

PRÁCTICA V.6
BENZODIAZEPINAS – PARTE II
CUANTIZACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO EN FÁRMACOS COMERCIALES
BENZODIAZEPINES – PART II. QUANTIFICATION OF THE ACTIVE
SUBSTANCE IN COMMERCIAL DRUGS

Miriam A. Martins Alho, Mirta L. Fascio y Norma B. D'Accorso

Centro de Investigaciones de Hidratos de Carbono (CIHIDECAR). Departamento de Química Orgánica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria. Pabellón II. 3º Piso. C.P. 1428. Buenos Aires. Argentina.

norma@qo.fcen.uba.ar

La práctica tiene dos posibles objetivos:

1. Si se conoce el principio activo del medicamento, será necesario el aislamiento como se describe en la práctica anterior para luego realizar su cuantificación.
2. Si se trata de un medicamento desconocido, deberá realizarse la identificación de la/s benzodiazepina/s presente/s antes de comenzar con su cuantificación.

Cuantificación del principio activo utilizando su absorción UV.

A partir del aislamiento de una benzodiazepina a partir de un producto comercial (realizado según el procedimiento descrito en la PARTE I) se procederá a la verificación de la dosis del producto activo por cuantificación del mismo utilizando métodos espectrofotométricos. Para ello es necesario la utilización de un espectrómetro de UV, realizándose una curva de calibración apropiada.

Determinación de la longitud de onda apropiada para la medición

Como primer paso se debe encontrar una longitud de onda apropiada para realizar la medición. En dicha longitud de onda el compuesto incógnita deberá presentar una absorción de intensidad apreciable, lo cual permitirá detectar bajas concentraciones de muestra. Por otra parte, es recomendable que el λ elegido presente escasas variaciones en la intensidad de la absorción respecto de pequeños $\Delta\lambda$, de esta manera, los resultados serán más

reproducibles y las distintas mediciones que se efectúen para la realización de la curva serán más comparables.

Cuantificación del principio activo en una muestra incógnita.

La cuantificación del principio activo en una muestra se realizará en base a la extrapolación de los datos de absorción UV de la muestra respecto de una curva de calibración realizada con patrones de concentración conocida. La curva de calibración se construirá utilizando diluciones en metanol del patrón correspondiente en diferentes concentraciones, las cuales deberán ser del orden de 10^{-4} molar o aún más diluidas para asegurarse el cumplimiento de la ley de Beer y Lambert. Una vez realizadas las diluciones se mide la absorción de cada una de las muestras a la longitud de onda apropiada y se construye la curva a partir de dichos datos.

$$A = \epsilon bc = \log I_0/I$$

ϵ = coeficiente de extinción molar

b = longitud de la cubeta [cm]

c = concentración del soluto [g/l]

I_0 = Intensidad de luz incidente

I = Intensidad de luz transmitida

Se extrae exhaustivamente el principio activo de un comprimido de muestra tal como se describió anteriormente y a la totalidad del material extraído se lo diluye en 50 mL de metanol exactamente medidos (utilice pipeta aforada o dilución en matraz volumétrico). A partir de esta solución se realizarán diluciones 1:10 y 1:100, midiéndose la absorción de las soluciones resultantes y comparándose cuál de ella se encuentra dentro del rango de linealidad de la curva. A partir de esta medición se determina la concentración de la muestra original, determinándose así la cantidad de mg de benzodiazepina presentes en el comprimido original.

Si ninguna de las mediciones realizadas se encuentra dentro de la zona útil de la curva realizada, se efectuarán nuevas diluciones de la solución original hasta encontrar alguna adecuada.

Miriam A. Martins Alho, Mirta L. Fascio y Norma B. D'Accorso

norma@go.fcen.uba.ar

El trabajo en los laboratorios de Medicinal Chemistry debe mantener altos estándares de precaución y buen uso.

El manejo de instrumental eléctrico, la utilización de calor, el material de cristal y los disolventes no presentan un especial problema, si se siguen las instrucciones del supervisor.

Este documento ha sido supervisado por la Profesora Norma B. D'Accorso (norma@go.fcen.uba.ar) quien informa que no existen problemas específicos de seguridad en la realización de este ejercicio, incluyendo toxicidad, inflamabilidad y explosión, ni cualquier otro destacable, dentro de lo usual en un laboratorio de Medicinal Chemistry.

Se agradecerá comunicar al Editor cualquier posible incidencia.

EXERCISE V.6
BENZODIAZEPINES – PART II
QUANTIFICATION OF THE ACTIVE SUBSTANCE IN COMMERCIAL DRUGS

Miriam A. Martins Alho, Mirta L. Fascio, and Norma B. D'Accorso

Centro de Investigaciones de Hidratos de Carbono (CIHIDECAR), Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Pabellón II, 3º Piso, C.P. 1428, Buenos Aires, Argentina

E-mail: norma@qo.fcen.uba.ar

To carry out the objective of the practice, you will have two situations:

1. If you know which is the active principle, then you will perform its isolation (see PART I), and the subsequent quantification.
2. If you have an unknown drug, previous to the quantification, you will perform the isolation, characterization, and identification of the active principle.

Quantitative Determination

From the benzodiazepines isolated from the commercial sample (see PART I), a verification of the active principle dose will be made using quantitative spectroscopic methods. Previously, a calibration curve must be made.

Appropriate Wavelength Determination

Prior to measurement, a determination of the appropriate wavelength must be made. In this particular wavelength, the sample must show an appreciable absorption intensity, to detect a low sample concentration.

On the other hand, it is recommended that the chosen wavelength shows few variations in the absorption intensity on the matter of small $\Delta\lambda$ in this specific case, the results will be reproducible and the different measurements of the curve will best fit.

Prepare a solution of the standard of the corresponding sample (approximately 10^{-4} M) and perform a qualitative UV spectrum. Pick an appropriate wavelength and perform the calibration curve measuring at this wavelength. The curve must be made using the diluted standard with methanol, at different concentrations; the molar concentration may be approximately 10^{-4} M or lower than this value, to observe the Beer and Lambert law.

$$A = \epsilon bc = \log I_0/I$$

ϵ = extinction molar coefficient.

b = cell length [cm]

c = solute concentration [g/l]

I_0 = incident light intensity

I = transmitted light intensity

Active Principle Quantification

Quantitative determination of the active principle in the sample will be made on the basis of the extrapolation of UV absorption, respective to the calibration

curve. Dissolve the extracted active principle in methanol (50 mL, using a graduated pipette), and use it to make dilutions 1:10 and 1:100. Determine the concentration of the original sample with these measurements and calculate the milligrams of benzodiazepine present in the original tablet.

If none of the measurements are in the useful linear zone of the curve, you must perform new dilutions from the original solution.

Miriam A. Martins Alho, Mirta L. Fascio, and Norma B. D'Accorso

norma@qo.fcen.uba.ar

High standards in safety measures should be maintained in all work carried out in Medicinal Chemistry Laboratories. The handling of electrical instruments, heating elements, glass materials, dissolvents and other inflammable materials does not present a problem if the supervisor's instructions are carefully followed.

This document has been supervised by Prof. Dra. Norma B. D'Accorso (norma@qo.fcen.uba.ar) who has informed that no special risk (regarding toxicity, inflammability, explosions), outside of the standard risks pertaining to a Medicinal Chemistry laboratory exist when performing this exercise.

If your exercise involves any "special" risks, please inform the editor.