

## Determinazione della Valnoctamide per spettrofotometria nell'infrarosso

La Valnoctamide (2-etyl-3-metilvalerammide) è un farmaco ad azione sedativa ed ansiolitica, introdotta in terapia<sup>1</sup> sotto forma di capsule o compresse normalmente dosate a 200 mg di principio attivo.

Nelle preparazioni farmaceutiche che la contengono può essere determinata con uno dei metodi generali delle ammidi (titolazione in ambiente anidro, colorimetria dell'acido idrossammico, titolazione dello zolfo ammidico, ecc.), certamente non specifici.

È questo un caso particolare in cui l'analisi quali-quantitativa può essere vantaggiosamente effettuata mediante spettrofotometria I. R. Tale metodo è più vantaggioso per la sua rapidità e perché ne permette contemporaneamente e inequivocabilmente il suo riconoscimento. Non sempre questa metodica viene usata nell'analisi farmaceutica e il caso in oggetto viene illustrato come un esempio significativo.

Considerato l'andamento spettrale I. R. della soluzione in cloroformio o in tetrachloruro di carbonio (Fig. 1) la banda a 1690 cm<sup>-1</sup>, caratteristica del gruppo am-

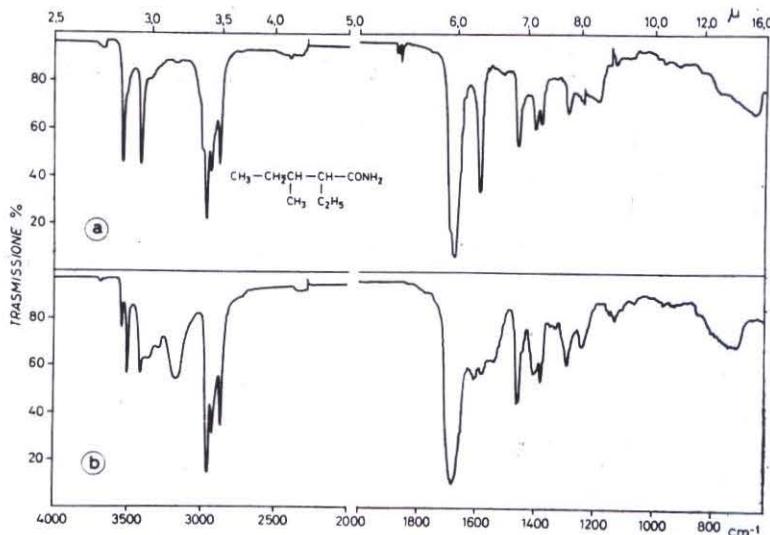


Fig. 1. — Spettri I. R. della Valnoctamide; a) in soluzione di cloroformio; b) in soluzione di tetrachloruro di carbonio.

midico alifatico non sostituito, viene scelta, anche in considerazione della sua intensità, come banda analitica.

*Materiali e metodi**Reattivi*

a) 2-metil-3-metilvalerammide, cristallizzata da acetone-acqua sino a p.f. 114-115°C e ulteriormente purificata per passaggio su colonna di allumina basica ( $\text{Al}_2\text{O}_3$  basico, C. Erba puro per cromatografia) ed eluendo con etanolo.

b) Soluzioni di 2-etyl-3-metilvalerammide a concentrazioni di 5; 4; 2,5; 1; 0,5 mg/ml in cloroformio.

*Apparecchiature*

a) Spettrofotometro I. R. Perkin Elmer 237, munito di celle di  $\text{NaCl}$  dallo spessore di 0,5 mm.

b) Colonnina cromatografica del diametro 10 mm lunga 17 cm, riempita con 5 g d'allumina basica e munita di imbuto di carico e beuta di raccolta da 100 ml.

*Curve di taratura.*

Si registrano gli spettri I. R., limitatamente alla regione della banda analitica, delle soluzioni di riferimento a concentrazioni decrescenti, sullo stesso foglio (Fig. 2).

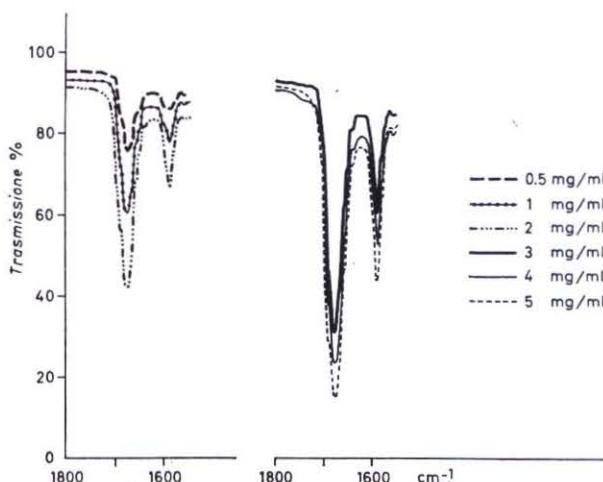


Fig. 2. — Andamento delle bande d'assorbimento a  $1680 \text{ cm}^{-1}$ , in funzione della concentrazione in soluzioni di cloroformio.

Si riportano in grafico i valori degli assorbimenti a  $1680 \text{ cm}^{-1}$ , dedotti con il metodo della linea di base <sup>2</sup>, rispetto a quelli della concentrazione e si traccia la curva di taratura che è lineare per i valori di concentrazione compresi tra 0,5 e 5 mg/ml (Fig. 3).

*Applicazione alle forme farmaceutiche (compresse o capsule).*

Dopo aver determinato il peso medio di una compressa o del contenuto di una capsula (P), si pesa in provetta con tappo a smeriglio una quantità di polvere (A) corrispondente a 35 mg circa di 2-etyl-3-metilvalerammide: si aggiunge 1 ml di acqua e si riscalda in bagnomaria a 50° per alcuni minuti, agitando saltuariamente; dopo raffreddamento si aggiungono 5 ml di alcool etilico, si agita ed infine si versa

nella colonnina da cromatografia. Si lava bene la provetta con 3 porzioni di alcool etilico ognuna di 3 ml e si eluisce con alcool etilico fino a raccogliere circa 50 ml di soluzione limpida.

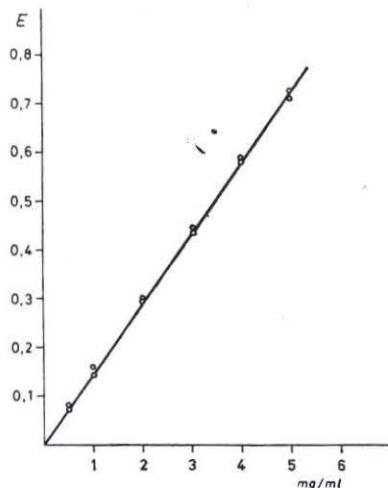


Fig. 3. — Curva di taratura.

L'eluato si evapora su bagnomaria in corrente d'azoto e il residuo si essicca nel vuoto per circa 2 ore, infine si scioglie in 3 ml di cloroformio e si porta al volume di 10 ml in cilindro tarato, lavando bene il recipiente con 2 porzioni di cloroformio ciascuna di 2,5 ml.

Si calcola la concentrazione nelle compresse o nelle capsule o mediante la curva di taratura oppure con riferimento all'assorbimento di una soluzione di confronto in cloroformio allestita come descritto alla concentrazione compresa tra 0,5 e 5 mg/ml, applicando la formula  $\frac{Ac \times Cs}{As \times A} \times P$  ove  $Ac$  è l'assorbimento del campione;  $As$  è l'assorbimento dello standard;  $Cs$  è la concentrazione della soluzione standard (in mg/ml);  $P$  il peso medio della polvere delle compresse o capsule;  $A$  il peso dell'aliquota della polvere analizzata.

L'errore relativo massimo dedotto dalla curva di taratura è del 2,5 % nel campo compreso tra il 20 e il 60 % di trasmissione.

26 aprile 1967

GUIDO BELLOMONTE  
*Laboratori di Biologia*

<sup>1</sup> ROSZKOWSKI, A. P. & W. M. GOVIER. *Int. J. Neuropharmacol.*, **1**, 423 (1962).

<sup>2</sup> WRIGHT, N. *Anal. Chem.*, **13**, 1, (1941).

## Dosaggio biologico dell'istamina nei farmaci

La presenza di istamina negli estratti d'organo e nei preparati antibiotici viene accertata, secondo la Farmacopea Ufficiale<sup>1</sup> con una tecnica basata sugli effetti ipotensivi che questa sostanza esercita nel gatto anestetizzato. Applicato nella sua forma ortodossa il metodo è in grado di rilevare quantità di istamina dell'ordine di 0,1 µg; associato ad eviscerazione<sup>2</sup> esso diventa estremamente sensibile e può mettere in evidenza quantità di istamina di 0,01-0,02 µg. Tuttavia se la sensibilità certamente elevata di questo metodo ne costituisse l'unico vantaggio, non v'è dubbio che anche la più semplice ed economica tecnica *in vitro* dell'ileo di cavia, sensibile a concentrazioni di istamina di 0,002 µg/ml<sup>3</sup>, potrebbe utilmente sostituire il più dispendioso metodo *in vivo*. In realtà altri fattori condizionano le possibilità di impiego dell'uno e dell'altro metodo. Innanzitutto la specificità delle risposte dei due reattivi biologici all'istamina: sotto questo aspetto se è noto che altre sostanze possono determinare risposte ipotensive arteriose nel gatto o contrazione dell'ileo isolato di cavia, è anche evidente che la natura istaminica di queste risposte può essere accertata ricorrendo agli antagonisti specifici dell'istamina o, nel caso dell'ileo isolato, utilizzando soluzioni di Tyrode acidificato<sup>4</sup>. Meno definito appare invece il problema delle possibili interferenze che estratti di organo o antibiotici, spesso associati ad altri farmaci nelle diverse specialità farmaceutiche, possono esercitare sugli effetti biologici della istamina in essi eventualmente presente. In rapporto a questo problema, si riferiscono in questa nota i risultati ottenuti in una serie di dosaggi eseguiti *in vivo* ed *in vitro* su alcuni farmaci del commercio, a base di estratti di organo o di antibiotici, ai quali era stata addizionata istamina in una concentrazione di 20 µg/ml che, costituendo il limite massimo tollerato per gli estratti d'organo, deve poter essere rivelata agevolmente.

Il dosaggio sia *in vivo* che *in vitro* è stato eseguito secondo i principi del dosaggio a quattro punti<sup>5</sup>, considerando valida una prova nella quale due successivi cicli di quattro punti (vedi Fig. 1) avessero dato un risultato concordante. Il dosaggio *in*

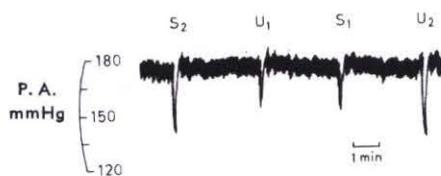


Fig. 1. — Dosaggio biologico *in vivo* dell'istamina addizionata allo stesso preparato antibiotico. Gatto, uretano cloralosio, pressione arteriosa alla carotide. Istamina:  $S_1 = 0,1 \mu\text{g}$ ,  $S_2 = 0,2 \mu\text{g}$ . Preparato:  $U_1 = 0,005 \text{ ml}$  corrispondenti a  $0,1 \mu\text{g}$  di istamina,  $U_2 = 0,01 \text{ ml}$  corrispondenti a  $0,2 \mu\text{g}$  di istamina.

*vivo* è stato eseguito sul gatto in anestesia uretano-cloralosica (uretano 375 mg/Kg e cloralosio 70 mg/Kg s.c.) iniettando le soluzioni nella giugulare esterna, in volume non superiore a 0,5 ml totali. Il dosaggio *in vitro* è stato eseguito sull'ileo di cavia sospeso in un bagno di 50 ml contenente Tyrode saturato con carbogeno a 37°C. Dei vari farmaci utilizzati in queste prove 4 erano a base di estratti di organo, 4 contenevano antibiotici e 4 erano di natura enzimatica.

Il metodo *in vivo* ha sempre permesso di dosare senza difficoltà l'esatta quantità di istamina addizionata al preparato. Il metodo *in vitro* si è rivelato ugualmente attendibile in 10 casi, mentre la sua applicazione ha trovato limitazioni ben definite nei due restanti preparati. Nel primo di questi la penicillina era combinata con un composto ad azione antiistaminica: nel dosaggio *in vitro* (Fig. 2) la prima somminis-

$S_2$     $S_1$     $U_1$     $S_2$

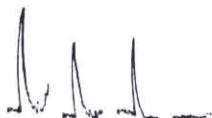


Fig. 2. — Dosaggio biologico *in vitro* dell'histamina addizionata ad un preparato antibiotico. Ileo di cavia. Istamina:  $S_1 = 0,25 \mu\text{g}$ ,  $S_2 = 0,5 \mu\text{g}$ . Preparato:  $U_1 = 0,0125 \text{ ml}$  corrispondenti a  $0,25 \mu\text{g}$  di histamina.

trazione del preparato ( $U_1$ ) provocava una contrazione equivalente a quella indotta dall'histamina che ad esso era stata addizionata ( $S_1$ ), ma era seguita da inibizione della risposta del preparato alle successive somministrazioni della soluzione di confronto ( $S_2$ ). La presenza di un antiistaminico nel preparato rende intuitiva questa constatazione (dopo la somministrazione del preparato in esame, la reattività dell'ileo all'acetilcolina rimaneva immutata); tuttavia essa assume un certo significato quando si tenga conto che il metodo *in vivo* ha permesso di eseguire un perfetto dosaggio dell'histamina addizionata al preparato (Fig. 1). Il fatto deve evidentemente inquadrarsi nella minore sensibilità agli antiistaminici che distingue i recettori responsabili dell'ipotensione da histamina da quelli che entrano in gioco nelle risposte all'histamina dell'ileo isolato di cavia<sup>6</sup>. Meno agevole è l'interpretazione dei risultati ottenuti con un estratto epatico. Anche in questo caso il dosaggio *in vivo* è risultato corretto (Figura 3): si deve solo notare che la differenza fra gli effetti esercitati da  $0,1$  e  $0,2 \mu\text{g}$

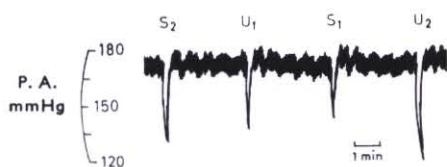


Fig. 3. — Dosaggio biologico *in vivo* dell'histamina addizionata ad un estratto epatico. Gatto, uretano cloralosio, pressione arteriosa alla carotide. Istamina:  $S_1 = 0,1 \mu\text{g}$ ,  $S_2 = 0,2 \mu\text{g}$ . Preparato:  $U_1 = 0,005 \text{ ml}$  corrispondenti a  $0,1 \mu\text{g}$  di histamina,  $U_2 = 0,01 \text{ ml}$  corrispondenti a  $0,2 \mu\text{g}$  di histamina.

totali di histamina in soluzione acquosa di confronto ( $S_1$  e  $S_2$ ) e in soluzione nell'estratto epatico ( $U_1$  e  $U_2$ ) è dovuta alla presenza di quantità tollerabili di histamina nel prodotto originale ( $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). Nel dosaggio *in vitro* viceversa si sono avuti evidenti fenomeni di interferenza: nei preparati poco sensibili all'histamina questi si rivelavano con una progressiva perdita di sensibilità dell'ileo dopo la somministrazione dell'estratto epatico (Fig. 4), mentre nei preparati con elevata sensibilità essi si tradu-

$S_1$     $S_2$     $U_1$     $S_1$     $U_2$     $S_2$



Fig. 4. — Dosaggio biologico *in vitro* dell'histamina addizionata allo stesso estratto epatico. Ileo di cavia. Istamina:  $S_1 = 0,5 \mu\text{g}$ ,  $S_2 = 1 \mu\text{g}$ . Preparato:  $U_1 = 0,025 \text{ ml}$  corrispondenti a  $0,5 \mu\text{g}$  di histamina,  $U_2 = 0,05 \text{ ml}$  corrispondenti a  $1 \mu\text{g}$  di histamina.

cevano in un aumento della risposta all'histamina stessa e nella comparsa di una attività spontanea che rendevano aleatori i risultati ottenuti. Su un totale di 8 dosaggi *in vitro* in un'unica prova è stato possibile ottenere due cicli di quattro punti suscet-

tibili di valutazione, malgrado i fenomeni di sensibilizzazione descritti (Fig. 5). Tuttavia il contenuto in istamina dell'estratto epatico risulta essere, secondo questo dosaggio, quasi doppio di quello rivelato dalla prova *in vivo* (27 µg/ml contro 15 µg/ml).

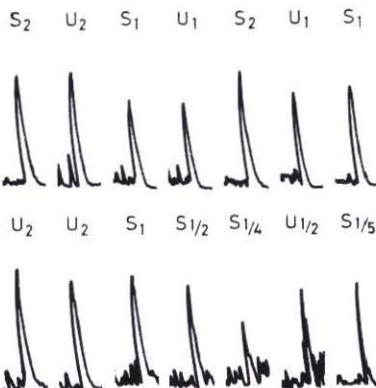


Fig. 5. — Dosaggio biologico *in vitro* dell'istamina addizionata allo stesso estratto epatico. Ileo di cavia. Istamina:  $S_1 = 0,5 \mu\text{g}$ ,  $S_2 = 1 \mu\text{g}$ ,  $S_{1/2} = 0,25 \mu\text{g}$ ,  $S_{1/4} = 0,125 \mu\text{g}$ ,  $S_{1/5} = 0,1 \mu\text{g}$ . Preparato:  $U_1 = 0,01 \text{ ml}$  corrispondenti a 0,2 µg di istamina,  $U_2 = 0,02 \text{ ml}$  corrispondenti a 0,4 µg di istamina,  $U_{1/2} = 0,005 \text{ ml}$  corrispondenti a 0,1 µg di istamina.

Questi dati confermano la piena validità del metodo *in vivo* nei confronti di quello *in vitro*, le cui limitazioni tuttavia si rivelano attraverso evidenti fenomeni di interferenza che impediscono una corretta attuazione del dosaggio a quattro punti. Di conseguenza la validità del metodo *in vitro* può essere accettata solo quando esso sia realizzabile secondo questa modalità e soprattutto quando la sua attendibilità sia stata valutata, per i prodotti in esame, con esperienze di ricupero simili a quelle qui descritte.

28 giugno 1967.

PAOLA DEL BASSO, CARLA ROSSI CARTONI  
e AMILCARE CARPI  
*Laboratori di Chimica Terapeutica*

<sup>1</sup> *Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana*, VII Ed., Roma 1965, p. 842.

<sup>2</sup> MAC INTOSH, F. C. & W. L. M. PERRY, in: *Methods in Medical Research*, The Year Book Publishers, Chicago 1950, vol. 3, p. 88.

<sup>3</sup> CODE, C. F. *J. Physiol. (Lond.)*, **89**, 257 (1937).

<sup>4</sup> LIBONATI, M. & G. SEGRE. *Farmaco Ed. Prat.* **15**, 676 (1960).

<sup>5</sup> BURN, J. M. *Biological standardization*. Oxford Univ. Press., London 1950, II Ed., p. 75.

<sup>6</sup> BOVET, D. & F. BOVET-NITTI. *Médicaments du système nerveux végétatif*, Karger, Bale 1948, p. 777.