

*Aktuelne teme/  
Current topics*

## ODREĐIVANJE ANTIEPILEPTIKA U ALTERNATIVNOM PREPARATU ZA LEČENJE EPILEPSIJE METODOM GASNO-MASENE SPEKTROMETRIJE

### DETERMINATION OF ANTIEPILEPTIC DRUGS IN ALTERNATIVE PRODUCTS FOR TREATMENT EPILEPSY BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

**Correspondence to:**

**Dipl. inž. hemije Dragana Rančić,**  
specijalista toksikološke hemije  
Vojnomedicinska akademija,  
Centar za kontrolu trovanja, Beograd  
Crnotravska 17  
Tel: +381-11-3609481  
E-mail: gagarancic@yahoo.com

Dragana Rančić<sup>1</sup>, Anđelka Spasić<sup>2</sup>, Gordana Brajković<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Vojnomedicinska akademija, Centar za kontrolu trovanja, Beograd

<sup>2</sup>Institut za sudsku medicinu, Medicinski fakultet, Beograd

---

#### *Apstrakt*

#### *Key words*

epilepsy, anticonvulsants, alternatively  
treatment of epilepsy, gas chromatogra-  
phy-mass spectrometry (GC-MS)

#### *Ključne reči*

epilepsija, antikonvulzivi, alternativno  
lečenje epilepsije, gasno-masena spek-  
trometrija (GC-MS)

Epilepsija je hronični neurološki poremećaj sa napadima koji se karakterišu prolaznim znacima ili simptomima nenormalne, pojačane ili sinhrono neurološke aktivnosti u mozgu. U terapiji epilepsije danas je na raspolaganju značajan broj lekova, koji se mogu kombinovati prema individualnim potrebama pacijenta. U radu je prikazan postupak identifikacije antiepileptika u alternativnom preparatu za lečenje epilepsije pod nazivom „Kineske kuglice”. Uzorke su dostavili pacijenti koji su bili na terapiji ovim preparatom. Preparat „Kineske kuglice” se sastoji od biljne paste biljke reum (*Rhei rhizoma, Polygonaceae*) u koju su umešane sprasene tablete sintetskih antiepileptika. Analiza „Kineskih kuglica” je rađena u Centru za kontrolu trovanja, Odeljenje za Toksikološku hemiju na VMA u Beogradu. Prisustvo antiepileptika određeno je metodom gasne hromatografije s masenom spektrometrijom (GC-MS) na aparatu: Varian 3400, maseni spektrometar (MS) Varian Saturn (Palo Alto, USA), autosampler (AS) Varian 8100, kapilarna kolona VF 5 ms, 60 m, 0,32 mm, 1 µm (Palo Alto, USA). Hromatografski uslovi su bili sledeći: temperatura injek-tora 260 °C, temperatura transfer linije 260 °C, kolona od 80 ° - 260 °C/10 °C min. Uzorci su pripremljeni tečno-tečnom ekstrakcijom, a zatim je izvršena skrining analiza na prisustvo benzodiazepina, barbiturata i drugih grupa lekova.

Detektovani su: karbamazepin, fenitoin, valproinska kiselina, fenobarbiton, primidon, diazepam i nitrazepam. Gasno-masena spektrometrija je metoda izbora za određivanje nepoznatih supstanci u rutinskim toksikološkim analizama.

---

#### *UVOD*

Epilepsija je neurološki poremećaj sa napadima koji se karakterišu prolaznim znacima ili simptomima nenormalne, pojačane ili sinhrono neurološke aktivnosti u mozgu. [1][2] Ovi napadi imaju različite oblike i različite ishode u zavisnosti od epizoda neuronskih pražnjenja, a oblik napada zavisi od dela mozga koji je zahvaćen. Simptomi se kreću od kratkotrajnog prekida pažnje, do potpuno razvijenog napada sa snažnim konvulzijama koji traje po nekoliko minuta. Smatra se da pacijent ima epilepsiju, ako ima dva ili više neprovocirana napada. Epileptični napad se opisuje kao

nagao, ponavljani i prolazan poremećaj mentalnih funkcija i/ili pokreta tela. [3] Epilepsiju ima 0,5-1% populacije. Savremeni antiepileptici efikasno kontrolišu napade epilepsije kod oko 70% pacijenata. Naziv antiepileptik koristi se istovremeno kao i antikonvulziv za opis lekova koji se koriste u terapiji epilepsije, kao i neepileptičkih konvulzivnih poremećaja.

Lečenje epilepsije registrovanim sintetskim preparatima zauzima centralno mesto u tretmanu epilepsije. Ovaj vid lečenja ima izrazito individualno obeležje. Za lečenje pacijenta sa epilepsijom prvo se primenjuje monoterapija. Ako se samo jedan lek pokaže nedovoljnim u kontroli svih napada bez neželjenih sporednih efekata, tada se upotrebljava

kombinacija najmanjeg broja lekova. Kombinuju se lekovi sa različitim mehanizmima akcije, pre nego antiepileptici sa sličnim mehanizmima djelovanja. [4]

Problem istovremene terapije upotrebom različitih antiepileptika je komplikovan. Jedan od osnovnih problema je inter-akcija između pojedinih antiepileptika. Nastaje paradoksalna situacija da dodavanjem novih lekova-antiepileptika nastaju suprotni efekti od očekivanih. Zbog toga je određivanje njihovih koncentracija u serumu od velikog značaja za pacijente, jer se tako najbolje može podešiti doza održavanja za svaku osobu.

U terapiji eplepsije danas je na raspolaganju značajan izbor lekova iz grupe barbiturata, benzodiazepina i drugih lekova. Karbamazepin, fenobarbiton, klonazepam, lamotrigin i valproinska kiselina su antiepileptici koji se najčešće koriste, a tu su i antiepileptici novije generacije. Antiepileptici registrovani u našoj zemlji su:

- Karbamazepin (Tegretol)
- Fenobarbiton
- Etosuksimid (Suxinutin)
- Klonazepam (Rivotril)
- Valproat (Eftil), valproinska kiselina (Depakine)
- Okskarbazepin (Trileptal)
- Lamotrigin (Lamictal)
- Topiramamat (Topamax)
- Gabapentin (Neurontin)
- Pregabalin (Lyrica)

Poslednjih godina tržište lekova preplavljeno je i alternativnim lekovima, bez obzira na njihove stvarne vrednosti. Jedan od takvih proizvoda su i "Kineske kuglice".



Slika 1. Preparat „Kineska kuglica”.

To je navodno proizvod biljnog porekla koji se koristi za lečenje epilepsije. Alternativni preparat „Kineske kuglice” doneli su roditelji koji su svoju decu, obolelu od epilepsije, vodili na lečenje u Kinu. Da bi utvrdili njegov hemijski sastav, doneli su preparat na analizu u Centar za kontrolu trovanja, Vojnomedicinske Akademije u Beogradu. Prvi slučaj ovakvog nekonvencionalnog načina lečenja navedenim preparatom registrovan je 1997. godine. U ovom radu prikazani su rezultati identifikacije antiepileptika u preparatu "Kineske kuglice" koji su konzumirali pacijenti J.N. i R.V.

## MATERIJAL I METODE

Dostavljeni uzorci "Kineskih kuglica" su bili u obliku nepravilne kuglice, prečnika 2-3 cm, meke konzistencije, tamno braon boje. Težina uzoraka razlikovala se od serije do serije i kretala se od 5,5 do 9,5 grama.

Organski rastvarači, hloroform, etar, etilacetat, hlorovodonična kiselina i amonijak (HPLC i p.a. čistoće) nabavljeni su od firme Merck, (Darmstadt, Nemačka). Standardne supstance karbamazepin, fenobarbiton, difetoin, valproinska kiselina, diazepam, nitrazepam, difenilamin, dobijeni su od Sigma-Aldrich Chemical Company (St Louis, MO, USA).

Izolovanje antiepileptika iz biljnog matriksa izvršeno je metodom tečno-tečne ekstrakcije. Odmeravano je po 0,1 gram uzorka i rastvarano u 1 mL destilovane vode. Kisela sredina pH 3 je doterana sa 6M HCl. Ekstrakcija je izvršena sa 5 mL dietiletra. Uzorak je mućkan 15 min. na električnoj mućkalici, a zatim centrifugiran 10 min na 3000 obrtaja. Organska faza je odvojena, uparena do suva, a suvi ostatak rastvoren u 1 mL etilacetata sa internim standardom (IS). Kao interni standard korišćen je difeniamin (DFA), koncentracije 25 mg/L. Ovako pripremljen, 1 µL uzorka injektovan je u GC-MS. Ista, tečno-tečna priprema uzorka, ponovljena je sa hloroformom, ali u alkalnoj sredini, a pH 9 postignut je dodavanjem 25% NH<sub>4</sub>OH.

Prisustvo antiepileptika određeno je metodom gasne hromatografije sa masenom detekcijom (GC-MS): (GC) Varian 3400, sa autosamplerom (AS) Varian 8100 i masenim spektrometrom (MS), Varian Saturn (Palo Alto, USA), kapilarna kolona VF 5 ms, 60 m, 0,32 mm, 1 µm (Palo Alto, USA). Uslovi za izvođenje gasne hromatografije bili su sledeći: temperatura injektora 260 °C, temperatura transfer linije 260 °C, temperaturni program od 80 - 260 °C/10 °C min.,

Uslovi za izvođenje masene spektrometrije bili su definisani sa opsegom jonskih masa m/z od 50-350 i brzinom smanjenja od 4 scan/s.

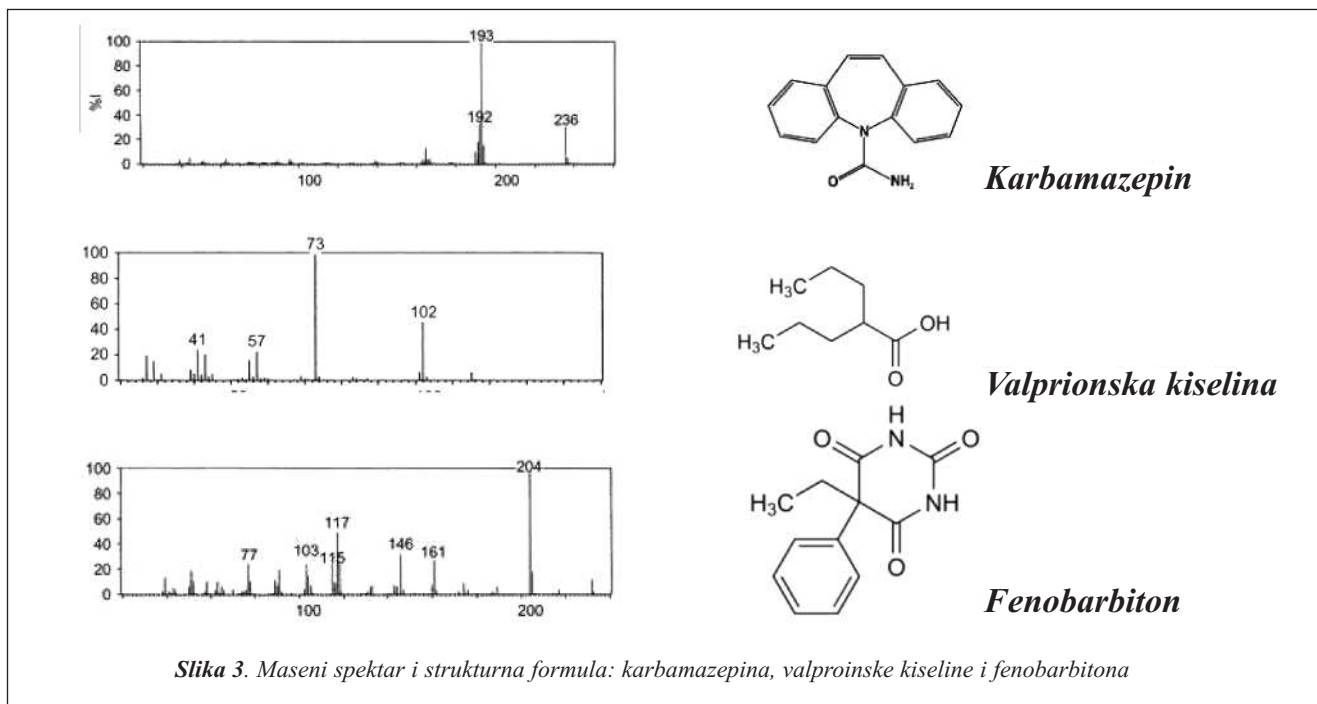
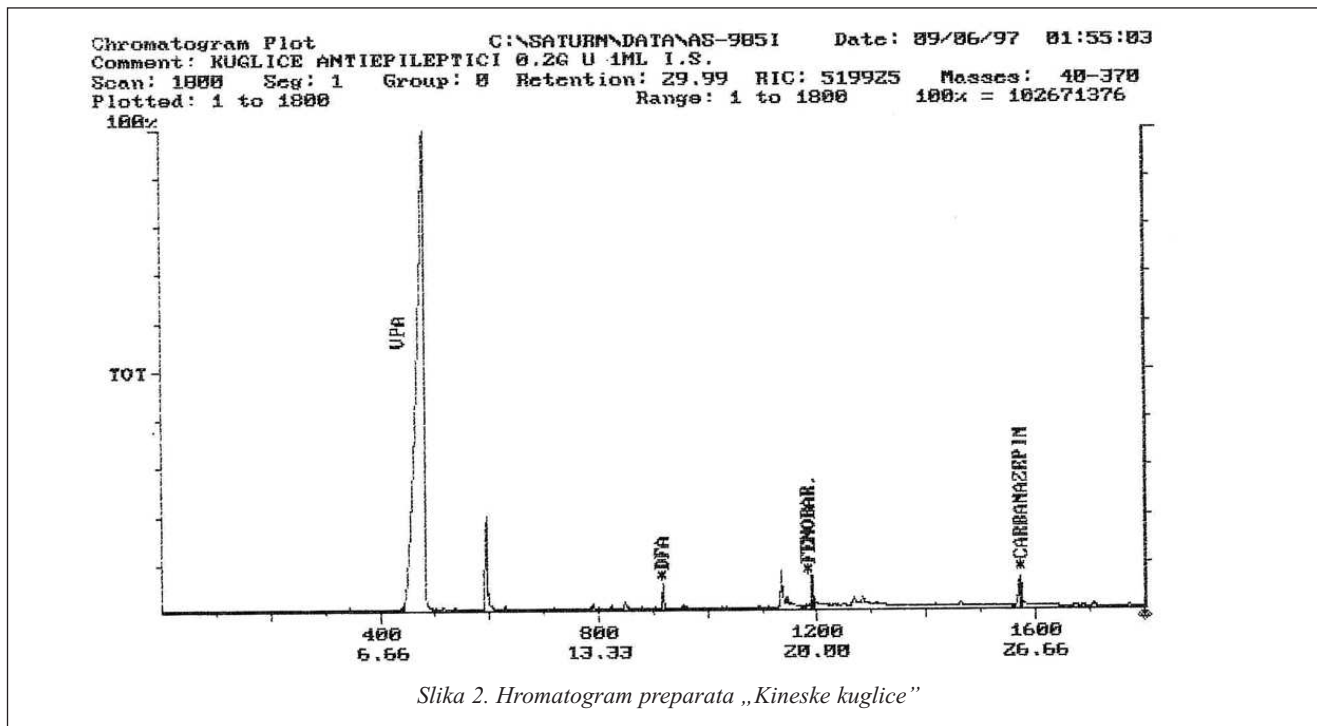
## REZULTATI

Identifikacija jedinjenja u uzorcima „Kineskih kuglica” radena je pretraživanjem preko NIST i Libr TX biblioteke, a na osnovu dobijenih karakterističnih jonskih masa m/z za svako detektovano jedinjenje. [5-9] Identifikovana su sledeća jedinjenja sa karakterističnim jonskim masama m-z: fenobarbiton 204, 117, 146,161, 77, 103, 115, 118; karbamazepin 193, 192, 236, 191, 194, 165, 190, 237; valproinska kiselina 73, 102, 41, 57, 43, 27, 55, 29; diazepam 256, 283; nitrazepam 280, 253, 281, 206, 234, 252, 254, 264, difetoin i primidon.

Vrednosti identifikovanih antiepileptika po kuglici za pacijente R. V. i J. N. prikazani su u tabelama

Tabela 1. Rezultati analize uzoraka „Kineske kuglice” za pacijenta R. V.

Aktivna komponenta	Serijski broj (mg/kuglici)
Fenobarbiton	0,32
Karbamazepin	4,20
Difetoin	1,68
Valproinska kiselina	408,66



**Tabela 2.** Rezultati analize uzoraka „Kineske kuglice” za pacijenta J.N.

Aktivna komponenta	Seriya 1 (mg/kuglici)	Seriya 2 (mg/kuglici)	Seriya 3 (mg/kuglici)	Seriya 4 (mg/kuglici)	Seriya 5 (mg/kuglici)	Seriya 6 (mg/kuglici)
Fenobarbiton	43,17	29,14	41,40	27,07	10,56	15,20
Karbamazepin	3,86	1,21	3,18	10,50	8,88	7,44
Difetoin	1,19	1,76	1,72	Nije detektovan	Nije detektovan	Nije detektovan
Valproinska kiselina	132,50	118,15	178,19	169,47	155,87	879,02
Nitrazepam	1,64	1,78	1,98	Nije detektovan	Nije detektovan	Nije detektovan

## DISKUSIJA I ZAKLJUČAK

Važan činilac u našem društvu koji doprinosi popularnosti alternativne medicine je opredeljenje za prirodnu terapiju. Prosečan savremeni čovek živi u strahu od produkata civilizacije, što naravno nije bez osnova, ali ga to dovodi u pogrešno uverenje da je "prirodno" uvek bolje, sigurnije i efikasnije od bilo kakve hemije. Osim toga, alternativna medicina se oslanja na magijsko, u šta veliki broj ljudi veruje, a magijsko po definiciji čini čuda. Naučna medicina nikada sebe nije proglasila za "čudotvornu", mada često i ona čini "čuda" u drugom značenju.

Imajući sve to u vidu, ne čudi što se ova formulacija ručno pravljeno "leka", našla na tržištu teritorije tadašnje Jugoslavije, bez ikakve kontrole zvaničnih institucija. Ovakav način lečenja otvara i pitanja interakcija između pojedinih vrsta antiepileptika. Neki antiepileptici se mogu međusobno kombinovati, kod drugih postoji velika poteškoća da se odredi doza pojedinog leka, a neki su, jednostavno inkompatibilni, pa se ne bi smeli nikako kombinovati.

Mikroskopskom i hemijskom analizom dokazano je, da su sintetski antiepileptici inkorporirani u biljni matriks biljke *Rhei rhizoma (Polygonaceae)*.<sup>[10]</sup> To je višegodišnja zeljas-

ta biljka sa krupnim listovima, čiji se delovi oguljenog i osušenog rizoma upotrebljavaju u medicini. Rabarbara je poreklom iz Kine, gde se vekovima koristi kao laksantno i adstringentno sredstvo.<sup>[11]</sup>

Vrednosti identifikovanih antiepileptika po kuglici, prikazane u tabeli, bile su na nivou vrednosti pojedinačnih dnevnih doza, ali su znatno varirale od serije do serije. Variranje količine inkorporiranih antiepileptika najverovatnije potiče od ručne pripreme i nedovoljne homogenizacije svake kuglice. U većini serija dominira kombinacija fenobarbitona, karbamazepina i valproinske kiseline. Prisustvo primidona i difetoina, nije detektovano u svim serijama ovog nekonvencionlnog preparata. Prisustvo diazepama i nitrazepama, lekova iz grupe benzodiazepina, takođe nije detektovano u svim uzorcima. Uočava se i razlika u kombinaciji antiepileptika, koja je verovatno ipak bila prilagođena svakom pacijentu u zavisnosti od dijagnoze.

Znatno variranje sadržaja antiepileptika od serije do serije "kuglica", moglo je dovesti do pojave neželjenih i sporednih efekata, pa čak i do akutnog trovanja antiepilepticima, posebno kada se ima u vidu činjenica da su roditelji bili u zabludi, misleći da se radi isključivo o prirodnom, biljnom preparatu.

### Abstract

Epilepsy is a common chronic neurological disorder characterized by seizures. Patients with newly diagnosed epilepsy who require treatment can be initiated on standard anticonvulsants and the choice of anticonvulsants depending on individual patient characteristics. This paper describes the process of identification of antiepileptic in an alternative treatment of epilepsy. Synthetic anticonvulsants were incorporated into matrix plants of *Rhei rhizoma, (Polygonaceae)*. Samples collected for quantitative determination of anticonvulsants from patients were sent to laboratory the Poison Control Centre, in the Department of Toxicological Chemistry at the Military Medical Academy in Belgrade. The presence of anticonvulsants was determined, using gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS). All samples were processed for benzodiazepines, barbiturates and other common group of drugs by liquid-liquid extraction screening analyses. Chromatography was accomplished using a VF 5 capillary column. The injector temperature was set up at 260°C, and the oven profile was in the range from 80-260°C. Carbamazepine, phenytoin, valproic acid, phenobarbital, primidon, diazepam and nitrazepam were detected. The gas chromatography-mass spectrometry is method of choice for identification of unknown drugs in routine toxicological analysis.

### LITERATURA

1. Commission on Epidemiology and Prognosis, "Guidelines for epidemiologic studies on epilepsy, International League Against Epilepsy" 1993; *Epilepsia* 34 (4): 592-6.
2. Blume W, Lüders H, Mizrahi E, Tassinari C, Emde Boas W, Engel J, "Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: Report of the ILAE task force on classification and terminology" 2001; *Epilepsia* 42 (9): 1212-8.
3. Bertham G.Katzung, Basic and Clinical Pharmacology, Prentice-Hall International Inc.1992.
4. Tarik Zukić, Jedan ili više lijekova u liječenju epilepsija, Medicinski arhiv 2005; 59 (6) 337-404

5. K. Kudo, T. Nagata, K. Kimura, T. Imamura. M. Noda, Sensitive determination of diazepam and N-desmethyldiazepam in human material using capillary gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 1998; 431: 1-492
6. Michael H Nelson, Angela K. Birnbaum, Peter J. Nyhus and Rory P. Remmel, A capillary GC-MS method for analysis of phenytoin and [<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]-phenytoin from plasma obtained from pulse dose pharmacokinetic studies, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1988; 17: 1311-1323
7. Jürgen Hallbach, Hermann Vogel, Walter G. Guder, Determination of Lamotrigine, Carbamazepine and Carbamazepine Epoxide in Human Serum by Gas Chromatography Mass

- Spectrometry, *Chinical Chemistry and Laboratory Medicine* 1997; 35 (10)
8. F.X. Klein, Patrick A. Hays, Detection and Analysis of Drugs of Forensic Interest, *Robert Microgram Journal* 2003; 1-2
9. H. Nau, W. Wittfoht, H. Schäfer, C. Jakobs, D. Rating, H. Helge; Valproic acid and several metabolites: quantitative determination in serum, urine, breast milk and tissues by gas chromatography—mass spectrometry using selected ion monitoring, *Journal of Chromatography B* 1981; 226: 69-78
10. Trease and Evans, *Pharmacognasy*, WB Saunders Company Ltd, UK, 1998.
11. Nada Kovačević, Osnovi farmakognosije, MJM Beograd, 2000.