

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICAMENTOS (INAME)
FARMACOPEA ARGENTINA

AV. CASEROS 2161

1264 BUENOS AIRES
REPUBLICA ARGENTINA

FAX 5411-4340-0853

CLONAZEPAM

Sustancia de Referencia para Ensayos Físico-Químicos

(Control N° 113014)

5-(2-Clorofenil)-1,3-dihidro-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona

$C_{15}H_{10}ClN_3O_3$

P. Mol.: 315,7

Descripción: polvo blanco cristalino.

Espectro de absorción infrarrojo:

Sustancia tal cual.

Equipo: espectrofotómetro FT-IR Perkin Elmer, modelo Spectrum Two.

Disco de KBr.

Concentración: aproximadamente 1 mg en 100 mg de KBr.

(Ver espectro adjunto).

Pérdida por secado: 0,0 % (Determinaciones efectuadas: 6; desviación estándar: 0,03).

Temperatura: 105 °C.

Tiempo: 4 horas.

Espectro de absorción ultravioleta:

Precauciones: no exponer la sustancia ni sus soluciones a la luz.

Concentración de la solución: 0,002 %, P/V.

Preparación de la solución: se pesan exactamente alrededor de 25 mg de clonazepam, se transfieren a un matraz aforado de 25 ml y se disuelven con metanol. Se lleva a volumen y se agita hasta disolución total. Se transfiere una alícuota de 2,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml y se lleva a volumen con una mezcla de (agua - metanol - tetrahidrofurano (48:42:10)).

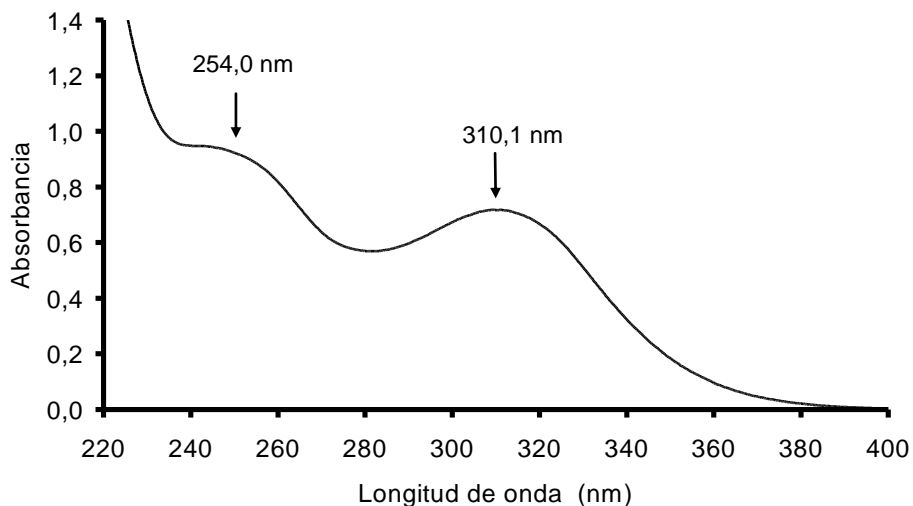
Blanco: metanol – (agua - metanol - tetrahidrofurano (48:42:10)) (2:98).

Cubetas de 1 cm de paso óptico.

Slit: 1.

Barrido U.V. entre 220 y 400 nm, efectuado con velocidad lenta.

Equipo: espectrofotómetro Shimadzu, modelo U.V. 2101 PC.



Absorbancia:

Cubetas, slit, equipo, concentración, preparación de la solución, blanco y precauciones ídem espectro de absorción ultravioleta.

λ : 254,0 nm

$A = 0,870$ (Determinaciones efectuadas: 6; desviación estándar: 0,006).

λ : 310,1 nm

$A = 0,697$ (Determinaciones efectuadas: 6; desviación estándar: 0,005).

Estimación de impurezas presentes por cromatografía líquida de alta eficacia:

Precauciones: no exponer la sustancia ni sus soluciones a la luz.

Equipo: cromatógrafo líquido de alta eficacia Shimadzu, modelo LC10A, con procesador de datos Lab Solutions.

Columna: Phenomenex Luna C8 (2); longitud: 25,0 cm; diámetro interno: 4,6 mm; diámetro de partícula: 5 μ m.

Longitud de onda: 254 nm.

Fase móvil: solución reguladora de pH 8,0 – metanol - tetrahidrofurano (48:42:10).

Preparación de la solución reguladora de pH 8,0: disolver 6,6 g de fosfato dibásico de amonio anhidro en aproximadamente 950 ml de agua bidestilada. Ajustar a pH 8,0 con ácido fosfórico 1 N, completar a 1 litro con agua bidestilada y mezclar.

Flujo: 1,0 ml/minuto.

Disolvente: agua - metanol - tetrahidrofurano (48:42:10).

Muestra: Clonazepam.

Concentración de la muestra: 0,25 mg/ml.

Preparación de la muestra: se pesan exactamente alrededor de 62,5 mg de clonazepam, se transfieren a un matraz aforado de 25 ml y se disuelven con metanol. Se lleva a volumen y se agita hasta disolución total. Se transfiere una alícuota de 1,0 ml de esta solución a un matraz de 10 ml y se lleva a volumen con el disolvente.

Testigos: - Impureza A, (2-amino-5-nitrofenil)-(2-clorofenil) metanona.

- Impureza B, 3-amino-4-(2-clorofenil)-6-nitroquinolín-2(1H)-ona.

Solución de referencia 1: solución diluida de Clonazepam

Concentración: 0,25 µg/ml en el disolvente, para estimación de toda impureza con excepción de la Impureza B.

Solución de referencia 2: solución diluida de Impureza B

Concentración: 0,5 µg/ml en el disolvente, para identificación y estimación de Impureza B.

Solución de impureza A + impureza B,

Concentración: ~ 1,5 µg/ml de Impureza A + 0,7 µg/ml de Impureza B en el disolvente, para identificación por tiempo de retención relativo.

Volumen inyectado de las soluciones de muestra y de referencia: 20 µl.

Resultado: se detecta la presencia de once impurezas.

	Tiempo de retención aproximado (minutos)	% de área respecto de las soluciones de referencia 1 y 2, según corresponda
Impureza desconocida	8,7	0,014
Impureza desconocida	9,3	0,029
Clonazepam	10,8	pico principal
Impureza desconocida	13,1	0,010
Impureza desconocida	14,6	0,005
Impureza desconocida	16,0	0,005
Impureza desconocida	17,6	0,012
Impureza desconocida	20,1	0,033
Imp B (identificada)	22,0	0,015
Impureza desconocida	22,9	0,004
Imp A (identificada)	25,0	0,004
Impureza desconocida	27,1	0,006

Impurezas totales estimadas: 0,14 %.

Análisis Térmico: la pureza estimada por Calorimetría Diferencial de Barrido, sobre sustancia tal cual, fue de 99,74 moles %. (Determinaciones efectuadas: 6; coeficiente de variación: 0,05 %).

Equipo: termoanalizador Mettler Toledo, modelo DSC 821^e.

Se emplearon crisoles de aluminio de 40 µl cerrados, con tapa perforada y con atmósfera de nitrógeno (caudal: 60 ml/min).

Temperatura inicial: 225 °C.

Velocidad de calentamiento: 3 °C/minuto.

Temperatura de fusión de los últimos cristales: 239,0 °C (Determinaciones efectuadas: 6; coeficiente de variación: 0,08 %).

Valoración: 100,1 %; calculado sobre la sustancia secada. (Determinaciones efectuadas: 8; coeficiente de variación: 0,17 %).

Método: Titulación potenciométrica en medio no acuoso con solución de ácido perclórico 0,05 N.

Disolvente de la muestra: 50 ml de anhídrido acético.

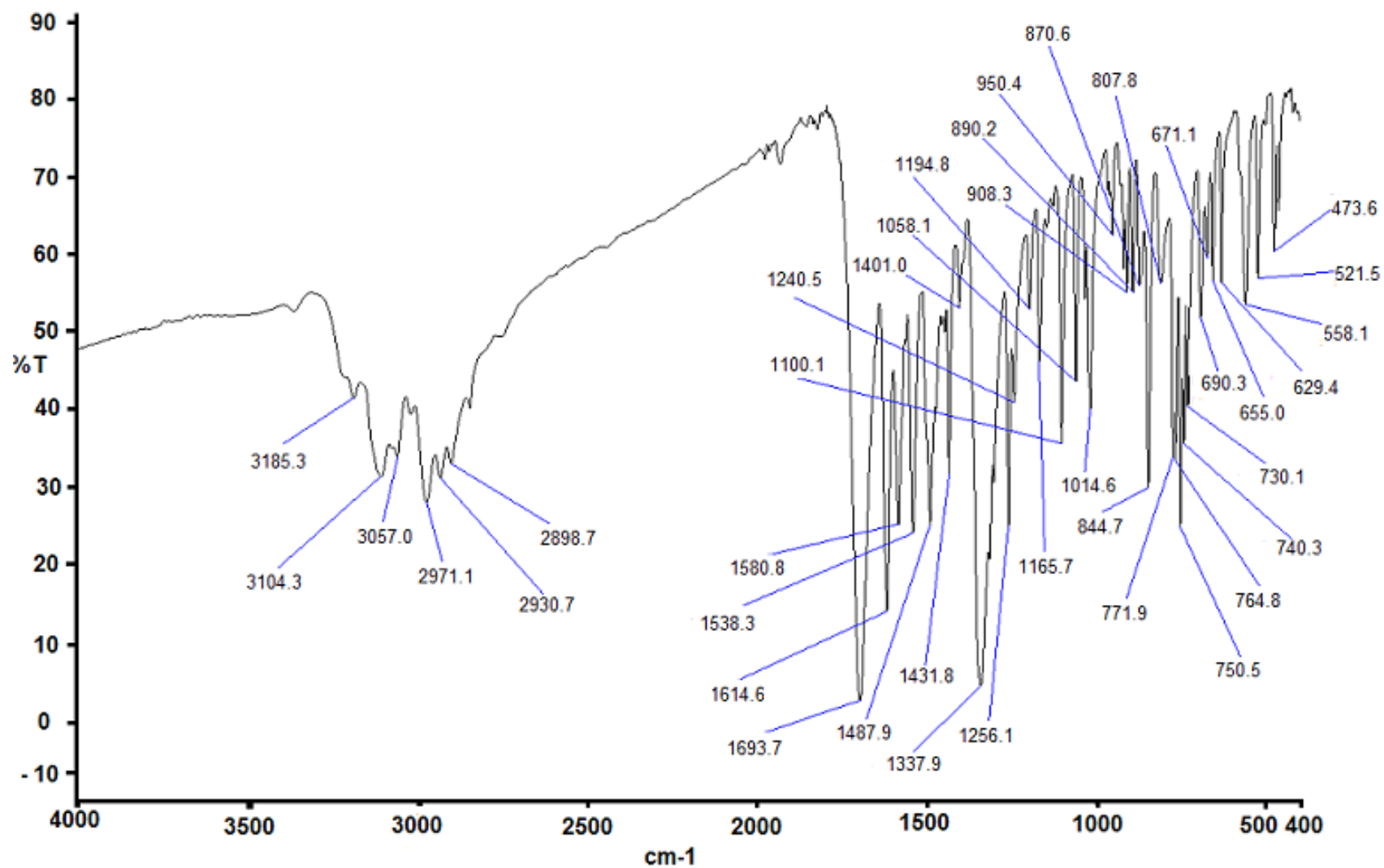
Equipo: titulador automático Metrohm, modelo Titrand 904.

Electrodo combinado: solvotrode, Metrohm 6.0229.100.

Efectuar correcciones por blancos tanto para la valoración de la solución titulante, como así también para la valoración de la sustancia.

Precauciones: durante todo el procedimiento, no exponer la sustancia ni sus soluciones a la luz.

Conservación: esta Sustancia de Referencia debe conservarse al abrigo de la luz, en envase herméticamente cerrado, a $6\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en ambiente de baja humedad.



Clonazepam – Sustancia de Referencia Farmacopea Argentina