

Schriftelijk tentamen Bereiding en Analyse (FA-202)
30 oktober 2009, 14:00-17:00 uur

| | |
|---|---------------|
| Naam student: MET ANTWOORDEN ANALYSE | |
| Studentnummer: | Handtekening: |
| NIET MEENEMEN | |

LEES DIT EERST

*Vermeld duidelijk je naam en studentnummer in het bovenstaande kader.
Controleer of het tentamen compleet is (7 vragen op 19 vellen).
Maak de vellen niet los!*

*Kruis bij de meerkeuzevragen het juiste antwoord aan.
Schrijf je de antwoorden en toelichtingen binnen de antwoordkaders.*

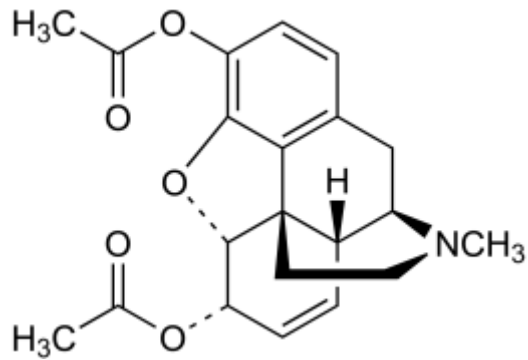
*Geef duidelijk en bondig antwoord op de gestelde vragen.
Formuleer precies en beargumenteer je antwoord altijd.
Bij de beoordeling wordt gelet op de juistheid en volledigheid van het antwoord.
Overbodige, niet ter zake doende informatie wordt negatief beoordeeld.*

*Voor dit tentamen kunnen in totaal 100 punten worden behaald.
De punten staan per vraag vermeld.*

*De uitslag van het tentamen wordt bekend gemaakt via studiezaken.
Inkijken van het tentamen is alleen mogelijk na het maken van een afspraak.*

Verkregen punten (in te vullen door docenten)

| Vraag1 | Vraag 2 | Vraag 3 | Vraag 4 | Vraag 5 | Vraag 6 | Vraag 7 |
|-------------------|--------------------------|---------|--------------------|---------|---------|---------|
| Analyse totaal | Recepteerkunde totaal | | Tentamen totaal | | | |



DIAMORFINE

Gegevens diamorfine

| | |
|----------------|---|
| Brutoformule | C ₂₁ H ₂₃ NO ₅ |
| Molecuulmassa: | 369.4 g/mol |
| UV-absorptie: | λ_{\max} (in waterig zuur) = 279 nm; E^1_1 (279 nm) = 46 |
| Oplosbaarheid: | <ul style="list-style-type: none"> - 1 op 1700 in water - 1 op 31 in ethanol - 1 op 1.5 in chloroform - 1 op 100 in ether |

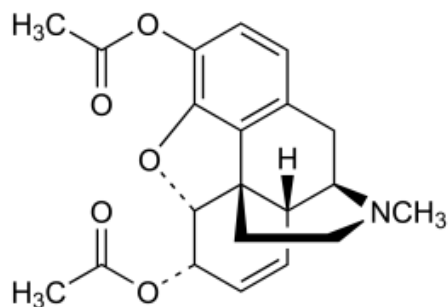
Van het farmacon diamorfine moet een oraal vaste, een oraal vloeibare en een rectale toedieningsvorm worden bereid. Tevens moeten de bijbehorende controles worden uitgevoerd. Beantwoord over de eigenschappen van de stof diamorfine, de bereidingen en de uitgevoerde controles de volgende vragen.

Vraag 1

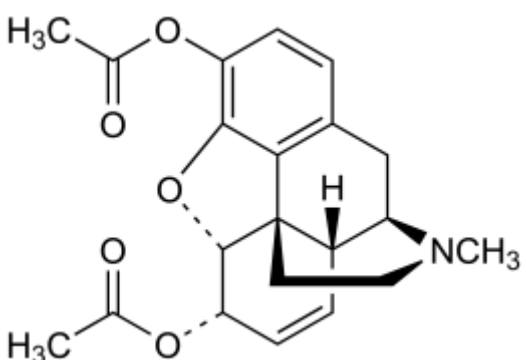
- a. Diamorfine is voornamelijk verkrijgbaar in de éénwaardige zoutvorm (HCl-zout) die aanzienlijk beter oplost in water. Geef aan in de structuur waar het proton wordt opgenomen. Schat de pKa van deze groep. (2 punt)

zoutvorm en pKa

Op tertiaire amine groep; pKa = 7.6 (tussen 7 en 10).



- b. Diamorfine vertoont UV absorptie met een λ_{\max} (in waterig zuur) = 279 nm. Geef in de structuur hieronder nauwkeurig de chromofore groep(en) aan die de absorptie bij 279 nm verklaren. (2 punt)

| <i>chromofore groep(en)</i> |
|---|
|  |
| <p>Motivatie / toelichting Benzeenring+ester+ether vormen geconjugeerd systeem.</p> |

- c. Om de zuiverheid van diamorfine te testen wordt er dunnelaagchromatografie (DLC) uitgevoerd. Als stationaire fase gebruikt men silica, als mobiele fase een mengsel van methanol-hexaan (20:80, v/v). De R_f waarde van diamorfine is in dit geval 0,72. Vaak voorkomende verontreinigingen in diamorphine zijn 6-O-acetylmorfine en morfine. Deze hebben R_f waarden van achtereenvolgens 0,67 en 0,62. Zijn deze verontreinigingen meer of minder polair dan diamorfine? Verklaar je antwoord aan de hand van het scheidingsmechanisme. (3 punt)

| <i>polariteit verontreinigingen</i> |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ○ De verontreinigingen zijn minder polair dan diamorfine ○ De verontreinigingen zijn meer polair dan diamorfine. |
| <p>Motivatie / toelichting Verontreinigingen zijn polairder. Stationaire fase is polair en mobiele fase apolair, dus als ze lagere R_f hebben, spenderen ze meer tijd in de stationaire fase en zijn ze dus polairder.</p> |

- d. De R_f waarde van morfine zit aan de bovengrens van het toelaatbare voor een goede test. Hoe moet de samenstelling van het loopmiddel worden veranderd om de R_f waarde van diamorfine te verlagen? Meer of minder methanol? Verklaar je antwoord. (2 punt)

| <i>R_f verlagen door</i> |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"><input type="radio"/> percentage methanol verhogen<input type="radio"/> percentage methanol verlagen |
| <p>Motivatie / toelichting</p> <p>Minder methanol. Morfine vertoont retentie op grond van polaire interacties met de stationaire fase (silica). Door het methanol-gehalte in de mobiele fase te verlagen wordt de mobiele fase minder polair en dus minder 'gunstig' voor de morfine (het kan minder polaire interacties met de mobiele fase aangaan). Gevolg is dat de morfine zich minder in de mobiele fase zal bevinden, langzamer en minder ver over de DLC plaat loopt, en dus een kleinere R_f-waarde krijgt.</p> |

- e. Voor het bevestigen van de identiteit van diamorfine wordt een infraroodspectrum opgenomen. Het spectrum vertoont absorptiebanden van zowel de C-O als de C=O rekvibratie. Beredeneer welke van deze twee vibraties de grootste frekwentie (in cm^{-1}) heeft. (2 punt)

| <i>Rekvibratie met grootste frekwentie (in cm^{-1})?</i> |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"><input type="radio"/> Frekwentie C-O rekvibratie groter dan frekwentie C=O rekvibratie.<input type="radio"/> Frekwentie C=O rekvibratie groter dan frekwentie C-O rekvibratie.<input type="radio"/> Frekwentie C-O rekvibratie en frekwentie C=O rekvibratie zijn gelijk..<input type="radio"/> Welke frekwentie groter is hangt af van de stof. |

Motivatie / toelichting

Frekwentie C=O groter want sterkere binding dan C-O.

- f. Om het gehalte diamorfine te bepalen wordt er gebruik gemaakt van een niet-waterige potentiometrische titratie in ethanol. Hiertoe wordt 400 mg diamorfine opgelost in 50 mL ethanol en vervolgens wordt er 5,00 mL van een 0,01 M HCl oplossing toegevoegd. Door titratie met NaOH (0,1052 M) ontstaan twee waarneembare omslagpunten. Hoe komt dat? (2 punt)

waarom twee omslagpunten?

Eerst alles aanzuren zodat alle diamorfine geprotoneerd is. Dan titreer je eerst het overblijvende zuur (omslagpunt 1) en vervolgens de diamorfine (omslagpunt 2).

- g. Het gehalte wordt bepaald door het toegevoegde volume NaOH tussen de twee omslagpunten te meten. Het toegevoegde volume is 10,15 mL. Bereken het gehalte (in %) diamorfine (2 punt)

gehalte diamorfine

Verbruikt 10,15 mL NaOH. Dit komt overeen met $10,15 \text{ mL} \times 0,1052 \text{ mol/L} = 1,06788 \text{ mmol NaOH}$. Reactieverhouding is 1:1 dus ook 1,06788 mmol diamorfine aanwezig. Dit weegt $1,06788 \times 369,4 = 394,4 \text{ mg}$, dus gehalte is $394,4/400 \times 100\% = 98,6\%$.

Vraag 3

Het gehalte diamorfine in de vloeibare toedieningsvormen (zie vraag 2) wordt bepaald met behulp van HPLC gebruikmakend van een C-18 kolom (150 mm × 4.6 mm), een mobiele fase van acetonitril-fosfaatbuffer pH 3,0 (50:50, v/v) en een injectieloop van 20 µl. De flow bedraagt 1,5 ml/min en de retentietijd van diamorfine is 2,9 min. Er wordt gedetecteerd bij een golflengte van 279 nm.

- a. Wat is de capaciteitsfactor k' van diamorfine in bovenstaand HPLC-systeem indien de dode tijd 1,9 min bedraagt? (2 punt)

Berekening k' van diamorfine:

$$k' = (t_r - t_0) / t_0 = (2,9 - 1,9) / 1,9 = 0,53$$

- b. Je wilt de capaciteitsfactor van diamorfine verhogen. 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)

k' van diamorfine verhogen door:

- Percentage modifier (acetonitril) te verlagen
- Het injectievolumen te verlagen (5 µl loop)
- De flow te verlagen
- De pH van mobiele fase te verhogen tot pH 8
- Een langere kolom te nemen

Motivatie / toelichting

Percentage modifier (acetonitril) te verlagen

Leidt inderdaad tot verhoging van k' . Een verlaging van het percentage modifier resulteert in een sterker solvofoob effect en dus tot een verhoging van k' .

Het injectievolumen te verlagen (5 µl loop)

Leidt niet tot verhoging van k' . In principe heeft het injectievolumen geen effect op de verdeling van het analyt over de mobiele en stationaire fase.

De flow verlagen

Leidt niet tot verhoging van k' . Ook de flow heeft in principe geen effect op de verdeling van het analyt over de mobiele en stationaire fase.

De pH van mobiele fase te verhogen tot pH 8

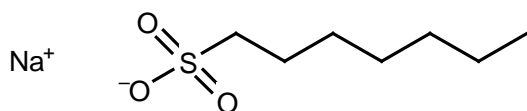
Leidt inderdaad tot verhoging van k' . De pK_a van diamorfine is ca. 8, dus bij pH 8 zal diamorfine voor een gedeelte in de gedissocieerde (neutrale) vorm voorkomen en dus meer retentie ondervinden.

Sommige C-18 kolommen zijn niet stabiel in alkalisch milieu waardoor het verhogen van de pH van de mobiele fase tot pH 8 geen optie is. Ook dit antwoord wordt goed gerekend.

Een langere kolom te nemen

Leidt niet tot verhoging van k' . De kolomlengte heeft in principe geen effect op de verdeling van het analyt over de mobiele en stationaire fase.

- c. Stel je voegt natrium heptaansulfonaat (zie onder) toe aan de mobiele fase. Zou hierdoor de retentietijd van diamorfine veranderen? Besteed in je antwoord aandacht aan het retentiemechanisme. (2 punt)



natrium heptaansulfonaat ($pK_a = 2,0$)

Retentietijd verandert?

- De retentietijd van diamorfine wordt groter.
- De retentietijd van diamorfine wordt kleiner.
- De retentietijd van diamorfine blijft gelijk.

Motivatie / toelichting

De retentietijd van diamorfine wordt groter. Natrium heptaansulfonaat is bij de pH van het loopmiddel (pH 3,0) grotendeels negatief geladen en vormt daardoor een ionpaar met de positief geladen diamorfine. Dankzij de afscherming van de positieve lading van diamorfine en de apolaire staart van heptaansulfonaat ondervindt het ionpaar een grotere retentie.

- d. Kan de gehaltebepaling van de diamorfine-drink die is bereid volgens voorschrift II (zie vraag 2) ook met UV-absorptiespectrometrie worden uitgevoerd? (2 punt)

Gehaltebepaling met UV mogelijk?

- Ja
- Nee

Motivatie / toelichting

Voorschrift II bevat het conserveermiddel MOB dat UV absorptie vertoont over het gebied 200-300 nm. In principe is een gehaltebepaling met UV daarom niet mogelijk, tenzij i) er bij twee verschillende golflengtes gemeten wordt of ii) MOB bij de monstervoorbewerking verwijderd kan worden.

Het gehalte diamorfine in de toedieningsvorm die bereid is volgens voorschrift II (zie vraag 2) wordt gecontroleerd. Hiertoe worden standaard- en monsteroplossingen gemaakt volgens het onderstaande schema. Als eerste oplosmiddel wordt ethanol gebruikt en daarna wordt doorverdund in mobiele fase. Voor de monsteroplossingen wordt een exacte hoeveelheid suspensie afgewogen en eventuele storende componenten worden verwijderd. Elke verdunning wordt geanalyseerd met HPLC en de oppervlakte van de diamorfine piek bepaald (zie schema). De dichtheid van de diamorfine drank is 1,201 g/ml.

| | afgewogen | opglost in | verdunning | piekoppervlakte |
|-------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------------|
| Standaard 1 | 106,5 mg | 100,0 ml | 50x | 84409 |
| Standaard 2 | 98,0 mg | 100,0 ml | 50x | 80001 |
| Monster 1 | 5,028 g | 50,0 ml | 10x | 79145 |
| Monster 2 | 5,476 g | 50,0 ml | 10x | 90779 |

- e. Bereken aan de hand van bovenstaande gegevens het gehalte diamorfine (in mg/ml) in de drank. Besteed hierbij aandacht aan de betrouwbaarheid van de gebruikte standaarden. (5 punt)

Berekening gehalte

Standaarden

$$[\text{standaard 1}] = (106,5 \text{ mg}/100 \text{ ml})/50 = 2,13 \cdot 10^{-2} \text{ mg/ml}$$

$$[\text{standaard 2}] = (98,0 \text{ mg}/100 \text{ ml})/50 = 1,96 \cdot 10^{-2} \text{ mg/ml}$$

Piekoppervlak per mg/ml:

$$\text{Standaard 1: } 84409/2,13 \cdot 10^{-2} = 3.962.864$$

$$\text{Standaard 2: } 80001/1,96 \cdot 10^{-2} = 4.081.684$$

$$\% \text{ verschil} = (4.081.684 - 3.962.864)/((3.962.864 + 4.081.684)/2) \cdot 100 = 2,95\%$$

Verskil is kleiner dan 3% dus de standaarden worden goedgekeurd.

Het gemiddelde piekoppervlak per mg/ml diamorfine is

$$(3.962.864 + 4.081.684)/2 = 4.022.274$$

Monster

$$C_{\text{inj}} \text{ M1} = 79145/4.022.274 = 0,019677 \text{ mg/ml}$$

De afgewogen hoeveelheid suspensie bevatte $0,019677 \cdot 10 \cdot 50 = 9,8384$ mg diamorfine.

$$\text{Het gehalte in de suspensie is } 9,8384 \text{ mg}/5,028 \text{ g} \cdot 1,201 \text{ g/ml} = \mathbf{2,350 \text{ mg/ml}}$$

$$C_{\text{inj}} \text{ M2} = 90779/4.022.274 = 0,02257 \text{ mg/ml}$$

Het gehalte in de suspensie is $0,02257 \cdot 500 / 5,476 \cdot 1,201 = \mathbf{2,47 \text{ mg/ml}}$

Gemiddeld gehalte = $(2,350 + 2,47) / 2 = 2,41 \text{ mg/ml}$

Vraag 5

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

Het gehalte diamorfine in zes capsules bereid volgens voorschrift II (7,5 mg diamorfine 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 standaard- en capsuleoplossingen bereid in ethanol die vervolgens worden verdund. Van de verdunningen wordt de extinctie gemeten bij 299 nm (zie onderstaand schema).

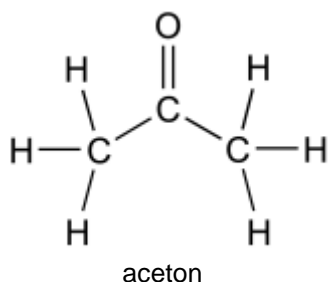
| | <i>Gewicht (mg)</i> | <i>Volume (ml)</i> | <i>Verdunning (ml)</i> | <i>Extinctie</i> | <i>Gehalte (mg)</i> |
|-------------|-------------------------|------------------------|----------------------------|------------------|-------------------------|
| Standaard 1 | 75,2 | 100,0 | 5,00→100,0 | 0,512 | |
| Standaard 2 | 74,2 | 100,0 | 5,00→100,0 | 0,502 | |
| Capsule 1 | | 50,0 | 25,00→100,0 | 0,519 | |
| Capsule 2 | | 50,0 | 25,00→100,0 | 0,521 | |
| Capsule 3 | | 50,0 | 25,00→100,0 | 0,514 | |
| Capsule 4 | | 50,0 | 25,00→100,0 | 0,523 | |
| Capsule 5 | | 50,0 | 25,00→100,0 | 0,508 | |
| Capsule 6 | | 50,0 | 25,00→100,0 | 0,501 | |

- a. Geef aan waarom en hoe de cellulose microcrystallinum in de diamorfine-capsules vòòr de UV-analyse verwijderd moet worden. (2 punt)

Waarom en hoe cellulose microcrystallinum verwijderen?

Voor een betrouwbare UV meting is een heldere oplossing nodig. Microkristallijne cellulose lost niet op en moet daarom verwijderd worden, bijv. door centrifugeren of filtratie. Let wel: cellulose vertoont geen UV-absorptie.

- b. Stel dat de diamorfine-capsules na bereiding nog aceton zouden bevatten, zou een betrouwbare UV-analyse van de diamorfine dan mogelijk zijn? Leg uit. (2 punt)



invloed aceton?

Aceton zou in de te meten diamorfineoplossingen komen. Aceton vertoont UV-absorptie (door de C=O-groep) en zou dus de absorptie van diamorfine bij 299 nm kunnen verstoren, en dus de meting onbetrouwbaar maken.

- c. Bereken de hoeveelheid diamorfine 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)

Berekening gehalte diamorfine:

$$\begin{aligned} \text{Conc. St1} &= 3,76 \times 10^{-2} \text{ mg/ml} & \text{Ext} &= 0,512 \\ \text{Conc. St1} &= 3,75 \times 10^{-2} \text{ mg/ml} & \text{Ext} &= 0,511 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Conc. St2} &= 3,71 \times 10^{-2} \text{ mg/ml} & \text{Ext} &= 0,502 \\ \text{Conc. St2} &= 3,75 \times 10^{-2} \text{ mg/ml} & \text{Ext} &= 0,507 \end{aligned}$$

$$\text{gem. Ext} = (0,511 + 0,507) / 2 = 0,509 \text{ voor } 3,75 \times 10^{-2} \text{ mg/ml}$$

$$\begin{aligned} \text{Conc. verdunning C1} &= 0,519 * (3,75 \times 10^{-2} / 0,509) = 3,824 \times 10^{-2} \text{ mg/ml} \\ \text{gehalte C1} &= 3,824 \times 10^{-2} \times 4 \times 50 = 7,65 \text{ mg} \end{aligned}$$

- d. Om na te gaan of de capsules voldoen aan de eis voor het gehalte van een werkzame stof in een farmaceutisch preparaat (zoals gesteld in uit het besluit geneesmiddelwet), wordt van 3 mengmonsters het gehalte bepaald. Uit deze metingen wordt het gemiddelde gehalte en de RSD van de analysemethode bepaald:
- | | |
|--|---------|
| gemiddeld gehalte: | 6,98 mg |
| RSD analysemethode: | 1,7% |
| t-waarde (uit t-tabel: n=3, 95%, eenzijdig): | 2,92 |

Stel vrijgiftgrenzen op voor de capsules en laat zien of de capsules voldoen aan de

gehalte-eis. (3 punt)

| <i>Voldoet aan eis gehalte?</i> |
|---|
| <p>vrijgiftegrenzen:</p> $OV = 90 + t (RSD/\sqrt{n}) = 90 + 2,92(1,7 / \sqrt{3}) = 92,9\%$ $BV = 110 - t (RSD/\sqrt{n}) = 110 - 2,92(1,7 / \sqrt{3}) = 107,1\%$ <p>het gemiddeld gehalte t.o.v. declaratie = $(6,98 / 7,50) * 100\% = 93,1\%$, dus voldoet, want binnen de vrijgiftegrenzen.</p> |

Vraag 7

Voor het bepalen van het gehalte van de vette zepillen (zie vraag 6) gebruikt men UV-absorptiespectrometrie na het uitvoeren van een water-hexaan extractie. Bij één van de series wordt echter een veel te laag gehalte gevonden.

a. Welke serie was dat, en wat is er mis gegaan met de analyse? (3 punt)

serie II, het farmacon lost onvoldoende op in water (evt. ook door hydrolyse).

b. Noem twee mogelijke oplossingen voor dit probleem. (3 punt)

optie 1: aanzuren (zoals dat bij serie I al vanzelf gebeurt door het wijnsteen zuur).

optie 2: de waterige fase minder polair maken, b.v. door ethanol toe te voegen.

Ook van de PEG-zepillen (voorschrift III) wil men het gehalte met UV-absorptiespectrometrie bepalen.

c. Beschrijf hiervoor een mogelijke voorbereidingsmethode. (3 punt)

het meest voor de hand ligt: oplossen, b.v. met aangezuurd water, in maatkolf en doorverdunnen tot juiste concentratie.