 37 °C timp de 5 min. Se notează timpul de scufundare a tubului în soluție. Timpul pentru deformarea completă a supozitorului este în intervalul 180 - 900 s.

Viteza de eliberare a substanțelor medicamentoase din supozitoare produse în fabrici și farmacii este determinată utilizând metoda de dializă printr-o membrană semipermeabilă. Este posibilă compararea vitezei de eliberare din formele farmaceutice investigate, produse de diferite fabrici sau diferite serii ale aceluiași producător, determinând unele dintre SM difuzate (novocaină, sintomicină, diclofenac sodic).

În cadrul experimentului mediul de dializă se alege individual. Solventul, lungimea de undă a maximumului de absorbție, extincția sunt selectate individual.

Prerechizite

1. Proprietățile fizico-chimice ale ingredientelor incluse în supozitoare.
2. Metodele de producere a supozitoarelor, ținându-se cont de proprietățile fizico-chimice ale substanțelor medicamentoase și ale bazelor din supozitoare.
3. Metodele spectrofotometrice pentru analiza antibioticelor din grupa cloramfenicolului, preparatelor cu acid p-aminobenzoic.

Materiale și reagenți chimici

Materiale: membrană de celofan sau membrană naturală (intestin de pui), supozitoare cu diclofenac sodic, novocaină.

Veselă chimică: baloane cotate (25, 100 mL), pipete gradate (2, 5, 10 mL), pahar de 200 mL.

Reagenți chimici: diclofenac sodic pur, acid clorhidric, novocaină.

Echipeamente: dispozitiv pentru dializă, spectrofotometrul UV-VIS, balanță analitică, ultratermostat.

Construirea curbei de etalonare pentru diclofenac sodic

- Pregătirea soluției stoc standard:** se cântărește 100 mg diclofenac sodic pur, se transferă într-un balon volumetric de 100 mL și se ajustează volumul cu apă distilată (Stoc I, 1 mg/mL). Se transferă 10 mL soluție stoc I într-un alt balon cotate de 100 mL și se aduce volumul până la cotă (stoc II, 100 μ g/mL).
- Pregătirea soluției de lucru:** din soluția stoc II se extrag 1, 2, 3, 4, 5 și 6 mL în baloane cotate de 25 mL și se aduce volumul la cotă pentru a obține concentrația în intervalul 4-24 μ g/mL.
- Măsurarea absorbantei:** se măsoară absorbanta soluțiilor respective la lungimea de undă de $\lambda = 276$ nm folosind spectrofotometrul UV-VIS. Se trasează graficul dependenței absorbantei pentru diclofenacul sodic față de concentrație, utilizând MS Excel și se determină panta și intercepta.

Tabelul 7.1. Parametrii substanțelor medicamentoase analizate

Substanța medicamentoasă	Solventul	λ_{\max} , nm	$E_{1cm}^{1\%}$
Novocaină	HCl (0,001M)	290	180,0
Diclofenac sodic	Apă distilată	276	297,0

Mod de lucru

Cercetările sunt efectuate în dispozitivul pentru dializă propus de L. Kravchinsky. Într-un pahar de 200 mL se introduc 100 mL din mediul de testare (balon volumetric) și un tub de dializă (diametru interior 32 mm și înălțimea 15 cm). Capătul inferior este acoperit cu o membrană de celofan, sau cu membrană naturală pe suprafața căreia

este așezat un supozitor.

Tubul este scufundat într-un pahar cu mediu de dializă (apă, 0,001M soluție HCl, soluție salină) la o adâncime de 2 mm. Dispozitivul este plasat într-un termostat la o temperatură de $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Prelevarea probelor se efectuează după 30, 60, 90 de minute. Dializatul este preliminar agitat și se prelevează 5 mL (pipetă volumetrică) din soluția testată. Volumul preluat este completat cu o cantitate egală de mediu investigat. În dializat (5 mL), cantitatea de substanță medicamentoasă care a trecut în soluție este determinată la lungimea de undă indicată în tabelul 7.1 (cuvă de cuarț cu grosimea stratului de 10 mm). În calitate de probă de referință se ia mediul de dializă.

Concentrația substanței medicamentoase în dializat (C, %) este determinată după formula (7.1):

$$C\% = \frac{A \cdot D \cdot V \cdot 100\%}{E_{sp} \cdot O \cdot M} \quad (7.1)$$

unde:

A - absorbanta probei dializate;

D - diluția probei selectate de dializat (volumul balonului), mL;

V - volumul total al mediului de dializă, mL;

E_{sp} - viteza de absorbție specifică;

O - volumul de dializat luat pentru analiză, mL;

M - cantitatea de substanță medicamentoasă din supozitoriu, g.

Rezultatele sunt introduse în tabelele 7.2 și 7.3, comparându-se cu concentrația plasmatică terapeutică a sintomicinei (5-10 $\mu\text{g} / \text{mL}$).

Tabelul 7.2. Datele pentru curba de etalonare a diclofenacului sodic

Concentrația, $\mu\text{g}/\text{mL}$	Absorbanta, $\lambda = 276 \text{ nm}$
4	
8	
12	
16	

Biofarmacia și farmacocinetica

20	
24	
Parametrul	Valoarea
Panta	
Intercepta	

Calculule

1. Determinarea concentrației substanței medicamentoase dizolvate ($\mu\text{g/mL}$)

$$y = mx + c,$$

unde: y - absorbanta, m - panta, x - concentrația ($\mu\text{g/ml}$),
 c - intercepta.

2. Cantitatea de substanță medicamentoasă eliberată (mg)

Cantitatea de substanță medicamentoasă eliberată = [concentrația ($\mu\text{g/mL}$) \cdot (volumul mediului de dizolvare) \cdot (factorul de diluție)]/1000

3. Factorul de diluție

Factorul de diluție = volumul probei diluate (mL)/volumul de probă prelevat (mL)

4. Procentul de eliberare cumulativă a substanței medicamentoase

Procentul de eliberare cumulativă a substanței medicamentoase = (cantitatea de substanță medicamentoasă eliberată) \cdot 100/cantitatea substanței active în comprimat.

5. Determinarea timpului de deformare completă a diferitor supozitoare.

Tabelul 7.3. Cinetica eliberării substanțelor medicamentoase din probe industriale de supozitoare

Parametri	Timp, min				
	20	40	60	80	100
Absorbanta probei dializate, $\lambda = 276 \text{ nm}$					
Cantitatea de substanță medicamentoasă eliberată, mg % de SM trecut în soluție					

Se construiește graficul dinamicii eliberării substanței medicamentoase din supozitor, reprezentând cantitatea de substanță medicamentoasă eliberată din supozitor (mg) pe axa ordonatei și timpul de dializă pe axa abscisei, iar în baza rezultatelor lucrării se fac concluziile. Se formulează o concluzie cu privire la conformitatea formei de dozare și diferența procesului de difuzie, comparând diferite mărci comerciale ale firmelor farmaceutice.

Sarcini pentru evaluare și autoevaluare:

1. Explicați cum se realizează experimental eliberarea substanței active din supozitoare prin metoda difuziei printr-o membrană semipermeabilă și cum se evaluează gradul de eliberare a medicamentelor din ele.
2. Explicați metoda de determinare cantitativă în dializat a substanței active eliberate din supozitoarele testate (acid aminobenzoic, antibiotice din grupa cloramfenicolului, diclofenac sodic).
3. Elaborați concluzii despre influența compoziției din baza supozitoarelor asupra procesului de eliberare a substanțelor medicamentoase din supozitoare.
4. Comparați rata de eliberare a substanței active din supozitoarele testate (ovocaină, Sintomicina, Diclofenac sodic) cu alte serii sau produse obținute de alte fabrici.
5. Alegeți o bază rațională pentru prepararea supozitoarelor.
6. Reprezentați grafic cinetica eliberării substanțelor medicamentoase din supozitoare preparate pe diferite baze.

CAPITOLUL 2. ABSORBȚIA SUBSTANȚELOR ACTIVE ÎN TRACTUL GASTROINTESTINAL

Lucrarea de laborator Nr. 8.

Efectul intensificatorilor de permeație asupra permeabilității intestinale a substanțelor medicamentoase

Scopul lucrării: studierea efectului intensificatorului de permeație asupra absorbției aciclovirului prin utilizarea sistemului de dizolvare-absorbție.

Obiective:

1. Analiza dizolvării și absorbției *in vitro* a comprimatului de aciclovir.
2. Cercetarea efectului intensificatorului de permeație asupra absorbției aciclovirului.

Generalități

O bună biodisponibilitate perorală există atunci când substanța medicamentoasă are o permeabilitate și solubilitate maximă la locul de absorbție. Prin urmare, gradul de absorbție a SM ar putea fi determinat în baza măsurării permeabilității și solubilității. Deci, permeabilitatea intestinală reprezintă o parte esențială în predicția de biodisponibilitate perorală. Datele de permeabilitate intestinală pot fi utilizate în studiile de preformulare pentru a evalua efectele diversilor excipienți farmaceutici asupra absorbției medicamentelor. O serie de metode *in vitro* au fost dezvoltate pentru evaluarea permeabilității intestinale a unei anumite substanțe medicamentoase. Studiile de absorbție (permeabilitate) se efectuează în mod obișnuit pe bază de saci intestinali izolați.

Avantajele acestui model de studiu sunt că sacii intestinali conțin toate tipurile de celule și stratul de mucus; astfel, este o metodă relativ rapidă și ieftină și poate fi utilizată pentru studii de preformulare. Acest tip de model este potrivit pentru măsurarea

parametrilor cinetici cu fiabilitate și reproductibilitate ridicată. Mai multe specii de animale, inclusiv șobolanul, iepurele, porcul, câinele și maimuța, au fost utilizați în studiile de permeabilitate a SM bazate pe saci intestinali izolați. Intestinul subțire de pui ar putea fi un model util pentru absorbția intestinală în bază ipotezei că permeabilitatea membranei pentru diferite medicamente nu este dependentă de specie, deoarece compoziția plasmei, membrana celulelor epiteliale intestinale este similară la nivelul diferitor specii. Astfel, permeabilitatea membranei de pui ar putea fi aceeași pentru segmente diferite de intestin.

Proiectarea sistemului de dizolvare-absorbție continuă folosind segmentul intestinului invertit. Proiectarea sistemului de absorbție cu dizolvare continuă *in vitro* este ilustrată în figura 8.1. În acest sistem, dizolvarea substanței active din comprimat cu eliberare lentă și pătrunderea prin intestinul evertit au loc simultan. Se utilizează 1000 mL de apă distilată ca mediu de dizolvare, termostatat la $37 \pm 0,5$ °C. Aparatul de perfuzie este format din două tuburi de sticlă, A și B, conectate între ele (Figura 8.1). Tubul B este o canulă (în formă de con) îndoită la capătul inferior, iar tubul A o canulă dreaptă la capătul inferior.

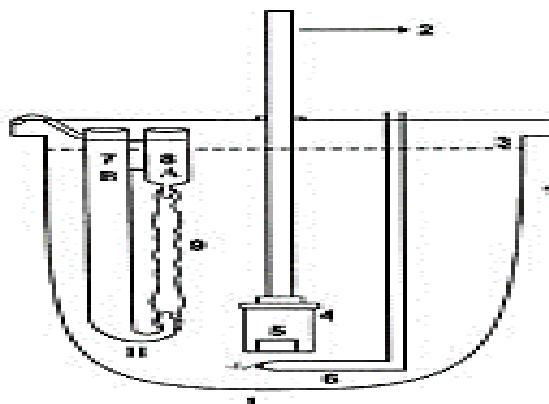


Figura 8.1. Schema sistemului de dizolvare-absorbție continuă *in vitro*

Etichete:

1 - vas pentru dizolvare, 2 - arbore rotativ, 3 - mediu de dizolvare, 4 - coș, 5 – comprima, 6 - tub pentru oxigen, 7 - tubul B, 8 - tubul A, 9 - intestin evertit, I - sistem de absorbție prin dizolvare, II - aparat de absorbție (perfuzie).

Distanța dintre două canule este menținută constant. Segmentul intestinal izolat este fixat între capetele tuburilor A și B așa cum se arată în figura 8.1. Capetele intestinului sunt legate în pozițiile date cu o ață. Aparatul este scufundat complet în vasul de dizolvare.

Aciclovirul [9-(2-hidroxi-etoximetil) guanina], (Figura 8.2), este un analog sintetic de nucleozide purinice, iar derivatul din guanină este cel mai utilizat agent antiviral.

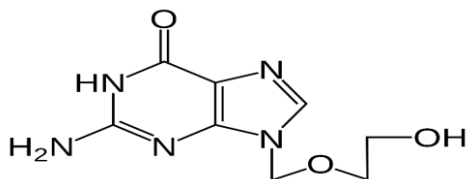


Figura 8.2. Formula de structură a aciclovirului

Aciclovirul este clasificat ca medicament de clasa a III-a, adică are solubilitate ridicată și permeabilitate scăzută. Absorbția sa în TGI este lentă, variabilă și incompletă. Biodisponibilitatea aciclovirului după administrarea orală variază între 10 și 30%. Aproximativ 80% dintr-o doză orală nu este niciodată absorbită și este excretată prin fecale. Sistemul de absorbție continuă, care utilizează segmentul intestinului evertit, poate fi utilizat pentru a studia dizolvarea comprimatului de aciclovir și, în același timp, absorbția aciclovirului prin membrana intestinală. Solubilitatea ridicată și permeabilitatea scăzută a aciclovirului pot fi demonstrate pe cale experimentală, deoarece atât solubilitatea, cât și permeabilitatea pot fi studiate simultan. Absorbția aciclovirului este limitată de viteza de penetrare.

Una dintre abordările de îmbunătățire a permeabilității substanței medicamentoase cu absorbție joasă din TGI este administrarea de intensificatori de absorbție, inclusiv agenți

tensioactivi, săruri biliare, acizi grași, unele mucoadezive și polimeri. Agenții tensioactivi sunt adesea incluși în formele de dozare solide orale pentru a îmbunătăți umectarea lor sau proprietățile de dizolvare ale medicamentului. Este important de cunoscut dacă acești agenți tensioactivi, la concentrații care sunt atinse în lumenul intestinal, sporesc permeabilitatea ingredientelor activi. Lauril sulfatul de sodiu (LSS) este un surfactant larg utilizat pentru studiul permeabilității în funcție de concentrație. Creșterea permeabilității se datorează capacității amplificatorului de permeație a LSS de a promova permeabilitatea în direcția absorbției prin deschiderea joncțiunilor dense și/sau prin inhibarea sistemului de reflux activ. Astfel, prin utilizarea LSS, problema permeabilității scăzute poate fi rezolvată, ceea ce poate duce la o absorbție crescută a aciclovirului, care, la rândul său, poate crește biodisponibilitatea acestuia. Creșterea concentrațiilor de LSS în mediul de dizolvare crește coeficientul de permeabilitate și coeficientul de intensificare.

Prerechizite

1. Cunoștințe despre amelioratorii de permeație.
2. Metode de absorbție a SM.
3. Conceptul de dizolvare a SM.

Materiale și reagenți:

Vesală chimică: pipete gradate (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 mL), eprubete de 20 mL, pâlnie, baloane cotate de 25 și 100 mL, vas pentru dizolvare de 900 mL.

Reagenți chimici: lauril sulfat de sodiu, NaCl, KCl, CaCl₂, KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O, NaHCO₃.

Materiale: comprimat de aciclovir cu doza de 200 mg, intestin de pui.

Echiptamente: balanță analitică, aparat de perfuzie, spectrofotometru UV-VIS, ultratermostat.

Prepararea soluțiilor

1. **Soluție Krebs Ringer (pH 7,4):** se prepară soluția Krebs Ringer

combinând 6,3 g NaCl, 0,35 g KCl, 0,14 g CaCl₂, 0,16 g KH₂PO₄, 0,15 g MgSO₄·7H₂O, 2,1 g NaHCO₃ și 5 g glucoză într-un litru de apă distilată.

2. **Soluție tampon fosfat cu pH 5,0:** se dizolvă 6,8 g de dihidrogenofosfat de potasiu în 1000 mL apă distilată și se ajustează pH la 5,0 cu hidroxid de potasiu 10 M.

Trasarea curbei de etalonare pentru determinarea concentrației de aciclovir

1. Se transferă 100 mg de aciclovir într-un balon cotat de 100 mL, care conține o cantitate suficientă de soluție tampon fosfat cu pH 5,0. Se ajustează volumul pentru a obține o soluție stoc standard care conține 100 μg/mL aciclovir.
2. Se extrag cantități corespunzătoare (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 mL) de alicote din soluția stoc standard în zece baloane cotate de 25 mL și se diluează cu soluție tampon fosfat pH 5,0 pentru a obține concentrația de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 și 20 μg/mL de aciclovir.
3. Se măsoară absorbanta acestor soluții diluate la lungimea de undă de $\lambda = 254$ nm utilizând spectrofotometrul UV-VIS cu fascicul dublu, comparativ cu proba martor de tampon fosfat cu pH 5,0.
4. Se trasează graficul dependenței absorbantei în funcție de concentrația aciclovirului și se determină panta, intercepta și coeficientul de corelație.

Modul de lucru

Obținerea intestinului invertit de pui

1. Se utilizează intestin de pui masculi cu o greutate între 500 până la 600 g.
2. Se curăță cu atenție lumenul de mucus clătind cu o soluție tampon cu pH 7,4 (soluție Ringer Krebs).
3. Se îndepărtează un segment intestinal de 6 cm lungime și se transferă în soluție tampon Krebs Ringer.
4. Se spală bine cu soluție caldă Krebs Ringer.

5. Se întoarce înapoi extremitatea proximală a intestinului și se leagă pe o tijă de sticlă pentru a obține intestinul evertit.

Studiu de absorbție prin dizolvare

1. Mediul de dizolvare format din 900 mL soluție tampon fosfat pH 5,0 se termostatează la $(37 \pm 0,5)$ °C. Se fixează clema la segmentul intestinal unit la aparatul de perfuzie.
2. Se umple cu soluție Krebs Ringer aparatul de perfuzie și se înregistrează volumul total al compartimentului de absorbție (tubul A și tubul B ale aparatului de perfuzie).
3. Se pune aparatul de perfuzie în mediu de dizolvare și se aerează.
4. Se pune în coș comprimatul de aciclovir și se agită la 50 rpm.
5. Se extrag din aparatul de perfuzie (I) 2 mL probă la intervale de 10 min timp de 120 min și se determină spectrofotometric la $\lambda = 254$ nm absorbanta soluției cu aciclovirul eliberat.
6. Se extrage substanță medicamentoasă transportată din compartimentul de absorbție (II) de la 13 min până la 123 min la un interval de 10 min (se înlocuiește cu soluția Ringer Krebs) și se analizează spectrofotometric la $\lambda = 254$ nm absorbanta soluției cu aciclovirul transportat.
7. Se repetă întregul experiment de trei ori ($n=3$) folosind mediu de dizolvare proaspăt, precum și de fiecare dată segment de intestin proaspăt.
8. Se repetă aceeași procedură pentru alte comprimate de aciclovir, cu excepția faptului că în mediul de dizolvare se adăugă lauril sulfat de sodiu în trei concentrații diferite - de 1%, 2% și 3%
9. Se trasează graficul dependenței procentului de substanță medicamentoasă eliberată în funcție de timp, iar datele se introduc în tabelul 8.1.
10. Se construiește graficul dependenței cantității cumulative de substanță medicamentoasă difuzată în funcție de timp (Tab. 8.2) și se determină panta porțiunii liniare ca viteza de apariție a stării de echilibru (mg/min), și anume: cantitatea de substanță medicamentoasă care traversează țesutul în timpul t (min).

Calculule

1. Concentrația substanței medicamentoase difuzate ($\mu\text{g/mL}$)

Se reprezintă graficul absorbanței aciclovirului în funcție de concentrație și se determină panta și punctul de interceptare cu axa Y.

$y = mx + c$, unde: y - absorbanta, m - pantă, x - concentrația ($\mu\text{g/ml}$), c - intercepta.

2. Cantitatea cumulativă de substanță medicamentoasă difuzată (mg)

Cantitatea cumulativă de substanță medicamentoasă difuzată (CCMD) = [concentrația ($\mu\text{g/mL}$) \cdot (volumul mediului de difuzie) \cdot (factor de diluție)]/1000

3. Suprafața (A) a intestinului de pui (cm^2)

$$A = 2 \cdot \pi \cdot r \cdot l$$

unde: r - raza internă a intestinului, l - lungimea intestinului.

4. Factorul de diluție

Factorul de diluție = volumul probei diluate (mL)/volumul probei îndepărtate (mL)

5. Cantitatea de substanță medicamentoasă eliberată în mediu de dizolvare (mg)

Cantitatea de substanță medicamentoasă eliberată = [concentrația ($\mu\text{g/mL}$) \cdot (volumul mediului de dizolvare) \cdot (factorul de diluție)]/1000

6. Procentul de eliberare cumulativă a substanței medicamentoase

Procentul de eliberare cumulativă a substanței medicamentoase = (cantitatea de substanță medicamentoasă eliberată) \cdot 100/doza substanței active în comprimat).

7. Permeabilitatea aparentă (cm/s)

$$P_{\text{app}} = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{C_0 \cdot A \cdot 60}$$

unde: dQ/dt – viteza de formare a stării de echilibru, și anume-cantitatea de compus care traversează țesutul în timpul t , A - suprafața expusă a țesutului intestinului (cm^2), C_0 - concentrația inițială a substanței medicamentoase în compartimentul donor.

8. Coeficientul de amplificare (ER)

$$ER = \frac{P_{app} \text{ medicament cu amplificator}}{P_{app} \text{ medicament fără amplificator}}$$

unde P_{app} - permeabilitatea aparentă

Rezultate experimentale

Tabelul 8.1. Procentul de eliberare cumulativă a substanței medicamentoase în funcție de [LSS]

Timpul, min	Procentul de eliberare cumulativă a medicamentului			
	0% LSS	1% LSS	2% LSS	3% LSS
10				
20				
30				
40				
50				
60				
70				
80				
90				
100				
110				
120				

Tabelul 8.2. Date pentru calcularea cantității de substanță medicamentoasă difuzată

Timpul, min.	Absorbanta, $\lambda = 254 \text{ nm}$	Concetrația, $\mu\text{g/mL}$	Cantitatea, mg	Cantitatea cumulativă de SM difuzată, (CCSM), mg
0				

Biofarmacia și farmacocinetica

13				
23				
33				
43				
53				
63				
73				
83				
93				
103				
113				
123				

1. Procentul de eliberare cumulativă a substanței medicamentoase din comprimat comercializat de aciclovir în soluție tampon fosfat, este de _____ % în 2 ore.
2. Cantitatea de aciclovir difuzată prin membrana intestinală timp de 2 ore este de _____ .
3. Permeabilitatea aparentă și coeficientul de amplificare a aciclovirului la diferite concentrații de LSS se prezintă în tabelul 8.3.

Tabelul 8.3. Permeabilitatea aparentă și coeficientul de amplificare a aciclovirului la diferite concentrații de LSS

	0% LSS	1% LSS	2% LSS	3% LSS
Permeabilitatea aparentă				
Coeficient de amplificare				

Deduceți concluzii

Aplicații

1. Se poate studia efectul diverșilor amplificatori asupra absorbției substanței medicamentoase.

2. Permeabilitatea substanțelor medicamentoase de clasa a III-a cu permeabilitate scăzută poate fi îmbunătățită prin utilizarea amplificatorilor de permeabilitate.

Sarcini de evaluare și autoevaluare

1. Prezentați o listă cu diverși potențiali amplificatori de permeație ce se utilizează în formele de dozare orală.
2. Explicați mecanismele prin care potențiatorii de permeație cresc permeabilitatea substanțelor medicamentoase.
3. Determinați care este % de aciclovir ce poate fi absorbit în organism fără utilizarea amplificatorilor de permeație.
4. Explicați cum se determină concentrația aciclovirului eliberată și cea difuzată prin membrana intestinală.

Exercițiu

Studiați efectul sărurilor biliare asupra permeabilității aciclovirului.

Lucrarea de laborator Nr. 9.

Absorbția percutanată a substanțelor medicamentoase din unguent cu diferite baze

Scopul lucrării: studierea absorbției percutanate a Metronidazolului din unguente cu transportatori solubili în apă și în lipide.

Obiective

1. Studierea metodei de absorbție percutanată.
2. Înțelegerea conceptului de coeficient de permeabilitate și estimarea acestuia.
3. Studierea influenței diferitor baze de unguent asupra absorbției percutanate a metronidazolului.

Generalități

Stratul cornos este bariera principală pentru penetrarea cutanată, oferind absorbția lentă pentru majoritatea substanțelor

medicamentoase. Permeabilitatea stratului cornos poate fi mărită prin utilizarea adecvată a transportatorului prezent în unguent. În general, se presupune că natura transportatorului selectat influențează puternic viteza și gradul de eliberare a substanțelor medicamentoase. Eliberarea poate fi îmbunătățită prin selectarea transportatorului potrivit. Cel mai bun transportator pentru uz topic este cel care contribuie la scăderea reversibilă a rezistenței stratului cornos și permite difuzia moleculelor în transportatorul propriu-zis.

Cel mai răspândit design al experimentului *in vitro* este acel în care o membrană (de obicei, epiderma) separă două compartimente. Un compartiment conține substanța medicamentoasă într-un transportator (vehicol), care poate fi o soluție apoasă simplă sau soluție tampon (numită soluție donor) și celălalt compartiment conține o soluție receptor, care oferă condiții de absorbție. După un anumit timp se atinge o stare de echilibru a permeației prin membrană, când gradientul de concentrație al substanței medicamentoase de-a lungul membranei este constant. În aceste condiții poate fi utilizată următoarea ecuație:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{D \cdot C_0}{h} \quad (9.1)$$

unde: dM - masa cumulativă a substanței medicamentoase, care este transportată pe o unitate de suprafață a membranei în timpul (dt), C_0 - concentrația substanței medicamentoase în primul strat al membranei (la suprafața pielii, în contact cu soluția donor), h - grosimea membranei, D - coeficientul de difuzie.

În practică este foarte dificil să se măsoare C_0 , concentrația substanței medicamentoase în primul strat al membranei, deoarece îndepărtarea stratului exterior pentru analiză este problematică și contaminarea de la donatorul aplicat este aproape inevitabilă. Cu toate acestea, concentrația substanței medicamentoase în transportator (soluție donor), ce scaldă membrana pielii (C_v), este de obicei cunoscută sau poate fi determinată relativ ușor. Deoarece C_0 și C_v sunt legate prin relația:

$$P = \frac{C_0}{C_v}, \text{ deci } C_0 = P \cdot C_v \quad (9.2)$$

unde P - coeficientul de partiție al substanței medicamentoase între membrană și transportator.

La introducerea ecuației (9.2) în ecuația (9.1) se obține:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{D \cdot P \cdot C_v}{h} \quad (9.3)$$

Aceasta este cea mai aplicată ecuație în examinarea datelor de transport transdermic al substanțelor medicamentoase. Trasarea unui grafic ce reprezintă cantitatea cumulativă de substanță medicamentoasă, care trece printr-o unitate de suprafață a membranei ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) în timp, oferă profilul tipic de permeație.

Coeficientul de permeabilitate (K_p), viteza de transport a substanței medicamentoase pe o unitate de concentrație a substanței medicamentoase printr-o membrană poate fi definită prin ecuația (9.4):

$$K_p = \frac{D \cdot P}{h} \quad (9.4)$$

Ecuația (9.4) poate fi înlocuită în ecuația (9.3), iar în rezultat obținem ecuația (9.5):

$$\frac{dM}{dt} = J_{ss} = K_p \cdot C_v \quad (9.5)$$

Fluxul de stare staționară (J_{ss}) se obține ca gradient al porțiunii liniare a profilului de permeație (prin reprezentarea graficului cantității cumulate de substanță medicamentoasă difuzate pe unitate de suprafață în funcție de timp). Dacă concentrația substanței medicamentoase în transportatorul aplicat este cunoscută, atunci poate fi determinat coeficientul de permeabilitate K_p . Cu cât valorile K_p și J_{ss} obținute pentru diferite formulări vor fi mai mari, cu atât va fi mai mare permeabilitatea.

Principiul metodei

Eliberarea substanței medicamentoase din formele de dozare depinde direct de proprietățile fizico-chimice ale transportatorului și ale medicamentului folosit. Solubilitatea substanței medicamentoase este una dintre cele mai importante proprietăți fizice care afectează

eliberarea atât în stratul de bază, cât și în mediul învecinat.

Metronidazolul (MTD) este solubil în soluție tampon fosfat. Prin urmare, solubilitatea nu constituie un factor limitator în procesul de absorbție. Lipofilitatea este un parametru fizico-chimic foarte util care reflectă proprietățile de transfer ale unui compus. Coeficientul de partiție (fază apoasă : n-octanol) este utilizat în mod obișnuit în industria farmaceutică pentru a reflecta lipofilitatea unui medicament. Coeficientul de partiție al MTD este de 0,56 și 0,69 în apă și, respectiv, în tampon fosfat (pH 7,4). Astfel, MTD are mai multă afinitate față de tamponul fosfat decât față de apă. Eliberarea MTD depinde de efectul de solubilizare al transportatorului. MTD va fi eliberat rapid și mai mult din bazele hidrosolubile, decât din bazele liposolubile datorită distribuției favorabile a MTD în direcția fazei apoase. Concentrația liberă de MTD va fi mai mare în transportatorii solubili în apă. Dimpotrivă, pentru transportatorii lipidici, distribuția către faza apoasă internă ar face ca substanța medicamentoasă să fie aproape indisponibilă în faza externă uleioasă.

În baza solubilității substanței medicamentoase în transportatori, putem presupune că formula preparatului ce conține bază hidrosolubilă va fi mai bună pentru transportarea topică a MTD.

Prerechizite

1. Permeabilitatea prin piele (membrane naturale).
2. Baze de unguent.

Materiale și reagenți

1. **Vesală chimică:** pahare de 100 mL, celulă de difuzie de tip deschis, tub de testare, cilindru de 50 ml., baloane cotate de 100, 25 mL.
2. **Reagenți chimici:** metronidazol, dihidrogenortofosfat de potasiu, acid stearic, alcool cetilic, glicerină, hidroxid de potasiu.
3. **Echipeamente:** spectometru UV-VIS, balanță analitică, ultratermostat, agitator magnetic cu încălzire.
4. **Materiale:** membrană naturală, celulă de difuzie cu tub deschis pentru dializă, ceară de albine, vaselină albă.

Mod de lucru

1. **Prepararea soluției tampon fosfat 0,05 M, pH 7,4:** se dizolvă cantitatea necesară de dihidrogenofosfat de potasiu în cantitate suficientă de apă pentru a obține 1000 mL soluție și se ajustează pH-ul la 7,4.

2. Curba de etalonare:

- a. **Prepararea soluției standard:** se cântăresc 100 mg de MTD pur, se transferă în balon cotat de 100 mL și se aduce până la cotă (Stoc I, 1 mg/mL). Se transferă 10 mL stoc I într-un alt balon cotat de 100 mL și se aduce la cotă (Stoc II, 100 μ g/mL).
- b. **Prepararea soluției de lucru:** din soluția stoc II se extrag 1,25; 2,50; 3,75; 5,00; 6,25 și 7,50 mL în baloane cotate de 25 mL și se aduce până la cotă pentru a obține o concentrație în intervalul 0-30 μ g/mL.
- c. **Măsurarea absorbantei:** se măsoară absorbanta diluțiilor respective la $\lambda = 320$ nm folosind spectrofotometrul UV-Vis. Se construiește graficul dependenței absorbantei MTD în funcție de concentrație utilizând MS Excel și se determină panta și intercepta.

3. Prepararea formei medicamentoase

- a. Se încălzesc separat fazele apoase și uleioase la 70 °C și se amestecă împreună la agitare continuă.
- b. După răcire la (40-50 °C), se adăugă MTD (1%) și se amestecă pentru a obține un amestec omogen și uniform conform formulei prezentate în tabelul 9.1.

Tabelul 9.1. Compoziția formelor medicamentoase

Ingrediente	F ₁	F ₂
Ceară de albine	5 g	-
Vaselină albă	95 g	-
Acid stearic	-	20 g
Alcool cetilic	-	1 g
Ceară de spermaceți	-	1 g

Glicerină	-	5 g
Hidroxid de potasiu	-	1,05 g
Apă distilată	-	71,95 g

4. Eliberarea și pătrunderea *in vitro* a SM

1. Se utilizează metoda celulei de dializă pentru a determina cantitatea de substanță medicamentoasă difuzată din diferite compoziții de unguent.
2. Se menține membrana în contact cu lichidul receptor (0,05 M soluție tampon fosfat, pH 7,4) timp de 1 oră.
3. Se acoperă tuburile cu membrană. Se scufundă tuburile într-un pahar de 100 mL care conține 50 ml din faza receptorului (tampon fosfat 0,05 M; pH 7,4).
4. În timpul experimentelor se agită continuu faza receptorului cu o bară magnetică mică la o viteză de 100 rpm pentru a asigura omogenitatea și a menține temperatura de 37 °C.
5. Se aplică o cantitate cunoscută din formula F1 (bază uleioasă) pe membrană. La timpul prestabilit se selectează probele și se măsoară absorbanta cu spectrofotometrul la $\lambda = 320$ nm.
6. Se repetă experimentul pentru formula F2 (bază solubilă în apă).
7. Se utilizează curba de etalonare pentru determinarea cantității de MTD difuzată.
8. Se trasează graficul dependenței cantității de substanță medicamentoasă difuzate pe unitate de suprafață în funcție de timp și se determină panta porțiunii liniare a graficului.
9. Se calculează coeficienții de permeabilitate folosind următoarea formulă:

$$K_p = J_{ss} / C_v \quad (9.6)$$

unde: K_p - coeficient de permeabilitate (cm/h), J_{ss} - flux (mg/cm²/hr), A - aria de difuzie a membranei (cm²); C_v - cantitatea inițială a substanței medicamentoase în forma farmaceutică (mg).

A. Setul de parametri necesari pentru trasarea curbei de etalonare

1. Intervalul legii Beer-Lambert: 5-30 $\mu\text{g/mL}$
2. Solvent: tampon fosfat 0,05 M, pH 7,4
3. λ_{max} pentru metronidazol: 320 nm

B. Setul de parametri pentru studiul difuziei SM

1. Formulare: unguent
2. Concentrație: 1%
3. Viteza de rotație: 100 rpm
4. Timp de testare: 8 h
5. Mediu de difuzie: tampon fosfat 0,05 M, pH 7,4
6. Volumul mediului de difuzie: 50 mL

Tabelul 9.2. Curba de etalonare pentru metronidazol

Concentrația, $\mu\text{g/mL}$	Absorbanța, $\lambda = 320\text{nm}$
5	
10	
15	
20	
25	
30	
Parametrul	Valoarea
Panta	
Intercepta	

Tabelul 9.3. Absorbția (*ex vivo*) a compoziției F₁ la dializa prin membrană

Timpul, ore	Absorbanța, $\lambda = 320\text{ nm}$	Concentrația, $\mu\text{g/mL}$	Cantitatea totală difuzată, mg	CCMD/ unități arie
0,5				
1				
2				
3				
4				
6				
8				

(ex vivo - experiment realizat pe țesuturi vii, dar în afara organismului viu)

Tabelul 9.4. Dependența absorbantei (*ex vivo*) a compoziției F₂ la dializa prin membrană

Timpul, ore	Absorbanța, λ = 320 nm	Concentrația, μg/mL	Cantitatea totală difuzată, mg	CCMD/ unități arie
0,5				
1				
2				
3				
4				
6				
8				

*CCMD- cantitatea cumulativă de substanță medicamentoasă difuzată

Calcul

1. Concentrația substanței medicamentoase difuzate (μg/mL)

Se construiește graficul dependenței absorbantei în funcție de concentrație și se determină panta și intercepta.

$$y = mx + c$$

unde: y - absorbanta, m- panta, x - concentrația (μg/mL), c - intercepta.

2. Cantitatea cumulativă de substanță medicamentoasă difuzată (mg)

Cantitatea cumulativă de substanță medicamentoasă difuzată (CCMD) = [concentrația (μg/mL) · (volumul mediului de difuzie) · (factor de diluție)]/1000

3. Suprafața membranei (A)

$$A = \pi \cdot r^2$$

unde: r - raza membranei studiate.

4. Cantitatea cumulativă de substanță medicamentoasă difuzată pe unitate de suprafață (CCMD/cm²)

$$CCMD/cm^2 = CCMD/Arie$$

5. Factorul de diluare

Factorul de diluție = volumul probei diluate (mL)/volumul probei îndepărtate (mL)

6. Flux (J_{ss})

J_{ss} - panta porțiunii liniare a graficului dependenței cantității de substanță medicamentoasă difuzată pe unitate de suprafață în funcție de timp.

7. Coeficient de permeabilitate (K_p)

$$K_p = J_{ss} / C_v$$

Rezultate

1. Coeficientul de permeabilitate și fluxul pentru formularea F1 s-au dovedit a fi ___ și, respectiv, ___.
2. Coeficientul de permeabilitate și fluxul pentru formularea F2 s-au dovedit a fi ___ și, respectiv, ___.

Deduceți concluzii

Aplicații

1. Determinarea transportatorului (vehiculului) corespunzător pentru administrarea topică a medicamentului.
2. Estimarea fluxului și a coeficientului de permeație al substanțelor medicamentoase.
3. Compararea diferitor mărci comerciale de medicamente disponibile pe piață prin estimarea fluxului și a coeficientului de permeație.

Sarcini de evaluare și autoevaluare

1. Explicați noțiunea de coeficient de permeație.
2. Definiți noțiunea de flux și explicați metoda de calcul al fluxului în stare staționară.
3. Comparați diferite tipuri de baze transportatoare.
4. Explicați metoda de determinare a coeficientului de permeabilitate (K_p).

Exercițiu

Studiați efectul diferitor baze asupra absorbției percutanate a gelului de diclofenac.

Lucrarea de laborator Nr. 10.

Studiu de pătrundere *in vitro* a diclofenacului sodic din unguent utilizând celula de difuzie Franz

Scopul lucrării: studiul permeabilității *in vitro* a gelului de diclofenac sodic folosind celula de difuzie Franz.

Obiective

1. A studia construcția celulei de difuzie Franz.
2. A studia absorbția percutanată (prin piele) a diclofenacului sodic utilizând celula de difuzie Franz.

Generalități

O modalitate ideală de a determina absorbția percutanată a unui compus este de a face studiul propriu-zis *in vivo*. Cu toate acestea, mulți compuși sunt potențial toxici pentru a fi testați pe oameni. În afară de aceasta, evaluarea acestor procese folosind ființe umane este dificilă din punctul de vedere al costului, al consumului de timp și al restricțiilor etice.

Prin urmare, studiile trebuie efectuate folosind pielea excizată (cadavru uman, animale). Pentru aceste studii de difuzare a substanței medicamentoase se utilizează membrane de la șobolani, șoareci, porci, cobai, șerpi, iepuri și oameni, precum și membrane sintetice. Pielea de animale diferă semnificativ de pielea umană datorită diferențelor de grosime, naturii stratului cornos, densității foliculilor de păr și a glandelor sudoripare. În această privință, studiile sunt, în general, efectuate utilizând un sistem de celule de difuzie statice sau cu termostatare. Dificultatea în obținerea pielii excizate și variația permeabilității acestora din cauza rasei, vârstei, sexului, sitului anatomic și preocuparea pentru utilizarea restricționată a animalelor i-a determinat pe cercetători să folosească pielea imitată sau o membrană artificială.

S-a investigat permeabilitatea substanțelor medicamentoase prin diferite membrane artificiale, cum ar fi membrana de colagen. În plus, s-au raportat multe studii privind eliberarea substanței

medicamentoase din unguente folosind membrană de cauciuc siliconic, membrană de celuloză și filtru cu membrană. Cu toate acestea, rezultatele obținute cu aceste membrane artificiale nu reflectă întotdeauna absorbția percutanată. În studiile de permeabilitate a substanțelor medicamentoase pot fi utilizate membranele naturale, cum ar fi cea de piersici și pielea de roșii, stratul inter-lamelar al cepei și stratul interior al oului, care pot înlocui pielea sintetică imitată sau artificială. Membranele naturale pot fi alternative bune pentru studiile de permeabilitate datorită disponibilității lor ușoare, costurilor foarte mici și a problemelor etice implicate. În acest experiment diverse membrane artificiale și naturale sunt comparate cu pielea animalelor pentru studii de permeabilitate.

Principiul metodei

Permeabilitatea *in vitro* a substanțelor medicamentoase poate fi studiată cu utilizarea celulelor de difuzie Franz. Celulele de difuzie Franz sunt realizate din sticlă cu o suprafață de contact de 4,7 cm². Celula de difuzie Franz (Fig. 10.1) este formată dintr-un compartiment donator (A) și un compartiment receptor (B). Membrana este montată între două compartimente celulare. Cele două compartimente celulare sunt fixate împreună cu o clemă. Compartimentul receptor are un volum de 74 mL și este umplut cu mediu de difuzie. Se menține la 37 °C prin circulația apei printr-o cămașă de apă externă. După 30 min de echilibrare a membranei cu soluția de receptor, cantitatea specifică de substanță medicamentoasă se aplică în compartimentul donator. Compartimentul donator este apoi acoperit cu parafilm (parafină) pentru a preveni evaporarea solventului. Soluția receptorului este agitată continuu cu ajutorul unui magnet rotativ, la 400 rpm. Probele de soluție din receptor (alicote de 2,0 mL) sunt extrase prin orificiul de eșantionare din compartimentul receptorului la diferite intervale de timp. Celulele sunt reumplute cu soluție de receptor pentru a menține volumul soluției constant în receptor în timpul experimentului.

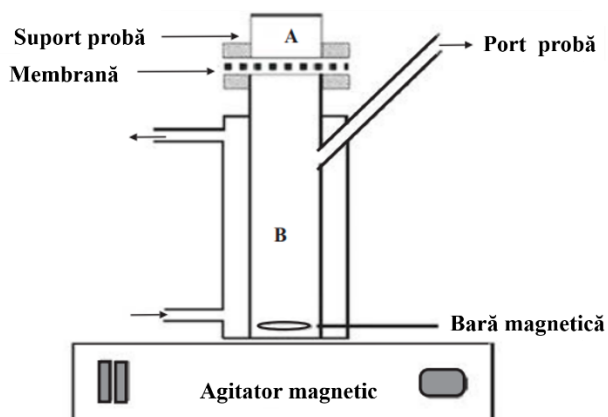


Figura 10.1. Schema celulei de difuzie Franz

Prerechizite

1. Permeabilitatea prin piele.
2. Baze de unguent.

Materiale și reagenți:

Veselă chimică: eprubete de 20 mL, pipete gradate de 2, 5 și 10 mL, cilindru de 50 mL, baloane cotate de 25, 100 mL etc.

Reagenți chimici: diclofenac sodic pur, dihidrogenoortofosfat de sodiu, hidrogenofosfat de sodiu.

Echipeamente: spectrometru UV-VIS, balanță analitică, ultratermostat, agitator magnetic.

Materiale: celulă de difuzie Franz, diclofenac sodic sub fomă de gel comercializat, membrană de celofan/membrană naturală.

1. Prepararea soluției tampon fosfat cu pH de 7,4

Soluția A: se iau 3,5 g de hidrogenofosfat de sodiu (Na_2HPO_4) și se dizolvă în 100 mL apă distilată.

Soluția B: se iau 2,76 g de dihidrogeno-fosfat de sodiu (NaH_2PO_4) și se dizolvă în 100 mL apă distilată. Se amestecă 40,5 mL de soluție A cu 9,5 mL de soluție B și se aduce volumul la 100 mL.

2. Trasarea curbei de etalonare pentru Diclofenacul de sodiu

- a. **Pregătirea soluției standard:** se cântărește 100 mg de diclofenac sodic pur, se transferă într-un balon volumetric de 100 mL și se

ajustează volumul cu apă distilată (**Stoc I, 1 mg/mL**). Se transferă 10 mL soluție **Stoc I** într-un alt balon cotate de 100 mL și se aduce volumul la cotă (**Stoc II, 100 µg/mL**).

- b. **Pregătirea soluției de lucru:** din soluția **Stoc II** se prelevează 1, 2, 3, 4, 5 și 6 mL în baloane volumetrice de 25 mL și se aduce volumul la cotă pentru a obține concentrația în intervalul de **4-24 µg/mL**.
- c. **Măsurarea absorbăței:** se măsoară absorbăța soluțiilor respective la lungimea de undă de $\lambda = 270$ nm folosind spectrofotometrul UV-Vis. Se trasează graficul dependenței absorbăței soluțiilor de diclofenac sodic față de concentrație utilizând MS Excel și se determină panta și intercepția.

3. Eliberare și permeabilitate *in vitro*

- a. Pentru studiul de permeabilitate se utilizează celule de difuzie Franz cu o zonă de difuzie de $4,7 \text{ cm}^2$ și o capacitate de 74 mL.
- b. Se plasează membrana de celofan (sau naturală) între compartimentele donator și receptor ale celulei.
- c. Se umple compartimentul receptorului cu aproximativ 74 mL de soluție tampon fosfat (pH 7,4). Se menține temperatura celulei la 37°C prin intermediul circulației apei de la un termostat de apă printr-o cămașă de apă externă. Se agită conținutul compartimentului receptor la 600 rpm cu bară magnetică acoperită cu teflon, care este plasată în interiorul celulei pe tot parcursul experimentului.
- d. Se asigură ca membrana să fie în contact cu mediul din receptor.
- e. Se plasează 2 g de diclofenac sodic sub formă de gel în compartimentul donator și se acoperă compartimentul donator cu folie de aluminiu pentru a evita evaporarea.
- f. La intervale de timp prestabilite, se extrag câte 2 mL de probă din compartimentul receptor și se înlocuiește imediat cu 2 mL de soluție asemănătoare cu cea din receptor, de aceeași temperatură.
- g. Se diluează probele extrase dacă este necesar și se măsoară absorbăța spectrofotometric la $\lambda = 270$ nm.

Biofarmacia și farmacocinetica

- h. Se folosește curba de etalonare pentru determinarea cantității de diclofenac sodic difuzat prin membrană.
- i. Se trasează graficul dependenței cantității de medicament difuzat pe unitate de suprafață în funcție de timp și se determină panta porțiunii liniare din grafic.
- j. Se calculează coeficienții de permeabilitate utilizând următoarea formulă:

$$K_p = J_{ss}/C_v \quad (10.1)$$

unde: K_p - coeficientul de permeabilitate (cm/h), J_{ss} - fluxul (mg/cm²/h), A - aria membranei de difuziune (cm²); C_v - cantitatea inițială a substanței medicamentoase în compartimentul donator (mg).

Date experimentale și calcule

Tabelul 10.1. Date pentru curba de etalonare a diclofenacului sodic

Concentrația, (μg/mL)	Absorbanța, λ = 270 nm
0	
4	
8	
12	
16	
20	
24	
Parametru	Valoarea
Pantă	
Intercepta	

Tabelul 10.2. Dependența parametrilor în funcție de timp la pătrunderea *in vitro* a diclofenacului sodic prin membrana de celofan (sau naturală)

Timp, h	Abosrbanța, λ = 270 nm	Concentrația, μg/mL	Cantitatea cumulativă de substanță medicamentoasă difuzată, mg	CCMD/pe unitate de suprafața
0,5				

Biofarmacia și farmacocinetica

1				
1,5				
2				

1. Determinarea concentrației substanței medicamentoase difuzate prin membrană ($\mu\text{g/mL}$)

Se trasează graficul dependenței absorbantei în funcție de concentrație și se determină panta și intercepta.

$$y = mx + c$$

unde: y - absorbanta, m - panta, x - concentrația ($\mu\text{g/mL}$), c - intercepta.

2. Cantitatea cumulativă de substanță medicamentoasă difuzată (mg)

Cantitatea cumulativă de substanță medicamentoasă difuzată (CCMD) = [concentrația ($\mu\text{g/ml}$) \cdot (volumul mediului de difuzie) \cdot (factorul de diluare)] / 1000

3. Suprafața (A) membranei de celofan

$$A = \pi \cdot r^2$$

unde, r - raza membranei de celofan expusă mediului de difuzie

4. Cantitatea cumulativă de substanță medicamentoasă difuzată pe unitate de suprafață (CCMD/cm²)

CCMD/cm² = CCMD/aria membranei de celofan

5. Factorul de diluție

Factor de diluție = volumul probei diluate (mL)/volumul probei eliminate (mL)

6. Fluxul (J_{ss})

Fluxul (J_{ss}) - panta (tangenta unghiului) porțiunii liniare a graficului dependenței cantității de substanță medicamentoasă difuzată pe unitate de suprafață în funcție de timp.

7. Coeficientul de permeabilitate (K_p)

$$K_p = \frac{J_{ss}}{C_v}, \quad (10.2)$$

unde: K_p - coeficient de permeabilitate (cm/h), J_{ss} - fluxul (mg/cm²/h), A - aria de difuzie a membranei (cm²); C_v - cantitatea inițială a

medicamentului în compartimentul donator (mg).

Rezultat

Coeficientul de permeabilitate și fluxul gelului de diclofenac sodic prin membrana de celofan este _____cm/h și _____mg/cm²/h, respectiv.

Deduceți concluzii

Din acest studiu se poate concluziona că permeabilitatea *in vitro* a gelului de diclofenac sodic prin membrană de celofan poate fi studiată utilizând celula de difuzie Franz.

Aplicații

1. Acest experiment ne permite să studiem permeabilitatea *in vitro* a diferitor formulări transdermice.
2. Acest model poate fi utilizat pentru a studia influența variabilelor compoziției formulate asupra permeabilității substanței medicamentoase.
3. Este posibilă estimarea fluxului și a coeficientului de permeabilitate.
4. Acest model poate fi utilizat pentru a studia permeabilitatea substanței medicamentoase pe cale nazală și bucală.

Sarcini pentru evaluare și autoevaluare

1. Explicați ce membrane naturale pot fi alternative bune pentru studiile de permeabilitate.
2. Descrieți ce reprezintă celula de difuzie Franz.
3. Explicați metoda de determinare a concentrației DCF
4. Analizați metoda de determinare a fluxului gelului de diclofenac sodic.
5. Explicați ce reprezintă coeficientul de permeabilitate.
6. Descrieți diverse modele de permeație.

Exerciții. Efectuați un studiu de penetrare a gelului de ketoconazol folosind celula de difuzie Franz.

CAPITOLUL 3. STUDIU PRIVIND LEGAREA SUBSTANȚELOR MEDICAMENTOASE DE PROTEINE

Lucrarea de laborator Nr. 11.

Studiu privind legare substanțelor medicamentoase de proteine prin utilizarea metodei de dializă la echilibru

Scopul lucrării: studiul procesului de legare a acidului salicilic cu proteinele prin metoda dializei de echilibru.

Obiective

1. Înțelegerea procesului de legare a substanțelor medicamentoase de proteine.
2. Demonstrarea legării de proteine a acidului salicilic prin metoda dializei de echilibru.

Generalități

Răspunsul terapeutic dorit al unei substanțe medicamentoase se obține ca urmare a interacțiunii acestuia cu situs-ul receptor specific. În calea spre receptorul respectiv substanța medicamentoasă se poate lega de alți constituenți ai sistemului biologic, cum ar fi proteinele plasmatică (de exemplu, albumina, lipoproteinele cu densitate mare și globulinele. Se vor forma complecși care nu pot traversa membranele biologice. Frația substanței medicamentoase nelegată de proteinele din plasmă/ser este disponibilă pentru legarea la un anumit situs. Natura și gradul de interacțiune a substanței medicamentoase cu proteinele influențează în mod semnificativ activitatea biologică a unei substanțe medicamentoase prin influența asupra farmacocineticii și a performanței farmacodinamice.

Fixarea substanței medicamentoase pentru transport se produce cu predilecție pe albumine. Ele reprezintă singurele lanțuri peptidice cu o suprafață de contact mare comparativ cu celelalte proteine sanguine. Teoretic, fiecare moleculă poate transporta cca. 100 sarcini

negative sau pozitive. Substanța medicamentoasă se leagă la grupările formate din resturile aminoacide ale albuminelor, orientate la suprafață: R-COO⁻, R-O⁻, R-S⁻, R-NH³⁺.

Ele interacționează cu moleculele polare ale substanței medicamentoase din soluție. Doar substanța medicamentoasă nelegată trece prin membrane biologice.

Cantitatea de substanță medicamentoasă cuplată la proteinele plasmatică este în funcție de:

- concentrația substanței medicamentoase;
- afinitatea substanței pe locurile de cuplare;
- capacitatea până la saturație a acestor locuri.

Albuminele plasmatică oferă:

- a. mai multe locuri de cuplare pentru medicamente bazice;
- b. pentru cele acide legarea se face la nu mai mult de două locuri primare de cuplare (în general, numai la unul).

Influența cuplării substanței medicamentoase la proteine. O proporție variabilă, de multe ori însemnată de substanță medicamentoasă absorbită, poate cupla reversibil la proteinele plasmatică. Concentrația activă de substanță medicamentoasă este fracțiunea necuplată, deoarece aceasta poate să părăsească spațiul plasmatic și să atingă locul de acțiune. Între fracțiunea cuplată și cea liberă există un echilibru dinamic. Atunci când substanța liberă părăsește circulația, fracțiunea cuplată este pusă în libertate pentru restabilirea echilibrului. Cuplarea la proteine reduce viteza pierderii de substanță în plasmă, în măsura în care ea determină scăderea concentrației plasmatică a fracțiunii libere. Astfel, va determina scăderea gradientului de concentrație pe baza căruia se produce difuziunea medicamentului. Ca rezultat, pe de-o parte, se va reduce viteza de pierdere a substanței medicamentoase prin rinichi (deoarece doar fracțiunea liberă este filtrată), iar, pe de-altă parte, substanța medicamentoasă este excretată activ și cuplarea la proteine nu conferă protecție, (ex: penicilina este excretată aproape în totalitate în primul pasaj renal). Consecința practică a cuplării la proteinele plasmatică

este că toxicitatea și efectul substanței medicamentoase care cuplează într-o proporție mare la proteine se intensifică mult în cazul hipoproteinemiei. Concentrația fracțiunii libere a substanței medicamentoase cuplate în proporție mare poate fi mărită atunci când se administrează o substanță medicamentoasă cu afinitate mai mare pentru aceleași *situs*-uri de cuplare. Cuplarea substanței medicamentoase în circulația sangvină se face cel mai frecvent la albuminele plasmatiche, dar mai poate avea loc la elementele figurate și la glicoproteinele α -1 acide.

Estimarea concentrației fracțiunii libere și a concentrației totale este ușor realizabilă experimental unde concentrația totală a substanței medicamentoase este mărită progresiv. Studiile de acest tip oferă informații despre numărul *situs*-urilor de cuplare ale unei molecule de albumină și despre valoarea constantei afinității de cuplare. Acest lucru este important când se caută aflarea dozei potrivite a unei substanțe medicamentoase antimicrobiene.

O substanță medicamentoasă din organism poate interacționa cu mai multe componente ale țesutului, dintre care două categorii majore sunt sângele și țesuturile extravasculare. Proteinele, în special, sunt responsabile pentru o astfel de interacțiune. Procesul formării complexilor cu proteinele se numește legarea de proteine a unei substanțe medicamentoase. Importanța unei astfel de legări derivă din faptul că substanța medicamentoasă legată este atât farmacocinetic cât și farmacodinamic inertă. Legarea substanței medicamentoase de proteine implică, în general, legături chimice slabe, cum ar fi legăturile de hidrogen, legăturile ionice sau Van der Waals și, prin urmare, este un proces reversibil.

Saturarea capacității de legare a proteinelor plasmatiche și creșterea fracțiunii libere duce la metabolizarea și eliminarea mai rapidă a substanțelor medicamentoase, ajungându-se la un echilibru între cele două fracțiuni.

Stările de hipoproteinemie și alterările raportului albumine-globuline au ca rezultat:

- saturația mai rapidă a capacității de cuplare;
- creșterea masivă a fracțiunii libere;
- pericolul efectelor secundare sau al unor intoxicații.

La nou-născuți concentrația proteinelor plasmatică este scăzută. Din această cauză fracțiunea liberă a substanței medicamentoase este mai mare decât la adulți, ceea ce explică sensibilitatea la această vârstă și pericolul intoxicațiilor.

Legarea unei substanțe medicamentoase de proteine ce se conțin în organism influențează acțiunea lor în mai multe moduri:

1. proteina poate facilita distribuția unei substanțe medicamentoase pe tot corpul;
2. poate inactiva substanța medicamentoasă prin faptul că nu permite dezvoltarea unei concentrații suficiente de substanță medicamentoasă liberă la locul receptorului;
3. poate întârzia excreția unei substanțe medicamentoase.

Interacțiunea unei substanțe medicamentoase cu proteine poate provoca:

- a) deplasarea hormonilor corporali sau a unui agent administrat concomitent;
- b) modificarea configurațională a proteinei;
- c) formarea unui complex de substanțe medicamentoase legate de proteine care sunt active biologic.

Metode pentru studiul legării substanțelor medicamentoase de proteine

Sunt disponibile numeroase metode pentru studierea legării substanțelor medicamentoase de proteine. În afară de criteriile generale pentru orice tehnică analitică, ele nu trebuie să suprimă echilibrul dintre substanța medicamentoasă liberă și cea legată.

Dializa de echilibru, dializa dinamică, ultrafiltrarea și electroforeza sunt tehnicile clasice folosite pe scară largă pentru a studia legarea proteinelor. În ultimii ani alte metode, cum ar fi filtrarea pe gel și rezonanța magnetică nucleară, au prezentat rezultate satisfăcătoare, toate având avantaje și dezavantaje proprii.

Modificări spectrale

Majoritatea substanțelor medicamentoase au absorbție distinctă în UV datorită cromoforilor conjugați din moleculă. Atunci când substanța medicamentoasă interacționează cu o proteină, spectrul UV sau vizibil poate fi schimbat din cauza modificărilor în configurația electronică. Aceste modificări pot fi cuantificate și utilizate pentru a determina gradul de legare. Schimbările în spectrul de fluorescență pot fi utilizate în același mod.

Dializă de echilibru

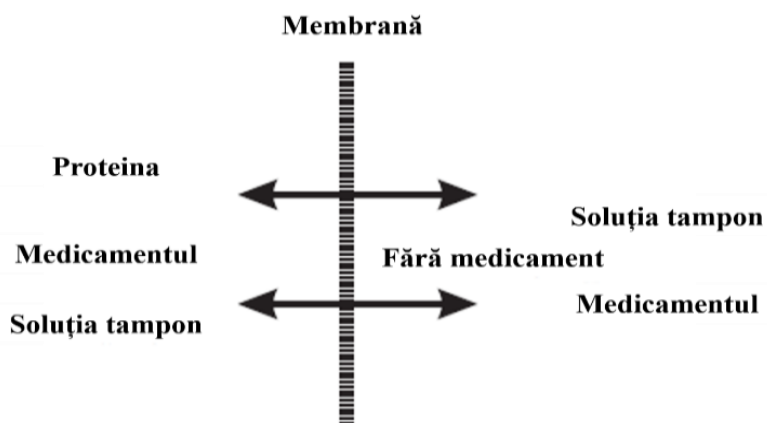


Figura 11.1. Echilibru pe o membrană semipermeabilă

Soluția proteică (de exemplu, plasmă), care conține substanță medicamentoasă, și o soluție tampon sunt plasate pe părțile opuse ale unei membrane de dializă. După o perioadă suficientă de timp (poate fi de 12-24 h), concentrația SM libere va fi aceeași pe ambele părți ale membranei. Legarea SM de proteine poate fi determinată prin măsurarea concentrației SM pe fiecare parte a membranei. În partea stângă concentrația va implica consumul de SM liberă și legată, în timp ce în partea dreaptă nu există legarea de proteine și concentrația va fi egală cu concentrația liberă de SM.

Ultrafiltrarea

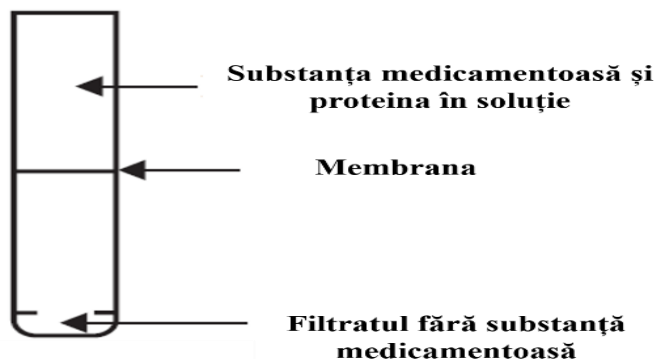


Figura 11.2. Ultrafiltrarea ca metodă de măsurare a legării substanței medicamentoase de proteine

O metodă mai rapidă de separare a substanței medicamentoase libere și legate este metoda de ultrafiltrare. Soluțiile de substanță medicamentoasă și proteine sunt plasate pe o membrană de filtrare, iar lichidul conținând substanță medicamentoasă liberă este forțat să treacă prin membrană la centrifugare.

Dializă dinamică

Una dintre metodele utilizate pe scară largă pentru studierea legării proteinelor *in vitro* a substanței medicamentoase este dializa dinamică. Dializa dinamică utilizează dinamica fluxului pentru a mări viteza și eficiența dializei. Dializa creează cel mai înalt grad de concentrație posibil, care ar reduce în mod semnificativ timpul de dializă. Alt avantaj al acțiunii de separare este acela că împiedică impurificarea membranei și, în anumite situații, generează o diferență de presiune. Această forță de antrenare suplimentară mărește viteza de transfer a masei hipo-osmotice prin membrana semipermeabilă și permite concentrarea probei în timpul procesului de dializă.

Principiul metodei de dializă la echilibru

Tubul A conține numai acid salicilic (AS) fără proteine. Echilibrul acidului salicilic în tubul A și în paharul de laborator este obținut datorită membranei semipermeabile și astfel se poate măsura

concentrația acidului salicilic în paharul de laborator. Tubul B conține acid salicilic în prezența proteinelor (albumină de ouă de 0,5 mL) și, prin urmare, are loc legarea de proteine (albumina) a acidului salicilic. Acest lucru permite numai acidul salicilic liber rămas după legarea de proteine să se transfere prin membrana semipermeabilă, ceea ce reduce concentrația de acid salicilic în paharul de laborator. Reducerea concentrației de acid salicilic are loc cel mai mult în tubul C din cauza prezenței crescute a proteinei (1 mL de albumină din ouă). Aceasta crește legarea de proteine a acidului salicilic, reducând astfel concentrația acidului salicilic liber în tubul C și în pahar.

Acidul salicilic prezent în paharul de laborator (compartimentul fără proteine) este determinat prin adăugarea soluției de nitrat de Fe(III). Reacția acidului salicilic cu nitratul de Fe (III) produce un complex intens colorat, a cărui absorbție maximă poate fi detectată spectrofotometric la $\lambda = 540 \text{ nm}$.

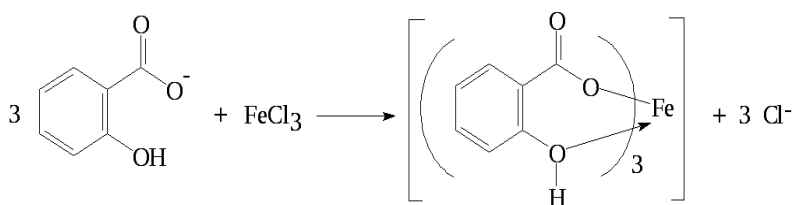


Figura 11.3 Mecanismul de interacțiune a acidului salicilic cu clorura de Fe (III)

Prerechizite

1. Conceptul de legare a SM de proteine.
2. Semnificația legării SM de proteine.

Materiale și reagenți:

1. **Reagenți chimici:** acid salicilic, nitrat de Fe (III), acid clorhidric, clorură de mercur.
2. **Echipamente:** spectrofotometru UV-VIS, balanță analitică, agitator magnetic și aparat pentru dializă la echilibru.
3. **Veselă chimică:** eprubete de 20 mL, pipete gradate de 2, 5 și 10

mL, cilindru de 50 mL, baloane cotate de 25, 100 mL, etc.

- 4. Materiale:** albumină din ou, membrană de celofan sau membrană naturală.

Modul de lucru:

Curba de etalonare pentru acidul salicilic

- 1. Prepararea agentului colorant:** se dizolvă clorura de mercur (4 g) în aproximativ o cincime din volumul de apă. Se dizolvă separat azotatul de Fe (III) (4 g) în 0,12M HCl (12 mL). Se amestecă cele două soluții și se ajustează volumul la 100 mL, se filtrează și filtratul se folosește ca agent colorant.
- 2. Prepararea soluției standard (stoc):** se cântărește exact 100 mg de acid salicilic (mai bine salicilat de sodiu). Se dizolvă în 100 mL de apă distilată utilizând 5 mL de alcool etilic. Se iau 10 mL din această soluție și se diluează până la cotă cu apă distilată în volumul de 50 mL.
- 3. Prepararea soluției de lucru:** din soluția stoc se prelevează 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 și 2,5 mL și se trec în baloane cotate de 25 mL, se adaugă 10 mL agent de colorare, iar soluția rezultată se aduce la cotă cu apă distilată pentru a se obține concentrația în intervalul 2-10 $\mu\text{g/mL}$.
- 4. Măsurarea absorbantei:** se înregistrează absorbanta soluției de lucru la $\lambda = 540 \text{ nm}$, utilizând spectrofotometrul UV-VIS, iar soluția de comparație este apa distilată. Se trasează un grafic al dependenței absorbției funcție de concentrația de acid salicilic și se determină panta și segmentul intersectat pe ordonată (intercepta).

Studiul experimental de legare a SM de proteine

1. Se iau trei tuburi goale și se marchează ca A, B și C.
2. Într-un capăt se leagă o membrană semipermeabilă în așa fel încât să se formeze un sac.
3. În tubul A se introduce 1 mL de acid salicilic de 1% și 1 mL de apă distilată.

4. În tubul B se introduce 1 mL de acid salicilic de 1%, 0,5 mL de albumină din ou și 0,5 mL de apă.
5. În tubul C se introduce 1 mL de acid salicilic 1% și 1 mL de albumină din ou.
6. Fiecare tub se amplacează într-o cantitate de 50 mL de apă distilată și se pipetează 5 mL de eșantion din paharul de laborator la intervale de 15, 30, 45, 60, 75 și 90 de minute. Se înlocuiește lichidul cu 5 mL de apă distilată în paharul de laborator.
7. Se determină absorbanta $\lambda = 540$ nm probelor selectate după adăugarea a 4 mL de agent colorant și 1 mL de apă distilată, la eșantionul prelevat.
8. Se trasează curbele comparative ale cantității de acid salicilic prezent în compartimentul fără proteină în funcție de timp.

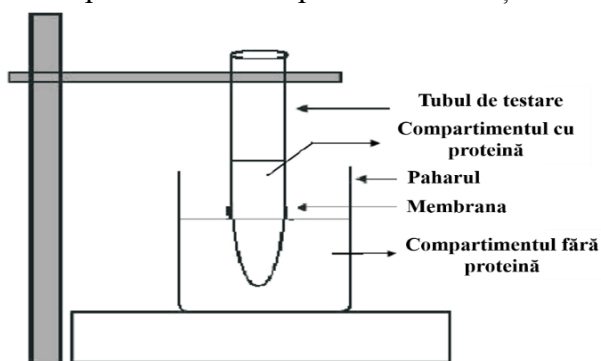


Figura 11.4. Schema dializei la echilibru

Rezultate și discuții

Tabelul 11.1. Date experimentale pentru curba de etalonare

Concentrația ac.salicilic, $\mu\text{g/mL}$	Absorbanta, $\lambda = 540$ nm
2	
4	
6	
8	
10	
Parametrul	Valoarea
Panta	
Intercepta	

Tabelul 11.2. Procentul de eliberare cumulativă a substanței medicamentoase prin membrană în funcție de timp

Timp, min	Procentul de eliberare cumulativă a substanței medicamentoase		
	Tubul A	Tubul B	Tubul C
15			
30			
45			
60			
75			
90			

Calculare

A. Determinarea concentrației necunoscute a acidului salicilic

Se determină concentrația necunoscută de acid salicilic din compartimentul receptorului utilizând următoarea ecuație:

$$y = mx + c$$

unde: Y - absorbția, m - panta, x - concentrația, c - segmentul intercepta.

B. Cantitatea de substanță medicamentoasă difuzată (mg)

Cantitatea de substanță medicamentoasă difuzată = [concentrația ($\mu\text{g/mL}$) \cdot (volumul mediului de difuzare) \cdot (factor de diluție)] / 1000

C. Factor de diluare. Factor de diluare = volumul probei diluate (mL)/volumul eșantionului eliminat (mL)

D. Procentul de eliberare cumulativă a substanței medicamentoase

Procentul de eliberare cumulativă a substanței medicamentoase = (cantitatea de substanță medicamentoasă difuzată \cdot 100)/ cantitatea totală din doză

Rezultat. S-a constatat că procentual de acid salicilic eliberat în tubul fără proteine a fost _____, cu 0,5 mL de albumină din ou _____ și cu 1 mL de albumină din ou a fost _____.

Deduceți concluzii

Aplicare

1. Poate fi folosit pentru studierea legării de proteine a diferitor substanțe medicamentoase.

2. Metoda dializei de echilibru este un procedeu neinvaziv pentru studierea legării SM de proteine.

Sarcini pentru evaluare și autoevaluare

1. Explicați procesul de legare a acidului salicilic de proteine.
2. Dați semnificația clinică a legării SM de proteine.
3. Explicați ce formă a SM este activă și influențează performanța farmacodinamică.
4. Descrieți tipul de legături chimice ce se formează la legarea SM de proteinele plasmatiche.
5. Descrieți ce proteine plasmatiche oferă mai multe locuri de cuplare.

Exercițiu. Studiați legarea clorhidratului de ranitidină la proteină utilizând metoda dializei de echilibru.

CAPITOLUL 4. FARMACOCINETICA SUBSTANȚELOR MEDICAMENTOASE

Lucrarea de laborator Nr. 12.

Modelarea eliminării plasmatică după o perfuzie de bolus intravenos

Scopul lucrării: investigarea unui proces de eliminare plasmatică a substanței medicamentoase prin simularea datelor în timpul perfuziei și după perfuzie.

Obiective

1. Determinarea diferitor parametri farmacocinetici: volumul aparent de distribuție, timpul de înjumătățire, constanta vitezei de eliminare și clearance-ul.
2. Determinarea parametrilor farmacocinetici din date plasmatică sau urinare.
3. Calcularea parametrilor farmacocinetici după administrarea unei doze de bolus intravenos (IV) de substanță medicamentoasă.

Generalități

La administrarea unei doze de substanță medicamentoasă sub formă de bolus intravenos (IV), concentrația terapeutică dorită este atinsă imediat. Totuși, acest mod de administrare este nepotrivit atunci, când este necesar să se mențină concentrații plasmatică sau tisulare pentru o perioadă prelungită. Aici se urmărește atingerea intervalului terapeutic și apoi menținerea concentrației de substanță medicamentoasă în intervalul dat pe o durată mai lungă. Este o practică obișnuită pentru a perfuza o substanță medicamentoasă la o viteză constantă (introducerea SM cu viteză constantă sau introducerea printr-un proces de ordinul zero). Această metodă permite administrarea precisă și ușor controlabilă a substanței medicamentoase.

Viteza de perfuzie a unei substanțe medicamentoase este

controlată de debitul și concentrația medicamentului în soluție. Curgerea este controlată prin reglarea înălțimii unui flacon de perfuzie sau prin reglarea dimensiunii deschiderii tubului care conectează flaconul de acul de perfuzie. Când se dorește o mai mare precizie și control al administrării substanței medicamentoase, se utilizează o pompă de perfuzie. Substanța medicamentoasă este monitorizată în sânge în două condiții:

1. în timpul perfuziei (în timp ce substanța medicamentoasă este perfuzată);
2. în perioada post-perfuzie (după încetarea perfuziei).

În figura 12.1 se prezintă schema instalației pentru determinarea modificărilor concentrației substanței medicamentoase în țesutul corporal sau în sânge la perfuzie constantă. În lucrarea dată se vor lua în considerare mai întâi problemele privind prelevarea probelor în timpul perfuziei și apoi cele privind monitorizarea concentrației substanței medicamentoase după oprirea perfuziei.

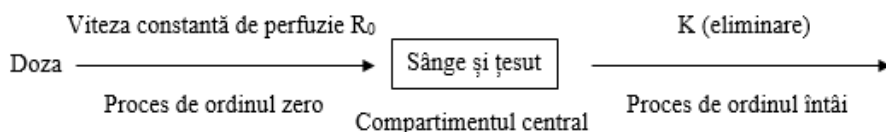


Figura 12.1. Schema de determinare a modificărilor concentrației substanței medicamentoase în organism sau în sânge la perfuzie constantă

Deoarece substanța medicamentoasă este monitorizată în sânge, modificarea cantității de substanță medicamentoasă în sânge/ corp (dX/dt) pentru configurarea de mai sus va fi:

$$\frac{dA}{dt} = R_0 - K \cdot A \quad (12.1)$$

unde: dA/dt - viteza de modificare a cantității de substanță medicamentoasă din organism; R_0 - constantă vitezei de perfuzie; $K \cdot A$ - viteza procesului de eliminare de ordinul întâi. La integrare, rezultă ecuația 12.2:

$$A = \frac{R_0}{K} \cdot (1 - e^{-K \cdot t}) \quad (12.2)$$

Ecuția (12.2) indică faptul că cantitatea de substanță medicamentoasă din organism crește asimptotic în timp. Deoarece se măsoară concentrația și nu cantitatea de substanță medicamentoasă, putem înlocui ecuația $C = A/V$ (sau $A = V \cdot C$) în ecuația (12.2) pentru a obține:

$$C = \frac{R_0}{K \cdot V} (1 - e^{-K \cdot t}) \quad (12.3)$$

unde: C - concentrația plasmatică (sau serică) a substanței medicamentoase la momentul t ; V - volumul aparent de distribuție; K - constanta vitezei de eliminare; iar $K \cdot V$ este clearance-ul sistemic (Cl).

$$C = \frac{R_0}{Cl} \cdot (1 - e^{-K \cdot t}) \quad (12.4)$$

Constanta vitezei de eliminare de ordinul întâi și timpul de înjumătățire prin eliminare pot fi calculate dintr-un grafic semilogaritm construit în baza datelor privind variația concentrației post-perfuzie în timp, așa cum este prezentat în figura 12.2.

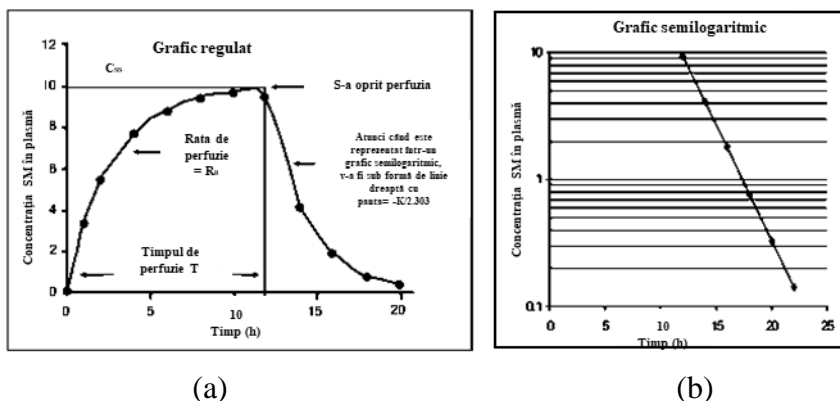


Figura 12.2. Graficul regulat (a) și semilogaritm (b) al concentrației plasmatice în funcție de profilul timpului prin perfuzie cu viteză constantă

La începutul perfuziei cu viteză constantă, cantitatea de substanță medicamentoasă din organism este zero. Pe măsură ce trece timpul, cantitatea de substanță medicamentoasă din organism crește

treptat până la un nivel, după care viteza de eliminare este egală cu viteza de perfuzie, adică concentrația substanței medicamentoase în plasmă se apropie de o valoare constantă numită stare de echilibru.

La starea de echilibru, modificarea cantității de substanță medicamentoasă din organism este egală cu zero, prin urmare, ecuația (12.1) devine:

$$(0) = R_0 - K \cdot A_{ss}, \quad R_0 = K \cdot A_{ss}, \quad A_{ss} = \frac{R_0}{K} \quad (12.5)$$

Se transformă în termeni de concentrație și se rearanjează ecuația:

$$C_{ss} = \frac{R_0}{K \cdot V} = \frac{R_0}{Cl} \quad (12.6)$$

Unde A_{ss} și C_{ss} sunt cantitatea de substanță medicamentoasă în organism și, respectiv, concentrația de substanță medicamentoasă în plasmă la starea de echilibru. Valoarea lui K poate fi obținută din panta dreptei obținute din graficul semilogaritm (lg C funcție de t) a datelor privind variația concentrației plasmatice în timp, colectate din momentul în care perfuzia este oprită.

Principiul metodei

Printr-un aranjament de pahare și un rezervor de apă cu presiune constantă este posibil să se simuleze concentrațiile plasmatice după perfuzia IV cu viteză constantă (a se vedea figura 12.2). Fluxul constant de apă prin sistem determină o diluare a markerului, permanganatului de potasiu, în timp ce infuzia de permanganat de potasiu la viteză constantă în compartimentul pentru plasmă are loc după un proces de ordinul zero. Probele din compartimentul pentru plasmă pot fi extrase la intervale prestabilite de timp, iar concentrația probelor poate fi determinată spectrofotometric. Din graficul semilogaritm al datelor privind dependența concentrației post-perfuzie în funcție de timp se va determina constanta vitezei de eliminare (K) și timpul de înjumătățire ($t_{1/2}$). Concentrația probei, în momentul în care perfuzia este oprită, este considerată concentrație la starea de echilibru (C_{ss}). Se pot calcula diferiți parametri folosind diverse formule discutate în partea teoretică.

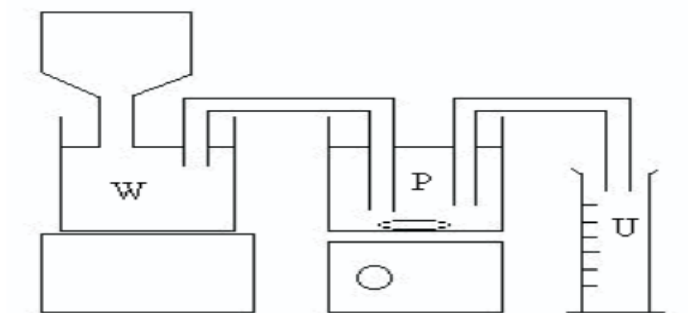


Figura 12.3. Schema instalației pentru simularea perfuziei de bolus intravenos cu viteză constantă

P - compartiment pentru plasma, W - apă, U - urină

Mod de lucru

1. Se prepară soluție de $100 \mu\text{g/mL}$ de permanganat de potasiu în apă distilată (soluția stoc). Se pregătește în continuare, în baloane cotate de 25 mL, soluțiile de lucru cu concentrațiile de 10, 20, 40, 60, 80 și $100 \mu\text{g/mL}$ din soluția stoc. Se măsoară absorbanta fiecărei soluții la $\lambda = 540 \text{ nm}$. Se utilizează apă distilată ca proba martor. Se construiește curba de etalonare și se înregistrează intercepta și panta.
2. Se identifică și se marchează în instalație compartimentul pentru plasmă (P). Se asigură că rezervorul de apă este plin.
3. Se pornește agitatorul la paharul pentru plasmă și se ajustează pentru o amestecare blândă. Se stabilește un debit de 20 mL/min . (se admite între 15 și 25 mL/min).
4. Se colectează probe de plasmă din compartimentul pentru plasmă la 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 și 60 min după pornirea perfuziei. Se aranjează și se etichetează eprubete pentru fiecare probă.
5. O persoană din grup trebuie să aibă responsabilitatea de a supraveghea activitatea pompei de injecție. Această persoană ar trebui să ia 15 picături de soluție saturată de permanganat de potasiu și să „injecțeze” o picătură pe minut în compartimentul pentru plasmă, până când va fi introdusă doza completă.
6. Se înregistrează acest timp t (min). Viteza de perfuzie este de $250/t$

(16,66 mg/min).

7. Se colectează cu pipeta 5 mL probă de plasmă din compartimentul pentru plasmă la momentele indicate. Nu se clătește pipeta între prelevări.
8. Fiecare probă va fi analizată spectrofotometric la $\lambda = 540$ nm. E posibil ca probele timpurii să necesite o diluție pentru a obține absorbanta sub o unitate. Se aplică acest factor de diluție în analiza rezultatelor.
9. Se trasează dependența grafică a datelor concentrației plasmatice (C) după perfuzie în funcție de timp (t) în formă grafică semilogaritmică și se determină panta.
10. Se determină concentrația substanței medicamentoase la starea de echilibru (C).
11. Se determină volumul aparent de distribuție (V_d):
 - a) Viteza de perfuzie $R_0 = 16,66$ mg/mL;
 - b) $C_{15} = C_{ss} = \underline{\hspace{2cm}}$

Tabelul 12.1. Dependența concentrației permanganatului de potasiu în compartimentul plasmatic în funcție de timp

Timpul, min	Factorul de diluție	Absorbanta $\lambda = 540$ nm	Concentrația, mg/L
0			
5			
10			
15			
20			
25			
30			
45			
60			

Calculare

1. Constanta vitezei de eliminare

Se determină panta graficului datelor post-perfuzie ale concentrației (C) în funcție de timp (t). Se calculează constanta vitezei de eliminare prin utilizarea pantei drepte.

$$\text{Panta} = \frac{-K}{2,303} = \frac{\lg C_2 - \lg C_1}{t_2 - t_1} \quad (12.7)$$

2. Timpul de înjumătățire

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{K} \quad (12.8)$$

3. Concentrația la starea de echilibru (C_{ss})

Se ia în considerare concentrația de permanganat de potasiu în compartimentul plasmatic la momentul opririi perfuziei C_{ss} (aici C_{ss} este concentrația la 15 min, deoarece perfuzia a fost oprită la 15 min).

4. Volumul de distribuție

Volumul de distribuție poate fi determinat folosind următoarea formulă:

$$C_{ss} = \frac{R_0}{K \cdot V} \quad (12.9)$$

unde
$$V = \frac{R_0}{K \cdot C_{ss}} \quad (12.10)$$

5. Clearance-ul

Clearance-ul se determină folosind următoarea formulă:

$$Cl = \frac{R_0}{C_{ss}} \quad (12.11)$$

Rezultate

Diferiți parametri farmacocinetici obținuți din datele la simularea perfuziei plasmatice ale permanganatului de potasiu sunt prezentate în tabelul 12.2.

Tabelul 12.2. Datele experimentale ale parametrilor farmacocinetici obținuți la simularea perfuziei plasmatice

Nr.	Parametrul farmacocinetic	Datele pentru parametrii farmacocinetici la perfuzia plasmatică
1	Concentrația la echilibru	
2	Constanta vitezei de eliminare	
3	Timpul de înjumătățire	
4	Volumul de distribuție	
5	Clearance-ul	

Deduceți concluzii

Aplicații

1. Utilizarea metodei neinvazive de determinare a parametrilor farmacocinetici.
2. Este posibilă simularea procesului de eliminare a SM după ordinul întâi în timpul și după o perfuzie IV.

Sarcini de evaluare și autoevaluare

1. Definiți noțiunea de concentrație la starea de echilibru.
2. Explicați reacțiile de ordinul zero și de ordinul unu.
3. Indicați maximul de absorbție al KMnO_4 .
4. Explicați metoda de determinare a constantei vitezei de eliminare a SM.
5. Explicați ce este clearance-ul și cum se calculează.
6. Explicați metoda de calcul pentru V_d a SM.

Exerciții

Concentrația plasmatică a unui medicament în timpul și după o perfuzie constantă (40 mg/h) timp de 12 h este dată în următorul tabel:

Timpul, h	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Concentrația, mg/L	3,3	5,4	7,6	8,7	9,3	9,6	9,5	4,1	1,8	0,76	0,33	0,14

Se calculează concentrația la starea de echilibru a substanței medicamentoase, constanta vitezei de eliminare, timpul de înjumătățire prin eliminare, volumul de distribuție și clearance-ul.

Lucrarea de laborator Nr. 13.

Simularea eliminării plasmatice și a excreției urinare de SM după o doză de bolus intravenos

Scopul lucrării: investigarea unui proces de ordinul întâi prin simularea eliminării plasmatice și a excreției urinare după o doză de bolus (IV).

Obiective

1. Studiul diferitor parametri farmacocinetici: volumul aparent de distribuție, timpul de înjumătățire, constanta vitezei de eliminare și clearance-ul.
2. Determinarea parametrilor farmacocinetici din datele de analiză plasmatică sau urinară.
3. Calculul parametrilor farmacocinetici după administrarea unei doze de bolus intravenos (IV).

Generalități

Atunci când o substanță medicamentoasă este administrată sub formă de injecție a unei soluții sterile, trebuie luate în considerare câteva aspecte importante:

1. calea de administrare IV asigură pătrunderea completă a dozei în circulația generală;
2. concentrația dorită de substanță medicamentoasă în sânge este atinsă rapid;
3. dozele trebuie calculate foarte atent din cauza pericolului de efecte adverse sau toxice.

Modelul farmacocinetic ca un compartiment deschis reprezintă organismul ca o singură unitate cinetic omogenă, care nu are nicio barieră în transportul substanței medicamentoase. De asemenea,

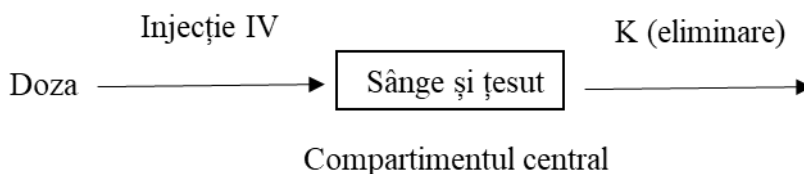
echilibrul final de distribuție între substanța medicamentoasă din plasmă și alte fluide corporale este atins instantaneu și menținut tot timpul. Acest model se aplică doar substanțelor medicamentoase care se distribuie rapid. Concentrația plasmatică a substanței medicamentoase este reprezentativă pentru concentrația tuturor țesuturilor corpului. Termenul *deschis* indică că intrarea și ieșirea sunt unidirecționale.

Administrare sub formă de bolus intravenos (IV)

Când o substanță medicamentoasă, care se distribuie rapid în organism, este administrată sub formă de bolus (IV), este nevoie aproximativ de la 1 minut până la 3 min pentru o circulație completă; prin urmare, rata de absorbție nu este luată în considerare la realizarea calculelor.

În urma administrării unei doze de bolus intravenos a unei substanțe medicamentoase, luând în considerare următoarele ipoteze, se pot obține parametrii farmacocinetici de bază ai unei substanțe medicamentoase:

- este operativ modelul cu un singur compartiment, procesul de ordinul întâi și difuzie pasivă;
- nu are loc metabolismul (se elimină 100% prin excreție renală);
- substanța medicamentoasă este monitorizată în sânge (plasmă/ser) și urină.



Ecuția diferențială pentru un proces de ordinul întâi poate fi redată prin ecuație (13.1):

$$\frac{dX}{dt} = -K \cdot X \quad (13.1)$$

unde dX/dt – viteza variației concentrației unei substanțe medicamentoase în timp.

Biofarmacia și farmacocinetica

Aplicând această ecuație la eliminarea substanței medicamentoase (cantității) din organism, obținem:

$$\frac{dA}{dt} = -K \cdot A \quad (13.2)$$

Forma integrată a ecuației (13.2) este dată de următoarea expresie:

$$A = A_0 \cdot e^{-K \cdot t} \quad (13.3)$$

$$\ln A = \ln A_0 - K \cdot t \quad (13.4)$$

$$\lg A = \lg A_0 - \frac{K \cdot t}{2,303} \quad (13.5)$$

unde A_0 – cantitatea nemodificată de substanță medicamentoasă din organism la momentul zero ($t=0$). În același timp, A_0 – doza de substanță medicamentoasă administrată intravenos. Atunci când substanța medicamentoasă este monitorizată în plasmă sau ser, concentrația (nu masa sau cantitatea) este determinată de ecuația (13.6).

$$\text{Concentrația (C)} = \frac{\text{cantitatea de SM (A), (mg, } \mu\text{g)}}{\text{unitatea de volum (V), (mL, L)}} = \frac{A}{V} \quad (13.6)$$

Împărțind ecuația (13.3) la volumul V, se obține:

$$\frac{A}{V} = \frac{A_0}{V} e^{-K \cdot t} \quad (13.7)$$

Înlocuind ecuația (13.6) ($A/V = C$), ecuația (13.7) poate fi scrisă ca ecuația (13.8):

$$C = C_0 \cdot e^{-K \cdot t} \quad (13.8)$$

$$\ln C = \ln C_0 - K \cdot t \quad (13.9)$$

$$\lg C = \lg C_0 - \frac{K \cdot t}{2,303} \quad (13.10)$$

Ecuația (13.10) poate fi reprezentată grafic așa cum se arată în

figura 13.1, din datele concentrației în funcție de timp în coordonate semilogaritmice (Fig. 13.1).

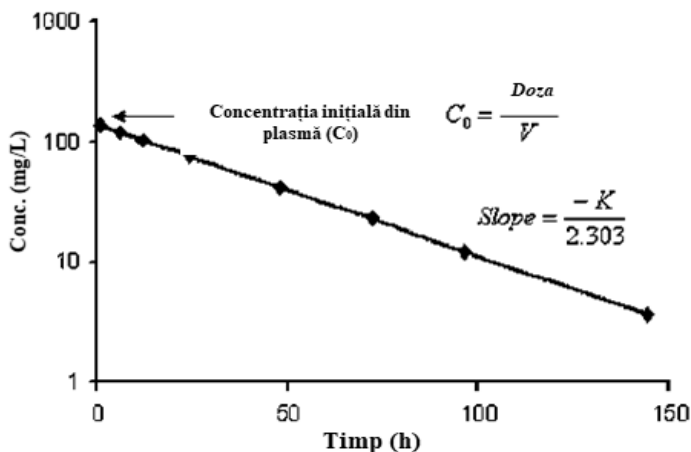


Figura 13.1. Graficul semilogaritm al dependenței concentrației plasmatice a unei substanțe medicamentoase în funcție de timp, după doza de bolus (IV)

Parametri farmacocinetici importanți

1. Timpul de înjumătățire ($t_{1/2}$)

Timpul de înjumătățire prin eliminare uneori este numit „timp de înjumătățire biologic” al unei substanțe medicamentoase. După administrarea unei doze, timpul de înjumătățire prin eliminare poate fi definit ca timpul la care echilibrul a fost stabilit și cantitatea de substanță medicamentoasă nemodificată reprezintă jumătate (50%) din cantitatea inițială de substanță medicamentoasă. Timpul de înjumătățire poate fi calculat din următoarea ecuație:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{K} \quad (13.11)$$

Alternativ, timpul de înjumătățire prin eliminare poate fi obținut din graficul semilogaritm al dependenței concentrației plasmatice date, în funcție de timp, așa cum este descris în figura 13.2. Se alege oricare două valori ale concentrației (citiți de pe axa Y a

graficului concentrația în funcție de timp) care sunt la jumătate una față de cealaltă (adică 100 și 200 $\mu\text{g/mL}$) și valorile de timp corespunzătoare (de pe axa **X** a graficului). Diferența dintre cele două valori de timp reprezintă timpul de înjumătățire a substanței medicamentoase.

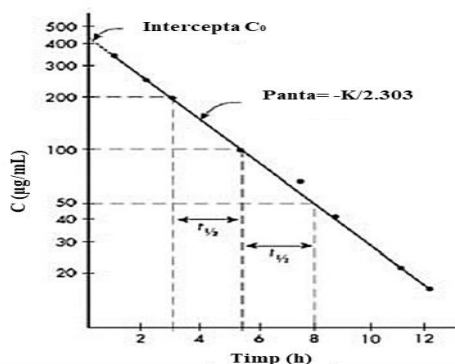


Figura 13.2. Graficul semilogaritm al dependenței concentrației plasmatice a SM în funcție de timp

2. Constanta vitezei de eliminare (K)

Constanta vitezei cu care substanța medicamentoasă se elimină din organism este cunoscută sub denumirea de constantă a vitezei de eliminare. Eliminarea sau excreția substanței medicamentoase din organism este suma excreției urinare, metabolismului, excreției biliare, excreției pulmonare etc. Astfel, constanta vitezei de eliminare este o mărime aditivă a tuturor constantelor de viteză. Constanta vitezei de eliminare totală poate fi calculată cu ajutorul următoarelor ecuații:

$$\text{Panta} = \frac{-K}{2,303} = \frac{\lg C_2 - \lg C_1}{t_2 - t_1} \quad (13.12)$$

$$K = \frac{0,693}{t_{1/2}} \quad (13.13)$$

3. Volumul aparent de distribuție (V_d)

În plasmă sau ser, de obicei, se determină concentrațiile (cantitatea de substanță medicamentoasă pe unitate de volum) și nu masa (mg). Prin urmare, este necesar un termen pentru a lega

concentrația măsurată (C) la un moment dat cu masa substanței medicamentoase (A) la acel moment. Acest termen este definit ca volumul aparent de distribuție (V_d) și este măsura gradului de distribuție a substanței medicamentoase în compartiment. Este definit ca volumul ipotetic de lichid corporal în care este dizolvată sau distribuită o substanță medicamentoasă.

De luat în considerare că volumul aparent de distribuție (V_d) este pur și simplu o constantă de proporționalitate al cărei scop este de a raporta concentrația plasmatică (C) și masa unui medicament (A) din organism la un moment dat. Nu este un volum fiziologic. Pentru a determina volumul aparent de distribuție a unei substanțe medicamentoase, este necesar să existe date privind concentrația plasmatică/serică în funcție de timp. Din ecuația (13.6), $C = A/V_d$, determinăm V_d :

$$V_d = \frac{A_t}{C_t} \quad (13.14)$$

unde: (A_t) - cantitatea de substanță medicamentoasă la timpul t ; V - volumul aparent de distribuție și (C_t) - concentrația plasmatică la timpul t . Dacă $t = 0$, ecuația (13.14) poate fi scrisă ca ec. (13.15):

$$V_d = \frac{A_0}{C_0} = \frac{\text{Doza}}{C_0} \quad (13.15)$$

unde: A_0 – doza administrată de medicament, (C_0) – concentrația plasmatică la momentul $t=0$.

Ecuația (13.15) permite determinarea volumului aparent de distribuție a unei substanțe medicamentoase din cunoscând concentrația inițială în plasmă sau ser (C_0) și doza administrată. Este important de reținut că volumul aparent de distribuție este o constantă pentru o anumită substanță medicamentoasă și este independentă de doza administrată și de calea de administrare a substanței medicamentoase.

4. Clearance-ul (Cl)

Clearance-ul este cel mai important parametru în aplicațiile clinice ale substanței medicamentoase și este important în evaluarea mecanismului prin care o substanță medicamentoasă este eliminată de

către întregul organism sau de către un anumit organ. Este definit ca volumul teoretic de lichid corporal ce conține substanța medicamentoasă și care este eliminat complet într-o perioadă dată de timp. Clearance-ul pentru o substanță medicamentoasă este constant dacă substanța medicamentoasă este eliminată prin cinetica de ordinul întâi. Din punct de vedere matematic, clearance-ul (L/hr) este produsul dintre constanta vitezei de eliminare de ordinul întâi (K) și volumul aparent de distribuție (V_d). Prin urmare:

$$\text{Clearance-ul} = \frac{\text{viteza de eliminare}}{\text{Concentrația plasmatică a SM}} = \frac{dA/dt}{C} \quad (13.16)$$

Înlocuind $dA/dt = K \cdot A$ în ecuația de mai sus, obținem:

$$Cl = \frac{K \cdot A}{C} \quad (13.17)$$

Deoarece $A/C = V_d$, ecuația (13.17) poate fi scrisă astfel:

$$Cl = K \cdot V_d \quad (13.18)$$

5. Aria totală de sub curbă

Aria totală de sub curbă (ASC) reprezintă aria totală integrată sub profilul nivelului plasmatic al concentrației în timp și exprimă cantitatea totală de substanță medicamentoasă care intră în circulația sanguină după administrare. Când o substanță medicamentoasă este administrată ca bolus (IV) și scăderea concentrației plasmatice extrapolate (C) este monoexponențială, ASC totală poate fi calculată prin împărțirea concentrației extrapolate (C) la timpul zero la constanta vitezei de eliminare a SM.

$$ASC = \frac{C_0}{K} \quad (13.19)$$

6. Calcularea constantei vitezei de eliminare (K) din datele de excreție urinară

Constanta vitezei de eliminare K poate fi calculată și din datele de excreție urinară folosind metoda vitezei de excreție. În acest calcul se presupune că viteza de excreție a substanței medicamentoase este de ordinul întâi. Termenul K_u este constanta vitezei de excreție renală

și A este cantitatea de medicament excretată în urină.

Acest proces poate fi descris cu următoarea ecuație diferențială:

$$\frac{dA_u}{dt} = K_u \cdot A \quad (13.20)$$

unde: dA_u/dt - viteza de excreție; A - cantitatea de substanță medicamentoasă din organism și K_u - constanta vitezei de excreție.

Înlocuind (A) din ecuația (13.3) în ecuația (13.20), se obține:

$$\frac{dA_u}{dt} = K_u \cdot A_0 \cdot e^{-Kt} \quad (13.21)$$

Forma logaritmică a ecuației (13.21) este următoarea:

$$\lg \frac{dA_u}{dt} = \lg(K_u \cdot A_0) - \frac{K \cdot t}{2,303} \quad (13.22)$$

Dacă reprezentăm în formă semilogaritmică dependența vitezei de excreție în funcție de timpul mediu (t^*), (Fig. 13.3), panta dreptei va permite determinarea constantei vitezei de eliminare (K); intercepta pe axa Y va reprezenta viteza inițială de excreție ($K_u \cdot A_0$). Astfel, cunoscând valoarea intercepției (mg/h) și doza administrată (mg), se poate determina constanta vitezei de excreție (K_u).

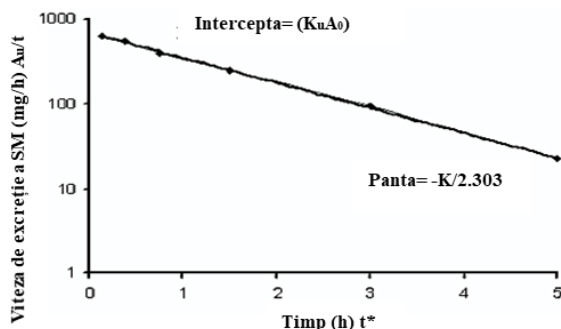


Figura 13.3. Grafic semilogaritmic al vitezei de excreție în dependență de timpul mediu t^*

În practică, ecuația (13.22) devine:

$$\lg \frac{dA_u^{t^*}}{dt} = \lg(K_u \cdot A_0) - \frac{K \cdot t^*}{2,303} \quad (13.23)$$

unde: $dA_u^{t^*}/dt$ - viteza medie de excreție; t^* - timpul mediu dintre colectarea urinei; K_u - constanta vitezei de excreție și A_0 - doza.

Ambele ecuații (13.22) și (13.23) sugerează că viteza de excreție

a unei substanțe medicamentoase scade monoexponențial cu timpul, așa cum se arată în figura 13.3. Timpul de înjumătățire prin eliminare ($t_{1/2}$), constanta vitezei de eliminare (K) și constanta vitezei de excreție (K_u) pot fi determinate din graficul semilogaritm al vitezei de excreție în dependență de timpul mediu t^* .

Principiul metodei

Printr-un aranjament de pahare și un rezervor de apă cu presiune constantă, este posibilă simularea concentrațiilor de substanță medicamentoasă în plasmă și în urină după administrarea de bolus IV. Fluxul constant de apă prin sistem, determină o diluție de ordinul întâi a markerului, permanganatului de potasiu. Concentrațiile markerului pot fi determinate spectrofotometric la $\lambda_{\max} = 540$ nm, prin prelevarea periodică a probelor de apă din compartimentul pentru plasmă (P) și din compartimentul (U) pentru urină. Parametrii farmacocinetici ai sistemului pot fi determinați prin analiză datelor obținute.

Din graficul dependenței concentrației plasmatice în funcție de timp reprezentat în formă semilogaritmă se pot determina următorii parametri: constanta vitezei de eliminare, timpul de înjumătățire prin eliminare, concentrația plasmată la momentul zero (C_0), volumul de distribuție, clearance-ul și aria de sub curbă.

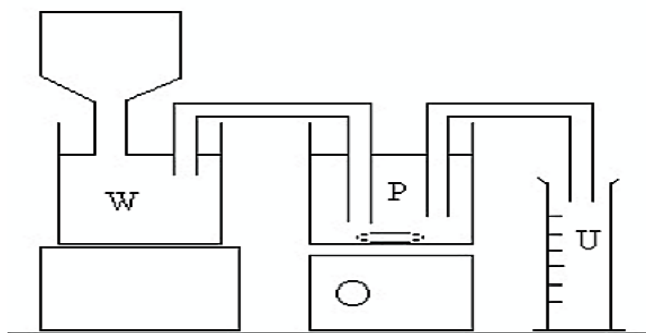


Figura 13.4. Schema instalației pentru simularea dozei de bolus (IV) pentru un model monocompartimental deschis

P - compartimentul pentru plasmă și U - compartimentul pentru urină, W - rezervorul de apă

Din graficul vitezei de excreție în funcție de timp, reprezentat în formă semilogaritmică, poate fi determinată constanta vitezei de excreție și timpul de înjumătățire prin eliminare, iar parametrii vitezei de eliminare sunt constanți.

Rechizite

1. Cunoașterea diferitor parametri farmacocinetici.
2. Cunoașterea teoretică a reacțiilor de ordinul întâi.

Materiale și reagenți chimici

1. **Veselă:** pahare (400 mL), cilindru de măsurare, pipete gradate (2, 5, 10 mL), pipetă Pasteur (5 mL), eprubete, baloane cotate (25, 100 mL).
2. **Reagenți chimici:** permanganat de potasiu.
3. **Echipamente:** spectrofotometru UV-VIS, balanță analitică, calculator, cronometru, agitator magnetic.

Mod de lucru

1. Se prepară soluție de 100 $\mu\text{g/mL}$ de permanganat de potasiu în apă distilată – soluția stoc. Din soluția stoc, în baloane cotate cu volumul de 25 mL se pregătesc soluțiile de lucru cu următoarele concentrații 10, 20, 40, 60, 80 și 100 $\mu\text{g/mL}$. Se măsoară absorbanta fiecărei soluții la 540 nm. Se utilizează apa distilată ca probă martor. Se trasează curba de etalonare utilizând MS Excel și se înregistrează intercepta și panta.
2. Se identifică și se marchează în instalație compartimentul pentru plasmă și urină. Se asigură că rezervorul de apă (W) e plin. Se pornește agitatorul din paharul pentru plasmă și se ajustează pentru o amestecare blândă. Se stabilește un debit de 20 (15-25) mL/min.
3. Se colectează probe de plasmă la 2,5, 7,5, 12,5, 17,5, 22,5, 27,5, 32,5, 37,5, 45 și 55 min și probe de urină la 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 și 60 min după administrarea dozei. Se aranjează și se etichetează eprubetele pentru fiecare mostră.
4. Se „injectează” în paharul pentru plasmă (P) o „doză” de

permanganat de potasiu (15 picături de soluție saturată sub formă de bolus), se pune un pahar gol (U) în poziția pentru a colecta proba de urină. Se utilizează apa distilată ca probă etalon. Se ia o probă de 5 mL folosind o pipetă Pasteur. Doza injectată poate fi determinată luând același volum ca și cel injectat în pahar, diluând până la 250 mL. și se măsoară absorbanta. O doză de aproximativ 15 picături (soluție de permanganat de potasiu saturat) ar trebui considerată egală cu 250 mg. Astfel, absorbanta măsurată corespunde soluției de un 1 mg/mL.

5. Se colectează cu pipeta 5 mL probă de plasmă la timpurile indicate. Nu se clătește pipeta între preluarea mostrelor.
6. La fiecare moment pentru colectarea urinei, se înlocuiește paharul cu un pahar gol. Se măsoară volumele colectate, se amestecă conținutul paharului pentru a obține o soluție omogenă și se ia o probă de 5 mL pentru analiză.
7. Se măsoară spectrofotometric fiecare probă la $\lambda = 540$ nm. Este posibil ca probele timpurii să necesite o diluție pentru a obține absorbanta sub o unitate. Se aplică acest factor de diluție în analiza rezultatelor.
8. Se trasează dependența grafică a concentrației plasmatice (C) în funcție de timp în forma semilogaritmică. Se calculează K din pantă și $t_{1/2}$ din K.
9. Se calculează volumul aparent de distribuție folosind C_0 și doza aplicată.
10. Se reprezintă grafic viteza de excreție (dA_u/dt) în funcție de timp (t^*) sub formă semilogaritmică și se calculează K.
11. Se reprezintă grafic viteza de excreție (dA_u/dt) față de C (concentrația plasmatică la mijlocul timpului de colectare a urinei). Se măsoară clearance-ul ca panta acestei linii.

Tabelul 13.1. Date pentru curba de etalonare

Concentrația, $\mu\text{g/mL}$	Absorbanta, $\lambda = 540$ nm
10	
20	
40	

Biofarmacia și farmacocinetica

60	
80	
100	
Parametru	Valoarea
Panta	
Intercepta	

Tabelul 13.2. Dependența concentrației permanganatului de potasiu în plasma în funcție de timp

Date plasmatice			
Timpul, min	Factorul de diluție	Absorbanța, $\lambda = 540 \text{ nm}$	Concentrația, mg/mL
2,5			
7,5			
12,5			
17,5			
22,5			
27,5			
32,5			
37,5			
45			
55			

Tabelul 13.3. Dependența concentrației permanganatului de potasiu în urină în funcție de timp

Intervalul de colectare a urinei, min	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35	35-40	40-50	50-60
Timpul (t), min	5	10	15	20	25	30	35	40	50	60
Intervalul de timp (dt)	5	5	5	5	5	5	5	5	10	10
Conc. în urină, mg/mL										
Volumul urinei										

Biofarmacia și farmacocinetica

colectate, mL										
Cantitatea de SM din urină (A_u), mg										
Suma cumulată excretată A_u , mg										
$\Delta A_u/dt$ (mg/h)										
t^* , punct de mijloc, min	2,5	7,5	12,5	17,5	22,5	27,5	32,5	37,5	45	55
C, punct de mijloc, mg/mL										

Calcule

1. Concentrația de permanganat de potasiu în plasmă și în urină

Se reprezintă graficul absorbantei în funcție de concentrația $KMnO_4$ și se determină panta și intercepta.

$$y = mx + c$$

unde: y - absorbantă, m - pantă, x - concentrația ($\mu g/mL$), c - intercepta.

2. Factorul de diluție

Factorul de diluție = volumul probei diluate (mL) / volumul probei îndepărtate (mL)

3. Timpul de înjumătățire prin eliminare ($t_{1/2}$)

Se trasează graficul concentrației plasmatice (C) în funcție de timp (t) în formă semilogaritmică și se determină prin metoda grafică timpul de înjumătățire. Alternativ, se reprezintă graficul vitezei de excreție (dA_u/dt) în funcție de timp (t^*) în formă semilogaritmică și se determină timpul de înjumătățire.

4. Constanta vitezei de eliminare (K)

Constanta vitezei de eliminare poate fi determinată folosind

următoarea formulă pentru datele plasmatice și urinare.

$$K = \frac{0,693}{t_{1/2}} \quad (13.24)$$

Alternativ, atât pentru datele plasmatice, cât și pentru cele urinare, se reprezintă graficele concentrației plasmatice C în funcție de timp (t) și viteza de excreție (dA_u/dt) în funcție de timp (t^*) în formă semilogaritmică și se determină panta liniei.

$$\text{Panta} = \frac{-K}{2,303} = \frac{\lg C_2 - \lg C_1}{t_2 - t_1} \quad (13.25)$$

(p/u datele plasmatice)

$$\text{Panta} = \frac{-K}{2,303} = \frac{\lg(A_u/t_2) - \lg(A_u/t_1)}{t_2^* - t_1^*} \quad (13.26)$$

(p/u datele urinare)

5. Concentrația plasmatică la timpul zero (C_0)

Concentrația plasmatică la momentul zero poate fi determinată prin extrapolarea inversă (adică, interceptarea axei Y) la scăderea concentrației plasmatice.

6. Volumul de distribuție (V_d)

$$V_d = \frac{A_0}{C_0} = \frac{\text{Doza}}{C_0} \quad (13.27)$$

7. Clearance (Cl)

Clearance-ul poate fi determinat folosind următoarea formulă:

$$Cl = K \cdot V_d \quad (13.28)$$

Se trasează graficul vitezei de excreție (dA_u/dt) față de C (concentrația plasmatică la mijlocul timpului de colectare a urinei). Se determină clearance-ul ca panta dreptei.

Aria de sub curbă

Se determină aria de sub curbă (ASC) utilizând următoarea formulă:

$$ASC = \frac{C_0}{K} (13.27) \quad (13.29)$$

8. Constanta vitezei de excreție (K_u)

Se determină intercepta pe axa Y din graficul semilogaritmic al vitezei de excreție (dA_u/dt) în funcție de timp (t^*).

$$\text{intercepta} = K_u \cdot A_0$$
$$K_u = \text{intercepta} / \text{doza}$$

Rezultate

Diferiții parametri farmacocinetici ai analizelor plasmatică și datele despre excreția urinară a permanganatului de potasiu se prezintă în tabelul 13.4.

Tabelul 13.4. Date pentru diferiți parametri farmacocinetici din analize plasmatică și urinare

Nr.	Parametru	Analize plasmatică	Analize urinare
1	Timpul de înjumătățire ($t_{1/2}$)		
2	Constanta de eliminare (K)		-
3	Constanta de excreție (K_u)	-	
4	Aria de sub curbă (ASC)		-
5	Volumul de distribuție (V_d)		-
6	Clarence-ul (Cl)		-

Deduceți concluzii

Aplicații

1. Metodă neinvazivă de determinare a parametrilor farmacocinetici în cazul când substanța medicamentoasă urmează cinetica reacțiilor de ordinul întâi.
2. Studiul farmacocinetic poate fi bine înțeles prin simularea procesului de ordinul întâi folosind aranjarea simplă a paharelor conform schemei din figura 13.4.
3. Pot fi estimați toți parametrii farmacocinetici prin generarea datelor din plasmă și urină din acest experiment.

Sarcini pentru evaluare și autoevaluare

1. Explicați metoda de calcul al concentrației de SM în plasmă.
2. Explicați metoda de calcul al volumului aparent de distribuție.
3. Descrieți semnificația volumului aparent de distribuție.

Biofarmacia și farmacocinetica

4. Determinați prin metoda grafică timpul de înjumătățire și constanta vitezei de eliminare.
5. Definiți noțiunea de clarence.
6. Explicați metoda de calcul al clarence-ului în baza volumului de distribuție.
7. Evaluați prin ce se deosebesc constanta vitezei de eliminare și constanta vitezei de excreție.

Exercițiu

Tabelul 13.5. Datele plasmatice și urinare obținute după o doză de bolus de 50 mg de substanță medicamentoasă

Datele plasmatice		Datele urinare		
Timpul, h	Concentrația, mg/L	Intervalul de timp pentru colectare, h	Volumul de urină, mL	Concentrația de medicament transferată în urină, mg/L
1H	2	0-2	120	133
3	1,13	2-4	180	50
5	0,70	4-6	89	63
7	0,43	6-8	340	10
10	0,20	8-12	178	18
18	0,025	12-24	950	2

Să se determine ASC, timpul de înjumătățire, constanta vitezei de eliminare, constanta vitezei de excreție și volumul de distribuție.

Lucrarea de laborator Nr.14. Calcularea diverșilor parametri farmacocinetici după injecția cu bolus intravenos

Scopul lucrării: calcularea diverșilor parametri farmacocinetici în funcție de datele obținute la analiza de sânge, după introducerea injecției de bolus intravenos (model moncompartimental).

Notă!

În medicină, un bolus (din latină: bolus, minge) este administrarea unei cantități discrete de medicație într-un anumit interval de timp, în general în intervalul 1-30 min, pentru a crește concentrația în sânge la o doză eficientă. Administrarea poate fi efectuată prin injecție: intravenos, intramuscular, subcutanat, prin inhalare cu doză sau oral.

Obiective

A înțelege calculul diferitor parametri farmacocinetici după administrarea unui bolus IV (intra-venos) într-un sistem monocompartimental cu cinetica de eliminare după ordinul întâi.

Date experimentale și sarcini

Datele concentrației plasmatice obținute după administrarea unei doze de bolus (IV) de 184 mg de **ceftriaxonă** (un antibiotic semisintetic din clasa cefalosporinelor) la un nou-născut sunt rezumate în tabelul 14.1.

Tabelul 14.1. Datele variației concentrației ceftriaxonei în funcție de timp

Timp, h	1	6	12	24	48	72	96	144
Conc., mg/L	137	120	103	76	42	23	12	4

1. În baza datelor din tabelul 14.1 se construiește un **grafic semilogaritmic** (<https://www.statology.org/semi-log-graph->

excel/) și se estimează timpul de înjumătățire a substanței medicamentoase.

2. Se estimează ASC-ul total.
3. Se calculează volumul de distribuție.
4. Se calculează clearance-ul total

Rezolvare

Notă! Dependența concentrației față de timp reprezintă o curbă, ceea ce face dificilă calcularea pantei și, prin urmare, se utilizează **graficul semilogaritmic**, care conferă liniaritate și face ușoară și precisă calcularea parametrilor farmacocinetici (a se consulta figura 14.1).

1. Construirea graficului semilogaritmic

- a. Se construiește graficul semilogaritmic, luând în considerare că datele de eliminare a SM urmează cinetica reacțiilor de ordinul întâi.
- b. Conform datelor oferite, se selectează numărul de cicluri în formă semilogaritmică.
- c. Se construiește graficul dependenței concentrației în funcție de timp.
- d. Se marchează concentrația pentru timpul respectiv pe graficul semilogaritmic.
- e. Se trasează o linie dreaptă până la axa **Y**, astfel încât să acopere maximum de puncte ale fazei de eliminare.
- f. Interceptarea pe axa **Y** este egală cu concentrația C_0 .
- g. Se determină panta liniei și se calculează constanta vitezei de eliminare.

2. Timpul de înjumătățire la eliminarea SM

- a. Pe axa **Y** aproape de faza de eliminare se selectează concentrația inițială ca $(C, 20)$. Din acel punct se trasează o linie dreaptă care intersectează linia grafică (a se consultă figura 14.2). Acest punct ar fi primul punct de intersecție. Din punctul intersectat se trasează linie dreaptă perpendiculară pe axa **X** și se obține timpul (t_1).
- b. Pe axa **Y** se trasează o a doua dreaptă din jumătatea concentrației

inițiale (C_0) care intersectează linia trasată. Acesta va fi al doilea punct de intersecție. Din acel punct se trasează perpendiculara pe axa X și se obține timpul (t_2).

c. Se calculează timpul de înjumătățire prin calcularea diferenței $t_2 - t_1$.

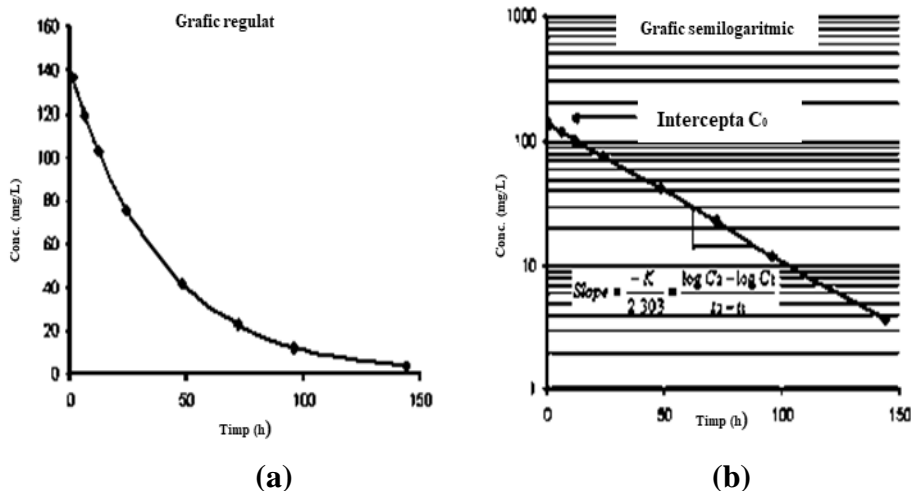


Figura 14.1. Grafic regulat (a) și semilogaritm (b) al dependenței concentrațiilor plasmatice în funcție de timp

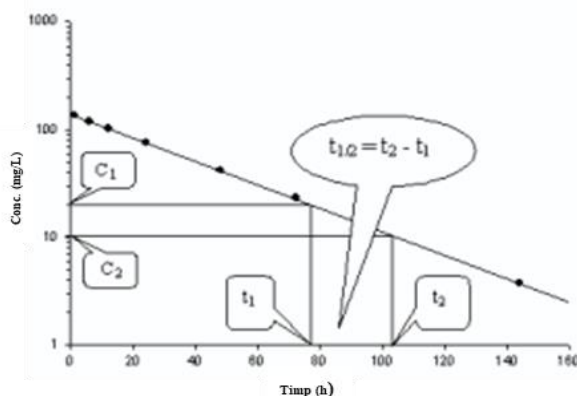


Figura 14.2. Graficul semilogaritm al dependenței concentrației plasmatice față de timp pentru determinarea timpului de înjumătățire

1. Constanta vitezei de eliminare

Constanta vitezei de eliminare se calculează folosind panta liniei:

$$\text{Panta} = \frac{\lg C_2 - \lg C_1}{t_2 - t_1} \quad (14.1)$$

$$K = - (\text{panta} \cdot 2,303) \quad (14.2)$$

2. Timpul de înjumătățire la eliminarea SM

Se calculează timpul de înjumătățire la eliminare utilizând formula (14.3). Alternativ, timpul de înjumătățire poate fi determinat grafic (Fig. 14.2).

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{K} \quad (14.3)$$

3. Aria de sub curbă (ASC)

Folosind concentrația la timpul zero, ASC poate fi calculat după ecuația următoare (intercepta de pe axa Y este concentrația C_0).

$$ASC_{0-\infty} = \frac{C_0}{K} \quad (14.4)$$

4. Clearance-ul Se calculează clearance-ul utilizând ecuația (14.5)

$$Cl = K \cdot V_d \quad (14.5)$$

Rezultate

Din datele concentrației plasmatice pentru ceftriaxonă se calculează parametrii farmacocinetici și se completează tabelul 14.2.

**Tabelul 14.2. Datele pentru parametrii farmacocinetici
calculați**

Nr.	Parametrul	Valoarea
1	Timpul de înjumătățire biologic	
2	Constanta vitezei de eliminare	
3	ASC total	
4	Volumul de distribuție	
5	Clarence-ul	

Deduceți concluzii

Aplicații

1. Se pot estima diferiți parametri farmacocinetici.
2. Parametrii farmacocinetici sunt foarte utili pentru calcularea dozei de medicament nou.
2. Poate fi realizat studiul de bioechivalență în baza datelor plasmatică ale diferitor mărci comerciale.

Sarcini pentru evaluare și autoevaluare

1. Explicați care parametri farmacocinetici pot fi determinați din graficul semilogaritm al concentrației plasmatică în funcție de timp.
2. Explicați cum poate fi calculată ASC atunci când se administrează doza de bolus (IV).

Exerciții

1. Datele concentrației plasmatică obținute după o doză de bolus de 500 mg de **feniletilmalonidă**, (un metabolit al medicamentului antiepileptic) sunt prezentate în tabelul 14.3.

Tabelul 14.3. Datele variației concentrației feniletilmalonidei în funcție de timp

Timp, h	0,33	0,5	0,67	1,5	2	4	6	10	16	24	32	48
Conc., mg/L	14,7	12,6	11	9	8,2	7,9	6,6	6,2	4,6	3,2	2,3	1,2

a. Se construiește un grafic semilogaritm și se estimează timpul de înjumătățire al substanței medicamentoase.

b. Se estimează ASC-ul total.

c. Se calculează volumul de distribuție.

d. Se calculează clearance-ul total.

2. Datele prezentate în tabelul 14.4 reprezintă concentrațiile plasmatică de **cocaină** în funcție de timp după administrarea unui bolus IV de 33 mg de **clorhidrat de cocaină**. (Masa molară a clorhidratului de cocaină este de 340 g/mol, masa molară a cocainei este de 303 g/mol).

Tabelul 14.4 Datele variației concentrației cocainei în funcție de timp

Timp, h	0,16	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
Conc., mg/L	170	122	74	45	28	17	10

- Se construiește un grafic semilogaritmic și se estimează timpul de înjumătățire a substanței medicamentoase.
- Se estimează ASC-ul total.
- Se calculează volumul de distribuție.
- Se calculează clearance-ul total.

3. Profilul concentrației plasmatice după o singură doză de 600 mg **ampicilină** aplicată IV la un adult este prezentată în tabelul 14.5.

Tabelul 14.5. Datele variației concentrației ampicilinei în funcție de timp

Timp, h	1	2	3	5
Conc., mg/L	37	21,5	12,5	4,5

- Se construiește un grafic semilogaritmic și se estimează timpul de înjumătățire a substanței medicamentoase.
- Se estimează ASC-ul total.
- Se calculează volumul de distribuție.
- Se calculează clearance-ul total.

Lucrarea de laborator Nr. 15.

Calcularea constantelor de viteză a excreției urinare și a constantelor de eliminare

Scopul lucrării: calcularea constantei vitezei de excreție urinară K_u și constantei vitezei de eliminare K din datele prezentate.

Obiective

1. Însușirea metodei de calcul al vitezei de excreție (K_u) și a metodei „sigma minus” pentru calcularea constantei vitezei de eliminare (K).
2. Calcularea K și K_u din datele prezentate.

Generalități

Un studiu efectuat pe baza excreției urinare pentru evaluarea biodisponibilității se bazează pe principiul că excreția urinară a substanței medicamentoase netransformată este direct proporțională cu concentrația plasmatică a substanței medicamentoase. Astfel, chiar dacă o substanță medicamentoasă este excretată parțial în urină, biodisponibilitatea SM poate fi determinată. Studiul este deosebit de util pentru substanțele medicamentoase excretate în mare măsură netransformate (nemetabolizate).

Ca exemplu servesc anumite diuretice tiazidice, sulfonamide și substanțe medicamentoase care au acțiune asupra urinei, de ex., antiseptice urinare, cum ar fi Nitrofurantoina și Hexamina.

Există două metode care ne permit să calculăm unii parametri farmacocinetici din datele de excreție urinară:

- metoda de calcul al vitezei de excreție a SM
- metoda de determinare a „cantității de SM ce rămâne de excretat”, cunoscută și sub denumirea de metoda „sigma-minus”.

Metoda vitezei de excreție

Constanta vitezei de eliminare K poate fi calculată și din datele de excreție urinară prin utilizarea metodei de calcul al vitezei de

excreției. În acest calcul, viteza de excreție a substanței medicamentoase se presupune a fi **de ordinul întâi**. Termenul K_u reprezintă constanta excreției renale și A_u – cantitatea de substanță medicamentoasă excretată în urină.

În urma ecuației diferențiale se descrie procesul:

$$\frac{dA_u}{dt} = K_u \cdot A \quad (15.1)$$

unde: dA_u/dt - viteza de excreție; A - cantitatea de substanță medicamentoasă din organism; K_u - constantă vitezei de excreție.

$$\frac{dA_u}{dt} = K_u \cdot A_0 \cdot e^{-K \cdot t} \quad (15.2)$$

Forma logaritmică a ecuației devine:

$$\lg \frac{dA_u}{dt} = \lg (K_u \cdot A_0) - \frac{K \cdot t}{2,303} \quad (15.3)$$

Dacă **viteza de excreție** este reprezentată grafic (Fig. 15.1) în dependență de **timpul mediu** (*punctul mijlociu al perioadei de colectare*) (t^*), în formă semilogaritmică, panta va permite determinarea constantei vitezei de eliminare (K), iar intercepta Y va reprezenta viteza inițială a excreției ($K_u \cdot A_0$). Din datele despre valoarea interceptei (mg/h) și doza administrată (mg) se poate determina constanta vitezei de excreție (K_u).

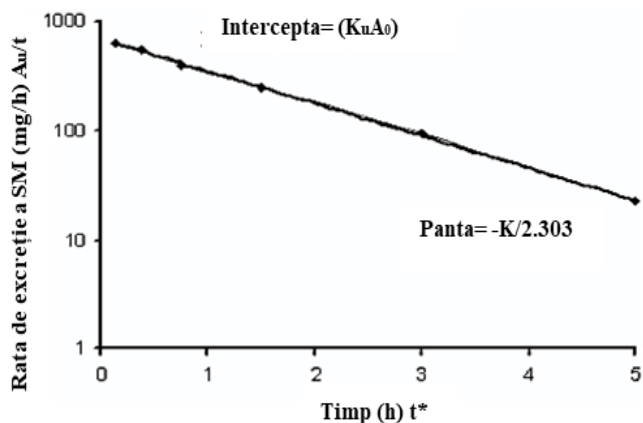


Figura 15.1. Grafic semilogaritmic al vitezei de excreție în funcție de timpul mediu t^*

Metoda dată tinde să dea o supraestimare a interceptei. Supraestimarea poate fi minimizată prin colectarea mai frecventă a probelor de urină. În practică, ecuația (15.3) devine:

$$\lg \frac{dA_u^{t^*}}{dt} = \lg(K_u \cdot A_0) - \frac{K \cdot t^*}{2,303} \quad (15.4)$$

unde: $dA_u^{t^*}/dt$ - viteza medie a excreției; t^* - timpul mediu dintre colectarea urinei; K_u - constanta vitezei de excreție; A_0 - doză.

Ambele ecuații (15.3) și (15.44) indică că viteza de excreție a unei substanțe medicamentoase scade monoexponențial cu timpul, așa cum se arată în figura 15.1.

Timpul de înjumătățire la eliminare ($t_{1/2}$), constanta vitezei de eliminare (K) și constanta vitezei de excreție (K_u) pot fi determinate din graficul semilogaritm al vitezei de excreție față de timpul mediu t^* .

Metoda Sigma-minus/cantitatea rămasă pentru a fi excretată (ARE)

Cantitatea de substanță medicamentoasă netransformată determinată în urină poate fi exprimată în funcție de timp prin ecuația (15.5):

$$A_u = \frac{A_0 \cdot K_u}{K} \cdot (1 - e^{-K \cdot t}) \quad (15.5)$$

unde: A_u – cantitatea cumulată de substanță medicamentoasă excretată în urină la momentul t ; A_0 – doza administrată de substanță medicamentoasă; K – constanta vitezei de eliminare; K_u – constanta vitezei de excreție. Cantitatea de substanță medicamentoasă nemodificată excretată în urină, A_u^∞ , poate fi determinată dacă timpul t este egal cu t_α . Astfel, termenul $e^{-K \cdot t}$ tinde spre zero, iar ecuația este redusă la ecuația (15.6):

$$A_u^\infty = \frac{A_0 \cdot K_u}{K} \quad (15.6)$$

Substituind A_u pentru termenul $(K_u \cdot A_0) / K$ în ecuația (15.5) obținem:

$$A_u = A_u^\infty \cdot (1 - e^{-K \cdot t}) \quad (15.7)$$

$$A_u = A_u^\infty - A_u^\infty \cdot e^{-K \cdot t} \quad (15.8)$$

$$A_u^\infty - A_u = A_u^\infty \cdot e^{-K \cdot t} \quad (15.9)$$

Ecuția (15.9) poate fi scrisă în formă logaritmică pentru a obține o ecuație liniară (15.10):

$$\lg(A_u^\infty - A_u) = \lg A_u^\infty - \frac{K \cdot t}{2,303} \quad (15.10)$$

Graficul dependenței $[A_u^\infty - A_u]$ (adică cantitatea de substanță medicamentoasă care rămâne de excretat (ARE)) în funcție de timp (t^*) (punctul mediu (de mijloc) al perioadei de colectare)) în coordonatele semilogaritmice prezintă o linie dreaptă.

Panta liniei permite determinarea constantei vitezei de eliminare (K) și **intercepta reprezintă** cantitatea cumulată de substanță medicamentoasă excretată în urină la timpul infinit (A_u^∞), care în acest caz nu este egală cu doza administrată. Figura 15.2 reprezintă graficul dependenței semilogaritmice a $[A_u^\infty - A_u]$ în funcție de timpul mediu.

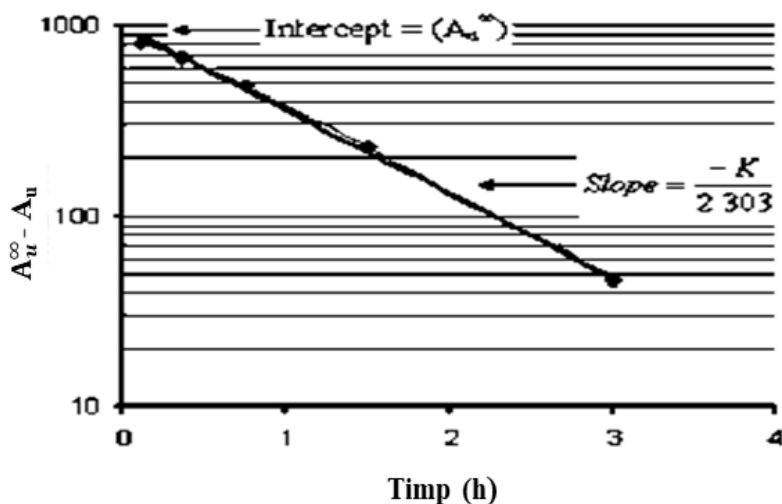


Figura 15.2. Graficul dependenței semilogaritmice a ARE în funcție de timpul mediu t^*

Limitările metodei Sigma-minus/ cantității rămase pentru excreție (ARE)

1. Probele de urină trebuie colectate până în momentul în care, practic, **în urină nu apare niciun preparat suplimentar.**
2. Nu se pot pierde probe de urină sau urină din probele utilizate la

determinarea A_u (trebuie cunoscut volumul exact de urină la fiecare interval de timp).

3. Aceasta este o metodă care consumă timp pentru o substanță medicamentoasă cu un **timp de înjumătățire lung la eliminare** ($t_{1/2}$).
4. Există o acumulare cumulativă de eroare.

Date pentru calcule teoretice

O doză unică de antibiotic a fost administrată unei femei de **50 kg** în raport de 20 mg/kg ($50 \cdot 20 = 1000$ mg doză). Probele de urină au fost prelevate periodic și analizate pentru o substanță medicamentoasă de bază. Datele obținute sunt prezentate în tabelul 15.1.

Tabelul 15.1. Dependența dozei de SM în probele de urină în funcție de timp

Timp, h	0,25	0,5	1	2	4	6
Au, mg	160	140	200	250	188	46

Se calculează constanta vitezei de excreție urinară K_u și constanta vitezei de eliminare K .

1. Metoda vitezei de excreție

1. Se construiește tabelul pentru determinarea vitezei de excreție.
2. Se construiește graficul semilogaritm al dependenței vitezei de excreție în funcție de timpul mediu al perioadei de colectare a urinei.
3. Se determină panta liniei.
4. Se determină timpul de înjumătățire prin eliminare.
5. Se determină constanta totală a vitezei de eliminare (K) din timpul de înjumătățire prin eliminare.
6. Se determină viteza de excreție urinară (K_u) din grafic (la interceptarea $Y = \lg K_u \cdot A_0$.)

2. Metoda Sigma-minus

1. Se construiește tabelul pentru calculul cantității cumulative de substanță medicamentoasă excretată și cantitatea rămasă pentru a fi excretată.
2. Se construiește graficul dependenței cantității rămase de substanță medicamentoasă pentru excretație în scară semilogaritmică în funcție de timpul mediu de colectare al urinei (t^*).
3. Se determină panta liniei.
4. Se determină prin metoda grafică timpul de înjumătățire prin eliminare.
5. Se determină constanta totală a vitezei de eliminare (K) din timpul de înjumătățire prin eliminare.

Tabelul 15.2. Datele obținute prin metoda vitezei de excreție

Timpul de colectare a urinei, h	Punctul intermediar al perioadei de colectare a urinei t^*, h	Interval de timp (dt) pentru recoltarea probelor de urină	dA_u (cantitate excretată) (mg)	Vitza de excreție $\Delta A_u/dt$, (mg/h)
0,25	0,125 (0,25/2)	0,25	160	
0,5	0,375 (0,125+0,250)	0,25	140	
1	0,750 (0,25 +0,5)	0,5	200	
2	1,50 (0,5+1.0)	1	250	
4	3 (1 +2)	2	188	
6	5 (2+ 3)	2	46	

Tabelul 15.3. Datele obținute prin metoda Sigma-minus

Timpul de colectare a urinei, h	A_u (cantitate excretată), (mg)	Punctul intermediar al perioadei de colectare a urinei t^*, h	Cantitatea cumulativă (A_u), mg	$A_u^\infty - A_u$

Biofarmacia și farmacocinetica

0,25	160	0,125		
0,5	140	0,375		
1	200	0,750		
2	250	1,50		
4	188	3		
5	46	5		

Calcul

1. Constanta vitezei de eliminare (viteza determinată prin metoda de excreție și prin metoda Sigma-minus)

Se determină constanta vitezei de eliminare din timpul de înjumătățire sau folosind panta de linie (ec. (15.11)). Se calculează panta liniei din grafic, fie prin selectarea a două puncte din graficul datelor prezentate.

$$\text{Panta} = \frac{-K}{2,303} \quad (15.11)$$

De asemenea, se calculează viteza de eliminare din $t_{1/2}$ obținută din grafic.

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{K} \quad (15.12)$$

2. Constanta vitezei de excreție (K_u) prin utilizarea metodei ratei excreției

Se construiește în formă semilogaritmică graficul dependenței vitezei de excreție în funcție de timpul mediu al perioadei de colectare a urinei. Se determină intercepta ($A_0 \cdot K_u$) extrapolând linia pe axa Y. Se folosește următoarea formulă pentru a determina constanta vitezei de excreție:

$$K_u = \frac{\text{Intercepta}}{A_0} = \frac{\text{Intercepta}}{\text{Doza}}$$

(15.13)

Rezultate

Diverși parametri farmacocinetici calculați în baza datelor analizei urinei sunt prezentați în tabelul 15.4.

Tabelul 15.4. Valoarea parametrilor farmacocinetici calculați prin metodele vitezei de excreție și Sigma-minus

Nr.	Parametri farmacocinetici	Metoda vitezei de excreție	Metoda Sigma-Minus
1	Constanta vitezei de eliminare (K)		
2	Constant vitezei de excreție (K_u)		
3	Timpul de înjumătățire la eliminare		

Deduceți concluzii

Aplicații

1. Poate fi determinată constanta vitezei de excreție.
2. Se oferă o metodă alternativă neinvazivă.

Sarcini pentru evaluare și autoevaluare

1. Definiți noțiunea de constantă a vitezei de excreție.
2. Explicați prin ce metodă se pot calcula parametrii farmacocinetici din datele de excreție urinară.

Exerciții

1. Datele de excreție urinară după doza bolus (IV) de 80 mg de substanță medicamentoasă sunt prezentate în tabelul 15.5.

Tabelul 15.5. Datele excreției urinare a SM în funcție de timp

Timpul de colectare a urinii, h	1	2	3	4	5	6	12
Cantitatea exercitată, mg	40	20	10	5	2,5	1,25	1,25

Se calculează:

- a) constanta vitezei de eliminare;
- b) constanta vitezei de excreție;
- c) timpul de înjumătățire la eliminare.

2. Datele de excreție urinară după doza de bolus (IV) de 50 mg de substanță medicamentoasă sunt prezentate în tabelul 15.6.

Tabelul 15.6. Datele excreției urinare a SM în funcție de timp

Timpul de colectare a urinii, h	2	4	6	8	12	24
Cantitatea exercitată, mg	16	9	5,6	3,4	3,2	1,9

Se calculează:

- a) constanta vitezei de eliminare;
- b) constanta vitezei de excreție;
- c) timpul de înjumătățire la eliminare

3. Datele de excreție urinară după doza de bolus (IV) de 1000 mg de substanță medicamentoasă sunt prezentate în tabelul 15.7.

Tabelul 15.7. Datele excreției urinare a SM în funcție de timp

Timpul de colectare a urinii, h	3	6	9	12	15	24	48
Cantitatea exercitată, mg	534	436	181	139	110	202	195

Se calculează:

- a) constanta vitezei de eliminare;
- b) constanta vitezei de excreție;
- c) timpul de înjumătățire la eliminare.

Lucrarea de laborator Nr. 16.

Calcularea ariei de sub curbă dependenței concentrației plasmatică în funcție de timp după regula trapezoidală

Scopul lucrării: calcularea ariei de sub curbă (ASC) după regula trapezoidală pentru o bază de date prezentată.

Obiective:

1. însușirea metodei de calcul al ariei de sub curbă folosind regula trapezoidală.
2. Înțelegerea importanței ASC pentru diverse studii.

Generalități

Aria de sub curbă reprezintă suprafața totală integrată sub profilul dependenței concentrației plasmatică în funcție de timp și exprimă **cantitatea totală** de substanță medicamentoasă care intră în circulația sistemică după administrarea sa. ASC este exprimată în $\mu\text{gh/ml}$ și este utilă în estimarea vitezei de absorbție. Parametrul dat are o importanță deosebită în evaluarea **eficacității substanței medicamentoase** utilizate pentru tratarea afecțiunilor acute, cum ar fi **durerea și insomnia**, care pot fi **tratate cu o singură doză**. Mai multe metode sunt utilizate pentru măsurarea ariei de sub curbă a dependenței concentrației plasmatică în funcție de timp, cum ar fi decuparea și cântărirea, utilizarea conturului și a regulilor trapezoidale.

Regula trapezoidală este o metodă numerică simplă de estimare a ariei. În această metodă ASC a dependenței concentrației plasmatică în funcție de timp este împărțită într-o serie de linii verticale, obținându-se **un număr de trapeze**. Aria fiecărui trapez este calculată separat și la sumarizarea suprafeței tuturor trapezilor obținem ASC. Când concentrația la timpul zero nu este indicată în date, atunci în determinarea ASC din dependența concentrației SM în funcție de timp, obținută după administrarea **extravasculară** a substanței medicamentoase, concentrația la timp zero este luată ca

zero. Însă, când concentrația față de timp este reprezentată **după administrarea IV** a substanței medicamentoase, atunci concentrația la timp zero nu trebuie luată ca zero, deoarece concentrația la timpul zero este maximă. Deci, concentrația la timpul zero trebuie determinată grafic pentru a obține primul segment pentru regula trapezoidală. Avantajul acestei metode este că necesită doar o extensie simplă a unui tabel de **date experimentale**. Alte metode implică fie o complexitate numerică mai mare, fie elaborarea unei ecuații și apoi calcularea suprafeței prin integrarea ecuației elaborate.

ASC pentru datele reprezentate în grafic se obține prin sumarizarea ariei fiecărui segment geometric reprezentat și este calculată folosind formula pentru figura geometrică a aceluia segment.

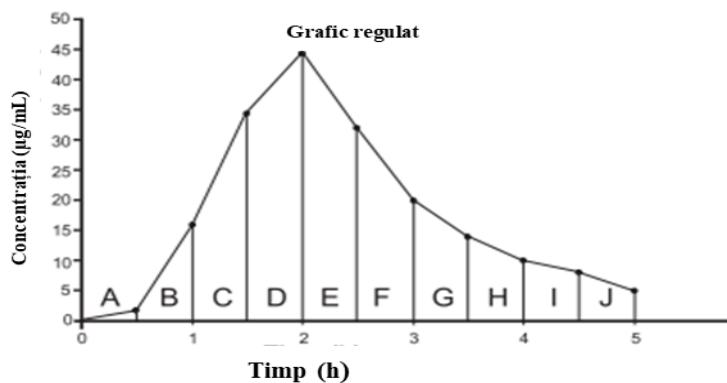


Figura 16.1. Dependența concentrației plasmatice în funcție de timp după administrarea extravasculară

Date experimentale

Concentrația plasmatică în funcție de timp după **administrarea orală** a unei singure doze de **500 mg** de substanță medicamentoasă este prezentată în tabelul 16.1.

Tabelul 16.1. Datele pentru concentrația plasmatică a SM după administrarea orală în funcție de timp

Timp, h	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
Conc., µg/mL	1.5	16	35	45	32	20	14	10	8	5

Se calculează aria de sub curbă pentru perioada de timp **(0-5) h**

Rezolvare

- a) Se plasează pe grafic datele despre concentrația plasmatică în funcție de profilul timpului.
- b) Se construiesc toate zece segmente (trapeze) în formă grafică și se indică segmentele A, B... la J.
- c) Se calculează aria fiecărui segment folosind formula pentru figura geometrică a segmentului.
- d) Suprafața delimitată de trapeze aproximează aria de sub curbă.
- e) Suma suprafețelor tuturor acestor segmente alcătuiește suprafața de sub curbă de la zero pînă la timpul final reprezentat pe grafic.
- f) Se introduc valorile concentrației și timpul corespunzător în următoarea formulă.

$$ASC_{0-1} = \frac{C_1 + C_0}{2} \cdot (t_1 - t_0)$$

$$ASC_{0-\infty} = ASC_{0-0,5} + ASC_{0,5-1} + \dots + ASC_{4-4,5} + ASC_{4,5-5}$$

Tabelul 16.2 Calculularea ASC totală utilizând regula trapezelor

Timp, h	Concentrația ($\mu\text{g/ml}$)	Segment	$\frac{C_{n-1} + C_n}{2}$	$t_n - t_{n-1}$	ASC
0,5	1,5	A			
1	16	B			
1,5	35	C			
2	45	D			
2,5	32	E			
3	20	F			
3,5	14	G			
4	10	H			
4,5	8	I			
5	5	J			
ASC₀₋₅					

Prin utilizarea metodei regulii trapezelor, **ASC de la (0-5) ore** a fost de _____ **$\mu\text{g}\cdot\text{hr/mL}$** .

Deduceți concluzii

Se poate concluziona că regula trapezoidală poate fi utilizată pentru determinarea suprafeței de sub curba dependenței concentrației plasmatice în funcție de timp.

Aplicații

1. În absența datelor despre graficul dependenței concentrației plasmatice în funcție de timp și constantelor de viteză, datele care însoțesc această metodă permit determinarea ariei aflate sub curba dependenței concentrației plasmatice (ASC) în funcție de timp.
2. Folosind această metodă se poate determina clearance-ul sistemic, renal și metabolic al unei substanțe medicamentoase.
3. ASC este una dintre metodele de determinare a gradului de biodisponibilitate a medicamentului.
4. ASC este un parametru foarte important în testarea bioechivalenței.

Sarcini pentru evaluare și autoevaluare

1. Definiți noțiunea de ASC și explicați importanța acestui parametru farmacocinetic.
2. Explicați regula trapezoidală de estimare a ASC.
3. Evaluați și comparați diferite metode pentru estimarea ASC.

Exerciții

1. Concentrația plasmatice în funcție de timp după administrarea orală a unei singure doze de 50 mg de substanță medicamentoasă este dată în tabelul 16.3. Se calculează aria de sub curbă de la (0-8) h.

Tabelul 16.3. Datele pentru concentrația plasmatice a SM administrată oral în funcție de timp

Timp, h	1	2	3	4	5	6	7	8
Conc., mg/L	7	10	5	2,5	1,25	0,6	0,2	0

2. Concentrația plasmatice în funcție de timp după administrarea orală a unei singure doze de 50 mg de substanță medicamentoasă este dată în tabelul 16.4. Se calculează aria de sub curbă de la (0-12) h.

Tabelul 16.4. Datele pentru concentrația plasmatică a SM administrată oral în funcție de timp

Timp, h	0	0,5	1	1,5	2	3	4	6	8	12
Conc., mg/L	0	0,38	0,6	0,73	0,85	0,95	0,94	0,87	0,66	0,37

3. Concentrația plasmatică în funcție de timp după administrarea orală a unei singure doze de 400 mg de substanță medicamentoasă este dată în tabelul 16.5. Se calculează aria de sub curbă de la (0-5) h.

Tabelul 16.5. Datele pentru concentrația plasmatică a SM administrată oral în funcție de timp

Timp, h	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Conc., mg/mL	1,5	16	35	45	32	20	14	10	8	5

Lucrarea de laborator Nr. 17.

Calcularea constantei vitezei de absorbție prin metoda rezidurilor

Scopul lucrării: calcularea timpului de înjumătățire a absorbției SM și a constantei vitezei de absorbție (K_a) pentru setul de date prezentat, folosind metoda rezidurilor.

Obiective

1. Însușirea metodei rezidurilor la calcularea constantei vitezei de absorbție.
2. Calcularea K_a din datele prezentate.

Generalități

Constanta vitezei de absorbție poate fi calculată prin metoda rezidurilor. Este frecvent utilizată în farmacocinetică pentru a trasa o curbă multiexponențială cu componentele sale individuale.

Pentru substanțe medicamentoase care urmează cinetica

monocompartmentală și sunt administrate extravascular, concentrația substanței medicamentoase în plasmă este exprimată printr-o ecuație bi-exponențială:

$$C = \frac{K_0 \cdot F \cdot A_0}{V \cdot (K_0 - K)} \cdot [e^{-K \cdot t} - e^{-K_a \cdot t}] \quad (17.1)$$

unde: F - fracția de substanță medicamentoasă absorbită sistemic după administrarea extravasculară; K_a - constanta vitezei de absorbție de ordinul întâi; K - constanta vitezei de eliminare de ordinul întâi; A_0 - cantitatea de substanță medicamentoasă la timpul zero.

Dacă $K_a \cdot F \cdot A_0 / V \cdot (K_a - K) = X$, o constantă mixtă, atunci:

$$C = X \cdot e^{-K \cdot t} - A \cdot e^{-K_a \cdot t} \quad (17.2)$$

În faza de eliminare, când absorbția este aproape terminată, $K_a \gg K$ și valoarea celei de-a doua exponențiale $e^{-K_a \cdot t}$ păstrează o anumită valoare finită. În acest moment, ecuația (17.2) se reduce la:

$$\tilde{C} = X \cdot e^{-K \cdot t} \quad (17.3)$$

La convertirea ecuației (17.3) în forma logaritmică obținem:

$$\lg \tilde{C} = \lg X - \frac{K \cdot t}{2,303} \quad (17.4)$$

unde \tilde{C} reprezintă valorile extrapolării inverse ale concentrației plasmatice.

Graficul dependenței $\lg C$ în funcție de timp este o curbă biexponențială cu o fază terminală liniară cu panta egală cu $K/2,303$. Extrapolarea inversă a acestei linii drepte la timpul zero produce o interceptare egală cu $\lg(X)$.

Scăderea valorilor reale ale concentrației plasmatice, adică ecuația (17.2), din valorile extrapolate ale concentrației plasmatice, adică ecuația (17.3), produce o serie de valori ale concentrației reziduale C_r :

$$(\tilde{C} - C) = C_r = X \cdot e^{-K_a \cdot t} \quad (17.5)$$

În forma logaritmică, ecuația este:

$$\lg C_r = \lg X - \frac{K_a \cdot t}{2,303} \quad (17.6)$$

Graficul dependenței log C față de timp prezintă o linie dreaptă cu panta $K_a/2,303$ și interceptarea pe ordonata y este egală cu X. Timpul de înjumătățire a absorbției poate fi calculat din K_a folosind relația $0,693/K_a$.

În mod ideal, liniile extrapolate și cele reziduale se intersectează pe axa y, adică la momentul $t = 0$ și nu există nicio întârziere în absorbție. Dacă intersectarea are loc la un timp mai mare de „zero”, aceasta indică o întârziere în timp.

Metoda este cea mai potrivită pentru substanțe medicamentoase care sunt absorbite rapid și complet și urmează o cinetică monocompartmentală.

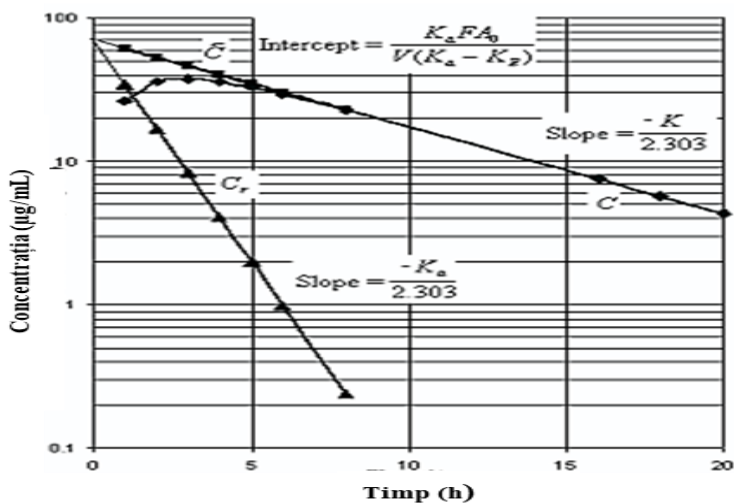


Figura 17.1. Dependența semilogaritmică a concentrației plasmatice a SM în funcție de timp după administrarea orală

La utilizarea metodei reziduurilor, trebuie folosite cel puțin trei puncte pentru a defini linia dreaptă. Este posibil ca datele punctelor care apar la scurt timp după t_{max} să nu fie exacte, deoarece absorbția substanței medicamentoase continuă în acel moment. Deoarece această porțiune a curbei reprezintă faza de după absorbție, numai punctele datelor din faza de eliminare trebuie utilizate pentru a defini viteza de absorbție a substanței medicamentoase ca un proces de ordinul întâi.

Rechizite

Conceptul de administrare extravasculară monocompartmentală.

Datele experimentale

Următoarele date au fost obținute în rezultatul administrării orale a 500 mg de antibiotic. Presupunem că 100% din doza administrată a fost absorbită.

Tabelul 17.1. Datele analizei plasmatice obținute după administrarea orală a dozei de 500 mg de substanță medicamentoasă în funcție de timp

Timp, h	1	2	3	4	5	6	8	16	18	20
Conc., mg/mL	26,5	36,1	37,5	36,1	32,9	29,4	22,7	7,5	5,7	4,3

Se calculează constanta vitezei de absorbție.

Mod de lucru

1. Se construiește graficul dependenței concentrației substanței medicamentoase (C) în forma semilogaritmică în funcție de timp după datele prezentate în tabelul 17.2.
2. Se extrapolează faza de eliminare până la axa Y.
3. Se notează concentrația de la linia extrapolată ca \bar{C} .
4. Se obțin concentrațiile \bar{C} pentru timpul (t_1, t_2, \dots, t_n) în funcție de concentrațiile (C_1, C_2, \dots, C_n) din reversul liniei extrapolate ($\bar{C}_1, \bar{C}_2, \dots, \bar{C}_n$).
5. Se obțin concentrații reziduale (C_r) scăzând C din \bar{C} în raport cu timpul.
6. Se construiește dependența concentrației reziduale (C_r) în funcție de timp, în același grafic semilogaritmic.
7. Se determină panta liniei concentrației reziduale.

Tabelul 17.2. Determinarea concentrațiilor reziduale ale SM în funcție de timp

Timp, h	CMP ($\mu\text{g/ml}$), C	CMP extrapolate, \bar{C}	CMP rezidual $C_r = \bar{C} - C$
1	26,501		
2	36,091		
3	37,512		
4	36,055		
5	32,924		
6	29,413		
8	22,784		
16	7,571		
18	5,734		
20	4,343		

CMP: Concentrația plasmatică a substanței medicamentoase.

Calcul

1. Constant vitezei de absorbție (K_a)

Se calculează constanta vitezei de absorbție utilizând panta liniei concentrațiilor reziduale.

$$\text{Panta} = \frac{\lg \bar{C}_2 - \lg \bar{C}_1}{t_2 - t_1} \quad (17.7)$$

$$K_a = -(\text{panta} \cdot 2,303) \quad (17.8)$$

2. Timpul de înjumătățire a absorbției

Se calculează timpul de înjumătățire a absorbției SM folosind următoarea formulă:

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{K_a} \quad (17.9)$$

Alternativ, timpul de înjumătățire poate fi determinat grafic.

Rezultate

Prin utilizarea metodei reziduurilor la determinarea constantei vitezei de absorbție (K_a) și a timpului de înjumătățire a absorbției ($t_{1/2}$) pentru baza de date prezentată în lucrare s-a constatat că K_a este _____ h^{-1} și $t_{1/2}$ este _____ h.

Deduceți concluzii

Aplicații

1. Este posibilă determinarea constantei ratei de absorbție din datele privind absorbția orală.
2. Metoda reziduurilor este o metodă simplă de calculare a constantei vitezei de absorbție.

Sarcini de evaluare și autoevaluare

1. Definiți noțiunea „constantă vitezei de absorbție”?
2. Explicați cum poate fi determinată constanta vitezei de absorbție prin metoda reziduurilor.

Exerciții

1. Probele de plasmă de la un pacient au fost colectate după o doză de bolus orală de 500 mg antibiotic și au fost obținute datele prezentate în tabelul 17.3. Se presupune că 100% din doza administrată a fost absorbită.

Tabelul 17.3. Datele pentru concentrația plasmatică a SM administrate oral în funcție de timp

Timpul, h	0.25	0.5	0.75	1	1.5	2	3	4	5	6	7
Conc. mg/L	1.91	2.98	3.54	3.80	3.84	3.62	3.04	2.49	2.04	1.67	1.37

Se calculează constanta vitezei de absorbție și timpul de înjumătățire a absorbției.

2. Probele de plasmă de la un pacient au fost colectate după o doză de bolus orală de 10 mg de soluție nouă de benzodiazepină și au fost obținute datele din tabelul 17.4.

Tabelul 17.4. Datele pentru concentrația plasmatică a SM administrate oral în funcție de timp

Timpul, h	0.25	0.5	0.75	1	2	4	6	10	14	20
Conc. mg/L	2.85	5.43	7.75	9.84	16.20	22.15	23.01	19.09	13.90	7.97

Se calculează constanta vitezei de absorbție și timpul de înjumătățire a absorbției.

3. La administrarea orală a 300 mg de antibiotic au fost obținute datele prezentate în tabelul 17.5. Se presupune că 100% din doza administrată a fost absorbită.

Tabelul 17.5. Datele pentru concentrația plasmatică a SM administrate oral în funcție de timp

Timpul, h	0.25	0.5	0.75	1	1.5	2	3	4	5	6	7
Conc. mg/L	1.91	2.98	3.54	3.80	3.84	3.62	3.04	2.49	2.04	1.67	1.37

Se calculează constanta vitezei de absorbție și timpul de înjumătățire a absorbției.

Lucrarea de laborator Nr. 18.

Calculul constantei vitezei de absorbție prin metoda Wagner-Nelson

Scopul lucrării: calcularea constantei vitezei de absorbție (K_a) folosind metoda Wagner-Nelson.

Obiective:

studierea metodei Wagner-Nelson pentru estimarea constantei vitezei de absorbție (K_a).

Generalități

Estimarea constantei vitezei de absorbție: metoda Wagner-Nelson

După o singură doză orală de substanță medicamentoasă în orice moment, cantitatea de substanță medicamentoasă absorbită în circulația sistemică A_a , este suma cantității de substanță medicamentoasă din corp (A) și a cantității de substanță medicamentoasă eliminată din corp (A_e).
Prin urmare:

$$A_a = A + A_e \quad (18.1)$$

Cantitatea de substanță medicamentoasă din organism se

Biofarmacia și farmacocinetica

calculează după formula: $A = V \cdot C$, în timp ce cantitatea de substanță medicamentoasă eliminată în orice moment t poate fi calculată după cum urmează:

$$A_e = K \cdot V \cdot [ASC]_0^t \quad (18.2)$$

Substituind valoarea A și A_e în ecuația (18.1), obținem:

$$A_a = V \cdot C + K \cdot V \cdot [ASC]_0^t \quad (18.3)$$

Cantitatea totală de substanță medicamentoasă absorbită în circulația sangvină din momentul zero până la infinit A_a^∞ poate fi calculată ca:

$$A_a^\infty = V \cdot C^\infty + K \cdot V \cdot [ASC]_0^\infty \quad (18.4)$$

Deoarece la $t = \infty$, $C = 0$, ecuația de mai sus poate fi redusă la:

$$A_e^\infty = K \cdot V \cdot [ASC]_0^\infty \quad (18.5)$$

Fracția de substanță medicamentoasă absorbită în orice moment t se determină ca:

$$\frac{A_a}{A_a^\infty} = \frac{V \cdot C + K \cdot V \cdot [ASC]_0^t}{K \cdot V \cdot [ASC]_0^\infty} \quad (18.6)$$

$$\frac{A_a}{A_a^\infty} = \frac{C + K \cdot [ASC]_0^t}{K \cdot [ASC]_0^\infty} \quad (18.7)$$

Prin urmare, procentul de substanță medicamentoasă neabsorbită în orice moment se calculează după ecuația (18.8):

$$\%ARA = \left[1 - \frac{A_a}{A_a^\infty} \right] \cdot 100 = \left[\frac{C + K \cdot [ASC]_0^t}{K \cdot [ASC]_0^\infty} \right] \cdot 100 \quad (18.8)$$

Metoda necesită colectarea probelor de sânge după o singură doză orală la intervale regulate de timp până când întreaga cantitate de substanță medicamentoasă este eliminată din organism. K se obține din dependența semilogaritmică a C față de t .

Într-un grafic semilogaritmice al dependenței procentului neabsorbit (adică, procent ARA) în funcție de t se trasează o linie dreaptă a cărei pantă este $K/2.303$. Dacă un grafic obișnuit (adică, nu semilogaritmice) al acestei dependențe este o linie dreaptă, atunci absorbția este de ordinul zero.

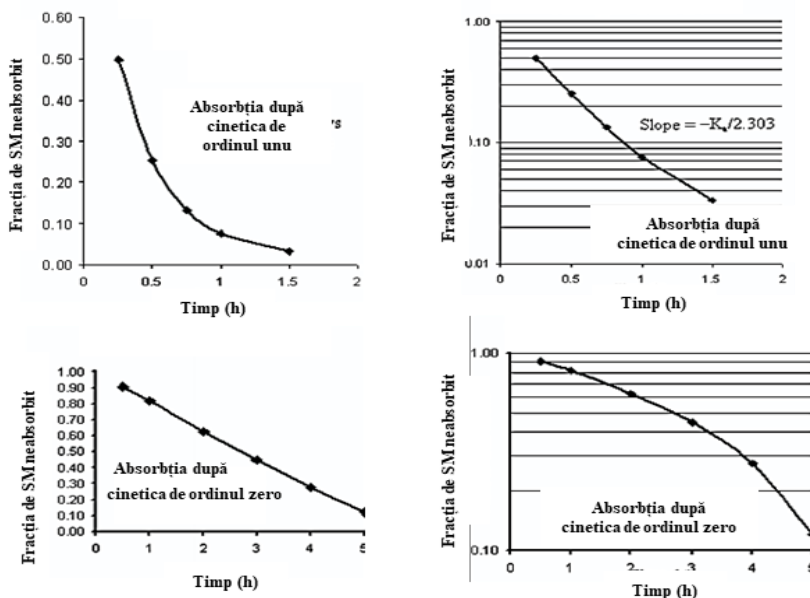


Figura 18.1. Dependența concentrației plasmatice și a concentrației semilogaritmice a SM în funcție de timp după administrarea orală

K_a poate fi, de asemenea, estimată în mod similar din datele de excreție urinară. Cel mai mare dezavantaj al metodei Wagner-Nelson este că se aplică în mod normal substanțe medicamentoase cu caracteristici pentru un sistem **monocompartmental**.

Date pentru calcule teoretice

Biodisponibilitatea clorhidratului de fenilpropanolamină a fost studiată pe 24 de subiecți (bărbați adulți). Următoarele date reprezintă concentrațiile medii de clorhidrat de fenilpropanolamină din sânge (ng/ml) după administrarea orală a unei singure doze de 25 mg de

soluție de clorhidrat de fenilpropanolamină.

Tabelul 18.1. Dependența dozei de clorhidrat de fenilpropanolamină din sânge în funcție de timp

Timp, h	0,25	0,5	0,75	1	1,5	2	3	4	6	8	12	18	24
Conc., μg/mL	51,33	74,05	82,91	85,11	81,76	75,51	62,98	52,32	36,08	24,88	11,83	3,8	1,27

Se determină constanta vitezei de absorbție și timpul de înjumătățire folosind metoda Wagner-Nelson.

Mod de lucru

Metoda Wagner-Nelson

1. Se construiește graficul semilogaritmice al concentrației plasmatice în funcție de timp.
2. Se determină constanta vitezei de eliminare din panta părții terminale a liniei.
3. Se construiește graficul concentrației plasmatice în funcție de timp și se determină $[ASC]_0^t$ după regula trapezelor. Se determină cumulativ $[ASC]_0^t$.
4. Se determină $K[ASC]_0^t$ prin înmulțirea fiecăruia $[ASC]_0^t$ cu K .
5. Se găsește $[ASC]_0^\infty$ adăugând toate părțile ASC de la zero la infinit.
6. Se determină valoarea fracției neabsorbite corespunzătoare fiecărui moment de timp t folosind tabelul de observare.
7. Se construiește graficul dependenței fracției neabsorbite în funcție de timp în formă semilogaritmice.
8. Se determină panta liniei.

Tabelul 18.2. Datele pentru determinarea fracției de substanță medicamentoasă neabsorbită

Timp	C	[ASC] _{0^t}	Cumulative [ASC] _{0^t}	K x Cum [ASC] _{0^t}	C + K x Cum [ASC] _{0^t} (cantitate absorbită)	Ab/A _b [∞] (Fracțiune absorbită)	1-(Ab/A _b [∞]) (Fracțiune neabsorbită)
0,25	51,33						
0,5	74,05						
0,75	82,91						
1	85,11						
1,5	81,76						
2	75,51						
3	62,98						
4	52,32						
6	36,08						
8	24,88						
12	11,83						
18	3,88						
24	1,27						

Se consideră valoarea $(C + K \cdot C_{um} \cdot [ASC]_0^{24})$ ca cantitate absorbită la infinit (A_b^∞)

Calcul

1. Determinarea constantei vitezei de adsorbție

Se determină ASC total după regula trapezelor. Se determină constanta vitezei de adsorbție.

$$(ASC)_{t_n}^{t_{n-1}} = \frac{C_{n-1} + C_n}{2} \cdot (t_n - t_{n-1}) \quad (18.9)$$

$$(ASC)_t^\infty = \frac{C_{last}}{K} \quad (18.10)$$

2. Timpul de înjumătățire a adsorbției SM

Se determină panta liniei și se calculează timpul de înjumătățire a adsorbției folosind formula:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{K_a} \quad (18.11)$$

Alternativ, timpul de înjumătățire poate fi determinat prin metoda grafică.

Rezultate

Utilizând constanta vitezei de absorbție (K_a), determinată după metoda Wagner-Nelson și timpul de înjumătățire a absorbției ($t_{1/2}$), pentru baza de date a fost calculat că _____ h^{-1} și _____ respectiv h.

Deduceți concluzii

Aplicații

Această metodă permite calcularea constantei vitezei de absorbție (K).

Sarcini de evaluare și autoevaluare

1. Explicați cum poate fi determinată constanta vitezei de absorbție prin metoda Wagner Nelson.
2. Enumerați dezavantajele metodei Wagner Nelson.

Exercițiul Nr.1

S-a administrat oral 100 mg de antibiotic și au fost obținute datele din tabelul 18.3. Presupunem că 100% din doza administrată a fost absorbită.

Tabelul 18.3. Datele pentru concentrația plasmatică a SM administrate oral în funcție de timp

Timp, h	0,25	0,5	1	2	3	4	6	8	10	12
Conc., $\mu g/M$	1,60	2,70	3,70	3,50	2,70	2,00	1,02	0,49	0,26	0,12

Se calculează constanta vitezei de absorbție și timpul de înjumătățire la absorbția antibioticului.

Exercițiul Nr. 2

S-a administrat oral 100 mg de SM antiinflamatoare și au fost obținute datele din tabelul 18.4. Se presupune că 100% din doza administrată a fost absorbită.

Tabelul 18.4. Datele pentru concentrația plasmatică a SM administrate oral în funcție de timp

Timp, h	0,5	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0	12,0	16,0	20,0	24,0
Conc., $\mu\text{g/mL}$	3,20	5,40	7,40	7,00	5,40	4,00	2,04	0,98	0,52	0,24

Se calculează constanta vitezei de absorbție și timpul de înjumătățire a absorbției SM.

Exercițiul Nr. 3

S-a administrat oral 15,0 mg de SM și au fost obținute datele din tabelul 18.5. Se presupune că 100% din doza administrată a fost absorbită.

Tabelul 18.5. Datele pentru concentrația plasmatică a SM administrate oral în funcție de timp

Timp, h	0,25	0,5	1	2	3	4	6	8	10	12
Conc., $\mu\text{g/mL}$	1,60	2,70	3,70	3,50	2,70	2,00	1,02	0,49	0,26	0,12

Se calculează constanta vitezei de absorbție și timpul de înjumătățire a absorbției SM.

Lucrarea de laborator Nr. 19.

Studierea unor parametri farmacocinetici ai curcuminei

Scopul lucrării: evidențierea distribuției și absorbției curcuminei în faza lipidică.

Obiective

1. Estimarea unor parametri farmacocinetici ai curcuminei.
2. Stabilirea solubilității curcuminei.
3. Examinarea macroscopică ai curcuminei.

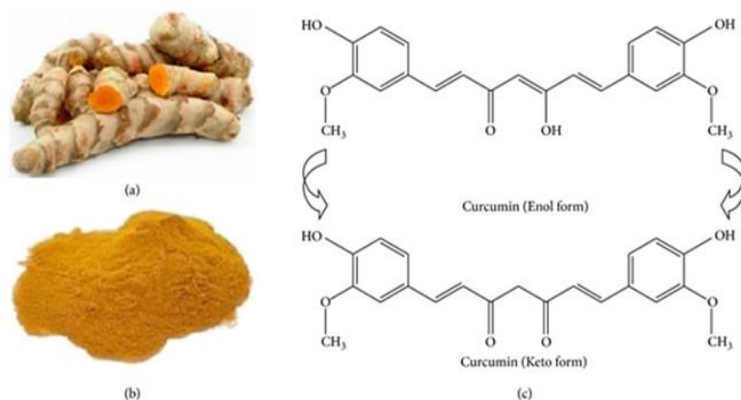


Figura 19.1. Formele tautomerice ale curcuminei

Materiale și reagenți:

Materiale: seringi; ulei de floarea soarelui, lamele de sticlă.

Reagenți chimici: etanol, curcumină.

Veselă chimică: pahare.

Aparate: microscop, balanță analitică, cronometru.

Mod de lucru

Pe o lamelă de sticlă se adăugă o cantitate de substanța de analizat (curcumină) și se examinează la microscop. Apoi se examinează la microscop un sistem model ce include ulei de floarea soarelui și curcumină: pe o lamelă de sticlă se picură 0,01 mL ulei de

floarea soarelui și se examinează la microscop; se adaugă 0,004 g probă de analizat (curcumina) în 0,01 mL ulei de floarea soarelui și se înregistrează timpul la care s-a început procesul de distribuție și timpul final.

Sarcini pentru evaluare și autoevaluare

1. Determinați timpul de distribuție pentru curcumină.
2. Studiați solubilitatea curcuminei în diferiți solvenți.
3. Studiați sursele naturale ce conțin curcumină.
4. Studiați domeniile de utilizare a curcuminei:
 - în industria farmaceutică (prezentați și analizați medicamentele);
 - în industria alimentară (prezentați și analizați produsele);
 - în industria cosmetică (prezentați și analizați produsele cosmetice).
5. Formulați concluzii în baza informațiilor identificate în articolele științifice.

Lucrarea de laborator Nr. 20.

Determinarea volumului de distribuție a capsaicinei în mediu lipidic

Scopul lucrării: determinarea volumului de distribuție a capsaicinei în ulei rafinat de floarea soarelui.

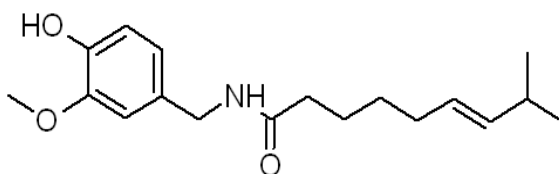


Figura 20.1. Formula de structură a capsaicinei

Obiective

1. Extragerea capsaicinei din proba de ardei dulce cu ajutorul solventului - alcool etilic (35-40) %.
2. Determinarea volumului de distribuție (V_d) în proba de analiză.

Materiale și reagenți

Materiale: ardei capia dulce – (25-30) g; ulei de floarea soarelui rafinat - 10 mL; seringi (2 bucăți de 2 mL); hârtie de filtru.

Reagenți: capsaicină, alcool etilic de (35-40)%

Veselă: pahare (10-15 mL); lamele; pâlnie

Echipamente: microscop

Mod de lucru

Capsaicina este solubilă în alcool, în eter, în cloroform, în HCl concentrat, dar greu solubilă în apă, în eter de petrol.

Volumul de distribuție, denumit și volum aparent de distribuție, este un termen farmacologic și reprezintă volumul lichidului total în care are loc difuzia unei substanțe medicamentoase administrate.

Prepararea probei de analiză de ardei (dulce) se realizează prin mărunțire și presare mecanică. În continuare se extrage capsaicina din proba de analizat de ardei dulce cu ajutorul solventului - alcool etilic (35-40) %. Pe o lamelă de sticlă se adăugă o cantitate de substanță analizată (capsaicina) și se examinează la microscop. Apoi se examinează la microscop în sistemul model alcătuit din ulei de floarea soarelui și capsaicină: se ia pe o lamelă de sticlă 0,01 mL ulei de floarea soarelui, se adaugă 0,1 g probă de analizat (capsaicină) și se examinează la microscop distribuția SM, înregistrând timpul la care s-a început declanșarea procesului de distribuție și timpul final.

Sarcini pentru evaluare și autoevaluare

1. Determinați timpul de distribuție pentru capsaicină.
2. Studiați solubilitatea capsaicină în diferiți solvenți.
3. Analizați literatura cu privire la sursele naturale ce conțin capsaicină.
4. Studiați domeniile de utilizare a capsaicinei: în industria farmaceutică (prezentați și analizați medicamentele); în industria alimentară (prezentați și analizați produsele alimentare); în industria cosmetică (prezentați și analizați produsele cosmetice).
5. Formulați concluzii în baza informațiilor identificate în articolele științifice.

BIBLIOGRAFIE

1. DIUG, E., GURANDA, D., CIOBANU, C. *Biofarmacia și farmacocinetica ed. (II)*. Chișinău, CEP Medicina, 2019, 205 p.
2. CIOBANU, C., GURANDA, D. *Methodological guide for practical lessons at Biopharmacy and pharmacokinetics for 5th year students of the faculty of pharmacy*. Chisinau, 2019, 54 p.
<https://library.usmf.md/ro/library/tehnologia-medicamentului/ciobanu-c-guranda-d-methodological-guide-practical-lessons>
3. BHISE, S.B., DIAS, R.J., DHAWALE, S.C., MALI, K.K. *Laboratory manual of biopharmaceutics and pharmacokinetics*. Trinity Publishing House, 2010, 168 p.
4. ГЛАДЫШЕВ В.В., ДАВТЯН Л.Л., ДРОЗДОВ А.Л., БИРЮК И.А., КЕЧИН И.Л. *Биофармация. Учебник для фармацевтических вузов и факультетов. 2-е изд.* ЧМП «Экономика», 2018, 250 с.
5. MIRCIOIU, C., MIRON, D., RĂDULESCU, F., MIRCIOIU, I., ANUȚA, V. *Elemente de biofarmacie și farmacocinetică. Evaluări comparative și corelări, Vol. 2*. Editura Universitară „Carol Davila”, București, 2008, 136 p.
6. NICOLETA CRISTEA Aurelia. *Tratat de farmacologie. Editia I*. Editura medicală, 2020, 1332 p.
7. DICKINSON, P.A., LEE, W.W., STOTT, P.W., TOWNSEND, A.I., et.al. *Clinical relevance of dissolution testing in quality by design*. In: *The AAPS Journal, Vol. 10 (2)*, 2008. pp. 380-390.
<https://doi.org/10.1208/s12248-008-9034-7>
8. ХОРУЖАЯ, Т.Г., ЧУЧАЛИН, В.С. *Биофармация – научное направление в разработке и совершенствовании лекарственных препаратов: Учебное пособие*. – Томск: Лаборатория оперативной полиграфии Сиб ГМУ, 2006, 75 с.
9. LEUCUȚA Sorin. *Biofarmacie și farmacocinetică*. Editura Dacia, Cluj-Napoca, 2002, 304 p.

10. GONCEAR, V., SCUTARI, C., CEKMAN, I., GORCEACOVA, N. *Farmacologie*. Chișinău, CEP Medicina, 2013, p. 12-80. ISBN 978 9975-118.08-8.
11. GARG, U., JAIN, K. Dermal and transdermal drug delivery through vesicles and particles: preparation and applications. In: *Advanced pharmaceutical bulletin*, 12(1), 2022, pp. 45-57. <https://doi.org/10.34172/apb.2022.00612>
12. KAUR Nirlep. Transdermal drug delivery through carriers: transfersomes. In: *PharmaTutor*, 2(12), 2014, pp. 77-85. ISSN: 2347-7881.
13. ALVAREZ-FIGUEROA, M.J., PESSOA-MAHANA, C.D., PALAVECINO-GONZÁLEZ, M.E., et.al. Evaluation of the membrane permeability (PAMPA and skin) of benzimidazoles with potential cannabinoid activity and their relation with the biopharmaceutics classification System (BCS). In: *AAPS PharmSciTech*, 12(2), 2011, pp. 573-578. <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9622-1>
14. AMIDON, K.S., LANGGUTH, P., LENNERNÄS, H., YU L., AMIDON, G.L. Bioequivalence of Oral Products and the Biopharmaceutics Classification System: Science, Regulation, and Public Policy. In: *Clin Pharmacol Ther.*, 90(3), 2011, pp. 467-470. <https://doi.org/10.1038/clpt.2011.109>
15. DAHAN, A., MILLER, J.M., AMIDON, G.L. Prediction of solubility and permeability class membership: provisional BCS classification of the world's top oral drugs. In: *The AAPS Journal*, 11(4), 2009, pp. 740-746. <https://doi.org/10.1208/s12248-009-9144-x>
16. GONCIAR, V. Recomandări metodice pentru lucrări practice la farmaco- și fitoterapie : (Facultatea de Farmacie) / V. Gonciar, C. Scutari, E. Bodrug ; USMF "Nicolae Testemițanu", Chișinău : Medicina, 2019 – 67 p.

Maria GONȚA

**BIOFARMACIA ȘI FARMACOCINETICA
ÎNDRUMAR
PENTRU LUCRĂRILE DE LABORATOR**

Redactare – **Ariadna STRUNGARU**

Asistență computerizată – **Carolina GRIGORAȘ**

Bun de tipar Formatul 70x100 ¹/₁₂

Coli de tipar 14,3 Coli editoriale 5,9

Comanda Tirajul 50 ex.

Centrul Editorial – Poligrafic al USM

str. Al. Mateevici, 60, Chișinău, MD-2009