

**FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE ALPRAZOLAM.
ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE LOS PRINCIPALES
PRODUCTOS DE DEGRADACION.**

**FACTORS AFFECTING THE STABILITY OF ALPRAZOLAM.
STRUCTURE ELUCIDATION OF THE MAJOR DEGRADANTS**

*Norma Nudelman, Cecilia Gallardo C.*¹

RESUMEN

Se ha investigado la influencia de varias condiciones ambientales (temperatura, pH, luz y oxígeno) en la estabilidad de Alprazolam, aplicando técnicas de cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía en capa delgada.

Se encontró que la luz es el principal factor de degradación del alprazolam. Los principales productos de fotodegradación han sido aislados e identificados por espectroscopía ¹H y ¹³C RMN y espectrometría de masa. Estos productos revelan que en la fotodegradación del alprazolam ocurren reacciones de oxidación, solvólisis y reordenamiento.

ABSTRACT

The influence of several environment conditions (temperature, pH, light and oxygen) on the stability of Alprazolam has been investigated, using high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography.

It was found that the light is the major degradation factor of alprazolam. The main photodegradants have been isolated and identified by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy and mass spectrometry. The products show that oxydation, solvolysis and rearrangement reactions are taken place in the degradation of alprazolam.

PALABRAS CLAVES Alprazolam, Benzodiazepinas, Estabilidad, Fotodegradación.

INTRODUCCIÓN

Las benzodiazepinas son medicamentos conocidos como tranquilizantes menores (ansiolíticos), cuya introducción a la práctica clínica facilitó el tratamiento de desórdenes del pánico, ansiedad, tensiones y depresión con un alto margen de seguridad por su baja toxicidad y por sus bajos efectos de dependencia física y alta tolerancia. El alprazolam aparece como una alternativa para mejorar las acciones ansiolíticas de las benzodiazepinas más tradicionales,

1. Depto de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
Fax: +541 4576 3346, E-mail: nudelman@qo.fcen.uba.ar

debido a su mayor afinidad con los receptores benzodiazepínicos (mayor efectividad) y a su rápido metabolismo y excreción (con un comienzo de acción más rápido y con efectos

sedantes leves).¹² Las indicaciones que tiene el alprazolam son muy frecuentes dado al ritmo de vida actual, caracterizándose como uno de los medicamentos de más alto consumo.¹³

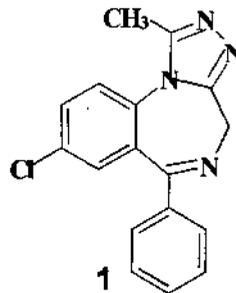


Figura 1.

Norme Nucleiman, Cecilia Gallardo C.

Químicamente en el alprazolam (8-cloro-1-metil-6-fenil-4*H*-s-triazo-[4,3- α] [1,4] benzodiazepina), 1, (véase figura 1) se ha introducido un anillo triazol en las posiciones 1-2 del anillo benzodiazepínico el cual induce algunos cambios en la propiedades clásicas de las benzodiazepinas tales como basicidad, estabilidad química, perfil farmacocinético y clínico. La mayoría de las benzodiazepinas son muy sensibles a la hidrólisis por la inestabilidad del anillo diazepinona.⁶ Recientemente, hemos aislado e identificado 4 nuevos productos de degradación por hidrólisis ácida^{7,8} y ha podido determinarse las distintas etapas de formación de los mismos.^{9,10}

En el caso del alprazolam, en cambio, existen muy escasos estudios de hidrólisis, encontrándose que la hidrólisis de la imina del anillo

benzodiazepínico es reversible.¹¹ Otras triazolobenzodiazepinas como el triazolam^{12,13,14} y adinazolam¹⁵ también muestran resistencia a las reacciones de hidrólisis. El alprazolam es la única benzodiazepina donde la etapa de anelación de la reacción de hidrólisis reversible es cuantitativa y relativamente rápida a pH fisiológico, esta propiedad podría ser usada en el desarrollo de prodrogas hidrosolubles para uso parenteral.¹⁶

Sin embargo no hay publicaciones sobre estudios de estabilidad de la molécula de alprazolam frente a otros factores ambientales, a excepción de un estudio del efecto de la temperatura sobre formulaciones líquidas no comerciales de alprazolam, donde no se encuentran cambios en la concentración después de 60 días de ensayo.¹⁷

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la estabilidad química intrínseca del alprazolam mediante ensayos en condiciones de estrés tales como temperatura, oxígeno, pH, y luz. Se presentan además los resultados del aislamiento y caracterización de los productos de fotodegradación mayoritariamente formados. Esta es la primera vez que se describe dichos productos en la literatura y los compuestos identificados sugieren rutas de degradación diferentes a las observadas comúnmente en benzodiazepinas y por consiguiente son interesantes para ser estudiadas desde un punto de vista químico.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Equipos: El monitoreo de las reacciones de degradación se realizó por HPLC, usando un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100 que consiste en una bomba Cuatremaria HP G1311A, detector UV HP 61315A, (220 nm), columna de fase reversa Lichrosorb RP-18, (5 μ m, 200 x 4.6 mm) a temperatura ambiente. Como fase móvil se usó una mezcla de buffer pH 3.5:acetonitrilo, 35:65, con un flujo de 1 mL/min. El buffer está compuesto por ácido fosfórico 5×10^{-2} M con trietilamina (TEA) 1.44×10^{-2} M, ajustado a pH 3.5 con NaOH. Las muestras se diluyeron en fase móvil para obtener una concentración final de 10^{-4} M y se inyectaron 20 μ l.

Los ensayos de TLC se desarrollaron usando folios de Silica Gel 60 F₂₅₄ Merck, como fase móvil: cloruro de

metileno:acetona, 30:70 y revelando con UV 254 nm.

Los espectros de masa por impacto electrónico IE-EM se registraron usando un espectrómetro de masa BG Trio-2 y los espectros de ¹H y ¹³C-RMN se registraron en un espectrómetro Bruker 200 usando cloroformo deuterado, CDCl₃ como solvente. El fotoreactor usado para estudios fotoquímicos consta de una lámpara de mercurio, Philips HPI-T, 400 w.

Degradación por hidrólisis: Se prepararon soluciones de alprazolam 3.00×10^{-3} M con HCl 0.1N y 6N en MeOH:H₂O, 1:1 y se refluxaron durante 3 horas. Después se evaporaron hasta sequedad a presión reducida.

Degradación por oxidación: Se preparó una solución de alprazolam 3.00×10^{-3} M en CH₂Cl₂ y CHCl₃ agregando H₂O₂ en exceso, se dejó este sistema bifásico agitando con y sin reflujo durante 5 días analizando frecuentemente el avance de la reacción con TLC. Luego la mezcla de reacción se lavó con suficiente agua destilada para eliminar el peróxido de hidrógeno, se secó con sulfato de magnesio y se filtró. Finalmente se llevó a sequedad aplicando vacío.

Degradación por fotólisis:

1.) La fotodescomposición en medios acuosos se estudió en muestras de alprazolam: 3×10^{-3} M en soluciones reguladoras de la siguiente composición: a) pH 1.8: KCl 0.05 M y HCl 0.02 M. b) pH 3.5: Ftalato ácido de

potasio 0.05 M y HCl 0.01 M. c) pH 10.0: ácido bórico 0.025 M, KCl 2×10^{-4} M y NaOH 0.04 M.

Las muestras arriba descritas se ubicaron en el fotoreactor a 5 cm de la lámpara de mercurio. La temperatura se mantuvo a $45 \pm 1^\circ \text{C}$. Idénticas muestras se irradiaron con luz natural por 5 meses durante el verano y en termostato a $80 \pm 1^\circ \text{C}$ al abrigo de la luz.

Las soluciones se irradiaron por 13 días y luego se extrajeron con una mezcla de diclorometano:isopropanol, 85:15. La separación de los productos de degradación se logró mediante el desarrollo de sucesivas TLC preparativas usando placas de sílica gel (Merck TLC Sílica 60 F₂₅₄), como primer eluyente EtOAc:MeOH:TEA, 70:30:4; y luego EtOAc:CH₂Cl₂:TEA, 70:30:4 ó EtOAc:MeOH:TEA, 70:30:4. Se revelaron con luz UV 254 nm, y finalmente se extrajeron de la sílica con metanol. La pureza se verificó por HPLC.

2.) La fotodescomposición en soluciones metanólicas se hizo irradiando una solución de 3.27×10^{-2} M de alprazolam en metanol; a una segunda solución se le adicionó peróxido de hidrógeno en exceso. Las soluciones se irradiaron hasta 54 y 9 días respectivamente.

Después estas soluciones se secaron agregando sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se removió el solvente por evaporación. El

aislamiento de los compuestos se logró por TLC, con EtOAc:MeOH:TEA, 95:5:4. Después del análisis por HPLC cada fracción se purificó nuevamente por TLC usando como eluyente isopropanol 100%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE DESCOMPOSICIÓN DEL ALPRAZOLAM.

Al iniciar los estudios de degradación de un principio activo es especialmente importante determinar los factores ambientales que afectan la estabilidad intrínseca de la molécula, esto se logra sometiendo experimentalmente la droga a la influencia severa de tales factores, para ello es necesario desarrollar condiciones experimentales que aceleren las reacciones de degradación, pero que sus resultados se puedan extrapolar a condiciones ambientales.

Encontrar las condiciones adecuadas es de esencial cuidado dado que pueden conducir a errores en las observaciones, por ejemplo se pueden modificar los mecanismos de degradación,^{18,19} éstas determinan en cierta forma el éxito de los estudios de estabilidad.

Teniendo esto en mente, el desarrollo de los estudios de estabilidad de alprazolam se inició analizando las muestras sometidas a las condiciones de estrés que muestra la Tabla 1. (véase Tabla 1)

Tabla 1. Condiciones de degradación estudiadas.

Reacción de degradación	Condición	Medio de reacción	Tiempo
Hidrólisis	HCl 6N, 0.1N reflujo	MeOH: H ₂ O 1:1	3 horas
Oxidación	H ₂ O ₂ reflujo	cloroformo	5 días
Fotólisis	Radiación artificial	Soluciones buffers pH: 1.8, 3.4, 10.0	13 días
	Radiación natural		5 meses
Temperatura	80 °C, oscuridad	Soluciones buffers	88 días

Inicialmente se trabajó bajo las condiciones en que se había estudiado previamente otras benzodiazepinas,⁹ esto es en condiciones de hidrólisis ácida; los resultados según análisis por HPLC indican la formación de un solo compuesto, un análisis posterior de una solución ácida recientemente preparada indica que ese producto se trata de una especie protonada del alprazolam.

Las reacciones de descomposición por oxidación con peróxido de hidrógeno en condiciones suaves se monitorearon por TLC observándose un mínimo porcentaje de degradación; se ensayó entonces en condiciones de oxidación más severas aplicando reflujo y usando un solvente que permita el aumento de temperatura, como se describe en la Tabla 1. Los resultados de esta reacción muestran que la descomposición del alprazolam continúa siendo lenta y siete productos

de degradación se formaron en concentraciones mínimas. Algunos resultados preliminares de estos ensayos han sido recientemente publicados.²⁰

Contrariamente a los resultados al abrigo de la luz, las muestras en solución sometidas a fotodescomposición con lámpara y con luz natural muestran un porcentaje de descomposición considerable (véase Tabla 2).

Tabla 2. Fotodescomposición en medio acuoso.

pH	% de alprazolam residual	
	Degradación artificial 13 días	Degradación natural 5 meses
1.8	55	45
3.5	74	63
10.0	100	100

Norma Nudelman, Cecilia Gallardo C.

El efecto concomitante de la temperatura se evaluó también en estas muestras. Los resultados por HPLC indican que las muestras termostatzadas al abrigo de la luz no sufren descomposición en el tiempo observado.

2. ELUCIDACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS DE PRODUCTOS FORMADOS DURANTE LA FOTODEGRADACION DE ALPRAZOLAM.

2.1 Fotoproductos en soluciones acuosas: Tres productos de degradación se aislaron de soluciones preparativas en buffer pH 1.8, de los cuales uno de ellos es mayoritario.

El aislamiento de cada uno de los productos formados resultó muy arduo debido al bajo porcentaje de

recuperación de los compuestos formados durante la extracción, y a la gran similitud de estructuras de los productos de degradación formados.

Un acercamiento a las estructuras de estos productos se hizo principalmente mediante los espectros de masa de impacto electrónico (IE-EM). Los espectros de ¹H RMN y ¹³C RMN solamente muestran señales aromáticas las que a efectos de elucidar las estructuras no ofrecen mucha ayuda.

A continuación se presenta las estructuras **2**, **3** y **4** (véase figura 2) que se proponen en base al ión molecular M⁺ y los fragmentos observados en los espectros de masa que se interpretan abajo. De estos tres compuestos el número **4** se encuentra en mayor proporción.

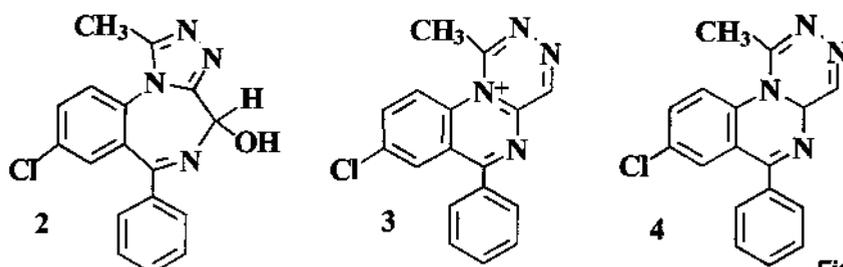


Figura 2.

Puede observarse en los EM de abajo de los tres compuestos el pattern característico de Cl:

$[M + 2]^+$, $[M + 2 - 1]^+$, $[M]^+$ y la pérdida de éste en algunos fragmentos de los compuestos 2 - 4. Otras pérdidas algunas lógicas como CHO, CN, CH_3CNNN , etc, conducen a la proposición de las estructuras 2 - 4 que son consistentes con sus espectros EM.

Compuesto 2. (t_r 3.2 min.) m/z [ion]: 326 $[M + 2]^+$, 325 $[M + 2 - 1]^+$, 324 $[M]^+$, 295 $[M - CHO]^+$, 289 $[M - Cl]^+$, 255 $[M - CH_3CNNN]^+$, 220 $[M - Cl - CH_3CNNN]^+$, 83 $[CH_3CNNNCH_2]^+$, 69 $[CH_3CNNN]^+$, 55 $[CH_3CNN]^+$.

Compuesto 3. (t_r 8.7 min.): m/z [ion] 309 $[M + 2]^+$, 308 $[M + 2 - 1]^+$, 307 $[M]^+$, 266 $[M - NNCH]^+$, 239 $[M - CH_3CNNCH]^+$, 231 $[M - CHNN - Cl]^+$, 205 $[M - CHNN - Cl - CN]^+$, 190 $[M - CH_3CHNN - Cl - CN]^+$, 137 $[C_6H_5NCH]^+$, 116 $[C_6H_5NCHN]^+$, 102 $[C_6H_4CN]^+$, 83 $[CH_3CNNNCH_2]^+$, 68 $[CH_3CNNCH]^+$, 55 $[CH_3CNN]^+$, 41 $[CHNN]^+$.

Compuesto 4. (t_r 2.7 min.) m/z [ion] 310 $[M + 2]^+$, 309 $[M + 1]^+$, 308 $[M]^+$, 307 $[M - 1]^+$, 266 $[M - NNCH_2]^+$, 239 $[M - CH_3CNNCH_2]^+$, 190 $[M - CH_2NN - C_6H_4]^+$, 151 $[C_6H_5NCHN]^+$, 137 $[C_6H_5NCH]^+$, 116 $[C_6H_5NCHN]^+$, 102 $[C_6H_4CN]^+$, 89 $[C_6H_5N]^+$, 83 $[CH_3CNNNCH_2]^+$, 77 $[C_6H_5]^+$, 69 $[CH_3CNNCH_2]^+$, 55 $[CH_3CNN]^+$, 42 $[NNCH_2]^+$.

El compuesto 2 muestra un pico molecular de 234 una que inmediatamente hace pensar en la introducción de un átomo de oxígeno en la molécula de alprazolam, lo cual se confirma con la presencia del ion m/z 295 que se interpreta como la expulsión de CHO del ion molecular.

De otra manera, el pico base es el ion $[CH_3CNNN]^+$ y sus los iones complementarios m/z 255 $[M - CH_3CNNN]^+$ y 220 $[M - Cl - CH_3CNNN]^+$, junto con otras fragmentaciones como la que da origen al ion m/z 83 $[CH_3CNNNCH_2]^+$ indican la presencia de tres átomos de nitrógeno cercanos, sugiriendo que este compuesto de degradación conserva el anillo triazólico.

El pico molecular de los compuestos **3** y **4** (307 y 308 uma, respectivamente), contrariamente a lo que se esperara para un producto de degradación, no difieren al pico molecular del alprazolam (308 uma); no obstante los espectros de masa, ^1H RMN y ^{13}C RMN de los compuestos **3** y **4** son completamente diferentes a los del alprazolam. Por otra parte, hay varios iones comunes en el EM de estos dos compuestos: el pico base m/z 55 $[\text{CH}_3\text{CNN}]^+$ y otros iones abundantes como m/z 41 $[\text{CHNN}]^+$, 42 $[\text{CH}_2\text{NN}]^+$, sus iones complementarios m/z 266, el ion m/z 68 $[\text{CH}_3\text{CNNCH}]^+$, $[\text{CH}_3\text{CNNCH}_2]^+$ con sus complementarios m/z 239; muestran que estas moléculas pierden fácilmente iones que contienen dos nitrógenos; en las estructuras propuestas estos iones se pueden formar a partir de la fragmentación del anillo 1,2,4-triazina, el tercer nitrógeno queda formando parte de un anillo de seis miembros. En cambio en el compuesto **2**, los iones más abundantes contienen tres átomos de nitrógeno, en este caso el tercer nitrógeno hace parte del anillo diazepínico que es mucho más lábil que el anillo de seis miembros de los compuestos **3** y **4**.

2.2. Fotoproductos en solución metanólica. Buscando una manera de mejorar y facilitar el aislamiento y así la caracterización de los productos de degradación, se ensayó la irradiación de alprazolam en solución metanólica, de donde sería más fácil la extracción de estos compuestos. Además considerando que el producto **1** sugiere reacciones de oxidación se ensayó la

irradiación de una solución metanólica con peróxido de hidrógeno también.

De la solución metanólica se lograron aislar y caracterizar tres compuestos principales. La fotodegradación con peróxido de hidrógeno en metanol, presenta el compuesto **7**.

Las señales de los espectros de ^1H RMN, ^{13}C RMN e IE-EM se describen a continuación:

Compuesto 5: ^1H NMR (CDCl_3) δ 2.27 [s, 3H, (CH_3)], 7.31 [d, $J = 8.6$ Hz, 1H, (H-3)], 7.45 [d, $J = 8.6$ Hz, 1H, (H-4)], 7.65 [m, 6H, (H-Ar)], 8.0 [s, 1H, (H-5)]. ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 10.42 (CH_3), 132 (C-Ar), 150.0 (C-2'), 167.0 (C-5'), 195.5 (C-7). MS m/z [ion] 299 [M+2] $^+$, 298 [M+2-1] $^+$, 297 [M] $^+$, 279 [M - H $_2$ O] $^+$, 268 [M - HNN] $^+$, 220 [M - C $_6$ H $_5$] $^+$, 194 [M - C $_6$ H $_5$ - CN] $^+$, 192 [M - C $_6$ H $_5$ CO] $^+$, 179 [M - C $_6$ H $_5$ - CH $_2$ CN] $^+$, 152 [C $_6$ H $_4$ NCHCH $_3$] $^+$, 129 [COC $_6$ H $_4$ NC] $^+$, 105 [C $_6$ H $_5$ CO] $^+$, 77 [C $_6$ H $_5$] $^+$.

Compuesto 6: ^1H NMR (CDCl_3) δ 2.18 [s, 3H, (CH_3)], 3.21 [s, 3H, (CH_2N)], 4.35 [d, $J = 15.5$ Hz, 1H, (H-9a')], 4.63 [d, $J = 15.5$ Hz, 1H, (H-9b')], 4.65 [d, $J = 10.5$ Hz, 1H, (H-5')], 4.74 [d, $J = 10.5$ Hz, 1H, (H-6')], 5.60 [s, 1H, (OH)], 7.60 [m, 8H, (H-Ar)]. ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 10.94 (CH_3), 35.5 (CH_2N), 55.5 (C-5'), 79.5 (C-9'), 107.6 (C-6'), 132 (C-Ar), 155.0, (C-3'), 162.6 (C-10'), 195.0 (C-7). MS m/z [ion] 400 [M + 2] $^+$, 299 [M + 2 - 1] $^+$, 398 [M] $^+$, 383 [M - CH $_3$] $^+$, 366 [M - CH $_3$ - OH] $^+$, 355 [M - CH $_3$ - NN] $^+$, 339 [M - CH $_3$ - CH $_2$ OCO] $^+$, 311 [M - CH $_3$ NN] $^+$, 282 [M -

$\text{CH}_3 - \text{NN} - \text{CHO}]^+$, 268 $[\text{M} - \text{CH}_3 - \text{NN} - \text{CHO} - \text{CH}_2]^+$, 263 $[\text{M} - \text{CH}_3 - \text{NN} - \text{CHO} - \text{Cl}]^+$, 206 $[\text{M} - \text{CH}_3 - \text{NN} - \text{C}_6\text{H}_5\text{CO}]^+$, 171 $[\text{M} - \text{CH}_3 - \text{N} - \text{C}_6\text{H}_5\text{CO} - \text{Cl}]^+$, 152 $[\text{C}_6\text{H}_4\text{NCHCH}_3]^+$, 105 $[\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}]^+$, 77 $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$.

Compuesto 7: ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.35 [m, 1H, (NH)], 2.15 [s, 3H, (CH_3)], 3.10 [d, $J = 7.5$ Hz, 1H, (H-5')], 4.15 [dd, $J = 15.0, 7.5$ Hz, 1H, (H-7a')], 4.55 [dd, $J = 15.0, 5.0$ Hz, 1H, (H-7b')], 7.68 [m, 8H, (H-Ar)]. ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 10.9 (CH_3), 32.9 (C-5'), 46.0 (C-7'), 132 (C-Ar), 150 (C-3'), 165 (C-9'), 195.0 (C-7). MS m/z [ion] 356 $[\text{M} + 2]^+$, 355 $[\text{M} + 2 - 1]^+$, 354 $[\text{M}]^+$, 325 $[\text{M} - \text{CHO}]^+$, 308 $[\text{M} - \text{OCH}_2\text{NH}_2]^+$, 307 $[\text{M} - \text{CHO} - \text{H}_2\text{O}]^+$, 298 $[\text{M} - \text{CHO} - \text{HCN}]^+$, 281 $[\text{M} - \text{CHO} - \text{HCN} - \text{HCN}]^+$, 249 $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{CO}]^+$, 220 $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{CO} - \text{NNH}]^+$, 204 $[\text{M} - \text{CHO} - \text{C}_6\text{H}_5\text{CO} - \text{NH}_2]^+$, 105 $[\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}]^+$, 77 $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$.

Los compuestos **5**, **6** y **7**, presentan un singlete correspondiente a 3 protones a campos altos en el espectro de ^1H RMN y presentan además en el ion molecular el típico satélite debido a la presencia de un átomo de cloro, $[\text{M} + 2]$, estos hallazgos indican que el anillo bencénico sustituido por un cloro y el grupo metilo presente en el anillo triazol del alprazolam están intactos en los productos de descomposición. (véase figura 3).

De otra manera, las resonancias a δ 195.5 en el espectro de ^{13}C RMN, también como el ion m/z 105 de los espectros de EM revelan la presencia de un grupo fenilcetona indicando que los productos de degradación se formaron por apertura del anillo benzodiazepínico donde se produce una cetona por hidrólisis del enlace imina.

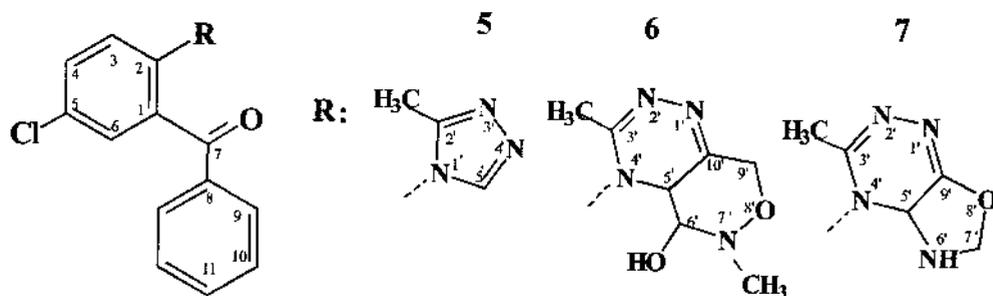


Figura 3.

El espectro de masa del compuesto **5** ($t_r = 4.1$ min) presenta un ion molecular de m/z 297, el cual difiere de 11 uma del peso molecular del alprazolam. El espectro de ^1H RMN muestra solamente tres tipos de señales: Un protón diferente a campos bajos $\delta 7.96$, s, H_{1-5'} que corresponde a un protón imino. La señal correspondiente a los protones aromáticos muestra dos dobletes debido a los protones: H-4 ($\delta 7.45$, d, $J = 8.6$ Hz) y H-3 ($\delta 7.31$, d, $J = 8.6$ Hz) en el anillo aromático sustituido con cloro. Los seis protones del anillo aromático aparecen como un multiplete a $\delta 7.65$. Por último el espectro exhibe un singulete de tres protones a $\delta 2.27$, el cual corresponde al grupo metilo de la posición 2 del anillo triazol. El análisis del espectro de ^{13}C RMN confirma la presencia del carbono metilo a $\delta 10.42$, y dos carbonos iminos $\delta 167.0$ y 150.0 .

El espectro de ^1H RMN del compuesto **6**, ($t_r = 3.7$ min) muestra dos singuletes que integran a 3 protones cada uno a $\delta 2.18$ y 3.21 correspondiendo a dos grupos metilos, que están de acuerdo al espectro de ^{13}C RMN en el cual dos carbonos metilos aparecen a $\delta 10.94$ y 35.5 . La última señal corresponde a un grupo metilo unido a nitrógeno. Las señales aromáticas se observan en el espectro de ^1H RMN a $\delta 7.60$ (8H) como un multiplete y en el espectro de ^{13}C RMN a $\delta 132$. También hay una señal a $\delta 195.0$ de un carbono carbonílico y dos señales a $\delta 162.6$, 155.0 que están de acuerdo con el desplazamiento químico correspondiente a carbonos imino. De estas señales se concluye que una benzofenona y un anillo 1,2,4-triazina están presente en el

compuesto **6**. El sistema biciclo en **6** fue establecido por análisis de las constantes de acoplamiento. Los protones 2H-9' aparecen como dos dobletes a $\delta 4.35$ y a 4.63 con un acoplamiento geminal $J = 15.5$ Hz, mientras H-6' aparece a ($\delta 4.74$, d) exhibiendo una constante de acoplamiento $J = 10.5$ Hz con H-5', el cual aparece a $\delta 4.65$, d. El espectro de ^{13}C RMN y el espectro DEPT confirma la presencia de estos carbonos metileno ($\delta 79.5$) y dos carbonos metinos ($\delta 107.6$, 55.5). Además la señal amplia del OH es observada a $\delta 5.60$. En base a estos datos la estructura **6** se propuso para este compuesto, considerando también el ion molecular que muestra el espectro de masa m/z 398 y demás fragmentaciones.

Compuesto **7** ($t_r = 3.4$ min) exhibe un ion molecular de m/z 354, el espectro de ^1H RMN (CDCl_3) muestra una señal en la región aromática a ($\delta 7.68$, m, 8H), siendo similar al multiplete mostrado por el compuesto **6**. Los experimentos DEPT son consistentes con la presencia de ocho carbonos metinos aromáticos. La estructura del sistema biciclo se definió por la presencia de un carbono metileno (C-7') con dos protones no equivalentes, éstos aparecen como dos dobletes en el espectro de protones (CDCl_3) a $\delta 4.15$, dd, $J = 15.0$, 7.5 Hz y $\delta 4.55$, dd, $J = 15.0$, 5.0 Hz, también como en el espectro de carbono y experimentos DEPT a $\delta 46.0$. Además se observa una señal amplia a $\delta 1.35$, m, que se puede asignar a NH. Esta señal y sus respectivos acoplamientos desapa-

recen en experimentos de ^1H RMN con intercambio de hidrógeno, sugiriendo que el protón del amino NH tiene un acoplamiento con los protones del metileno adyacente 2H-7' anteriormente descritos, y un segundo acoplamiento con el protón H-5' (δ 3.1, d, J = 7.5 Hz). Los dos carbonos del enlace imina pueden ser identificados por la señal del espectro de ^{13}C RMN a δ 165.0 y 150.0, también como por dos picos significativos a m/z 298 y 281 formados por pérdida de HCN (27 mmu) de los iones m/z 325 y 3 m/z 38, respectivamente, en el espectro de masa.

Estos productos identificados y aislados en la degradación artificial son observados también en las muestras irradiadas con luz natural y no fueron observados en blancos conservados al abrigo de la luz, como tampoco en muestras sometidas a temperatura y oscuridad.

CONCLUSIONES

El alprazolam es una molécula muy estable frente a la mayoría de los factores ambientales. Durante las experiencias en el laboratorio es necesario aplicar condiciones muy severas para observar degradación.

La luz es el factor ambiental que notablemente afecta la estabilidad del alprazolam. Los productos formados en la reacción de fotodegradación son diferentes dependiendo del solvente usado, y en soluciones acuosas se observa que es fuertemente dependiente del pH.

Las estructuras de los compuestos aislados de solución acuosa sugieren que la fotodegradación incluye reacciones en los cuales anillos de cinco y siete miembros se transforman en anillos más estables de seis miembros y otro se forma por reacciones de oxidación. Mientras que en la fotodegradación en metanol parecería que la primera etapa de reacción es probablemente la hidrólisis del enlace imina seguido por reacciones de reordenamiento y reacciones de solvolisis.

AGRADECIMIENTOS

C. G. agradece la beca otorgada por COLCIENCIAS-Colombia. Los autores están agradecidos por el apoyo financiero brindado por la Universidad de Buenos Aires, la Agencia de Promoción Científica y Técnica y el CONICET-Argentina. Los autores agradecen también a Laboratorios Gador S. A., División Farmoquímica por facilitarnos muestras de alprazolam que se utilizaron en este trabajo.

Fecha de Recepción: junio 12 de 1999

Fecha de Aceptación: agosto 19 de 1999

BIBLIOGRAFÍA

- 1 USP DI, 16 edición, 1996, Pág 529.
- 2 Goodman Gilman A. Las bases farmacológicas de la terapéutica, Novena ed. México, McGraw-Hill Interamericana, 1996, vol. I, Pág.394.
- 3 Wright C.E.; Sissin T.L.; Fleishaker J. C.; Antal, E. J. *J. Clin. Pharmacol.*, 37 (4), 321, 1997.
- 4 Bourin, M. et. al. *J. Clin. psychopharmacol.* 18(5),364, 1998.
- 5 Noyes, R. Jr. et. al. *J.Clin. Psychiatry*, 57(8),349, 1996.
- 6 Yang, K. S.; Yang, M. S. *J. Pharm. Sci.* 1994, 83, 58
- 7 Nudelman, N. E.; Waisbaum, R. G. *J. Pharm. Sci.*, 84, 998, 1995.
- 8 Nudelman, N. S.; Waisbaum, R. G. *J. Pharm. Sci.*, 84, 208, 1995.
- 9 Nudelman, N. S.; Waisbaum, R. G. *J. Phys. Org. Chem.*, 10, 97, 1997.
- 10 Nudelman, N. S.; Waisbaum, R. G.,Gallardo C. *J. Org. Chem.*, Enviado
- 11 Cho, M. J., Scahill, T. A., Hester, J. B. *J. Pharm. Sci.*, 72, 356, 1983.
- 12 Jiménez, R. M.; Dominguez, E.; Baía, D., Alonso, R. M.; Vicente, F. J. *Heteroc. Chem.*, 24, 421, 1987.
- 13 Konishi, M.; Hirai, K.; Mori, Y. *J. Pharm. Sci.*, 71, 1328, 1982.
- 14 Patriarcho, G. J.; Vire, J. C. *Analytica Chim. Acta*, 196, 193, 1987.
- 15 Minoru, O.; Tsutomu, T.; Toshihide, N. *J. Pharm. Sci.*, 84, 786, 1995.
- 16 Cho, M. J.; Sethy, V. H.; Haynes, L. C. *J. Med. Chem.*, 29, 1346, 1986.
- 17 Allen, L.V. *Am. J. Health Syst Pharm.*, 5(18), 1915, 1998.
- 18 Shah, K. P.; Zhou, J.; Lee, R.; Schowen, R. L.; Ault, J. M.; Stobaugh, J. F., Slavir, M. *J.Pharm. & Bio-med.Anal.*, 12, 993, 1994.
- 19 Pranker, R. J. *Australiana J.Hosp. Pharm.*, 25, 405, 1995.
- 20 Nudelman, N. S.; Waisbaum, R. G.,Gallardo C. *Atualidades de Físico-Química Organica*, 1998, en prensa.