

Toets Bereiding en Analyse (Fa-202)
4 april 2008, 9:00-12:00 uur, Vechtse Banen, hal 3

Naam student:	
Studentnummer:	Handtekening:

Vermeld duidelijk uw naam en studentnummer in het kader. Maak de vellen niet los!

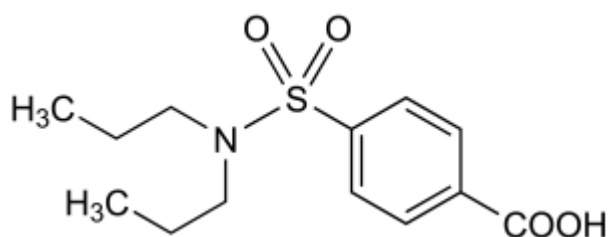
Gebruik de kaders om te schrijven.

Controleer of het tentamen compleet is (14 vellen, 7 vragen)

Geef duidelijk maar bondig antwoord op de gestelde vragen respectievelijk opdrachten. Bij de beoordeling en becijfering wordt gelet op volledigheid van het antwoord, op de afwezigheid van overbodige en niet ter zake doende informatie en op de juistheid en precisie van de formulering van het antwoord. Beargumenteer uw antwoord altijd. Voor dit tentamen kunnen in totaal 100 punten worden behaald. Dit tentamen bevat 7 vragen. De uitslag wordt bekend gemaakt via studiezaken. Inkijken van het tentamen is alleen mogelijk na het maken van een afspraak.

Verkregen punten

Vraag 1	Vraag 2	Vraag 3	Vraag 4	Vraag 5	Vraag 6	Vraag 7
Analyse totaal		Recepteerkunde totaal		Tentamen totaal		



Probenecide

Gegevens

M (probenecide) = 285.4 g/mol

pK_a (probenecide) = 3,4

UV (probenecide): λ_{max} 248 nm; E₁¹ = 332 (ethanol)

Oplosbaarheid probenecide: onoplosbaar in water; 1:25 in ethanol, 1:12 in aceton, oplosbaar in chloroform en verdunde alkali.

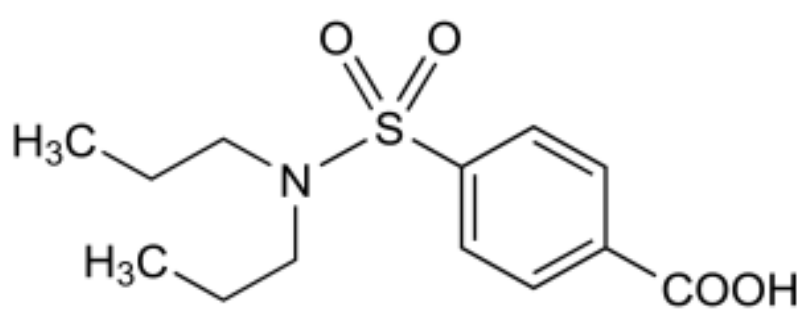
Van het farmacon probenecide (een analgeticum) moet een oraal vaste, een oraal vloeibare en een rectale toedieningsvorm worden bereid. Tevens moeten de bijbehorende controles worden uitgevoerd. Beantwoord over de eigenschappen van de stof probenecide, de bereidingen en de uitgevoerde controles de volgende vragen.

Vraag 1

- a. Is probenecide een zure of een basische stof? Omcirkel in de bovenstaande structuur de zure en/of basische functionele groepen. (2 punt)

<i>Zuur of base?</i>	<i>Schatting pK_a</i>
<input type="radio"/> Zuur X <input type="radio"/> Base <input type="radio"/> Beide	pK _a ~ 3-4.5 (zoals van benzoezuur)
Motivatie / toelichting -COOH is zwak zure groep. - N maakt deel uit van sulfonamide en is niet basisch.	

- b. Probenecide vertoont UV-absorptie. Geef in de onderstaande molecuulstructuur van probenecide nauwkeurig de chromofore groep(en) aan. (2 punt)

<i>Chromofoor / chromoforen?</i>

<i>Motivatie / toelichting</i>
Geconjugeerde dubbele bindingen: S=O – aromatische ring – C=O.

- c. Verwacht dat je dat het UV-absorptiespectrum van een oplossing van probenecide bij hoge pH is verschoven ten opzichte van het spectrum bij lage pH (pH-shift)? (2 punt)

<i>pH-shift?</i>
<input type="radio"/> Ja X <input type="radio"/> Nee
<i>Motivatie / toelichting</i>
Carboxylgroep is geconjugeerd met chromofoor.

- d. Voor het bevestigen van de identiteit van probenecide wordt een infraroodspectrum opgenomen. Het spectrum vertoont ondermeer sterke absorptiebanden bij 1683 en 1307 cm^{-1} die behoren bij S=O en C=O vibraties. Beredeneer van welke vibratie de band bij 1683 cm^{-1} afkomstig is. (3 punt)

De band bij 1683 cm^{-1} hoort bij de:

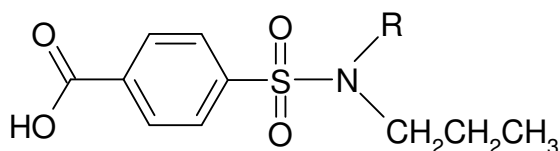
- S=O rekvibratie
- C=O rekvibratie X

Motivatie / toelichting

De massa van S is groter dan C. Dus S=O zal met een lagere frequentie vibreren dan C=O.

- e. Voor het controleren van de zuiverheid van probenecide wordt onder meer dunnelaagchromatografie (DLC) gebruikt met silica als stationaire fase en benzeen:ethyl acetaat: ijsazijn 7:3:1 (v/v/v) als mobiele fase. In dit systeem heeft probenecide een R_f -waarde van 0,70.

Er zijn een aantal mogelijke verontreinigingen van probenecide bekend waarvan t.o.v. probenecide de N-propyl groep gewijzigd is (zie onderstaande structuur en tabel):



stof	R
probenecide	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
secundair hydroxy propyl	$\text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$
primair hydroxy propyl	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
N-depropyl	H

Rangschik deze vier stoffen op R_f -waarde als van bovenstaand DLC-systeem gebruik wordt gemaakt. (3 punt)

De volgorde van de vier stoffen is:

- $R_f \text{ N-depropyl} < R_f \text{ probenecide} < R_f \text{ secundair hydroxy} < R_f \text{ primair hydroxy}$
- $R_f \text{ probenecide} < R_f \text{ N-depropyl} < R_f \text{ primair hydroxy} < R_f \text{ secundair hydroxy}$
- $R_f \text{ primair hydroxy} < R_f \text{ secundair hydroxy} < R_f \text{ N-depropyl} < R_f \text{ probenecide X}$

Motivatie / toelichting

We hebben hier te maken met normal phase chromatografie. D.w.z. hoe polairder de stof, hoe meer interactie met de polaire stationaire fase, des te lager de R_f .

- f. Voor de gehaltebepaling van probenecide kan de volgende titratie worden uitgevoerd:

Los 250 mg probenecide op in 50 mL ethanol. Titreer met 0,1 M natrium hydroxide en bepaal het eindpunt potentiometrisch.

1 mL 0,1 M natrium hydroxide is equivalent aan 28,54 mg probenecide.

Een apotheker weegt 247,4 mg probenecide grondstof af en titreert met $9,665 \cdot 10^{-2}$ M natrium hydroxide. Hij bereikt het eindpunt na toevoeging van 8,843 mL natrium hydroxide oplossing.

Voldoet de probenecide grondstof aan de Ph. Eur.-eis (gehalte tussen de 99 en 101%)? Geef berekening. (3 punt)

Voldoet probenecide?

- Ja
- Nee X

Berekening

8,843 mL $9,665 \cdot 10^{-2}$ M NaOH = 0,8547 mmol = 243,9 mg probenecide

Gehalte = $100 * (243,9 / 247,4) = 98,59\%$

Vraag 2

De twee onderstaande voorschriften zijn voor vloeibare orale toedieningsvormen met het analgeticum probenecide (of een derivaat daarvan, zie vraag 2b).

Tegenwoordig worden ze, om verschillende redenen, in deze hoedanigheid in Nederland niet meer gebruikt. Bekijk de voorschriften goed.

Voorschrift I		Voorschrift II	
Probenecide	2,5g	Probenecide	2,5g
Sol. MOB conc. FNA	1mL	Glycerolum 85 %	50g
Dinatriummonowaterstoffosfaat	200mg	Solutio sorbitol	20 mL
Sol. NaOH dil.	q.s.	Essentia citri	0.5mL
Sirupus simplex	10 mL	Propyleenglycol	10g
Aqua purificata ad 100mL		Aqua	ad 100mL

- a. Is voorschrift I een oplossing of een suspensie? Wat zal de vermoedelijke pH zijn van het eerste voorschrift? Verklaar uw antwoorden. (4 punt)

Oplossing of suspensie		(kruis het juiste antwoord aan)	
Voorschrift 1	<input checked="" type="radio"/> oplossing	<input type="radio"/> suspensie	
Verklaring: Probenecide is oplosbaar bij hogere pH, is dan n.l. geladen			
Vermoedelijke pH: hoog(10?), Dinatriummonowaterstoffosfaat met NaOH geeft een buffer met $pH \gg pK_a$			

- b. Propylprobenecinaat is een derivaat van probenecide. Is propylprobenecinaat de ester of een zout van probenecide? Verklaar uw antwoord. (3 punt)

Propylprobenecinaat		(kruis het juiste antwoord aan)	
<input type="radio"/> Zowel een ester als een zout	<input type="radio"/> zout	<input checked="" type="radio"/> ester	
Verklaring: Ester van probenecide. "Propyl" kan geen zout vormen.			

- c. Is voorschrift II een oplossing of een suspensie? Verklaar uw antwoord. (4 punt)

Oplossing of suspensie (kruis het juiste antwoord aan)		
Voorschrift 2	<input checked="" type="radio"/> oplossing	<input type="radio"/> suspensie
Verklaring: Probenecide is goed oplosbaar in alcohol. Deze drank bevat veel "alcoholen" (glycerol en propyleenglycol)		

- d. Aan welke van de twee voorschriften geeft u de voorkeur? Geef duidelijk de reden(en) aan waarom u de voorkeur geeft aan dat voorschrift. (4 punt)

Nadeel I: hydrolyse van probenecide en MOB, en een zeepachtige smaak
 Nadeel II: Veel alcoholen: niet zo geschikt voor kinderen. Sorbitol: kans op laxering

- e. Waarom wordt er in het eerste voorschrift wel en in het tweede voorschrift geen aqua **purificata** toegevoegd? Verklaar uw antwoord. (3 punt)

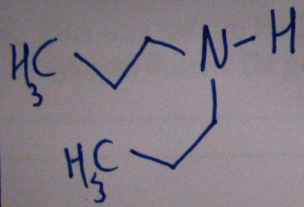
.Het is in "II" niet nodig. In "I" wel: kans op neerslag van b.v. magnesium of calciumfosfaat.....

f. Verwacht u dat probenecide ontledingsgevoelig is? Zo ja, teken de stuctuurformules van de mogelijke ontledingsproducten. (3 punt)

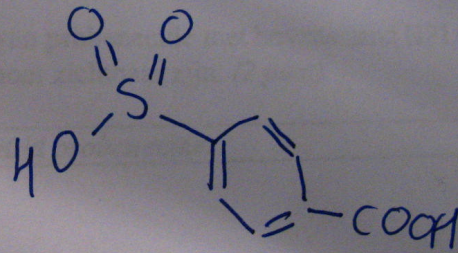
Ontledingsgevoelig?

Ja

Nee



+



Vraag 3

Het gehalte probenecide in de vloeibare toedieningsvormen (zie vraag 2) wordt bepaald met behulp van HPLC gebruikmakend van een C18-kolom (Select-B) en een mobiele fase van 40% methanol in water waaraan 10 mM perchloorzuur is toegevoegd. De flow bedraagt 0,5 ml/min en de dode tijd van de kolom is 2,5 min. De capaciteitsfactor k' van probenecide in dit systeem is 3,6.

- a. Hoe lang zal een HPLC-analyse van probenecide met bovenstaand HPLC-systeem duren? De *gehele* piek moet zichtbaar zijn. (2 punt)

Analysetijd probenecide:

$t_R = t_0 (k' + 1) = 2,5 (3,6 + 1) = 11,5$ min. Dus de hele analyse duurt 13 -14 min.

- b. Je wil de HPLC-analyse versnellen door de retentietijd van probenecide te verlagen. Je overweegt daartoe een aantal mogelijkheden (zie onder). Geef van elke mogelijkheid aan of die wel of niet leidt tot het gewenste resultaat en waarom. (3 punt)

Retentietijd van probenecide verkorten door:

- de loop (injectievolumen) te vergroten

Geen effect op retentietijd.

- de flow te vergroten

Retentietijd wordt korter.

- het percentage methanol te verlagen

Retentietijd wordt korter.

- een kortere kolom te nemen

Retentietijd wordt korter.

- een andere detectiegolflengte in te stellen

Geen effect op retentietijd.

- c. De mobiele fase bevat perchloorzuur. Geef aan wat de rol van perchloorzuur is in HPLC-analyse van probenecide. (2 punt)

Uitleg rol perchloorzuur:

Perchloorzuur werkt in dit geval **niet** als ionpaarvormer, immers probenecide is een zuur (dus niet positief geladen). Door perchloorzuur wordt de pH van de mobiele fase verlaagd, waardoor probenecide ongeladen is, wat goed is om retentie op de reversed-phase kolom te krijgen.

- d. Welke van de twee probenecide-dranken (zie vraag 2) kunnen ook met UV-absorptie spectrometrie worden geanalyseerd? (2 punt)

Gehaltesbepaling met UV mogelijk?

- Alleen de drank volgens voorschrift I
- Alleen de drank volgens voorschrift II X
- Beide dranken kunnen met UV-absorptie spectrometrie geanalyseerd worden
- Beide dranken moeten met HPLC geanalyseerd worden

Motivatie / toelichting

I bevat MOB en dat absorbeert ook UV. II bevat naast probenecide geen UV-absorberende stoffen.

Het gehalte probenecide in de toedieningsvorm die bereid is volgens voorschrift II (zie vraag 2) wordt gecontroleerd. De drank bevat volgens het etiket 2,5 g probenecide per 100 ml. Om de dichtheid te bepalen is een maatkolf van 25,00 ml gevuld met de drank. De inhoud weegt 26,150 g.

Voor de standaarden wordt ongeveer 100 mg afgewogen, dit wordt opgelost in 50,0 ml oplosmiddel en vervolgens 20 keer verdund. Van de drank wordt in duplo ongeveer 8 g in een maatkolf van 100,0 ml overgebracht, aangevuld tot de streep en vervolgens 20 keer verdund. Elke oplossing wordt geanalyseerd met HPLC en de oppervlakte van de probenecide-piek wordt bepaald (zie schema).

		<i>Piekoppervlakte</i>
Standaard 1	103,9 mg in 50,0 ml, daarna 20x verdund	135.795
Standaard 2	98,7 mg in 50,0 ml, daarna 20x verdund	127.286
Monster 1	8,496 g in 100,0 ml, daarna 20x verdund	129.971
Monster 2	7,032 g in 100,0 ml, daarna 20x verdund	120.505

- e. Bereken aan de hand van de verkregen HPLC-resultaten het gehalte probenecide in de drank. Besteed hierbij aandacht aan de betrouwbaarheid van de gebruikte standaarden. (4 punt)

Berekening gehalte

Spreiding standaarden: 1,34%

Gehalte monster 1: 23,6 mg/g drank

Gehaltemonster 2: 26,4 mg/g drank

Gemiddeld gehalte: 25,0 mg/g drank = 26,2 mg/ml drank



- f. Een student heeft de drank per ongeluk in een maatkolf van 250 ml i.p.v. een maatkolf van 100 ml overgebracht. Hij noteert de wijziging in zijn labjournaal en werkt gewoon verder. Voor de gehaltebepaling maakt hij gebruik van standaardoplossingen die door zijn groepsgenoot volgens voorschrift (zie boven) bereid zijn. Bij de gehalteberekening houdt hij rekening met het afwijkende volume van de maatkolf.

Is deze gehaltebepaling net zo betrouwbaar? Besteed aandacht aan de gevolgen van het gebruik van de afwijkende maatkolf en de reguliere standaarden (2 punt)

Gehaltebepaling betrouwbaar?

- Als de student rekening houdt met de verkregen verdunning is dat op zich geen probleem. Met HPLC kan net zo betrouwbaar een iets lagere of hogere concentratie worden gemeten

- Echter de gebruikte standaard wijken nu (te) sterk af van de te meten concentratie, en dit leidt wel tot onnauwkeurigheid.

Vraag 4

Het Formularium der Apothekers uit Pays Yicht beschrijft twee oude voorschriften voor probenecidecapsules:

Voorschrift I (bevat per capsule)	
Probenecide	100 mg
1,2 diaminoethaan	20mg
Lactose c.a.	105mg
Capsule maat2	

Voorschrift II (bevat per capsule)	
Probenecide	100mg
Cellulosum microcrystallinum	c.a. 125mg
Silica colloidalis	2mg
Capsule maat 2	

- a. Geef een waarschijnlijke reden voor het ontbreken van silica colloidalis in voorschrift 1. (3 punt)

Het bevat 1,2diaminoethaan: het probenecide is waarschijnlijk als zout aanwezig. Het hydrofielere zout heeft waarschijnlijk ook betere stromingseigenschappen.

- b. De farmaceutische beschikbaarheid van o.a. voorschrift II blijkt erg laag te zijn. Noem drie mogelijke redenen voor de lage beschikbaarheid van voorschrift II. Noem ook twee mogelijke aanpassingen in het voorschrift om dit probleem te voorkomen. (3 punt)

<i>Oorzaak lage beschikbaarheid</i>	<i>Op te lossen door</i>
1 Lage oplosbaarheid	En zout van probenecide nemen
2 Adsorptie aan cellulose	Lactose nemen
3 Adsorptie aan silica	Silica weglaten: ander glijmiddel of andere mengmethode

- c. Geef uw kritisch commentaar op het gebruik van lactose in voorschrift 1. (3 punt)

Uw commentaar:..."I" bevat een primairamine Eventueel is dan een

reactie met lactose mogelijk.

Vraag 5

Vraag 5b wordt ook afzonderlijk beoordeeld voor het portfolio (rekenvaardigheid). Laat duidelijk de logische gang van de berekening zien. Let ook op de significante cijfers.

De gehaltespreiding in de capsules bereid volgens voorschrift II (100 mg probenecide per capsule; zie vraag 4) wordt bepaald met behulp van UV-absorptie spectrometrie gebruikmakend van cuvetten met een weglengte van 1,00 cm. Er worden oplossingen bereid volgend onderstaand schema. De extinctie wordt gemeten bij 248 nm.

	Gewicht (mg)	Volume (ml)	Verdunning (ml)	Extinctie	Gehalte (mg)
Standaard 1	48,4	in 250,0	5,00→100,0	0,328	
Standaard 2	50,5	in 250,0	5,00→100,0	0,339	
Capsule 1		in 100,0	5,00→500,0	0,318
Capsule 2		in 100,0	5,00→500,0	0,341
Capsule 3		in 100,0	5,00→500,0	0,331
Capsule 4		in 100,0	5,00→500,0	0,309
Capsule 5		in 100,0	5,00→500,0	0,315
Capsule 6		in 100,0	5,00→500,0	0,323

- a. Als oplosmiddel voor de UV-analyse van de capsules wordt ethanol, aceton of chloroform overwogen. Geef aan welk oplosmiddel de voorkeur geniet en waarom. Geef tevens aan of, en zo ja welke, voorbehandeling nodig is voor het correct meten van de oplossingen? Motiveer. (3 punt)

Oplosmiddel en voorbehandeling?:

Chloroform en aceton absorberen UV in het te meten gebied en zijn dus niet geschikt. Ethanol is UV-transparant en probenecide lost voldoende op in ethanol. Microkristallijne cellulose en colloïdale silicium lossen niet op in ethanol en kunnen de UV-meting storen. Verwijderen door centrifugatie en/of filtratie.

- b. Bereken de hoeveelheid probenecide in elk van de 6 capsules. Geef voor één capsule de volledige berekening, en vul vervolgens in het schema de berekende gehalten voor elke capsule in. (5 punt)

<i>Berekening gehalte probenecide:</i>
<p>1. 93,8 mg 2. 100,5 mg 3. 97,6 mg 4. 91,2 mg 5. 92,9 mg 6. 95,2 mg</p>

- c. Laat zien of de probenecide-capsules voldoen aan de door het LNA gestelde eis ten aanzien van de gehalten spreiding (RSD maximaal 5,1% voor 6 eenheden geanalyseerd)? (2 punt)

<i>Voldoen capsules aan eis gehalten spreiding?</i>
<p>$RSD = 100 * (SD / \text{gemiddelde}) = 100 * (3,38 / 95,2) = 3,55\%$. Voldoet.</p>

- d. Leg uit waarom en wanneer het van belang kan zijn om de gehalten spreiding van capsules te controleren. (2 punt)

<p>Bij slechte menging kan de gewichtsspreiding in orde zijn, terwijl de gehalten spreiding te groot is. Dit is vooral van belang bij lage doseringen en doseringen met een smal therapeutisch venster.</p>

- e. Leg uit waarom voor het bepalen van het gemiddelde gehalte van de capsules het beter is om een mengmonster te maken van een aantal capsules en dat te analyseren, in plaats van het gemiddelde te nemen van de gehalten van de 6 afzonderlijke capsules. (2 punt)

Doordat het totaal aantal analytische handelingen bij een mengmonster veel kleiner is dan bij het meten van afzonderlijke capsules, is de analysefout veel kleiner en daarom het gemeten gemiddeld gehalte betrouwbaarder.

b. Welke serie zal de snelste afgifte hebben? Leg duidelijk uit waarom. (4 punt)

Snelste afgifte is:

Serie I Serie II Serie III Onbekend

Verklaring: Probenecide is moeilijk wateroplosbaar. Waarschijnlijk is probenecide beter oplosbaar in “vet”(goed oplosbaar in chloroform, kan een indicatie zijn) Komt dan moeilijk vrij uit een vette basis (diffusie door de basis is traag) Een macrogolzetpil lost zelf op....indien de probenecide is opgelost in de macrogol (dit is aannemelijk) zal de afgifte sneller zijn.

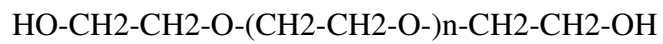
c. Het voorschrift van serie II wil men wijzigen zodat de afgiftesnelheid van probenecide uit de zetpillen wordt verhoogd. U moet twee voorstellen doen m.b.t deze verhoogde afgifte. Wat zijn uw voorstellen? (4 punt)

Eerste voorstel:...Grotere zetpil (meer grensvlak beschikbaar voor bevochtiging) en kleinere deeltjesgrootte kiezen.
Tweede voorstel:Een zout nemen van probenecide (echter dan niet in combinatie met een kleinere deeltjesgrootte

d. Serie III bevat PEG. Wat is een nadeel van macrogolzetpillen m.b.t. het bewaren in een vochtige omgeving? Hoe kan men dit gedeeltelijk voorkomen? (2 punt)

Nadeel van PEG-Zetpillen: Trekt water aan, hygroscopisch.....
.....
.....Dit kan men voorkomen door:De zetpillen af te plakken
.....
.....

e. PEG is een PolyEthyleenGlycol. Teken de structuurformule van PEG (3 punt)



f. Bovenstaande zetpillen (het tweede voorschrift) worden bereid. De probenecide wordt o.a. gesuspendeerd in de witepsol. Na het uitgieten en tijdens het stollen in de zetpilvorm treedt er sedimentatie op van de probenecide in de zetpilmasa. Noem de wet die het sedimentatieproces van probenecide in de zetpilmasa beschrijft. Geef duidelijk de betekenis van de in deze wet genoemde parameters. (3pt) Zie Martin, colleges

Vraag 7

Het gehalte probenecide in de zepillen wordt bepaald met behulp van UV-absorptie spectrometrie. Voor de zepillen bereid volgend voorschrift I (zie vraag 6) kan voor de monstervoorbewerking gekozen worden voor een tweefasenextractie of het direct oplossen van de zepil.

- a.** Bedenk voor beide methoden een geschikt(e) oplosmiddel(-combinatie) (4 punt)

<i>Keuze oplosmiddel voor oplossen:</i>
--

<i>Argumentatie:</i>

Chloroform lost zowel probenecide als Witepsol goed op. Let wel op de golflengte hoger dan de cut-off van chloroform (240 nm) te kiezen.
--

<i>Keuze oplosmiddelen extractie:</i>
--

<i>Argumentatie:</i>

Waterige fase: waterige ethanol met voldoende hoge pH (alkalisch) Organische fase: petroleum-ether

- b.** Is bij de extractie de pH van belang en zo ja, welke pH zou je wensen te gebruiken? (2 punt)

pH:

<i>Argumentatie:</i>

Ja. Kies pH van de waterfase > 5,4. Dan is probenecide geladen en zal in de waterfase blijven, terwijl Witepsol naar de organische fase gaat.
