

Nº/29
ZEL



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**Diazepam. Métodos de
Análisis en Presentaciones
Farmacéuticas**

**TRABAJO ESCRITO
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
LUIS RAMIREZ VAZQUEZ**



MEXICO. D. F.

1992

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DIAZEPAM

CONTENIDO:

INTRODUCCION

GENERALIDADES

FARMACOLOGIA

PROPIEDADES

ESPECTROSCOPIA

METODOS DE ANALISIS

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

El hombre ha buscado durante toda su historia agentes para controlar los efectos de la tensión, la ansiedad y otros trastornos de este tipo. Muchos de estos esfuerzos han llevado al uso de agentes clasificados a menudo como sedantes. El más usado de ellos es también de los más antiguos, el etanol.

En el siglo pasado se introdujeron en la práctica médica, como sedantes, las sales de bromuro y los barbitúricos junto con compuestos de efecto similar al alcohol, como el paraldehído y el hidrato de cloral.

Al llegar la década de 1930 se hizo evidente que los bromuros tenían efectos tóxicos acumulativos sobre el sistema nervioso central (SNC). Ya actualmente ha desaparecido su uso en la práctica médica.

En las primeras décadas de este siglo los barbitúricos siguieron siendo los principales agentes ansiolíticos, pero hacia -- 1950 comenzó a preocupar su tendencia a inducir tolerancia seguida a veces de dependencia física y reacciones potencialmente letales durante el retiro. Estos problemas influyeron mucho, tanto en la actitud de los médicos como en la actitud popular frente a los sedantes y así se estimuló la búsqueda de otros agentes que no presentaran los problemas mencionados.

Una parte de este esfuerzo condujo al estudio de derivados de polialcoholes alifáticos, uno de cuales, la mefenesina (derivado

o-metil fenólico del propanotriol), mostró propiedades tanto de relajación muscular como sedantes. El problema que presentaba - este fármaco consistía en que su acción era demasiado breve.

La síntesis de compuestos relacionados llevaron directamente a la introducción de los carbamatos de propanediol (meprobamato) a principios de la década de 1950. Durante este período también surgieron otros productos relacionados con los barbitúricos -- o derivados de alcoholes superiores.

Durante toda la década de 1950, pese a la enorme popularidad de algunos de estos compuestos como sedantes diurnos o como hipnóticos se tuvo una conciencia cada vez mayor de que compartían muchas de las propiedades indeseables de los barbitúricos, incluyendo una separación difusa entre sus efectos ansiolíticos-útiles y un efecto sedante excesivo además de su notable tendencia a causar dependencia física y severa intoxicación aguda por sobredosis.

Esto abrió el camino a las investigaciones que condujeron al descubrimiento del clordiazepóxido a fines de la década de 1950 y la introducción de más de una docena de compuestos semejantes a la benzodiazepina.

En los últimos años, el clordiazepóxido y el diazepam han sido los más importantes en términos del número de prescripciones - entre todos los fármacos con este tipo de actividad que se han usado, es decir, esta clase de sedantes ha llegado a dominar el mercado y la práctica médica.

La mayoría de las benzodiazepinas que han llegado al mercado fueron seleccionadas por su gran potencial ansiolítico y su poca potencia como depresores generales de las funciones del SNC. Su extraordinaria popularidad en clínica médica se debe en gran parte a que alivian los síntomas de ansiedad con una interferencia mínima en la función cognocitiva o la vigilia. Sin embargo todas las benzodiazepinas poseen, en diversas medidas propiedades hipnosedantes que se aprovechan mucho en clínica, en particular para facilitar el sueño.

Por su capacidad tan escasa para ocasionar depresión fatal del SNC, las benzodiazepinas han desplazado en gran parte a los barbitúricos como agentes hipnosedantes.

Un fármaco sedante disminuye la actividad, modera la excitación y calma a su receptor. Un fármaco hipnótico produce somnolencia y facilita la iniciación y el mantenimiento de un estado de sueño que se asemeja al sueño natural en sus características electroencefalográficas y del que es fácil despertar al paciente el efecto se llama a veces hipnosis, pero el sueño inducido con fármacos hipnóticos no se parece al estado pasivo artificialmente inducido de sugestionabilidad que también se llama hipnósis. (1)

GENERALIDADES

BENZODIAZEPINAS. Dada la enorme popularidad actual de las benzodiazepinas en general y de manera particular la del Diazepam, en este trabajo se presenta una pequeña monografía de este fármaco, dando primordial importancia a los métodos de análisis -- más usados para su determinación en las presentaciones farmacéuticas más usadas.

Actualmente para el tratamiento de la ansiedad se recomiendan ocho derivados de la benzodiazepina.

Por orden de introducción son: clordiazepóxido, diazepam, oxazepam, clorazepato, lorazepam, prazepam, alprazolam y holazepam.

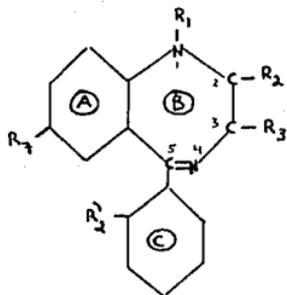
Aunque se usan comunmente para tratar la ansiedad tienen otras indicaciones terapéuticas, en particular como sedantes y para inducir el sueño.

Aunque a otras benzodiazepinas se les menciona destacando los efectos sedantes o hipnóticos, las diferencias entre ellas y las ocho recomendadas para la ansiedad son insignificantes en algunos casos.

El término benzodiazepina alude a la porción de la estructura constituida por un anillo bencénico (A) fusionado con un anillo diazepínico (B) de siete miembros (Fig.1).

Sin embargo en vista de que todas las benzodiazepinas importantes contienen un sustituyente arilo en la posición 5 del anillo, el término ha venido a significar 5-aril-1,4-benzodiazepina. (1)

BENZODIAZEPINAS: Nombres y estructuras



(Fig. 1)

Benzodiazepina	R ₁	R ₂	R ₃	R ₇	R ₂ '
Alprazolam	(anillo triazol fusionado)		-H	-Cl	-H
Clordiazepóxido	(-)	NHCH ₃	-H	-Cl	-H
Clonazepam	(-)	=O	-H	-NO ₂	-Cl
Clorazepato	-H	=O	-COOH	-Cl	-H
Demoxepam	-H	=O	-H	-Cl	-H
DIAZEPAM	-CH ₃	=O	-H	-Cl	-H
Flurazepam	CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	=O	-H	-Cl	-F
Halazepam	-CH ₂ CF ₃	=O	-H	-Cl	-H
Lorazepam	-H	=O	-OH	-Cl	-H
Nitrazepam	-H	=O	-H	-NO ₂	-H
Oxazepam	-H	=O	-OH	-Cl	-H

FARMACOLOGIA

Propiedades Farmacológicas de las Benzodiazepinas

Aunque las benzodiazepinas que se usan en clínica ejercen efectos cualitativamente similares, existen diferencias cuantitativas importantes en sus espectros farmacodinámicos y en sus propiedades farmacocinéticas que han conducido a distintas modalidades de aplicación terapéutica.

En la actualidad hay motivos para creer que existen diversos mecanismos de acción que contribuyen en grado variable a producir los efectos hipnosedantes, relajantes musculares, ansiolíticos y anticonvulsivos de las benzodiazepinas.

Las benzodiazepinas tienen efecto sobre el sistema nervioso central (SNC).

En el hombre y otros mamíferos producen los siguientes efectos: sedante, hipnótico, ansiolítico, relajante muscular y anticonvulsivo.

Unicamente dos de los efectos de estos fármacos se deben a acciones sobre los tejidos periféricos: la vasodilatación coronaria, que se observa después de la administración intravenosa de dosis terapéuticas de ciertas benzodiazepinas, y el bloqueo neuromuscular con dosis muy altas.

Aunque las benzodiazepinas afectan la actividad en todos los niveles del neuroeje, algunas estructuras están afectadas en grado

mucho mayor que otras. Además, algunos efectos de los fármacos son indirectos. Todas las benzodiazepinas tienen el mismo perfil farmacológico, excepto los efectos anticonvulsivos y posiblemente analgésicos de sus grupos funcionales. Sin embargo hay grandes diferencias de selectividad entre los fármacos y la utilidad clínica de las benzodiazepinas individuales varía también considerablemente.

El efecto farmacológico de un fármaco determinado varía marcadamente si es en el ser humano o en algunos animales, cuando se han llevado a cabo ciertos experimentos.

En algunas personas, el sujeto puede estar alerta antes de que aparezcan pruebas de depresión del SNC. Las nitrobenzodiazepinas inducen hiperactividad en ratones, ratas y monos, pero no en la mayoría de las demás especies animales; el flurazepam causa convulsiones únicamente en los gatos.

En el hombre, al aumentar la dosis de benzodiazepina, la actividad sedante llega a la hipnosis y ésta al estupor, como puede esperarse de un depresivo general del SNC. (1)

1.-ABSORCION, DESTINO Y EXCRECION.

El clordiazepóxido, oxazepam, lorazepam, alprozolam y halazepam se absorben con relativa lentitud cuando se administran por vía oral, y las concentraciones plasmáticas máximas pueden alcanzarse sólo después de varias horas. El diazepam es una de las benzodiazepinas de absorción más rápida, y alcanza su concentración máxima aproximadamente en una hora en adultos, y sólo de 15 a 30 minutos en niños.

La mayoría de las benzodiazepinas se fijan en gran medida a las proteínas plasmáticas (85 a 95%) y este factor limita la eficacia de la diálisis en el tratamiento del envenenamiento agudo.

La mayoría de las benzodiazepinas se excretan casi con exclusividad por la orina como metabolitos oxidados y glucuronados.

(1) (2)

2.-DISTRIBUCION Y BIOTRANSFORMACION.

Después de la administración intravenosa el diazepam se distribuye en la forma típica que corresponde a los agentes muy liposolubles. El diazepam se distribuye con particular rapidez, pues posee una vida media de cerca de 1 hora. La magnitud de la fijación de las benzodiazepinas en las proteínas plasmáticas concuerda con su liposolubilidad y varía desde cerca del 99% para el diazepam y un 85% para el clonazepam. (1) (2)

El metabolito principal del diazepam, N-desmetildiazepam, posee más o menos la misma actividad que el fármaco original. Este metabolito se produce mediante la rápida descarboxilación del clorazepato después de su ingestión. El diazepam y el N-desmetildiazepam se hidroxilan con lentitud a otros metabolitos activos. La vida media plasmática del diazepam es en promedio de 1 a 2 días y la del N-desmetildiazepam es de unas 60 horas.

3.-EFECTOS SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

Actualmente existe una coincidencia general respecto a que la mayoría de las acciones de las benzodiazepinas se deben a la potenciación de la inhibición neuronal mediada por el ácido gammaaminobutírico (GABA). Corrobora este punto de vista el hecho de que las evidencias de la conducta y los estudios electrofisiológicos muestran que los efectos de las benzodiazepinas se reducen o se evitan tratando de antemano a los pacientes con antagonistas del GABA, o con inhibidores de la síntesis del transmisor. Aunque no se puede descartar posibles acciones que conducen a un aumento en la liberación del GABA se ha prestado mucha atención a la capacidad de las benzodiazepinas para potenciar las acciones del GABA sobre las neuronas de todos los niveles. (1) (2)

4.-EFECTOS INDESEABLES.

En el momento de alcanzar la concentración plasmática máxima - dosis hipnóticas de benzodiazepinas pueden causar diversos grados de mareo, laxitud, prolongación del tiempo de reacción, falta de coordinación motora, ataxia, deterioro de las funciones mentales y psicomotoras, desorganización del pensamiento, confusión, amnesia retrograda, sequedad bucal y sabor amargo. Todos estos efectos deterioran mucho la habilidad para conducir vehículos y otras actividades psicomotoras. La interacción con el etanol puede ser especialmente seria. (1) (2)

5.-REACCIONES TOXICAS Y EFECTOS SECUNDARIOS.

Los efectos secundarios que pueden esperarse con los depresores del SNC, o sea somnolencia y ataxia, son extensiones de las acciones farmacológicas de estos fármacos.

Con el diazepam pueden esperarse efectos ansiolíticos a concentraciones sanguíneas de 300 a 400 $\mu\text{g/ml}$, y algunos efectos secundarios, el deterioro psicomotor comienza con concentraciones similares.

Los efectos colaterales del diazepam y de otras benzodiazepinas son usualmente moderadas e infrecuentes. Somnolencia, dolor de cabeza y ataxia son los más comunes y dependen de la dosis.

(1) (2)

6.-TOLERANCIA Y DEPENDENCIA FISICA.

Sólo se observaron síntomas importantes de abstinencia, que inducían convulsiones, cuando se administraron grandes dosis de benzodiazepina durante períodos prolongados y se suspendía bruscamente. Los síntomas de abstinencia consecutivos al uso crónico pueden tardar una semana en aparecer desde que se interrumpe de pronto el fármaco a causa de la larga vida media y de la conversión a metabolitos activos.

Generalmente el síndrome de abstinencia no se presenta después de haber administrado las dosis habituales. (1) (2)

7.-INTERACCION CON OTROS FARMACOS.

Las interacciones de otros fármacos con las benzodiazepinas son poco frecuentes excepto por un efecto aditivo con otros depresores del sistema nervioso central.

En los grandes fumadores de cigarrillos puede disminuir la efectividad de las dosis habituales de estos fármacos. La capacidad de las benzodiazepinas de inducir el metabolismo hepático de otros agentes es mucho menor que la de muchos otros sedantes, especialmente barbitúricos. (1) (2)

8.-USOS.

El diazepam es una benzodiazepina con propiedades de tranquilizante, anticonvulsivo, sedante, musculorelajante.

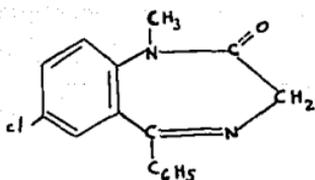
Es usado en el tratamiento de ansiedad y estados de tensión, como sedante y premedicación, en el control de espasmos musculares, en el tétanos y en el manejo de los síntomas del retiro -- del alcohol.

Esto es de valor en pacientes que sufren procesos ortopédicos, endoscópicos y problemas cardiacos. Cuando se administra diazepam por vía oral puede ser beneficioso en el tratamiento de algunos pacientes con epilepsia y este es el tratamiento recomendado. (1) (2)

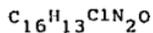
PROPIEDADES.

DIAZEPAM. 7-chloro-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one.

Estructura



Fórmula Molecular



Peso Molecular

284.75

Otros nombres del DIAZEPAM en MEXICO.

Alboral;Ortopsiq;Valium.

En combinación. Alboral GD;Ebelcaps;Numencial;Qual;Dedotex.
con otros principios activos.

Punto de Fusión. 131-135 °C

Solubilidad.

Solvente	Solubilidad mg/ml
Agua	.05
Eter	18
Etanol	41
Metanol	49
Acetona	125
Cloroformo	+ de 500

Coefficiente de Distribución.

El coeficiente de distribución del Diazepam entre 1-octanol y buffer de fosfatos de PH 7.2 es 382 a temperatura ambiente.

Constante de Disociación.

El PK_a para Diazepam es de 3.4 (6),(8),(9),(10).

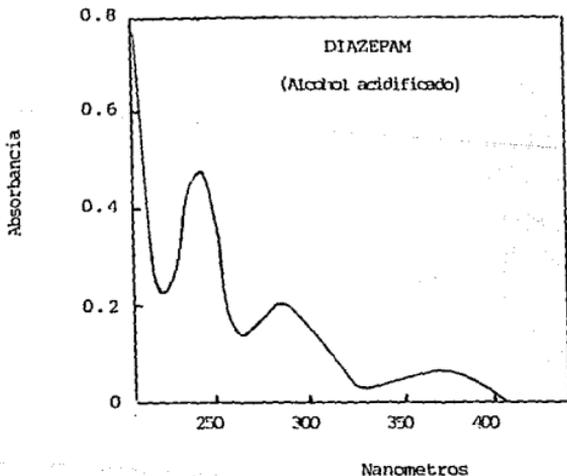
ESPECTROSCOPIA.

ULTRAVIOLETA

Espectro de Absorción Ultravioleta

El Diazepam en HCl 2 N exhibe una absorción máxima en 242 $m\mu$ y a 287 $m\mu$. En H_2SO_4 0.1 N exhibe una absorción máxima en 241 $m\mu$ ($E_{1cm}^{1\%}$ 1402), 284 $m\mu$ ($E_{1cm}^{1\%}$ 700), y 359 $m\mu$ ($E_{1cm}^{1\%}$ 170).

El Diazepam fué analizado entre 420 y 210 nm en alcohol acidificado, exhibiendo 3 máximos. Estos fueron localizados a 242 ± 2 nm ($a=100$), 285 ± 2 nm ($a=43.7$) y 368 ± 2 nm ($a=14.5$). (6)(10)



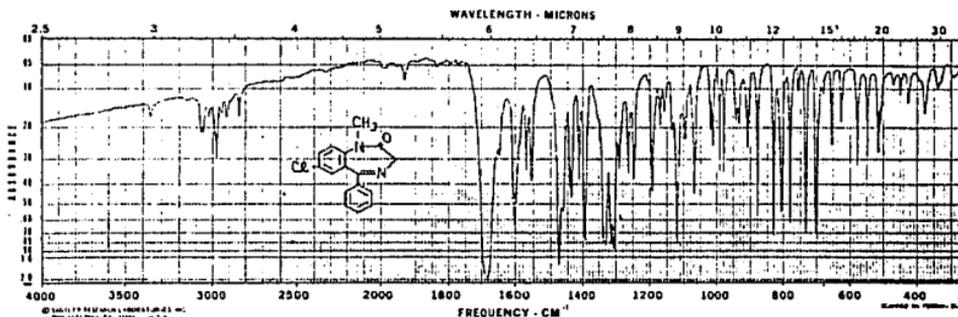
INFRARROJO

El espectro de infrarrojo de Diazepam se determinó en pastilla de KBr. Concentración del estandar 1 mg/400 mg KBr . (6), (10)

BANDAS CARACTERISTICAS

1680, 1560, 1480

7-CHLORO-1,3-DIHYDRO-1-METHYL-5-PHENYL-2H-1,4-BENZODIAZEPIN-2-ONE



Source: J. V. Earley, Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, N. J.

SADTLER RESEARCH LABORATORIES, INC.

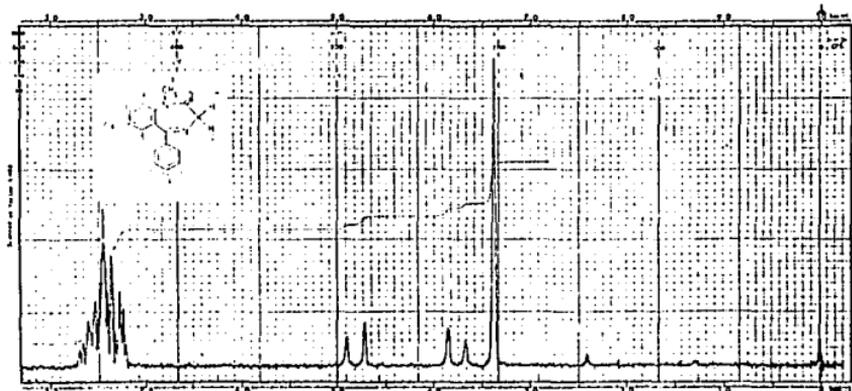
RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR (RMN)

El espectro de (RMN) fué obtenido disolviendo 47 mg de estandar de referencia en 0.5 ml de $CDCl_3$, usando tetrametilsilano - como referencia interna.

El espectro se reportó a temperatura ambiente en $CDCl_3$, los dos protones del metileno exhibieron un espectro AB. (6)

Desplazamiento Químico

Protones	ppm
a	3.39
b	3.78 ó c
c	4.80 ó b
d	7.19-7.72



CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

Soporte:gel de sílice, capa de 0.25 mm de espesor.

Fase móvil:Sistema disolvente de acetato de etilo y n-heptano-
(1:1) .

Solución de la muestra:Muestra de diazepam en acetona conte --
niendo 50 mg/ml .

Solución de referencia: S Ref. de diazepam en acetona conte --
niendo 50 mg/ml .

Solución reveladora:Yodo platinato de potasio.

PROCEDIMIENTO.

En una cromoplaca, por separado se aplican 10 μ l de la solución de la muestra y 10 μ l de la solución de referencia. Se deja se car las aplicaciones y se desarrolla el cromatograma dentro de una cámara sin saturar, hasta que el frente de la fase móvil ha recorrido cerca de las tres cuartas partes de la longitud de la cromoplaca. Se retira ésta de la cámara de desarrollo, se marca el frente del disolvente y se deja evaporar. Se localizan las manchas rociando ligeramente con la solución reveladora y observando con luz ultravioleta. El diazepam se muestra como -- una mancha morada con un Rf aproximado de 0.3-0.4 . (8)

METODOS DE ANALISIS DE DIAZEPAM.

Cromatografía de Líquidos (HPLC)

Cromatografía en capa Fina

En esta sección se presentan los métodos de análisis de diazepam más comunmente usados para su determinación en presentaciones farmacéuticas, y describiendolos con detalle para las presentaciones más usuales: Cápsulas, Tabletas, Inyectables y suspensión oral. (3), (4), (5)

CROMATOGRAFIA LIQUIDA.

La cromatografía es un proceso para la separación de mezclas moleculares por distribución de los solutos entre dos fases, las cuales están en contacto de una forma parecida a una contracorriente continua.

Tipos de Cromatografía Líquida. La naturaleza física de las fases y los mecanismos de toma de contacto entre ellas, producen varios tipos de cromatografía. Mientras que la fase móvil sea un líquido, la técnica se llama cromatografía líquida (CL).

Se clasifican de varias maneras los tipos de cromatografía líquida:

1.-Por el mecanismo. Cuando la fase estacionaria es un líquido, de manera que el mecanismo de distribución es una partición líquido-líquido, la técnica se denomina cromatografía de partición o cromatografía líquido-líquido (CLL). Cuando la fase estacionaria es un sólido (más propiamente, la interfase entre un sólido y un líquido), el método es cromatografía de adsorción o cromatografía sólido-líquido (CSL). Pueden existir otros mecanismos de distribución, tales como cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular.

2.-Por la forma experimental. En la columna cromatográfica, el sistema cromatográfico se halla en un tubo cilíndrico, de vidrio o metal por lo general. La cromatografía plana se efectúa

en una superficie plana. Las formas de la cromatografía plana - son cromatografía de papel (que por lo general, actúa por un mecanismo de partición) y cromatografía de capa fina (CCF), que suele ser una forma de cromatografía de adsorción.

3.-Por la linealidad de las isoterma. En la cromatografía lineal, el coeficiente de partición o coeficiente de distribución es independiente de la concentración, es decir, la isoterma de partición es lineal sobre el margen de concentración encontrado en la zona. En la cromatografía no lineal, la isoterma es no lineal.

Cromatografía de Partición. En la cromatografía de partición -- ambas fases son líquidas, por lo que también se le denomina cromatografía líquido-líquido (CLL). El proceso responsable de la retención es decir, de las diferentes velocidades de desplazamiento de las zonas, es una distribución líquido-líquido.

En el caso de que la CLL se efectúe normalmente, la fase estacionaria (fase interna) es la más polar de los dos líquidos.

Esta fase se adsorbe en una película muy delgada, a la superficie de un sólido finamente dividido (el soporte). En teoría, el único papel del soporte en la CLL, es contener a la fase estacionaria. La fase móvil es un solvente menos polar inmiscible con la fase estacionaria. Muy a menudo la fase estacionaria es agua o una solución acuosa y la fase móvil es un solvente orgánico. (16), (17), (18)

Importancia de la Cromatografía Líquida.

La cromatografía líquida es un método muy adecuado para la separación de mezclas moleculares. Se pueden separar moléculas -- con pesos moleculares en el intervalo aproximado de 200-2000 . La cromatografía líquida es adecuada para sustancias solubles- en agua. (16) (17)

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

La cromatografía de capa fina es una forma de cromatografía de adsorción en la que el adsorbente se difunde en una capa fina sobre una placa de vidrio. A nivel comercial hay equipos de cromatografía en capa fina sobre placa de vidrio. Esta capa puede formarse por extensión, pulverización, criba u otro método cualquiera que produzca una capa de grosor uniforme.

El aplicador comercial es, en esencia, un depósito bajo el cual las placas de vidrio, generalmente de 20 por 20 cm., se pasan para recibir un revestimiento uniforme de masa adsorbente. El grosor habitual de una capa típica es de 250 μ .

La alúmina y el gel de sílice son los adsorbentes más útiles.

El tamaño de partícula del adsorbente es más pequeño que el de los materiales de columna, y esta característica de grano fino de los adsorbentes indica la gran sensibilidad de la cromatografía de capa fina (CCF).

En la CCF, el revelado se efectúa por la técnica ascendente. Completado el revelado, se secan las placas al aire antes del examen de las zonas desplazadas. A continuación se revelan las manchas por un método físico o químico apropiado. La iluminación con luz ultravioleta está indicada para compuestos fluorescentes. Los compuestos no fluorescentes se localizan por incorporación de una sustancia fluorescente a la masa adsorbente. Completado el revelado aparecerán las manchas oscurecidas contra un fondo fluorescente.

Importancia de la Cromatografía en Capa Fina.

La principal aplicación de la CCF consiste en detectar e identificar compuestos en mezclas complejas. La correspondencia de los valores de R_f de una especie auténtica y de la sustancia desconocida es un criterio de identidad, aunque no una prueba.

El cromatograma de capa fina es superior al cromatograma sobre papel como medio para reacciones coloreadas, porque muchos reactivos corrosivos, susceptibles de reaccionar con el papel pueden aplicarse directamente al revelado de manchas en el cromatograma de CCF.

Una ventaja de la CCF sobre la cromatografía en papel es su mayor sensibilidad, debido al carácter de grano fino de las partículas del adsorbente comparadas con las fibras del papel. En la CCF, la muestra permanece concentrada en una zona más pequeña y por consiguiente, es posible detectar una muestra más pequeña.

Otra ventaja de la CCF es su rapidez de revelado, que sólo requiere minutos, frente a horas, para la mayoría de las separaciones cromatográficas sobre papel. (16), (17), (18)

CUADRO 1

PRESENTACIONES FARMACEUTICAS DEL DIAZEPAM.

PRESENTACIONES	METODOS PARA SU CUANTIFICACION
CAPSULAS	a) Cromatografía de líquidos
TABLETAS	a) Cromatografía de líquidos b) Cromatografía en capa fina
INYECTABLES	a) Cromatografía en capa fina
SUSPENSION ORAL	a) Cromatografía de líquidos b) Cromatografía en capa fina c) Microbiológico

Presentación.-CAPSULAS

Método.-a) CROMATOGRAFIA LIQUIDA

El cromatógrafo utiliza un detector ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm y una columna de 30 cm. por 3.9 mm, la columna contiene sílice o micropartículas de cerámica cubiertas de octadecil silano, de 5 a 10 μ m de diámetro. La velocidad de flujo es de 1.2 ml por minuto. La fase móvil es metanol-agua -- (65:35). La desviación relativa del estandar no es más de 2.0 % y la resolución del factor entre sulfanilamida y el diazepam no es menor a 10.0 . El estandar de sulfanilamida tiene una concentración de 250 μ g/ml .

Procedimiento.

Se inyectan al cromatógrafo por separado, muestras de 5 μ l del estandar de diazepam que tiene una concentración de 0.2 mg/ml y de la muestra de ensayo al cromatógrafo y se analiza el registro de los cromatogramas, se mide el área bajo los picos.

El tiempo de retención relativa es 2 minutos para sulfanilamida y 8 minutos para el diazepam.

Se calcula la cantidad en mg de diazepam en la porción de cápsulas, tomando como fórmula $50 C (RU/RS)$, donde C es la concentración en mg por ml de diazepam en el estandar, RU y RS son las áreas relativas obtenidas de la muestra de ensayo y el estandar respectivamente. (8)

En la presentación de cápsulas, el método de cromatografía líquida se utiliza en el ensayo de identidad. (8)

Presentación.-TABLETAS

Método.-a) CROMATOGRAFIA LIQUIDA

Solución de referencia interna.-Preparar una solución de SRef de sulfanilamida en metanol que contenga 250 µg/ml aproximadamente de sulfanilamida.

Solución de referencia.-Pesar 25 mg de SRef de diazepam, pasar a un matraz volumétrico de 25 ml, disolver y llevar al aforo con metanol. Esta solución contiene 1 mg/ml aproximadamente de diazepam. Pasar una parte alícuota de 5.0 ml de esta solución y una parte alícuota de 5 ml de la solución de referencia interna a un matraz volumétrico de 25 ml, llevar al aforo con metanol y mezclar. Esta solución contiene 0.2 mg/ml aproximadamente de diazepam.

Solución de la muestra.-Pesar 20 tabletas, calcular su peso promedio, moler hasta polvo fino, pesar una cantidad de polvo equivalente a 10 mg aproximadamente de diazepam, pasar a un matraz volumétrico de 50 ml, agregar 10 ml de la solución de referencia interna y 15 ml de metanol. Agitar mecánicamente por 30 minutos, llevar al aforo con metanol y mezclar.

Condiciones del equipo.-Columna de 30 cm por 3.9 mm, empacada -

con sílica porosa o micropartículas de cerámica de 5 a 10 micras, recubiertas con octadecilsilano; como fase móvil metanol - agua (65:35) a un flujo de 1.2 ml/min, para obtener un factor de resolución no menor de 4.5; cinco inyecciones iguales de la solución de referencia deben mostrar un coeficiente de variación no mayor del 2.0 %; detector de ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm.

Procedimiento.-Una vez que estén establecidas las condiciones del equipo, proceder a inyectar al cromatógrafo, 5 μ l de la solución de la muestra. Una vez obtenidos los correspondientes cromatogramas, medir el área bajo los picos obtenidos con un tiempo de retención de 2 minutos aproximadamente para sulfanilamida y 8 minutos aproximadamente para diazepam, tanto en el cromatograma obtenido con la solución de referencia como en el obtenido con la solución de la muestra. Calcular la cantidad en mg de diazepam, en la porción tomada de la muestra, por la fórmula: $50 C (R_m/R_{ref})$; en donde C es la concentración en μ g/ml de la solución de referencia, R_m y R_{ref} son las áreas relativas obtenidas con la solución de la muestra y la solución de referencia, respectivamente. Relacionar el valor obtenido con el peso promedio por tableta obtenido al principio de la valoración.

En la presentación de tabletas, el método de cromatografía líquida se utiliza en el ensayo de identidad y de valoración.

Método.-b) CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Emplear una cromatoplaaca de gel de sílice cromatográfico.

Solución reveladora.-Mezclar en el momento de usarse, en proporción 1:1, solución 1:10 de cloruro férrico y solución 1:20 de ferricianuro de potasio.

Solución 1.-Preparar una solución de SRef de diazepam en acetona, que contenga 10 mg/ml.

Solución 2.-Preparar una solución de 2-metilamino-5-cloro-benzofenona, en acetona, que contenga 10 µg/ml.

Solución 3.-Preparar una solución de 3-amino-6-cloro-1-metil-4-fenilcarbostiril, en acetona que contenga 100 µg/ml.

Solución 4.-Preparar una solución de 7-cloro-1,3-dihidro-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona en acetona, que contenga 300 µg/ml.

Solución de la muestra.-Moler finamente no menos de 20 tabletas pesar una cantidad de polvo equivalente a 100 mg de diazepam, - pasar aun tubo de centrífuga de 50 ml y agregar 10 ml de acetona, someter a la acción del ultrasonido por 5 minutos y centrifugar, emplear el líquido claro para la prueba.

Procedimiento.-Utilizar como fase móvil una mezcla de acetato de etilo-n-heptano (1:1), dividir la cromatoplaaca en 5 carriles y aplicar las soluciones, por separado, en el orden siguiente:

100 µl de la solución 1, 100 µl de la solución de la muestra, -- 10 µl de la solución 2, 10 µl de la solución 3 y 10 µl de solu -

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

ción 4. Desarrollar el cromatograma sin saturación previa de la cámara, hasta que el frente de la fase móvil alcance 15 cm desde la línea de aplicación, sacar la cromatoplaque de la cámara, dejar secar y observar bajo luz ultravioleta, posteriormente rociar suavemente con la solución reveladora. (8)

En la presentación de tabletas, el método de cromatografía en capa fina se utiliza en el ensayo de identidad. (8)

Presentación.- INYECTABLES

Método.- a) CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Utilizar una cromatoplaque de gel de sílice cromatográfico. Preparar una solución de SRef de diazepam en acetona, que contenga 10 mg/ml (solución 1). Preparar una solución de 2-metilamino-5-cloro-benzofenona, en acetona, que contenga 10 µg/ml (solución 2). Preparar una solución de 3-amino-6-cloro-1-metil-4-fenil carbostiril, en acetona, que contenga 100 µg/ml (solución 3). Preparar una solución de 7-cloro-1,3-dihidro-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona en acetona, que contenga 300 µg/ml (solución 4). Pasar a un embudo de separación un volumen de la muestra equivalente a 10 mg de diazepam, agregar 20 ml de la solución reguladora de fosfatos PH 7.0, extraer con 4 porciones de 20 ml de cloroformo, pasando cada extracto a través de papel --

filtro con sulfato de sodio anhidro, reunir los extracto y evaporar a sequedad con corriente de nitrógeno. Disolver el residuo en 1.0 ml de acetona.

Dividir la cromatoplaça en 5 carriles y aplicar las soluciones en el orden siguiente: 100 μ l de la solución 1; 100 μ l de la solución de la muestra, 10 μ l de la solución 2; 10 μ l de la solución 3 y 10 μ l de la solución 4.

Desarrollar el cromatograma, sin saturación previa de la cámara con una fase móvil de acetato de etilo-n-heptano (1:1), hasta 15 cm arriba de la línea de aplicación, retirar la cromatoplaça de la cámara, marcar el frente de la fase móvil y dejarla secar al aire. Localizar las manchas con luz ultravioleta de onda corta y rociar suavemente con una mezcla de volúmenes iguales de solución (1:10) de cloruro férrico y solución (1:20) de ferri-cianuro de potasio. (8)

En la presentación de inyectables, el método de cromatografía en capa fina se utiliza en el ensayo de identidad. (8)

Presentación.-SUSPENSION ORAL

Método.-a) CROMATOGRAFIA LIQUIDA

Patrón interno.-Pesar aproximadamente 25 mg de p-hidroxibenzoato de etilo, transferir a un matraz volumétrico de 50 ml, disolver y llevar al aforo con metanol, mezclar. Esta solución contiene 500 µg/ml aproximadamente de p-hidroxibenzoato de etilo.

Preparación de referencia.-Pesar aproximadamente 10 mg de diazepam, transferir a un matraz volumétrico de 10 ml, llevar al aforo con metanol y mezclar. Transferir 5 ml de la solución anterior a un matraz volumétrico de 25 ml, agregar 5 ml del patrón interno, llevar al aforo con metanol y mezclar. Esta solución contiene 200 µg/ml aproximadamente de diazepam.

Preparación de la muestra.-Transferir una parte alícuota de la muestra previamente agitada equivalente a 10 mg de diazepam a un matraz volumétrico de 50 ml, 10 ml del patrón interno y 10 ml de metanol, agitar mecánicamente durante 30 minutos, llevar al aforo con metanol, mezclar.

Condiciones del equipo.-Fase móvil: metanol-agua (65:35) a un flujo de 1.2 ml/min, detector de ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm, columna de 30 cm por 3.9 mm, empacada con micropartículas de cerámica o sílica porosa, de 5 a 10 micras de diámetro, recubiertas con octadecilsilano.

Procedimiento.-Inyectar al cromatógrafo, por quintuplicado, volú

menes iguales (5 μ l aproximadamente) de la preparación de referencia, ajustar los parámetros de operación y el tamaño de los picos. El coeficiente de variación, no debe ser mayor del 2 % y el factor de resolución no debe ser menor de 4.5 .

Una vez cumplidas estas especificaciones, inyectar al cromatógrafo, por separado, volúmenes iguales (5 μ l aproximadamente) de la preparación de referencia y de la preparación de la muestra. Obtener sus cromatogramas correspondientes y medir el área bajo los picos para p-hidroxibenzoato de etilo y diazepam, que son eluidos en este orden.

Calcular la cantidad en mg/ml de $C_{16}H_{13}ClN_2O$ en la muestra tomada, por medio de la fórmula siguiente: $0.05 C/V (R_m/R_{ref})$; donde C es la concentración en μ g/ml de la preparación de referencia; R_m y R_{ref} son las áreas relativas obtenidas en el cromatograma con la preparación de la muestra y la preparación de referencia, respectivamente y V es el volumen, en ml, de muestra tomada. (8)

En la presentación de suspensión oral, el método de cromatografía líquida se utiliza en el ensayo de identidad. (8)

Presentación.-SUSPENSION ORAL

Método.-b) CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Solución reguladora a PH 7 .-Mezclar 104.5 ml de solución 0.2M de fosfato dibásico de sodio con 85.5 ml de solución 0.2 M de fosfato monobásico de potasio en un matraz volumétrico de 1000 ml, llevar al aforo con agua y mezclar.

Preparación de referencia.-Pesar 5 mg de diazepam, pasar a un matraz volumétrico de 1 ml, disolver y llevar al aforo con acetona. Esta solución contiene 5 mg/ml aproximadamente de diazepam.

Preparación de la muestra.-Transferir a un embudo de separación una parte alícuota de la muestra previamente agitada, equivalente a 10 mg de diazepam, agregar 20 ml de la solución reguladora y extraer con 4 porciones de cloroformo de 20 ml cada una. Pasar cada extracto a través de 5 g de sulfato de sodio anhidro y recibir los extractos en un matraz volumétrico de 100 ml, llevar al aforo con cloroformo y mezclar. Evaporar 50 ml de la solución anterior con ayuda de corriente de nitrógeno, agregar 1 ml de cloroformo y mezclar.

Procedimiento.-Aplicar a una cromatoplaaca de gel de sílice, en carriles separados, 30 ul de la preparación de referencia y 30 ul de la preparación de la muestra, emplear como fase móvil una mezcla de volúmenes iguales de acetato de etilo y n-heptano.

Desarrollar el cromatograma sin saturar la cámara, dejar correr la fase móvil hasta 3/4 partes de la longitud de la placa, retirar la cromatoplaque de la cámara, marcar el frente de la fase móvil, dejar secar y observar bajo luz ultravioleta. (8)

Presentación.-SUSPENSION ORAL

Método.-c) MICROBIOLOGICO. EN PLACA.

Límites microbianos.

La muestra debe estar ausente de microorganismos patógenos, no debe contener más de 100 colonias/ml de mesofílicos aerobios - ni más de 10 colonias/ml de hongos y levaduras. (8)

En la presentación de suspensión oral, el método microbiológico se utiliza en el ensayo microbiano. (8)

CONCLUSIONES

Se hizo una revisión de los métodos oficiales de análisis comúnmente empleados para diazepam en las presentaciones farmacéuticas más comunes: tabletas, cápsulas, inyectables y suspensión oral. Las farmacopeas consultadas fueron las siguientes :

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos

5ª Edición. Mexico. S.S.A. Secretaría de Salud. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

USP XXI

The United States Pharmacopeia

The National Formulary NF XVI

United States Pharmacopeial Convention Inc.

The United States Pharmacopeia

USP XX NF XV SUPP 3-5 .Twentieth Revision. United States -- Pharmacopeial Convention Inc.

British Pharmacopeia Vol. II

Se presentan las técnicas analíticas para diazepam, en las cuatro presentaciones anteriormente mencionadas que se encuentran en las farmacopeas consultadas. Se encontró que los métodos más empleados para el diazepam son: Cromatografía de líquidos y Cromatografía en capa fina.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Goodman y Gilman
Las bases farmacológicas de la terapéutica
1988, pags. 334-346; 419-424; 448-450
7ª Edición. Edit. Panamericana
- 2.- Martindale the Extra Pharmacopeia Pte. 2
1979, pags. 1529-1536
Twenty-seventh Edition. London. The Pharmaceutical Press
- 3.- USP XXI
The United States Pharmacopeia
Twenty-First Revision 1985
The National Formulary NF XVI
Sixteenth Edition 1985
1985, pags. 306-309
United States Pharmacopeial Convention Inc.
- 4.- British Pharmacopeia Vol. II
1980, pags. 529-530; 602; 758
Medicines commission pursuant to the Medicines Act 1968
- 5.- The United States Pharmacopeia
USP XX NF XV SUPP 3-5
1982, pags. 101-102; 507-508. Twentieth Revision
United States Pharmacopeial Convention Inc.

6.-A.MacDonald;A.F.Michelis;and B.Z.Senkowski.

Analytical Profiles of Drug Substances

1972, 79-99

Edited by Klaus Florey.

Academic Press 1972

7.-J.Arthur F. de Silva

GLC and HPLC Determination of Therapeutic Agents Part. (2)

1978, pages 607;612-618;625-628

Edited by Kiyoshi Tsuji

Marcel Dekker, Inc. 1978

8.-Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos

1988, pages 625-626;1131-1135

5ª Edición.México. S.S.A.

Secretaría de Salud.Comisión Permanente de la Farmacopea
de los Estados Unidos Mexicanos.

9.-The Merck Index

10 TH ED.

10.-E.G.C.Clarke

Isolation and Identification of Drugs. Vol. I

pag. 294

Bibliografía complementaria

11.-Alfred Burger

Medical Chemistry Vol. II

1980, pags. 1380-1381, 1396-1397, 1503-1509, 1533

12.-Wolfjag, Sadee; Gertruida, C.M. Belem.

Drug Level Monitoring. Analytical Techniques, Metabolism, and
Pharmacokinetics. pags. 6.212-215

13.-A.H. Lawrence

Characterization of Benzodiazepine Drugs by Ion Mobility
Spectrometry. Anal. Chem. 1989, 61, 343-349

14.-Robinson, K.; Rutterford, M.G.; Smith, R.N.

A Sensitive Benzodiazepine Radioimmunoassay of Broad
specificity. J. Pharm. Pharmacol. 1980, 32, 773-777

15.-Hanekamp, H. B.; Voogf, W. H.; Frel, R. W.; Bos, P.

Continuos Flow Altrnating Current Polarographic Detection
of Nitrazepam in Liquid Chromatography.
Anal. Chem. 1891, 53, 1362-1365

16.-Kenneth A. Connors

Curso deAnálisis Farmacéutico

1980.Edit. Reverté

17.-Henry H. Bauer

Instrumental Analysis

1978. Allyn and Bacon, Inc.

18.-Springer-Verlag

Practice of High Performance Liquid Chromatography

1989. Edit. H. Engelhart