

ANNA SYKUŁA-ZAJĄC
PAULINA ZDZIARSKA

Instytut Podstaw Chemii Żywności
Politechnika Łódzka

ZASTOSOWANIE SPEKTROFOTOMETRII UV-VIS DO OZNACZENIA ROZPUSZCZALNOŚCI CHLOROWODORKU BUPIWAKAINY

Opiniodawca: dr hab. inż. Elżbieta Łodyga-Chruścińska, prof. PŁ

W celu wstępnego zbadania rozpuszczalności i ogólnego zachowania się chlorowodorku bupiwakainy, leku znieczulającego miejscowo, w różnych rozpuszczalnikach oraz w środowiskach o różnym pH i przy zmiennych stężeniach wykorzystano spektroskopię UV-Vis. W literaturze światowej, jak i polskiej znajduje się niewiele informacji dotyczących tego typu badań, dlatego też wyniki uzyskane w tej pracy stanowią pewne uzupełnienie stanu wiedzy w tym zakresie.

1. Wprowadzenie

Rozpuszczalność substancji leczniczej jest jednym z najważniejszych czynników wpływających na dostępność farmaceutycznej leku [1,2]. Słabo rozpuszczalną w wodzie substancję leczniczą modyfikuje się w celu zwiększenia jej rozpuszczalności. W tym celu, można przeprowadzić zmianę pH roztworu [3], chemiczną modyfikację cząsteczki substancji leczniczej [4], reakcję kompleksowania substancji leczniczej związkami hydrofilowymi [5], użycie różnych rozpuszczalników [6,7], dodanie solubilizatorów [8] lub zastosowanie odpowiedniej formy polimorficznej danego leku [9-12].

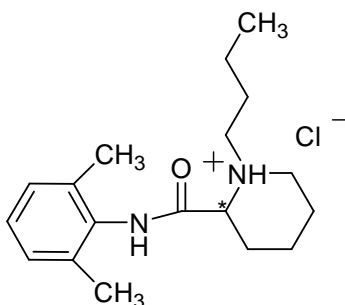
W celu wyznaczenia rozpuszczalności farmaceutyków stosuje się różne metody badawcze, tj. metodę mieszania [13], kolumny przepływowej [14], kalorymetryczną [14,15] czy spektrofotometrii UV-Vis [16].

Jako badany obiekt wybrano bupiwakainę w postaci chlorowodorku (BupiHCl) – związek chemiczny wykorzystywany w wielu dziedzinach medycyny jako środek miejscowo znieczulający. Chlorowodorek bupiwakainy to racemiczny lek o budowie amidu, będący N-butyłową pochodną piperydiny. Z literatury wiadomo,

że rozpuszczalność chlorowodoru bupiwakainy w wodzie wynosi 50 mg/l, w etanolu – 760 mg/l [17]. W buforze fosforanowym rozpuszczalność BupiHCl jest słaba, a powyżej pH 6.5 rozpuszczalność leku maleje.

2. Chlorowodorek bupiwakainy (BupiHCl)

Obecnie najbardziej rozpowszechnionym amidowym środkiem znieczulającym miejscowo do znoszenia bólu okołoperacyjnego jest chlorowodorek bupiwakainy (Marcain, BupiHCl) (rys. 1). Jest to pochodna ksylidyny, będąca racematem zawierającym formę lewo- i prawoskrętną w stosunku 1:1.



Rys. 1. Wzór strukturalny chlorowodoru bupiwakainy

Bupiwakaina należy do rodziny związków 1-alkilo-2',6'-piperokoloksyilididów. W jej cząsteczce płaszczyzna amidowa jest skrzyżowana w stosunku do pierścienia benzenowego o około 70°, a grupa amidowa i *N*-alkilowy podstawnik pierścienia piperidyny (o konformacji krzesłowej) leżą w pozycji *cis* i są umiejscowione równikowo. Uprotonowane cząsteczki leku są połączone wiązaniami wodorowymi pomiędzy anionami chloru, tworząc równoległe wiązania wodorowe w kryształach [18].

Chlorowodorek bupiwakainy powoduje odwracalne zahamowanie przewodnictwa nerwowego. Podawanie tego leku w postaci wolnej zasady czy w formie zjonizowanej może wywołać znieczulenie z powodu ogólnego fizykochemicznego zaburzenia osłonki mielinowej neuronu oraz zablokowania kanałów sodowych w membranach neuronowych [19-21].

Chlorowodorek bupiwakainy (BupiHCl) został po raz pierwszy zsyntetyzowany w 1957 roku w Szwecji przez Ekenstam'a [22]. Był to pierwszy pojedynczy długo działający lek o budowie amidowej. W roku 1963 po raz pierwszy zastosowano go jako środek znieczulający miejscowo, po czym odkryto, że jest on czterokrotnie bardziej toksyczny niż mepiwakaina [23]. W 1979 roku firma AstraZeneca otrzymała pierwsze pozwolenie na dopuszczenie BupiHCl do obrotu. Klinicznie po raz pierwszy bupiwakaina w postaci chlorowodoru została użyta w krajach skandynawskich, a następnie w Japonii i Niemczech [24].

Bupiwakaina w postaci wolnej zasady występuje jako krystaliczny proszek w temperaturze otoczenia. W tej formie bupiwakaina jest skuteczna w przechodzeniu przez osłonki nerwowe i w przestrzenie zewnątrzkomórkowe, gdzie cząsteczka może oddziaływać z receptorem kanału jonu sodowego. Względna rozpuszczalność i biodostępność wolnej zasady bupiwakainy w porównaniu z solą – chlorowodorkiem, jest bardzo ważnym problemem. Podstawą zrozumienia tego problemu może być poznanie strukturalnych właściwości tych substancji. Cheung i współpracownicy po udoskonaleniu Rietvelda (*Rietveld refinement*) określili ostateczne parametry komórki podstawowej zasady bupiwakainy [19].

Właściwości fizykochemiczne chlorowodoru bupiwakainy są przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1

Właściwości fizykochemiczne chlorowodoru bupiwakainy [25]

Nazwa systematyczna	1-butylo-N-(2,6-dimetylofenylo)piperidyno-2-karboksyamid
Nazwa zwyczajowa	chlorowodorek bupiwakainy
Synonimy	AH-2250; (+)-Bupivacaine hydrochloride; 1-Butyl-2',6'-piperidylidide hydrochloride (+-); (+,-)-1-Butyl-2',6'-piperidylidide monohydrochloride, monohydrate; LAC-43; Marcaine hydrochloride; 2-piperidinecarboxamide; 1-butyl-N-(2,6-dimethylphenyl)-monohydrochloride, monohydrate;
Wzór sumaryczny	C₁₈H₂₈N₂O • HCl, H₂O
Masa molowa	342.9 g/mol
Postać i właściwości	biały, krystaliczny proszek
Temperatura topnienia	255-256 °C
Rozpuszczalność w wodzie	50 mg/ml (przy ogrzewaniu)
Rozpuszczalność w etanolu	760 mg/ml
Rozpuszczalność w buforze fosforanowym	słaba
Rozpuszczalność	maleje przy pH > 6,5
pK _a	8,1

Bupiwakaina została wprowadzona na rynek w 1965 roku. Szybko zyskała sobie popularność ze względu na jej długi czas działania. Pierwszy opisany przypadek toksyczności bupiwakainy został odnotowany w 1966 roku. Czternaście lat zajęło pełne rozpoznanie toksyczności bupiwakainy. Odnotowano również przypadki śmiertelne [23].

Środek znieczulający miejscowo – BupiHCl wpływa na zahamowanie przewodzenia impulsów nerwowych we włóknach czuciowych. Przy wytwarzaniu blokady ruchowej jest nieskuteczny. Podanie chlorowodoru bupiwakainy zarówno w formie zasadowej, jak i w formie jonowej wywołuje znieczulenie w wyniku ogólnych fizykochemicznych zakłóceń w osłonce mielinowej neuronu oraz zahamowanie zamykania i otwierania kanałów sodowych w membranach neuronowych. Środek ten podawany jest w formie zastrzyku z roztworu [19]. Czas znieczulenia przewodowego wynosi 240-480 min. Dodatek epinefryny zmniejsza toksyczność leku, nie wydłużając jednak czasu jego działania. BupiHCl charakteryzuje się silnym i długotrwałym znieczuleniem (do 10 godz.), rozpoczynającym się po około 2-10 min. od chwili wstrzyknięcia [26].

Bupiwakaina podlega metabolizmowi w wątrobie i tylko 6% podanej dawki jest wydalane z moczem w postaci niezmienionej. U dorosłych okres półtrwania leku wynosi 3.5 godz. Podanie bupiwakainy może wywołać objawy toksyczności, takie jak: drętwienie języka, ograniczenie kontaktu, zawroty głowy, niewyraźne widzenie, drżenie mięśniowe, senność, drgawki, utratę przytomności oraz zatrzymanie oddechu [27].

BupiHCl jest klinicznie dostępna jako racemat. Obydwa enancjomery są aktywne, ale enancjomer S(-) charakteryzuje się dłuższym czasem działania [28]. Bupiwakaina w postaci chlorowodoru stosowana jest w takich dziedzinach medycyny, jak ginekologia, położnictwo, chirurgia ogólna, okulistyka czy stomatologia ogólna. Służy również do monitorowania natężenia bólu po zabiegach chirurgicznych. Środek ten może wywołać objawy toksyczności, a nawet doprowadzić do śmierci, dlatego też podawana może być wyłącznie przez lekarzy, przy ciągłym monitorowaniu funkcji życiowych.

3. Spektrofotometria UV-Vis

Metody spektroskopowe są dużą grupą metod analitycznych pozwalających na identyfikację związku chemicznego, jego struktury oraz rodzaju wiązań chemicznych na podstawie badań widm. Ważne jest dobranie odpowiedniej metody, gdyż jedna metoda nie pozwala na wyznaczenie wszystkich parametrów badanej substancji. Metody te znalazły różnorodne zastosowania między innymi w medycynie, farmacji i chemii [29].

Różne metody spektroskopowe dostarczają odmiennych, zazwyczaj niekompletnych informacji o cząsteczkach substancji absorbującej. Informacje te potwierdzają się i wzajemnie uzupełniają. Wiele widm cząsteczkowych jest tak bardzo charakterystycznych dla substancji, że można je zidentyfikować po porównaniu ich z uprzednio otrzymanymi widmami, zgromadzonymi w odpowiednich bazach danych lub katalogach. Zatem metodyka identyfikacji substancji organicznych jedynie na podstawie ich widm wykazuje pewne zalety i wady, które zostały przedstawione w tabeli 2.

Tabela 2

Zalety i wady metod spektroskopowych [30]

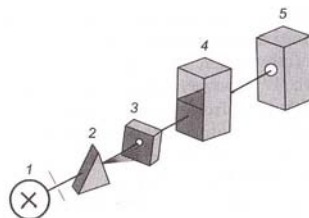
ZALETY	WADY
wymaga niewielkiej ilości substancji badanej	konieczność posiadania drogiej aparatury
badana substancja nie zużywa się w trakcie wykonywania widm (z wyjątkiem spektrometrii masowej),	uzyskane informacje otrzymuje się w zaszyfrowanej postaci widm, które wymagają ich odpowiedniej interpretacji, co wymaga wiedzy i doświadczenia
czas wykonywania widm jest stosunkowo krótki	

Spektrofotometria w zakresie nadfioletu (ang. *ultra-violet* – UV, 200-380 nm) i promieniowania widzialnego (ang. *visible* – Vis, 380-780 nm), czyli spektrofotometria UV-Vis jest jedną z najstarszych metod instrumentalnych w analizie chemicznej. Przedmiotem badań spektrofotometrii UV-Vis jest elektronowe widmo absorpcyjne. Powstaje ono w wyniku wzbudzenia elektronów, gdy w wyniku absorpcji promieniowania zachodzi przeniesienie elektronu z orbitalu o niższej energii na wolny orbital o energii wyższej [31].

Natężenie promieniowania po przejściu przez ośrodek absorbujący (I) jest porównywalne z natężeniem wiązki promieniowania monochromatycznego padającej na jednorodny ośrodek absorbujący (I_0). Stosunek I/I_0 jest nazywany transmitancją (T). Transmitancja wskazuje, jaka część promieniowania padającego została przepuszczona przez roztwór. Często transmitancja jest podawana w procentach %T. Absorbancja (A) jest oparta na transmitancji: $A = -\log(T)$.

Podstawowymi częściami spektrofotometru są (rys. 2): źródło promieniowania – lampy (deuterowe, wolframowo-halogenowe, wysokociśnieniowe łukowe lampy ksenonowe); monochromator składający się z dwóch szczelin: wejściowej (regulującej natężenie wiązki promieniowania ze źródła), wyjściowej (wyodrębniającej z widma wiązki o wybranej długości fali) oraz urządzenia monochromatującego (pryzmat i siatka dyfrakcyjna); szczelina umożliwiająca zmianę natężenia

promieniowania przechodzącego przez badaną próbkę (zwiększenie szczeliny powoduje zwiększenie natężenia promieniowania, ale równocześnie pogorszenie monochromatyzacji); detektor umożliwiający obiektywną ocenę intensywności zabarwienia i bezpośredni pomiar natężenia promieniowania (podstawą działania detektora jest efekt fotoelektryczny, polegający na zmianie energii świetlnej na energię elektryczną) [32].



Rys. 2. Schematy spektrofotometrów: a) klasycznego jednowiązkowego
1 – źródło promieniowania, 2 – monochromator, 3 – szczelina, 4 – próbka, 5 – detektor [32]

Wyróżnia się spektrofotometry jedno- i dwuwiązkowe. W klasycznym jednowiązkowym spektrofotometrze wiązka światła przechodzi najpierw przez roztwór odniesienia, a następnie, po zamianie kuwet, przez próbkę badaną. W dwuwiązkowym instrumencie wiązka promieniowania ze źródła jest dzielona przez odpowiedni układ na dwie równocenne wiązki przechodzące równolegle – jedna przez roztwór, a druga przez roztwór badany. Różnice absorbancji w trakcie pomiaru wskazuje detektor. W innych instrumentach dwie wiązki przechodzą przez tzw. przerywacz (*ang. beam chopper*), który może blokować jedną z dwóch wiązek promieniowania. Detektor wymienia się pomiędzy mierzoną wiązką próbki badanej a odniesienia [33].

W spektrofotometrii UV-Vis badanymi próbkami są najczęściej ciecze, chociaż absorbancja gazów, nawet ciał stałych, może być również mierzona. Mierzone substancje są standardowo umieszczane w przezroczystym naczynku, znanym jako kuweta. Kuwety charakteryzują się zazwyczaj prostokątnym kształtem, zwykle z wewnętrzną szerokością 1 cm. (Szerokość ta staje się długością drogi w prawie Beer-Lambert). W niektórych aparatach próbki mogą być stosowane jako kuwety. Najlepsze kuwety są wykonane z wysokiej jakości kwarcu, mimo to kuwety szklane i plastikowe są obecnie w ogólnym użytku. (Szkło, a przeważnie plastikowe materiały pochłaniają UV, które ogranicza ich przydatność dla widzialnych długości fal) [33].

4. Część doświadczalna

4.1. Materiały

Racemat chlorowodoru bupiwakainy został zakupiony w postaci monohydratu od firmy Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA. Chlorowoderek bupiwakainy – lek znieczulający miejscowo poddany badaniom spektrofotometrycznym był substancją czystą, co potwierdziło widmo IR.

Rozpuszczalniki użyte w opisywanej analizie wybrano na podstawie ich właściwości donorowych i akceptorowych (tabela 3). Pierwszym i najczęściej stosowanym była woda jako najbardziej rozpowszechniony w przyrodzie rozpuszczalnik. Metanol, etanol, izopropanol, 1-butanol, *N,N*-dimetyloformamid (DMF), aceton czy octan etylu zastosowano w celu zanalizowania potencjalnych właściwości rozpuszczania chlorowodoru bupiwakainy.

Środowisko kwasowe i zasadowe zostały uzyskane poprzez sporządzenie roztworów kwasu solnego (0.01 M) i wodorotlenku sodu (0.002 M). Środowiskiem obojętnym była podwójnie destylowana woda. Wartości pH każdego środowiska zostały podane przez pehametr.

4.2. Przygotowanie próbek do pomiarów spektrofotometrycznych

Przygotowanie serii próbek do pomiarów spektrofotometrycznych polegało na otrzymaniu roztworów BupiHCl o stężeniach 1 mg/ml i 3.33 mg/ml.

4.3. Aparatura

Pomiary pH roztworów 0.01 M HCl i 0.002 M NaOH oraz wody podwójnie destylowanej zostały wykonane przy użyciu pH-metru Mettler Delta 320, z elektrodą InLab 414. Do skalowania wykorzystano wzorce pH 4,01 i 7,00.

Analizy spektrometryczne roztworów chlorowodoru bupiwakainy zostały przeprowadzone przy użyciu spektrofotometru UV-Vis Hewlett Packard 8453 w zakresie 190-1100 nm z oprogramowaniem 845x UV-Visible Chemstation Software. Pomiaru spektrometryczne wykonano w kuwetach pomiarowych UV/Vis Spectroscopy Cells (Perkin Elmer, Part No. B0631009) o grubości 10.00 mm.

Substancję wyjściową poddano dodatkowo analizie przy użyciu spektrometru Thermo Nicolet 6700 FT-IR pracującego w zakresie średniej podczerwieni od 4000-400 cm^{-1} .

Tabela 3

Parametry fizykochemiczne rozpuszczalników użytych w części doświadczalnej

Rozpuszczalnik	Wzór sumar.	M [g/mol]	T _{wz.} [°C]	d [g/ml]	DN _{SbCl5} [kcal/mol]	AN [kcal/mol]	□	μ ^a [D]	E _T [kcal/mol]	Z [kcal/mol]
Rozpuszczalnik apolarny										
octan etylu	C ₄ H ₈ O ₂	88.11	77.1	0.8946	(17.1)	9.3	6.0	1.88	38.1	-
Rozpuszczalniki polarne protonowe										
woda	H ₂ O	18.02	100	0.998	(33, 18)	54.8	81.0	1.834	63.1	94.6
metanol	CH ₃ OH	32.04	65	0.791	(30, 19)	41.5	32.70	2.87	55.5	83.6
etanol	C ₂ H ₅ OH	46.07	79	0.789	(32)	37.9	24.55	1.66	51.9	79.6
izopropanol	C ₃ H ₇ OH	60.10	82	0.781	(36)	33.6	19.92	1.66	48.6	76.3
1-butanol	C ₄ H ₉ OH	74.12	118	0.810	(29)	36.8	17.51	1.75	50.2	77.7
Rozpuszczalniki polarne aprotynowe										
N,N-dimetyloformamid	C ₃ H ₇ NO	73.09	153	0.944	26.6	16.0	36.71	3.86	43.9	68.4
dimetylosulfotlenek	C ₂ H ₆ OS	78.13	189	1.0958	29.8	19.3	45.1	3.9	45.0	71.1

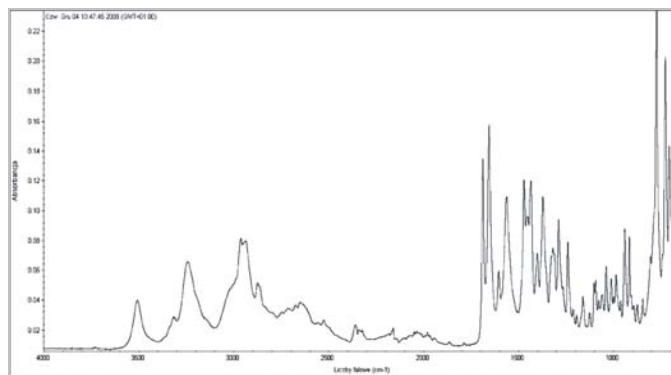
Objaśnienia skrótów:

wzór sumar. – wzór sumaryczny; M – masa molowa; T_{wz.} – temperatura wrzenia; d – gęstość; DN_{SbCl5} – liczba donorowa Gutmann'a; AN – liczba akceptorowa Gutman'a; ε- stała dielektryczna; μ^a – moment dipolowy; E_T – wartość charakteryzująca moc akceptora wg Dimroth'a i Reichardt'a; Z – wartość charakteryzująca moc akceptora wg Kosowera; C_p – molowa pojemność cieplna pod stałym ciśnieniem.

5. Wyniki i dyskusja

Pierwszym krokiem w analizie racemicznego chlorowodoru bupiwakainy było wizualne zaobserwowanie procesu rozpuszczania się BupiHCl w różnych rozpuszczalnikach. W octanie etylu z grupy rozpuszczalników polarnych BupiHCl w tym środowisku jest bardzo słabo rozpuszczalna. W przypadku rozpuszczalników polarnych protonowych wraz ze spadkiem wartości momentu dipolowego, rozpuszczalność chlorowodoru bupiwakainy zmniejsza się. W grupie rozpuszczalników polarnych aprotonowych zaobserwowano, że rozpuszczalność badanej substancji jest lepsza w acetonie niż w DMF (tabela 3).

Drugim etapem badań racemicznego chlorowodoru bupiwakainy było potwierdzenie jego struktury za pomocą spektrometrii IR. Zarejestrowane widmo (rys. 3) udowodniło czystość związku w porównaniu z widmem przedstawionym w raporcie WHO z 1989r [34].



Rys. 3. Widmo IR racemicznego chlorowodoru bupiwakainy

W tabeli 4 zostały podane odpowiednie pasma absorpcyjne grup funkcyjnych obecnych w cząsteczce chlorowodoru bupiwakainy. Racemiczny chlorowodorek bupiwakainy wykazuje szerokie pasmo absorpcji w zakresie 3600-650 cm^{-1} . Pasma absorpcyjne charakterystyczne dla odpowiednich grup funkcyjnych w pełni potwierdzają tożsamość chlorowodoru bupiwakainy.

Tabela 4

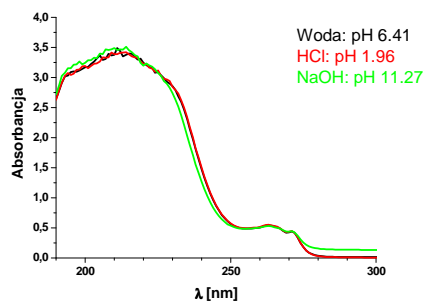
Pasma absorpcyjne i odpowiadające im grupy funkcyjne [35-38]

Pasma absorpcyjne [cm^{-1}]	Grupy funkcyjne
3600-1300	Rejon grup funkcyjnych
3500-3100	-NH
3100-2800	-CH
2800-2000	Częstości drgań C...C, C...O, C...N

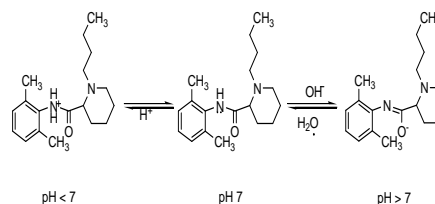
Tabela 4. (cd.)

1800-1500	Częstość drgań C=C, C=O, C- C, C- N
3200-3000	C-H węglowodorów aromatycznych
2000-1800	C-H występujące poza płaszczyzną pierścienia aromatycznego
1800-1600	C=O grupy karbonylowej, C=C
1600-1500	C-C, C=C pierścienia
1500-1350	Grupy metylenowa i metylowa
1300-700	Niepowtarzalne złożone drgania rozciągające i deformacyjne szkieletu cząsteczki
1000-635	C-H poza płaszczyzną cząsteczki

Trzecim etapem analiz było zbadanie zachowania się racemicznej cząsteczki BupiHCl o tym samym stężeniu w różnych środowiskach: obojętnym (pH 6.41), kwasowym (pH 1.96) i zasadowym (pH 11.27) (rys. 4).



Rys. 4. Widma absorpcyjne BupiHCl w funkcji pH

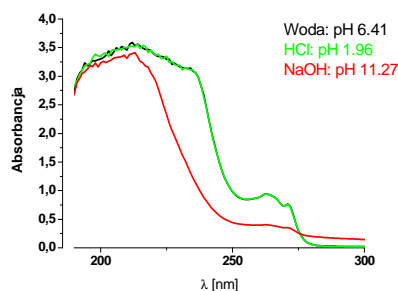


Rys. 5. Prawdopodobna struktura racemicznego BupiHCl w funkcji pH

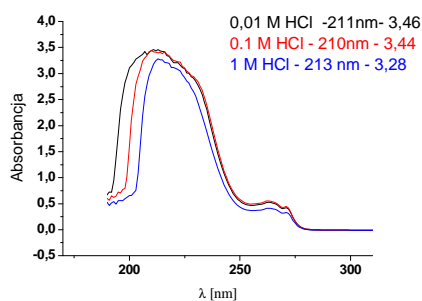
Z krzywych przedstawionych na rys. 4 wynika, że na rozpuszczalność BupiHCl nie ma wpływu pH środowiska, w którym jest prowadzony proces rozpuszczania. Wszystkie krzywe mają podobne szerokości pasm, jak i intensywności fali. W zakresie długości fal 263-271 nm chlorowodorek bupiwakainy wykazuje charakterystyczne piki dla środków znieczulających miejscowo, co potwierdzają dane źródłowe [34, 39]. Wiadomo również, że stopień dysocjacji zwiększa się przy obniżaniu pH środowiska, co sprzyja rozpuszczaniu się zasad, natomiast przy podwyższaniu pH stopień dysocjacji zmniejsza się i w konsekwencji powoduje wytrącanie niezdysoncjowanych i nierozpuszczalnych wolnych zasad [40]. Mając to na uwadze, spodziewano się, że wraz ze wzrostem pH krzywe absorpcyjne będą się różnić. Prawdopodobnie przejścia elektronowe w strukturze badanego związku, co przedstawia (rys. 5), są zbyt słabe i nie mają

znaczącego wpływu na przebieg krzywych absorpcyjnych BupiHCl w różnym pH środowiska.

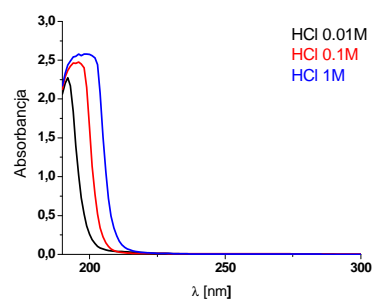
Po 24 godzinach w naczyniu, w którym rozpuszczono BupiHCl w środowisku zasadowym, zauważono wytrącenie się osadu. W pH 11.27 badany związek uległ rozkładowi, co zostało potwierdzone przez powtórny pomiar absorpcji próbek BupiHCl w różnym pH środowiska po 24 godz. (rys. 6).



Rys. 6. Widma absorpcyjne BupiHCl w różnym pH środowiska wykonane po 24 godz.



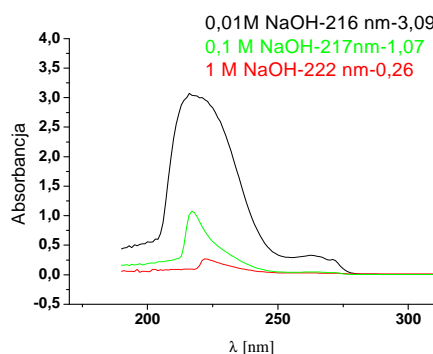
Rys. 7. Widma absorpcyjne BupiHCl w roztworach 0.01, 0.1 i 1 M HCl



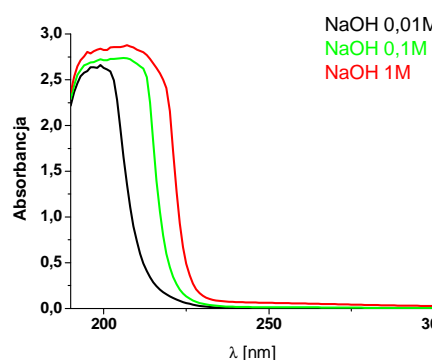
Rys. 8. Widma absorpcyjne 0.01, 0.1 i 1 M HCl

Kolejnym wykonanym badaniem było sprawdzenie przebiegu krzywych BupiHCl w zależności od stężenia kwasu, którym był kwas chlorowodorowy (HCl) (rys. 7). Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia HCl intensywność i szerokość pasma krzywych odpowiadających trzem próbkom BupiHCl zmniejsza się. Dla porównania wykonano pomiary absorpcji roztworów HCl: 0.01, 0.1 i 1 M (rys. 8). Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia HCl maksimum absorpcji przesunęło się ku dłuższym falom, zarówno dla roztworu HCl, jak i roztworu BupiHCl (rys. 7 i 8).

Podobne zależności zaobserwowano w przypadku chlorowodoru bupiwakainy rozpuszczonej w roztworach wodorotlenku sodu (NaOH) o różnym stężeniu (rys. 9). Przed przystąpieniem do pomiarów spektrofotometrycznych BupiHCl rozpuszczonej w 0.01, 0.1 i 1 M NaOH zmierzono absorbancję samych roztworów NaOH (rys. 10). Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia roztworów NaOH szerokość pasma i ich intensywność zwiększa się.



Rys. 9. Widma absorpcyjne BupiHCl w roztworach 0.01, 0.1 i 1 M NaOH

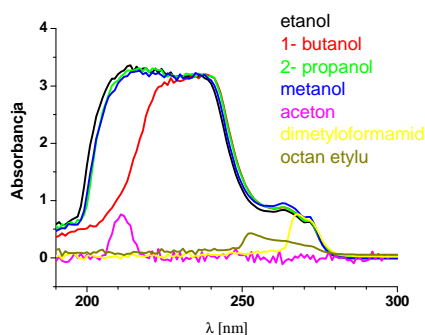


Rys. 10. Widma absorpcyjne 0.01, 0.1 i 1 M NaOH

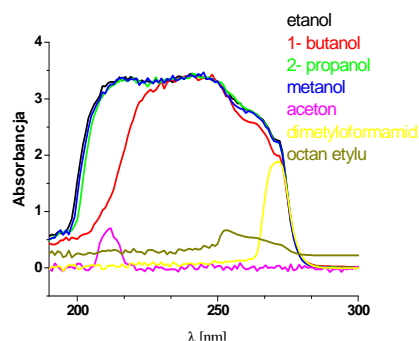
Wraz ze wzrostem stężenia drastycznie zmniejszyła się zarówno intensywność, jak i szerokość pasma krzywych absorpcyjnych BupiHCl w różnych stężeniach NaOH (rys. 9). Charakterystyczne piki w zakresie 263-271 nm nie są widoczne w roztworach 0.1 i 1 M NaOH.

Kolejnym etapem w analizie rozpuszczalności BupiHCl było zanalizowanie krzywych absorpcyjnych roztworów BupiHCl o różnym stężeniu w różnych rozpuszczalnikach – polarnych i niepolarnych (rys. 11 i 12). Analizę rozpoczęto od przeprowadzenia kontrolnych pomiarów spektrofotometrycznych samych rozpuszczalników bez dodatku chlorowodoru bupiwakainy (rys. 13).

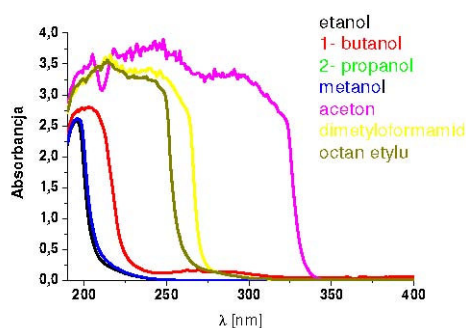
Po badaniach kontrolnych rozpuszczalników przystąpiono do analiz odpowiednich roztworów BupiHCl o stężeniu 1 mg/ml. Z wykresu na rys. 11 widać, że krzywe absorpcyjne odpowiadające BupiHCl rozpuszczonej w rozpuszczalnikach z grupy rozpuszczalników polarnych protonowych: etanol (krzywa czarna), metanol (krzywa niebieska), 2-propanol (krzywa zielona) i 1-butanol (krzywa czerwona) posiadają trzy piki (I), (II) i (III) w następujących zakresach długości fal: (I) 196-256, (II) 256-270 i (III) 270-277 nm.



Rys. 11. Widma absorpcyjne roztworów BupiHCl o stężeniu 1 mg/ml



Rys. 12. Widma absorpcyjne roztworów BupiHCl o stężeniu 3,33 mg/ml



Rys. 13. Widma absorpcyjne rozpuszczalników polarnych i niepolarnych bez obecności BupiHCl

W przypadku rozpuszczalników polarnych aprotowych – acetonu i dimetyloformamidu pojawiły się dobrze wykształcone piki. Jednakże z powodu różnic w polarności acetonu i DMF pozycje pików występują w różnym zakresie długości fal. Pik na krzywej absorpcyjnej (krzywej brązowej) dla BupiHCl w octanie etylu jest rozmyty i bardzo szeroki. Nierozpuszczalność chlorowodoru bupiwakainy w octanie etylu ma odzworowanie na przedstawionej krzywej absorpcyjnej.

Porównując wykresy (rys. 11) i (rys. 13), widać, że dodanie chlorowodoru bupiwakainy do rozpuszczalników zmienia widma absorpcyjne rozpuszczalników. W przypadku alkoholi zostały zachowane charakterystyczne piki dla środków znieczulających miejscowo, natomiast w przypadku acetonu, dimetyloformamidu oraz octanu etylu piki te zniknęły.

Przeprowadzono również analizę spektrofotometryczną roztworów BupiHCl w ww. rozpuszczalnikach w trzykrotnie wyższym stężeniu. W wyniku tego otrzymano krzywe absorpcyjne przedstawione na rys. 12. Po zwiększeniu ilości BupiHCl zauważono, że szerokość pików na krzywych zwiększa się. Także piki

dla środków znieczulających miejscowo zostały całkowicie utracone we wszystkich rozpuszczalnikach. Podobnie jak w przypadku użycia roztworów o stężeniu 1 mg/ml BupiHCl zakresy długości fal i intensywności pików charakterystycznych dla chlorowodoru bupiwakainy są takie same dla rozpuszczalników, takich jak: etanol, izopropanol i metanol. W przypadku dimetyloformamidu intensywność pików zwiększyła się. Krzywe absorpcyjne dla octanu etylu oraz acetonu różnią się nieznacznie od tych na wykresie na (rys. 11) i charakteryzują się takim samym wyglądem pików.

6. Podsumowanie

Zastosowanie spektrofotometru UV-Vis pozwoliło na zbadanie rozpuszczalności i ogólnego zachowania się chlorowodoru bupiwakainy, leku znieczulającego miejscowo, w różnych rozpuszczalnikach oraz w środowiskach o różnym pH i przy zmiennych stężeniach.

BupiHCl rozpuszczona w różnych pH środowiska przy użyciu tej samej ilości środka farmaceutycznego nie wykazała żadnych różnic na krzywych absorpcyjnych. Prawdopodobnie przejścia elektronowe w cząsteczce chlorowodoru bupiwakainy nie mają wpływu na przebieg krzywych absorpcyjnych. Zaobserwowano tylko, że w funkcji czasu bupiwakaina w postaci chlorowodoru ulega rozkładowi.

Badając wpływ stężenia roztworów HCl i NaOH na krzywe absorpcyjne BupiHCl rozpuszczonej w tych roztworach, stwierdzono, że wraz ze wzrostem stężenia HCl intensywność i szerokość pasma pików na krzywych zmniejsza się, a także maksimum absorpcji pików przesuwa się ku dłuższym długościom fali. Natomiast podczas analizy procesu rozpuszczania BupiHCl w roztworze NaOH zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia roztworu drastycznie zmniejszyła się zarówno intensywność, jak i szerokość pasma krzywych absorpcyjnych BupiHCl w różnych stężeniach NaOH. Charakterystyczne pików w zakresie 263-271 nm nie są widoczne w roztworach 0.1 i 1 M NaOH. Najprawdopodobniej BupiHCl w roztworach o pH > 7 ulega rozkładowi.

Wizualnie i za pomocą aparatury zaobserwowano, że chlorowodorek bupiwakainy rozpuszcza się niezależnie od użytej ilości BupiHCl (1 i 3.33 mg/ml) w rozpuszczalnikach: polarnych protonowych – metanolu, etanolu, 1-butanolu, izopropanolu oraz w rozpuszczalnikach polarnych aprotonowych –dimetyloformamidzie i acetonie. Natomiast w octanie etylu – rozpuszczalniku apolarnym, BupiHCl nie ulega rozpuszczeniu, nawet przy zastosowaniu rozpuszczania mechanicznego (tabela 5).

Reasumując wstępną analizę rozpuszczalności środka farmaceutycznego – racemicznego chlorowodoru bupiwakainy – w różnych warunkach, można stwierdzić, że na rozpuszczalność BupiHCl ma wpływ przede wszystkim rodzaj

użytego rozpuszczalnika. Natomiast nie zaobserwowano wpływu pH środowiska na przebieg krzywych absorpcyjnych BupiHCl.

Tabela 5

Wpływ rozpuszczalnika na rozpuszczalność BupiHCl

Rozpuszczalność BupiHCl	Użyty rozpuszczalnik
dobra	polarny protonowy
	woda, metanol, etanol, izopropanol, 1-butanol
	polarny aprotynowy
nie rozpuszcza się	dimetyloformamid, aceton
	apolarny
	octan etylu

Literatura

- [1] **Janicki S., Sznitowska M., Zieliński W.:** Dostępność farmaceutyczna i dostępność biologiczna leków. Ośrodek Informacji Naukowej "Polfa", Warszawa, (2001).
- [2] **Blagden N., Matas D., Gavan P.T., York P.:** Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 59, 617-630, (2007).
- [3] **Woskowicz M.:** Biofarmaceutyczny System Klasyfikacji (BSC) jako nowoczesna metoda oceny właściwości fizykochemicznych i farmakokinetycznych środków leczniczych. *Farm. Pol.*, 64, 191-195, (2008).
- [4] **Lu J., Liong M., Zink J.I., Tamanoi F.:** Mesoporous silica nanoparticles as a delivery system for hydrophobic anticancer drugs. *Small*, 3, 1341-1346, (2007).
- [5] **Li P., Zhao L., Yalkowsky S.H.:** Combined effect of cosolvent and cyclodextrin on solubilization of nonpolar drugs. *J. Pharm. Sci.*, 88, 1107-1111, (1999).
- [6] **Ruelle P., Kesselring U.W.:** The hydrophobic effect. 2. Relative importance of the hydrophobic effect on the solubility of hydrophobes and pharmaceuticals in h-bonded solvents. *J. Pharm. Sci.*, 87, 998-1014, (1998).
- [7] **Ruether F., Sadowski G.:** Modeling the solubility of pharmaceuticals in pure solvents and solvent mixtures for drug process design. *J. Pharm. Sci.*, 98, 4205-4215, (2009).
- [8] **Jain P., Yalkowsky S.H.:** Solubilization of poorly soluble compounds using 2-pyrrolidone. *Int. J. Pharm.* 342, 1-5, (2007).
- [9] **Łodyga-Chruścińska E., Zakrzewski M., Kuberski S., Paluszkiewicz A., Dinnebier R.E., Sugimoto K.:** Preliminary characterization of new polymorphic forms of Bupivacaine HCl. *Ann. Pol. Chem. Soc.*, 2, 87-90, (2005).
- [10] **Giron D, Draghi M, Goldbronn C., Pfeffer S., Piechon P.:** Study of the polymorphic behaviour of some local anesthetic drugs. *J. Therm. Anal.*, 49, 913-927, (1997).
- [11] **Kieć-Konowicz K.:** Wybrane zagadnienia z metod poszukiwania i otrzymywania środków leczniczych. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 137-138, (2000).

- [12] **Grant D.J.W.:** Estimating the relative stability of polymorphs and hydrates from heats of solution and solubility data. *J. Pharm. Sci.*, 9, 1277-1287, (2001).
- [13] **Weiss A., Lynch J.:** Screening compounds for aqueous solubility: a new automated, high-throughput method for solubility determination. *Preclinica*, 2, 119-121, (2004).
- [14] **Zakrzewski A. & M.:** Solid state characterization of pharmaceuticals. Tychy. Pergamon, 2006, str. 591.
- [15] **Sapoundjie D., Lorenz H., Morgensten A.S.:** Determination of solubility data by means of calorimetr. *Thermochim. Acta*, 436, 1-9, (2005).
- [16] **Frant D.J.W, Brittain H.G.:** Solubility of pharmaceutical solids in physical characterisation of pharmaceutical solid. New York, Red. Marcel Dekker 1995, str. 321-386.
- [17] **Farmakopea Polska VI**, Polskie Towarzystwo farmaceutyczne, Warszawa, (2002).
- [18] **Csöregi I.:** structures and absolute configurations of enantiomers of two local anaesthetics: (2S)-1-methyl- and (2R)-1-butyl-2',6'-pipercoloxylidide hydrochlorides. *Acta Crystallogr.*, C48, 1794-1798, (1992).
- [19] **Cheung E.Y., Harris K.D.M., Johnston R.L., Kitchin S.J., Hadden K.L., Zakrzewski M.:** Rationalizing the structural properties of bupivacaine base – a local anesthetic – directly from powder x-ray diffraction data. *J. Pharm. Sci.* 93, 667-674, (2004).
- [20] **The Merck Index** Thirteenth Edition, Merck&Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, (2001).
- [21] **Leksykon farmacji** pod redakcją A. Danke, PZWL, Warszawa, (1990).
- [22] **Ekenstam B. Af, Egner B., Pettersson G.,** N-alkyl pyrrolidine and N-alkylpiperidine carboxylic acid amines. *Acta Chem. Scand*, 11, 1183-1190, (1957).
- [23] **Ruetsch Y.A., Böni T., Borgeat A.:** From cocaine to ropivacaine: the history of local anesthetic drugs. *Curr. Top. Med. Chem.*, 1, 175-182, (2001).
- [24] **Lagasse R.S., Marx G.F.:** Lessons learned from the bupivacaine experience. *Int. J. Obstetric Anesth.*, 6, 217-218, (1997).
- [25] **Farmakopea Polska VI**, Polskie Towarzystwo farmaceutyczne. Warszawa, 258-260, (2002).
- [26] **Grześkowiak E., Balcerkiewicz M., Olejniczak-Rabinek M., Melzer H.:** Dostępność biologiczna bupiwakainy z jej kompleksów inkluzyjnych z cyklodekstrynami. *Farm. Pol.*, 61, 310-313, (2005).
- [27] **Podlewski J.K., Chwalibogowska-Podlowska A.:** Leki współczesnej terapii. Wydawnictwo Fundacji Büchnera, Warszawa 1996, str. 123.
- [28] **Fawcett J.P., Kennedy J.M., Kumar A., Ledger R., Kumara G.M., Patel M.J., Zacharias M.:** Comparative efficacy and pharmacokinetics of racemic bupivacaine and S-bupivacaine in third molar burger. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 5, 199-204, (2002).
- [29] **Zieliński W., Rajca A.:** Metody spektroskopowe i ich zastosowania do identyfikacji związków organicznych. WNT, Warszawa, (2000).
- [30] **Cygański A.:** Metody spektroskopowe w chemii analitycznej. WNT, Warszawa, (1993).

- [31] **Gouw T.:** Nowoczesne metody instrumentalnej analizy. WNT, Warszawa, (1976).
- [32] **Szczepaniak W.:** Metody instrumentalne w analizie chemicznej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa (1996).
- [33] **Turek M., Senar X.L.:** Potentiometric and spectroscopic studies on di-, tri- and tetraglycine with copper(II) ions systems. Zesz. Nauk. Politech. Łódz. Chem. Spoż. Biotechnol., 1029, 16-34, (2008).
- [34] **WHO Collaborating Centre for chemical references substances WHO/PHARM/ 90-547.** Report on the work In 1989 by M. Westernork. str. 19- 22.
- [35] **Silverstein R. M., Bassler G.:** Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych. PWN, Warszawa, (1969).
- [36] **Szafran M., Dega-Szafran Z.:** Określenie struktury związków metodami spektroskopowymi. PWN, Warszawa, (1988).
- [37] **Woliński J., Terpiński J.:** Organiczna analiza jakościowa. PWN, Warszawa, (1973).
- [38] **Sawicka J. Janich-Kilian A., Cejner-Mania W., Urbańczyk G.:** Tablice chemiczne. Wydawnictwo Podkowa, Gdańsk, (2002).
- [39] **Wiberg K., Hagmana A., Burénc P., Jacobssona S.:** Determination of the content and identity of lidocaine solutions with UV-visible spectroscopy and multivariate calibration. 126, 1142-1148, (2001).
- [40] **Hermann T.:** Chemia fizyczna. Wydawnictwo lekarskie PZWL, Warszawa, (2007).

APPLICATION OF UV-VIS SPECTROPHOTOMETRY IN DETERMINATION OF SOLUBILITY OF BUPIVACAINE HYDROCHLORIDE

Summary

Preliminary examination of solubility and general behaviour of bupivacaine hydrochloride, local anaesthetic, in different solvents, pH environment and variable concentrations was performed using UV-Vis spectrophotometry. There are not much information, including this kind of examinations, in world and Polish literature. Therefore, obtained results in this paper present certain addition in knowledge in this area.

Institute of General Food Chemistry
Technical University of Lodz