



201
41

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

“DESARROLLO DE UN METODO CROMATOGRAFICO
PARA EL ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE OXITETRA-
CICLINA EN FORMAS FARMACEUTICAS”.

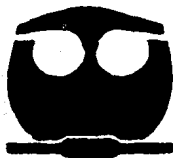
T E S I S

Q u e p r e s e n t a :

Alfonso García Morales

En opción al título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLÓGICO



México, D. F.

1989

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.

INDICE GENERAL

CAPITULOS

PAGINAS

1.	INTRODUCCION	1
2.	GENERALIDADES	3
2.1.	PROPIEDADES GENERALES DEL CLORHIDRATO DE OXITETRACICLINA.	3
2.2.	METODOS ANALITICOS PARA DETERMINAR CLORHIDRATO DE OXITETRACICLINA	5
2.2.1.	Métodos Espectrofotométricos	6
2.2.2.	Métodos Cromatográficos	8
2.2.3.	Otros Métodos Analíticos para determinar Clorhidrato de Oxitetraciclina	18
2.2.3.1.	Métodos Microbiológicos	18
2.2.3.2.	Métodos Volumétricos	20
2.2.3.3.	Métodos Electroquímicos	21
2.3.	ESTABILIDAD DE MEDICAMENTOS	24
2.3.A.	ASPECTOS GENERALES SOBRE ESTABILIDAD	24
2.3.A.1.	Definición de Estabilidad de un Fármaco	24
2.3.A.2.	Pruebas de Estabilidad	24
2.3.A.3.	Fases de Estabilidad	25
2.3.A.4.	Programas de Estabilidad	31
2.3.A.5.	Manejo de Datos de Estabilidad	33
2.3.1.	Mecanismos de degradación de Fármacos	34
2.3.1.1.	Hidrólisis	34
2.3.1.2.	Oxidación	34
2.3.1.3.	Descomposición	34
2.3.1.4.	Fotólisis	35

INDICE GENERAL

CAPITULOS	PAGINAS
2.3.2. Mecanismos de degradación de Oxitetraciclina	36
2.3.2.1. Degradación en medio Alcalino	37
2.3.2.2. Degradación en medio Acido	39
2.3.2.3. Degradación Reductiva	42
2.3.2.4. Degradación Oxidativa	44
2.3.2.5. Isomerización (Formación del Epímero)	45
3. PARTE EXPERIMENTAL	47
3.1. DESARROLLO DEL METODO	47
3.1.1. Material y Equipo	47
3.1.2. Reactivos utilizados	47
3.1.3. Preparación de soluciones	48
3.1.4. Preparación de soluciones Patrón de Referencia	48
3.1.5. Preparación de muestras	50
3.1.6. Condiciones cromatográficas	51
3.1.6.1. Procedimiento	52
3.2. VALIDACION DEL METODO	53
3.2.1. Especificidad	53
3.2.2. Linealidad	57
3.2.3. Exactitud	58
3.2.4. Precisión	58
3.3. APLICACIONES	59
3.4. ANALISIS DE MUESTRAS EN ESTABILIDAD	60

INDICE GENERAL

CAPITULOS	PAGINAS
4. RESULTADOS61
4.1. DESARROLLO DEL METODO61
4.2. VALIDACION DEL METODO63
4.3. APLICACIONES75
4.4. MUESTRAS ANALIZADAS EN ESTABILIDAD76
5. DISCUSION DE RESULTADOS77
5.1. DESARROLLO DEL METODO77
5.2. VALIDACION DEL METODO77
5.3. APLICACIONES79
5.4. ANALISIS DE MUESTRAS EN ESTABILIDAD80
6. CONCLUSIONES81
7. BIBLIOGRAFIA82

APENDICES

1. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS89
2. CALCULOS EFECTUADOS PARA LINEALIDAD97
3. PROCEDIMIENTO ESTADISTICO APLICADO PARA EXACTITUD98
4. PROCEDIMIENTO ESTADISTICO DE REPRODUCIBILIDAD100
5. CALCULOS EFECTUADOS PARA EL ANALISIS CUANTITATIVO DE MUESTRAS COMERCIALES DIFERENTES A LA ESTUDIADA103

INDICE

LISTA DE FIGURAS , ESQUEMAS Y TABLAS.	PAGINAS
Cromatogramas obtenidos al ser expuesta la Oxitetraclina a diversas condiciones de Degradación63
Cromatogramas obtenidos al ser expuesto el Placebo a diferentes condiciones de Degradación67
Cromatogramas obtenidos del Placebo + Fármaco al ser expuestos a diversas condiciones de Degradación69
Figura 27.-Cromatograma típico correspondiente a las señales de OTC.HCl y TC.HCl75
Grafica No.1. Linealidad del Método para determinar Clorhidrato de Oxitetraclina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución73
Esquema No.1.1. Serie de Degradación de Oxitetraclina en medio Alcalino37
Esquema No.1.2. Serie de Degradación de Oxitetraclina en medio Alcalino38
Esquema No.2.1. Serie de Degradación de Oxitetraclina en medio Acido40
Esquema No.2.2. Serie de Degradación de Oxitetraclina en medio Acido41
Esquema No.3.1. Vía de Degradación Reductiva para Oxitetraclina42
Esquema No.3.2. Vía de Degradación Reductiva para Oxitetraclina43
Esquema No.4. Vías de Degradación Oxidativas para Oxitetraclina44
Esquema No.5. Formación del Epímero de Oxitetraclina46
Tabla No.1. Diferentes Condiciones de Degradación del estándar de Oxitetraclina53
Tabla No.2. Diversas Condiciones de Degradación para el estándar de Oxitetraclina54

INDICE

LISTA DE FIGURAS , ESQUEMAS Y TABLAS	PAGINAS
Tabla No.3. Diversas Condiciones de Degradación para el para el Placebo en la Formulación de Oxitetraciclina	55
Tabla No.4. Condiciones de Degradación para el Placebo de la Formulación de Oxitetraciclina	56
Tabla No.5. Cuadro Esquemático de Preparación de la Curva Problema	57
Tabla No.6. Precisión del Metodo para la Determinación de Oxitetraciclina	58
Tabla No.7. Lotes Analizados en Estabilidad	60
Tabla No.8. Cuadro Sinóptico de Resultados para Linealidad (Apéndice No.2)	72
Tabla No.9. Porcentaje cuantificado en la Formulación comercial (% DTC en la muestra analizada) . . .	74
Tabla No.10. % GfC cuantificada en los diversos Lotes de la Formulación estudiada	76

CAPITULO I-

INTRODUCCION.

Hoy en día, la sencillez o complejidad de formulaciones tanto de medicamentos nuevos como de los ya existentes en el mercado, exige el desarrollo de métodos analíticos cuya especificidad, exactitud y reproducibilidad, nos permita llevar a cabo un análisis cuantitativo del principio activo en presencia de excipientes y de sus posibles productos de degradación.

Para lograr lo anterior, es necesario un amplio conocimiento de las propiedades químicas, físicas y fisicoquímicas de las sustancias a ser analizadas y de la utilización de la instrumentación analítica moderna.

Los productos de degradación de principios activos y excipientes presentes en una formulación, además de disminuir la actividad terapéutica, pueden producir efectos secundarios y causar cierta toxicidad durante la administración del medicamento, así como interferir en la determinación cuantitativa de los principios activos, siendo esto una de las causas de resultados falsos. Por esto es necesario contar con métodos analíticos específicos, que permitan determinar tanto las sustancias activas como sus productos de degradación.

La Oxitetraciclina se determina principalmente por métodos microbiológicos (2), a pesar de que éstos son sensibles, exactos y precisos en las valoraciones de Tetraciclinas (entre ellas Oxitetraciclina) son inespecíficos; debido a que no es posible utilizarlos para demostrar la presencia de productos de degradación ni para evaluar la cantidad presente de los mismos en una formulación, por lo que es necesario establecer

paralelamente métodos analíticos que permitan separar y cuantificar el principio activo y de ser posible sus productos de degradación.

El presente trabajo tiene por objeto desarrollar y evaluar un método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución que permita separar al Clorhidrato de Oxitetraciclina de sus posibles productos de degradación y excipientes, así como cuantificarlo en una forma farmacéutica sólida.

CAPITULO 2.

GENERALIDADES.

2.1. PROPIEDADES GENERALES DEL CLORHIDRATO DE OXITETRACICLINA

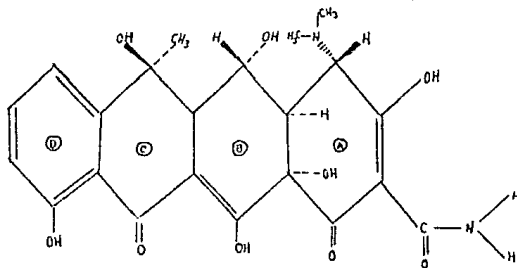
El Clorhidrato de Oxitetraciclina (OTC.HCl) es un antibiótico producido por el actinomiceto Streptomyces rimosus y pertenece a la familia de las Tetraciclinas.(1,2,3).

NOMBRE QUÍMICO: 4-(Dimetilamino)-4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-3,5,6,10,12,12a-hexahidroxi-5-metil-1,11-dioxo-1-naftacén carboxamida clorhidrato.

SINÓNIMOS: Glomicina, Terrafungina, Hidroxitetraciclina, Terraject, Terramicina.

NOMBRE COMÚN: 5-hidroxi-Tetraciclina, Oxitetraciclina.

FORMULA SEMIDESARROLLADA:



FORMULA CONDENSADA: $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$

PESO MOLECULAR: 496.90

DESCRIPCION: Polvo amarillo cristalino, inodoro e higroscópico.

SOLUBILIDAD: Soluble en Agua, Metanol y Acido Clorhídrico 0.1 Normal.

TEMPERATURA DE FUSION: 184.5 °C - 185.5 °C con descomposición.

pH: 2.0 - 3.0 , a concentraciones de 10 mg.ml⁻¹

pKas: pKa₁ = 3.49 pKa₂ = 7.55 pKa₃ = 9.24 , en solución acuosa a temperatura de 28 °C.

CARACTERISTICAS GENERALES: La OTC.HCl es una sustancia anfotérica capaz de reaccionar con ácidos y bases fuertes.

Este antibiótico en solución es menos estable (dependerá de factores tales como pH y temperatura) que en fase sólida y es fotosensible.(4).

Es un agente quelante, forma complejos diferentes con varios metales (Calcio, Magnesio, Manganeso, etc.). interacciona con algunos compuestos orgánicos tales como: Acido Ascórbico, Urea, Acido Fólico.(5,6).

ACTIVIDAD TERAPEUTICA: Es un antibiótico de amplio espectro antibacteriano , útil contra infecciones causadas por bacterias grampositivas y gramnegativas por excelencia, también es útil para combatir infecciones causadas por rickettsias y el protozoo Entamoeba histolitica.(7,8,9).

2.2. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAR CLORHIDRATO DE OXITE-RACICLINA

Para la determinación de OTC.HCl en productos farmacéuticos, se han desarrollado y publicado numerosos métodos analíticos que permiten separar y cuantificar de manera adecuada el fármaco.

Algunos son de carácter oficial como los métodos microbiológicos(2,4) los cuales utilizan microorganismos susceptibles al fármaco.

Existen otros métodos de análisis que se fundamentan en reacciones químicas bien definidas, por ejemplo: Valoraciones ácido-base, reacciones de oxido-reducción, formación de complejos, formación de precipitado, etc.(10).

Otros métodos se basan en la determinación directa de algunas características moleculares por medio de instrumentos, por ejemplo Espectrofotometría Ultravioleta y Visible.(10).

Algunos métodos se fundamentan en procesos fisicoquímicos de separación por ejemplo la Cromatografía en Capa Delgada (10). Otros procesos cromatográficos se combinan con la detección instrumental por ejemplo Cromatografía de Gases y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (10). Los métodos cromatográficos comparados con los métodos espectrofotométricos, microbiológicos, electroquímicos, etc., tienen la ventaja de ser rápidos y específicos.

2.2.1. MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Estos métodos se fundamentan en el hecho de que la energía radiante de cualquier región del espectro electromagnético interacciona con la materia, ya sea absorbiendo parte de la energía (Espectroscopia de absorción) o emitiendo parte de la misma (Espectroscopia de emisión). Estos métodos constituyen la base para los análisis de rutina en la Industria Farmacéutica.

D.W.Hughes y W.L.Wilson (10) reportaron la determinación espectrofotométrica a 490 nm de un complejo colorido, formado entre la OTC y el Cloruro férrico, al igual que la determinación de un complejo formado por la OTC y soluciones de Cerio.

Grove y Randall (11) describieron una técnica de extracción para OTC en diferentes formas farmacéuticas, para ello la extracción de OTC se realizó a pH = 2.1 (Solución reguladora de Britton-Robinson) con 1,2-dicloroetano, formando un complejo por par iónico con Dioctilsulfosuccinato. La absorbancia del extracto se leyó a 270 nm y 365 nm.

L.G.Chatten y S.I.Krause (12) desarrollaron un procedimiento de análisis por Colorimetría para diferentes Tetraciclinas, entre ellas la OTC en varias formas farmacéuticas. Utilizaron para ello como agente complejante Nitrato de Torio en solución de Acetatos pH = 4.0 el cual se leyó a 395 nm, la absorción molar del complejo reportado fue de 14 784.

E.Ragazzi y G.Veronese (13) reportaron un método cuantitativo para OTC por Fluorometría directa, después de la elución cromatográfica en

placas de celulosa, los diferentes agentes complejantes utilizados fueron soluciones acuosas de Cloruro de Magnesio, Calcio, Aluminio y Zinc a diferentes concentraciones molares.

El analisis cuantitativo se realizo por excitacion de la fluorescencia a longitud de onda de 340 nanometros.

Wilson y Hughes (10) describieron un método por Fluorometría para la determinación cuantitativa de OTC, la cual después de una serie de extracciones sucesivas en medio basico, se hace reaccionar con un reactivo fluorescente.

Willekens (14) basandose en el método de Sina y colaboradores (15) desarrolló un metodo por Fluorometria directa en Cromatografia de Capa Delgada, para evaluar OTC y sus productos de degradación.

Las placas fueron preparadas con silica gel en solución acuosa al 5% de EDTA disódico previamente ajustada a pH = 9 con NaOH al 20%. La fase móvil utilizada fue Etilenglicol: Agua: Acetona: Etilformato: Etilacetoacetato. El revelado se efectuó en la región del UV de onda larga. El analisis cuantitativo se realizo por excitación de la fluorescencia en linea de mercurio a 365 nm, los resultados de reproducibilidad y exactitud obtenidos fueron aceptables.

Los métodos espectrofotométricos reportados (10-15) para el analisis de OTC.HCl tienen las siguientes ventajas: Son rápidos, sencillos y precisos(Coeficiente de Variación aceptable C.V. = $\pm 3\%$). Mayor sensibilidad del orden de microgramos (10^{-6} g), pero presentan la desventaja de ser inespecificos en presencia de sustancias estructuralmente similares.

de CTC, uno de los isómeros de la apooxitetraciclina y otras tetraciclinas, empleando placas cubiertas de celulosa microcristalina previamente tratadas con una solución metanólica de etilenglicol al 20%. El eluyente utilizado fue Acetato de Etilo saturado con agua. El revelado se realizó empleando una mezcla de cloruro de Magnesio 0.2 M en solución acuosa-Etanol al 95% (1:1) y después con Trietanolamina al 10% v/v en Metanol.

Gyanchandani y Mc.Gilveray (18) desarrollaron un método de separación e identificación por CCD, para Tetraciclinas y sus productos de degradación.

Las placas se prepararon con silicagel aproximadamente 50 gramos en una mezcla homogénea de 95 ml de EDTA 0.1 M en agua y 5 ml de una solución al 20 % V/V de Polietilenglicol-400 en Glicerina.

Las fases móviles utilizadas fueron: 1.- Metiletilcetona saturada con solución reguladora de McIlvaine (pH = 4.7).

2.- Diclorometano:Etilformato:Etanol saturado con solución reguladora de McIlvaine (pH = 4.7). El revelado se hizo con luz UV de longitud de onda larga.

Doris Herbst (19) reportó un método para detectar niveles residuales de Penicilina G, Penicilamina y Ampicilina en diferentes tetraciclinas por Cromatografía en Capa Delgada fase Inversa, entre las cuales se identificó a la Oxitetraciclina.

La fase estacionaria fue sílica gel impregnada de sílica 60-200; la fase móvil solución reguladora de Acetato-acetona.

A. Alvarez y colaboradores (20) describieron un método de separación y cuantificación para tetraciclinas y sus productos de

degradación por CCD utilizando para ello, sílica gel impregnada con soluciones acuosas de EDTA ajustadas a dos diferentes valores de pH.

Se utilizó una mezcla agua-acetona como eluyente. La determinación espectrofotométrica se realizó a 430 nanómetros.

Este método permite detectar tetraciclinas (entre ellas OTC) sin degradar hasta un 0.5%, el método tiene el inconveniente de que previo al análisis la sílica gel requiere de varios lavados con HCl para dejarla libre de hierro y calcio. Este proceso es tedioso y requiere de experiencia considerable por parte del analista para obtener el soporte libre de iones.

En la Referencia (10) se describen varios procedimientos desarrollados y reportados por Kapadia y Rao para OTC por CCD, usaron como fase estacionaria sílica gel, a uno de ellos se le adicionó un agente complejante (EDTA). Las fases móviles utilizadas fueron Sistema 1: n-butanol-Acido oxálico-Agua. Sistema 2: n-butanol saturado con agua. El revelado fue realizado con Luz UV y solución de Cloruro Férrico al 5% en Metanol.

En la Referencia (10) se menciona un procedimiento por CCD reportado por Sonamini y Anker, para detectar y separar Oxitetraciclina de Clorotetraciclina y Tetraciclina. La fase estacionaria fue sílica gel impregnada con una mezcla de Glicerol y solución de fosfatos-citratos pH = 3.7. La fase móvil utilizada fue Cloroformo-Acetona. El revelado se llevo a cabo con luz UV de longitud de onda larga.

En el Handbook of Chromatography (21) se reportan dos procedimientos desarrollados por Sobieczewski y Domjadzki por CCD

para detectar y separar diferentes tetraciclinas entre las mismas OTC. Utilizándose dos fases estacionarias distintas. 1.-Talco y 2.-fierra de diatomas. La fase móvil fue Acetato de etilo saturado con EDTA 0.1 M.

Santos y colaboradores (21) reportaron también una técnica por LCD para detectar y separar OTC, usando para ello diferentes fases móviles. La fase estacionaria fue poliamida 11 (Rislan).

Las fases móviles utilizadas fueron Sistema 1: n-butanol-cloroformo-Acido acético. Sistema 2: n-butanol-Acido acético-agua.

Losscher, Brander y Kern (22) elaboraron dos procedimientos por CLAR para separar y cuantificar OTC en presencia de otras Tetraciclinas. Utilizaron para ello dos columnas de diversos tamaños de partícula. Columna 1: Zipax Peliionex SCX, tamaño de partícula 30-40 micras. Columna 2: Microbondapak-CN, tamaño de partícula de 10 micras; las fases móviles fueron diferentes para cada tipo de columna. Las longitudes de detección fueron 280 nm para la columna 1 y 268 nm para la columna 2 respectivamente.

Hamilton y Sewell (23) citaron dos técnicas por CLAR de intercambio iónico. las fases móviles fueron preparadas con solución reguladora de fosfatos a pH = 7.0. La longitud de onda para detectar Oxitetraciclina fue a 280 nanómetros.

J.P.Sharma y colaboradores (24) desarrollaron un método analítico para determinar Tetraciclinas en fluidos biológicos (orina) usando para ello una columna de intercambio aniónico

La cuantificación se realizó por estandarización interna. La desviación estándar relativa fue de 5% (40).

Gupta y colaboradores (21) han descrito y recopilado diversos métodos por CLAR para OTC. A continuación se mencionan las condiciones cromatográficas.

La fase estacionaria utilizada fue una columna Microbondapak C₁₈ de tamaño de partícula de 10 micras.

La fase móvil fue solución reguladora de fosfatos 0.01 M pH = 7.3 - acetonitrilo. Flujo 1.0 ml/min. La Detección se realizó a 355 nm.

Nilson y Yoshikawa desarrollaron también un método por CLAR, reportado en la referencia (25) utilizando para ello columna Microbondapak C₁₈, la fase móvil fue: Metanol-EDTA.

La detección se realizó a 355 nanómetros.

Wagman H. y Marvin J. (25) reportaron un método por CLAR para cuantificar Doxiciclina y su epímero, así como OTC. Para su separación se utilizó una columna C₁₈, la temperatura de trabajo fue a 60 °C.

La fase móvil utilizada fue: solución reguladora de fosfatos-Tetrahidrofurano-Agua. La detección se realizó a 254 nm.

La detección se realizó a 254 nm. Se analizaron con éxito capsulas, tabletas y producto a granel.

Wagman H. y Marvin J. (25) determinaron por CLAR-Fase inversa OTC en una columna comercial Spherisorb C₈, los resultados obtenidos fueron comparados con aquellos seguidos por la Farmacopea Británica.

El paracetamol (Acetaminofen) recristalizado fue utilizado como

patrón interno. La comparación de factores de capacidad y valores de platos teóricos, indicaron que la CLAR-fase inversa da una resolución superior con respecto a la Cromatografía de Intercambio Iónico, utilizada por la Farmacopea Británica.

Oka y colaboradores (25) desarrollaron métodos por CLAR, para la determinación de Tetraciclina y OTC. La fase estacionaria utilizada es una columna C₁₈, la fase móvil fue una mezcla de Metanol-Acetonitrilo-Acido oxálico 0.01M pH=2.

Wagman y Marvin (25) reportaron un método analítico por CLAR. La columna usada es una ODS-Sil-X-II. La fase móvil es Metanol-Carbonato de Amonio 0.05 M. La detección fue hecha a 254 nanómetros.

Iyoshi, Robertson y Beyer (26) elaboraron un método cuantitativo para diferentes Tetraciclinas por CLAR-Fase Inversa. La columna utilizada fue una Zipax HCF ODS, la fase móvil una mezcla de Metanol-solución de EDTA-solución reguladora de Fosfatos. El método demostró ser sensible hasta 10 ng. La desviación estándar relativa fue de 1.02%.

Kiyoshi y Robertson (27) desarrollaron un método para cuantificar diferentes Tetraciclinas por CLAR. Utilizaron para ello una columna C₁₈ y elución por gradiente. La detección se realizó a 280 nm.

Kiyoshi (28) reportó un método analítico por CLAR utilizando para ello una columna Microbondapak C₁₈. La elución por gradiente se realizó por cambio en la proporción de fase móvil A (7%) por ejemplo a fase móvil B. El tiempo de corrida fue de 15

minutos. La longitud de onda para detectar OTC fue 280 nm.

Flujo 1.0 ml/min. La fase móvil A: Metanol-Agua-solución reguladora de Fosfatos 0.2 M pH = 2.5. La fase móvil B: Metanol-Acetonitrilo-Agua-solución reguladora de fosfatos 0.2 M pH = 2.5. La columna debe ser pre-acondicionada por espacio de 2 a 4 horas con solución de EDTA 0.1 Molar para minimizar el coque de las señales de OTC. Este método utilizó Triptófano como patrón interno.

Mack y Ashworth (29) reportaron un método por CLAR-Fase inversa, para el análisis de ocho análogos de Tetraciclina, algunos productos de degradación e impurezas (entre las Tetraciclinas analizadas se incluye la Oxitetraciclina).

La mayoría de los análisis cromatográficos se leyeron a 254 nanómetros. El disolvente universal encontrado fue el Metanol, por su capacidad para disolver a las Tetraciclinas y su miscibilidad con disolventes orgánicos y acuosos. Además, da cierta estabilidad ya que los disolventes acuosos tienden a acelerar la degradación de los análogos de la tetraciclina.

Snyder y Kirkland (30) describieron dos técnicas por CLAR usando la modalidad de par iónico. No se observó resolución ni tampoco simetría en las señales de OTC y sus productos de degradación.

Hermansson y Anderson (31) desarrollaron un método por CLAR-Fase inversa modalidad de par iónico para la separación de diferentes tetraciclinas (entre ellas la OTC) y posibles impurezas.

Las columnas utilizadas son C₈ y C₁₈. La detección se hizo a 280 nanómetros. Las fases móviles fueron preparadas con solución

reguladora se fosfatos a pH = 6 y Acetonitrilo, utilizando en las diferentes fases móviles diversos contraiones como sales de tripropilamina y N,N-dimetiloctilamina. Los resultados óptimos fueron obtenidos con el contraión N,N-dimetiloctilamina.

Mourot, Boisseau y Gavot (32) reportaron también un método rápido y eficiente por CLAR-Fase inversa modalidad por iónico, para separar y detectar OTC en presencia de su epímero y de anhidroxitetra-ciclina. La columna utilizada fue una RP-8 Lichrosorb con tamaño de partícula de 10 micras y una longitud de onda de 275nm. La fase móvil fue agua y acetonitrilo en diferentes proporciones. El contraión utilizado fue el tetrabutilamonio (39).

Steffan Eksborg (33) describió un procedimiento por par iónico en fase inversa, utilizando para ello columnas de diversas fases estacionarias RP-8, Lichrosorb Amino y Lichrosorb.

La detección se realizó a 357 nm.

El contraión usado fue el Ácido 1-hidróxi-2,3-diisobutilbencen-sulfónico (HIBS) en fase móvil de Acetonitrilo-solución reguladora de fosfatos 0.1 Molar.

Los resultados óptimos se encontraron al usar 10% de Acetonitrilo y columna RP-8.

Sharma y Bevil (34) realizaron una determinación cuantitativa de diferentes tetraciclinas (entre ellas la OTC) en orina y plasma por CLAR-Fase inversa, previa complejación con Calcio, extraídas con Etilacetato y reextraídas con HCl 0.5 Normal. La columna utilizada fue una Microbondapak C₁₈ y la longitud de onda de detección fue 355 nm. La fase móvil fue solución

reguladora reguladora de fosfatos 0.01 Molar-Acetonitrilo.

Hasta aquí, se han descrito algunos de los diferentes métodos analíticos reportados, que han servido en algunos casos para separar y detectar e incluso en otros para cuantificar diferentes Tetraciclinas (entre las mismas DTC).

Analizando las ventajas que presenta la CLAR sobre la CCD estas se fundamentan en el hecho de tener mayor resolución ($R > 1$), esto es separación del fármaco de interés de posibles productos de degradación e impurezas (30). Tiempos de análisis muy cortos, facilidad en la preparación de la muestra, mayor sensibilidad (detección del orden de nanogramos, 10^{-9} gramos), combina la separación del principio activo de interés con diferentes métodos de detección instrumental del sistema (ultravioleta, conductividad térmica, índice de refracción, etc.).

Versatilidad en cuanto a las posibilidades de emplear cualesquiera de los mecanismos fundamentales de separación cromatográficos como son: Adsorción, Exclusión Molecular, Intercambio Iónico o de Partición (denominada también Cromatografía de Reparto), presenta una gran precisión y exactitud en los resultados (para métodos por CLAR el coeficiente de variación es de 2% (22).

Una de las principales ventajas que tiene la CLAR sobre otros métodos (Espectrofotométricos, Microbiológicos, Volumétricos, Electroquímicos, etc.) es la ESPECIFICIDAD de la misma.

La desventaja que presenta la CLAR como tal sobre la CCD y los demás métodos mencionados es su costo, por el equipo e instrumentación utilizados en el análisis.

Después de hacer una revisión de los diferentes métodos reportados para el análisis de la OTC.HCl, se evaluó que la CLAR satisface las necesidades para el desarrollo de un procedimiento analítico indicador de estabilidad, debido a las ventajas que ofrece, así como la versatilidad de aplicación.

2.2.3. OTROS METODOS ANALITICOS PARA DETERMINAR UIC.HCI

2.2.3.1. METODOS MICROBIOLOGICOS

1. El fundamento de estos metodos es la comparación de una cantidad de muestra que contiene el antibiótico (Dosis de Respuesta o Potencia estimada) con respecto a un patrón de referencia de Potencia conocida (Dosis de Respuesta especifica). Tanto la muestra como el patrón de referencia deben ser preparados en las mismas condiciones de trabajo.

2. La medida del efecto inhibitor del antibiótico sobre la multiplicación y crecimiento del microorganismo de prueba.

3. La existencia de algún tipo de relación cuantitativa entre la respuesta observada y la concentración del antibiótico utilizada tanto para la muestra problema como para el patrón de referencia (2)

Los métodos microbiológicos conocidos son:

Difusión en Agar o Cilindro-placa

Turbidimetricos.

El primero se basa en la medida de inhibición causada por un antibiótico sobre el crecimiento de un microorganismo sensible a este, cuando se mantiene en un medio de cultivo bajo condiciones adecuadas. Es decir, que la inhibición de crecimiento de los microorganismos dependerá de las diferentes concentraciones del antibiótico (Patrón de Referencia y muestra) por difusión en la capa de agar, la cual contiene una cantidad de inóculo del microorganismo descrito en la monografía y que es distribuido en toda la capa de manera uniforme.

Después de un periodo de incubación se obtendrán halos circulares de inhibición de diámetros diferentes sobre el crecimiento del microorganismo.

Se miden estos halos para cada solución patrón añadida en el cilindro y se comparan contra los del problema. Haciendo los cálculos especificados en la monografía y graficando [Concentración de la solución patrón] vs Diámetro del halo de inhibición, extrapolamos el diámetro obtenido del antibiótico problema en la curva.

Finalmente la concentración obtenida nos dará la Potencia estimada del antibiótico en la muestra problema.

Los Turbidimétricos se fundamentan en la medición de la turbidez producida por las células microbianas en suspensión, después de la interacción con el antibiótico a analizar. La determinación cuantitativa se logra midiendo el porcentaje de transmitancia del medio que contiene cada una de las concentraciones del patrón de referencia y la muestra problema, tomando como blanco de referencia un medio de cultivo que sólo contiene el microorganismo y diluyente.

Graficando % de Transmitancia (Respuesta) contra concentración del patrón de referencia (Dosis) se obtiene una curva patrón, en la cual se interpola el % de Transmitancia medido para la muestra problema y se obtiene la concentración del antibiótico en la misma. Haciendo los cálculos especificados en la monografía respectiva obtenemos la Potencia estimada del antibiótico en la muestra problema (37).

Los métodos turbidimétricos comparados con los de cilindro-placa, presentan las siguientes ventajas: son más rápidos, sensibles, exactos y precisos, pero son más laboriosos requiriendo mayor tiempo de análisis (2).

En general ambos métodos requieren además condiciones adecuadas para el crecimiento del microorganismo, como son: pH del medio de cultivo, temperatura de incubación, pureza de la cepa y pureza del medio de cultivo así como de los reactivos utilizados (38).

Para el análisis del Clorhidrato de Oxitetraciclina se utiliza el método turbidimétrico tal como lo describe la Farmacopea de los Estados Unidos (2) y un trabajo experimental(35), los cuales utilizan Staphylococcus aureus cepa de la serie ATCC No.6538-P y Acido Clorhídrico 0.1 Normal como disolvente del Antibiótico.

2.2.3.2. METODOS VOLUMETRICOS

El análisis volumétrico se basa en que el analito se determina de forma indirecta midiendo el volumen de una disolución de concentración conocida, que se necesita para que reaccione con el constituyente a analizar o con otra sustancia químicamente equivalente(10). Para el análisis de OTC.HCl estos métodos presentan varias ventajas: no requieren de equipo instrumental, son rápidos, presentan una precisión y exactitud en los resultados aceptables, versatilidad de reacciones tales como reacciones de neutralización, formación de precipitados, formación de complejos o reacciones de oxidación-reducción.

Las desventajas que presentan estos para el análisis de OTC.HCl

son: a) sensibilidad del orden de miligramos . b) necesita separación previa del principio activo de interés de los excipientes v/o principios activos diferentes. Un ejemplo de esto es el método que presentaron Hughes D.yWilson (10) , los cuales describieron un método analítico para la valoración ácido-base no acusa de Oxitetraciclina.

2.2.3.3. METODOS ELECTROQUIMICOS

Existen distintos métodos que presentan el punto final de la valoración cuantitativa de una sustancia activa por cambios en sus propiedades eléctricas. Cabe señalar que la mayor parte de éste tipo de tipo de métodos implica el trazado de una curva que indica la variación de una magnitud eléctrica en función de la cantidad de reactivo que se va añadiendo; el punto estequiométrico se pone de manifiesto en esta curva por una variación rápida de la propiedad eléctrica que se mide. Los métodos electroquímicos más utilizados son: Potenciométricos, Conductimétricos, Coulombimétricos y Amperométricos. Dentro de estos últimos se encuentran en especial las técnicas polarográficas, las cuales se aplican en particular para el análisis de Oxitetraciclina.

2.2.3.3.1. METODOS POLAROGRAFICOS

Estos se basan en la medida del flujo de corriente que se produce por la electrolisis de una solución en un microelectrodo polarizable, en función del voltaje aplicado.

Los polarogramas así obtenidos proporcionan información

cualitativa y cuantitativa de sustancias electroactivas, siendo específicas para cada tipo de compuesto electroactivo, diferenciándose los principios activos de interés, productos de degradación así como sustancias afines. Es un método no destructivo ya que solo reacciona en el electrodo una cantidad infinitesimal del soluto.

L. G. Chatten y P. E. Muskalik (36) realizaron análisis polarográficos cuantitativos para diferentes tetraciclinas entre ellas la OTC en diferentes formas farmacéuticas. Este estudio también tuvo como propósito investigar el efecto del pH y los diversos sistemas reguladores en la reducción de las Tetraciclinas, utilizando para ello un electrodo de mercurio.

Las conclusiones a la que llegaron estos investigadores fueron las siguientes: 1.- El pH de trabajo óptimo para OTC fue de 6 en solución reguladora de fosfatos, sin embargo, no fueron reproducibles los polarogramas a diferentes pHs en esta solución amortiguadora.

2.- La solución reguladora óptima fue la de Acido bórico-borato de sodio, debido a la reproducibilidad de los polarogramas obtenidos en diversos pHs de trabajo.

El método mencionado (36) presenta desventajas en el análisis cuantitativo de OTC.HCl debido al intervalo de concentración aplicable es de 10^{-2} a 10^{-5} Molar del soluto de interés. Si en una formulación también se encuentran otros principios activos y/o excipientes electroactivos, el método

se vuelve inespecífico. ejemplo: Clorhidrato de Procaina, Acido Ascorbico, conservadores y estabilizadores, Nistatina, Sulfato de Folimixina B, etc. Además el uso de soluciones reguladoras también afectan en el analisis (incremento en la diferencia de potencial por iones hidronio o hidroxilo).

2.3. ESTABILIDAD DE MEDICAMENTOS.

2.3.A. ASPECTOS GENERALES SOBRE ESTABILIDAD

2.3.A.1. DEFINICION DE ESTABILIDAD DE UN FARMACO

La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) denomina la Estabilidad de un fármaco como la capacidad del mismo de no sufrir cambios físicos o químicos (cuando es sometido a condiciones extremas de temperatura , pH, luz, humedad, etc.), que modifiquen su estructura y por consiguiente sus propiedades durante un periodo de tiempo denominado periodo de degradación (48).

La FDA describe a un fármaco muy estable como aquél que se degrada menos del 0.5% de la cantidad original etiquetada en un año a temperatura ambiente (48) y un fármaco estable como aquél que se degrada un 2.0% de la cantidad original etiquetada en un año a temperatura ambiente. Así pues deberá buscarse la formulación (excipientes) que den una mayor estabilidad al fármaco de interés (48).

2.3.A.2. PRUEBAS DE ESTABILIDAD

Las pruebas de estabilidad hoy en día son una parte integral en los Programas de Aseguramiento de Calidad de la Industria Farmacéutica en general (41).

Las predicciones de estabilidad derivadas de los resultados de esas pruebas representa una manera de asegurar la calidad que tanto contenedores, formas de empaque y formas farmacéuticas

cumplan con las características asignadas durante su vida de anaquel (ejemplo: características organolépticas, químicas, físicas microbiológicas para medicamentos de administración oral y/o productos farmacéuticos de administración intravenosa).

Las pruebas de Estabilidad acelerada (42) son utilizadas para predecir la pérdida de potencia de las diferentes formas farmacéuticas a diversas temperaturas e intervalos de tiempo.

Una de las razones para realizar programas de estabilidad acelerada es obtener una aproximación de la fecha de expiración aparente para un fármaco en una forma farmacéutica.

2.3.A.3. FASES DE ESTABILIDAD

Las Pruebas de Estabilidad han cobrado gran importancia para compañías farmacéuticas y agencias gubernamentales debido a la necesidad de asegurar que un producto farmacéutico mantendrá su integridad durante su vida de anaquel designada (45).

Se hace hincapie que las diferentes formulaciones tienen diversas fechas de caducidad, por lo que se propone establecer un programa de estabilidad internacional en el que se involucren varios factores inherentes a las diferentes formulaciones.

Estos factores se catalogan en cuatro actividades específicas:

- A) Estudios del principio activo así como de la formulación.
- B) Aseguramiento de la Estabilidad.
- C) Confirmación de los datos de estabilidad.
- D) Reanálisis periódico de las muestras en Estabilidad.

La relación de estas actividades va a establecer un programa de estabilidad específico.

2.3.A.3.1. PROGRAMA DE ESTABILIDAD POR FASES

En el desarrollo de un programa de estabilidad para un nuevo principio activo, así como su forma farmacéutica final se delimitan cuatro fases: I.- Etapa del nuevo principio activo.

Los objetivos de esta etapa son los siguientes: a) describir las propiedades físicas y químicas del fármaco para determinar los factores que promueven la degradación.

b) identificación de probables rutas de degradación y alguno de los productos de degradación resultantes.

c) desarrollar un método de análisis que sea específico para el fármaco en presencia de impurezas y productos de degradación.

II.- Etapa de la forma farmacéutica más conveniente. Los objetivos de esta etapa son: a) asegurar las características de estabilidad del principio activo en la formulación seleccionada, así como definir las condiciones de almacenamiento óptimas.

b) confirmar las rutas de degradación en la formulación escogida así como la validación de la especificidad y exactitud en el análisis cuantitativo del fármaco.

c) El tercer objetivo determina la vida de anaquel de la formulación seleccionada en el contenedor más adecuado que va a ser puesto a la venta. Así por ejemplo: Si un producto es inestable a un pH determinado en solución, lo más conveniente es administrarlo en forma sólida (tabletas, cápsulas) o si se quiere administrar por vía

parenteral se pensará en un liofilizado o polvo reconstituible en el momento de su uso.

III.- Elección del sistema contenedor.

IV.- Estudios de Estabilidad a largo plazo.

I.- ETAPA DEL NUEVO PRINCIPIO ACTIVO.

Los factores que influyen en la estabilidad del fármaco (47) son los siguientes:

1.- Humedad y pH. La Humedad es uno de los factores que afectan a la estabilidad directamente puesto que la adsorción de moléculas de agua en la superficie del fármaco induce a la descomposición hidrolítica. Ejemplo: El ácido Ascórbico se degradará rápidamente en presencia de humedad. La Aspirina se degrada a Ácido Salicílico, deben escogerse por lo tanto excipientes que le den estabilidad con respecto a la humedad.

2. Oxígeno.- Varios fármacos, especialmente aquellos que contienen el grupo funcional tiol, amina, aldehído o centros de insaturación son sujetos a degradación oxidativa en exposición al calor seco. Por ejemplo los antibióticos poliénicos como fumagilina y filipina pueden ser térmicamente destruidos como sólidos en presencia de aire.

Hay varias maneras por las cuales la oxidación puede ser inhibida en una formulación, ya sea adicionando en el contenedor Dióxido de Carbono, Nitrógeno o también agregando antioxidantes en la formulación. En algunos casos los solvatos e Hidratos son más estables químicamente que sus formas anhidras, por lo que la estructura cristalina de la sustancia cambia y modifica sus

propiedades físicas. Un ejemplo lo constituye el incremento del punto de fusión.

3. Luz.- Hay diversos compuestos farmacéuticos como Vitaminas A, B, C, D y E, Morfina, Fenotiazina, Sulfonamidas, que son sujetos a degradación fotolítica. El mecanismo que describe la degradación en su forma más simple involucra tres constantes de velocidad, las cuales dan por resultado una cinética de degradación de primer orden o de orden cero.

4. Estado cristalino.- Muchos compuestos orgánicos cristalinos pueden existir en más de una estructura polimórfica por lo que tendrán diversa actividad farmacéutica, algunos son inocuos pero otros son tóxicos (ejemplo: OTC y 4-EpiOTC). Para determinar el grado de cristalinidad hoy en día se cuenta con herramientas muy valiosas como la Calorimetría y la Difracción por Rayos X (47).

5. Manipulación mecánica.- Durante el proceso de fabricación se obtiene un tipo de cristal el cual presentará actividad, pero si hay mucha manipulación mecánica (ejemplo: agitación muy fuerte) se romperá el cristal o cambiará su forma perdiendo su actividad, así tenemos la producción de Insulinas (en forma inyectable, 47).

6. Complejación e interacción con excipientes.- Muchos fármacos logran estabilizarse formando complejos como por ejemplo: Benzocaina con Cafeína, vitamina D₃ con Beta-ciclodextrina, en otros casos aceleran la degradación ejemplo: Dicloxiclina en presencia de Ácido Estearico. Por lo que al formularse una forma farmacéutica sólida deberá tomarse en cuenta todos estos factores y así poder evaluar cuales son los más importantes y como contrarrestarlos (47).

11. ELECCION DE LA FORMULACION EXPERIMENTAL MAS CONVENIENTE.

Una vez establecido la forma farmacéutica, se procede a evaluar la formulación más adecuada que asegure la estabilidad de propiedades físicas. Ejemplo: las tabletas son sujetas a condiciones de luz muy fuertes para determinar si hay decoloración u oscurecimiento de las mismas o a condiciones de humedad y temperatura elevada para probar si hay alguna tendencia a endurecerse o ablandarse.

Cremas y ungüentos pueden ser puestos a temperaturas elevadas para determinar la tendencia de una separación de fases parcial o total. Así también se establece y evalúa la estabilidad química involucrando el desarrollo de métodos analíticos específicos para el principio activo en presencia de productos de degradación.

La causa común de la inestabilidad de sistemas farmacéuticos es de origen termodinámico (46), caracterizados por lo general por un nivel bajo de valores de Entropía que favorecen la degradación.

Hay seis efectos que resultan de la inestabilidad de un producto farmacéutico: 1.- Pérdida del fármaco (ejemplo: hidrólisis del Acido acetil salicílico).

2.- Pérdida del vehículo (ejemplo: elixir de morfina).

3.- Pérdida de la uniformidad de contenido (ejemplo: emulsiones rompimiento de las micelas por separación de fases. Otro

ejemplo lo constituyen las suspensiones (formación de sedimento).

4.- Reducción de la biodisponibilidad (ejemplo: características diferentes de la tableta dan por resultado cambios en el perfil de disolución).

5.- Desarrollo de la elegancia farmacéutica (interacción de fármacos que contienen el radical amino, con lactosa seca dan por resultado la aparición de manchas amarillas en las tabletas).

6.- Formación de materiales potencialmente tóxicos (ejemplo: partículas de vidrio en la esterilización por autoclave de soluciones que contienen citratos).

MUOS DE DEGRADACION.

La degradación de los productos farmacéuticos esta dada por mecanismos físicos, químicos o biológicos. Los cuales estan relacionados con reacciones cinéticas que los describen (cero, primero y segundo orden) basandose para ello en las ecuaciones de Arrhenius. Los datos cinéticos son buenos solamente cuando son usados en métodos experimentales. Desafortunadamente los métodos cromatográficos especialmente los de CLAF ofrecen una precisión aceptable en los ensayos indicadores de estabilidad. En los últimos años se le ha puesto a la degradación microbiológica atención debido al efecto que los microorganismos causan en la estabilidad de los sistemas farmacéuticos, sobre todo aquellos que entran en contacto directo con el sistema biológico (ejemplo: inyectables y soluciones oftálmicas) ya que causan problemas en la estabilidad física y química produciendo productos de degradación nocivos para el ser humano, así como la liberación de sus desechos metabólicos y una posible infección. El método que describe la cinética de mortandad es el proceso de esterilización.

111. ELECCION DEL SISTEMA CONTENEDOR

En esta etapa se evalúa el contenedor que de máxima seguridad al producto así como estabilidad al mismo. Por ejemplo para tabletas se buscará un contenedor que las proteja de la luz (en caso de sufrir decoloración), así tenemos frascos de vidrio color ámbar. Hay contenedores de vidrio que dada su naturaleza química interaccionan con el producto farmacéutico como es el caso de soluciones o suspensiones, por lo que, se pensará en un recipiente de estructura química diferente, ejemplo: frasco de plástico.

IV. ESTUDIO DE ESTABILIDAD A LARGO PLAZO

Esta es la etapa en la que se monitorea la estabilidad por un cierto periodo de tiempo (3-5 años) de la forma farmacéutica y contenedor seleccionados.

En términos generales 3 a 5 lotes producidos de la formulación propuesta son puestos a prueba y los análisis de estabilidad se hacen en el primer año cada tres meses, en el segundo año cada seis meses y a partir del tercer año en adelante cada año.

2.3.A.1. PROGRAMAS DE ESTABILIDAD

Basándose Robert Nash (44) en la observación hecha por Okusa determina el los valores estimados de energía de activación y constante de velocidad a la temperatura de anaquel deseada, mediante los análisis de los interceptos y las pendientes de diferentes curvas lineales a diversas temperaturas elevadas.

Para ello se apoyaron en la conocida ecuación de Arrhenius elaborando un programa denominado FUENECVLUSS, basado sobre el algoritmo escrito en lenguaje basic para uso en una computadora

persona: (IBM-PC).

Las características principales del nuevo modelo lineal para la predicción de la estabilidad son resumidas a continuación:

- 1.- El programa calcula energías de activación provisionales, de la cual se puede estimar una constante de velocidad de degradación.
- 2.- Pueden determinarse constantes de velocidad de la pérdida de principio activo a la temperatura deseada más un factor residual que se usa para distinguir entre dos tratamientos cinéticos básicos (cero y primer orden).
- 3.- El programa calcula periodos de expiración para casos de orden cero y primer orden, basados en límites estadísticos al 95%.
- 4.- El programa también provee de términos importantes en Termodinámica como Entropía, Energía Libre, que nos dan indicio del mecanismo de degradación térmico.
- 5.- Las características principales del programa es que presenta expresiones matemáticas especiales que permiten el cálculo de la temperatura estimada y la constante de velocidad de pérdida del principio activo en por ciento.

Las limitaciones de los modelos cinéticos y del programa Potencyloss se resumen como siguen:

- 1.- Reacciones de descomposición de soluciones acuosas y suspensiones pueden ser descritas por procesos de cero, primer o pseudo primer orden, incluyen reacciones de rearrreglo molecular, oxidación y reducción.
- 2.- En este modelo lineal la Potencia y los datos de tiempo son transformados logaritmicamente y las pendientes paralelas

resultantes a las diversas temperaturas de análisis son igual a la unidad (1.0).

3.- En sistemas a altas temperaturas ($>40^{\circ}\text{C}$), la ecuación de Arrhenius (log constante de velocidad de la reacción vs el recíproco de la temperatura absoluta) puede desviarse de la linealidad.

4.- La exactitud del presente modelo para estimar valores de de estabilidad del fármaco a diferentes temperaturas, dependen de la calidad de los datos que se proporcionen al programa. (Cabe señalar que las técnicas cromatográficas modernas CLAR Y CG con ayuda de sistemas computarizados reducen de manera significativa la variabilidad y dispersión de los ensayos).

2.3.A.5. MANEJO DE DATOS DE ESTABILIDAD

Hoy en día la Computadora es una herramienta indispensable para obtener información rápida de todos los procesos y programas que involucran la estabilidad de las diferentes formas farmacéuticas. Su versatilidad y eficiencia han creado una nueva dimensión para el manejo de los datos de estabilidad, siendo posible a mediano plazo avanzar rápidamente en aspectos legales y científicos de la industria farmacéutica. Por lo que hoy en día y a futuro es y será una herramienta indispensable para la optimización de las empresas farmacéuticas (43). Las aplicaciones son muchas entre ellas - la elaboración de diferentes Programas de Estabilidad.

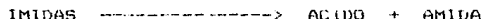
Elaboración de Protocolos de Estabilidad para diferentes - productos farmacéuticos. Control histórico de las evaluaciones realizadas para cada producto en un periodo de tiempo - establecido.

2.3.1. MECANISMOS DE DEGRADACION DE FARMACOS

Los Mecanismos de Degradación más comunes abarcan tres tipos:

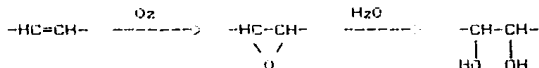
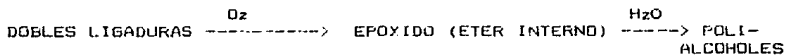
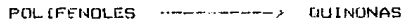
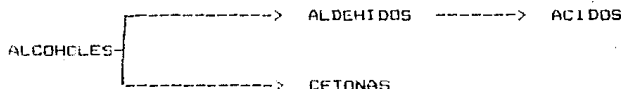
2.3.1.1. HIDROLISIS (47,49)

Los ejemplos de reacciones mas comunes son:



2.3.1.2. OXIDACION (47)

Los ejemplos de reacción más comunes son :



Siendo más fácil la oxidación en dobles ligaduras conjugadas (47).

2.3.1.3. DESCOMPOSICION (49)

Ejemplos de este mecanismo son: DESCARBOXILACION (eliminación de Dióxido de Carbono (CO₂))

DESHIDRATACION (eliminación de una molécula de agua) como es el caso de la familia de las Tetraciclinas que por eliminación de agua dan las Anhidrotetraciclinas (10).

2.3.2.4. FOTOLISIS (19)

La reacción fotoquímica es una fuente de degradación muy importante. La luz (artificial como natural) se considera como única fuente de radiación ultravioleta y visible. Una de las condiciones para que la reacción fotoquímica se produzca es que la molécula tenga máximos de absorción en la zona de longitud de onda de la fuente de radiación. Prácticamente todas las drogas usadas en la preparación de productos farmacéuticos tienen máximos de absorción en la región del Ultravioleta, pero esta radiación es interferida por el recipiente que contiene al fármaco.

Afortunadamente la actividad fotoquímica de las radiaciones disminuye al aumentar la longitud de onda, de modo que el recipiente puede ser un protector bastante eficaz. La USP XXI (2) establece que un recipiente protege de la luz si está hecho de un material tal que en un espesor de 22 mm no transmite más del 18% de luz entre 290 nm y 540 nm. Los compuestos con grupos cromóforos, tales como nitro, cetonas, sulfonas, nitroso, dobles y triples ligaduras conjugadas son sensibles a la radiación, tanto más su máximo de absorción se encuentre cercano a la región visible del espectro electromagnético.

Las radiaciones catalizan: ruptura de enlaces, oxidaciones, isomerizaciones, reordenamientos y racemizaciones. Un ejemplo de reacción fotoquímica lo constituye la cobamida que se destruye completamente en un corto tiempo de exposición.

2.3.1.4. FOTOLISIS (45)

La reacción fotoquímica es una fuente de degradación muy importante. La luz (artificial como natural) se considera como única fuente de radiación ultravioleta y visible. Una de las condiciones para que la reacción fotoquímica se produzca es que la molécula tenga máximos de absorción en la zona de longitud de onda de la fuente de radiación. Prácticamente todas las drogas usadas en la preparación de productos farmacéuticos tienen máximos de absorción en la región del Ultravioleta, pero esta radiación es interferida por el recipiente que contiene al fármaco.

Afortunadamente la actividad fotoquímica de las radiaciones disminuye al aumentar la longitud de onda, de modo que el recipiente puede ser un protector bastante eficaz. La USP XXI (2) establece que un recipiente protege de la luz si está hecho de un material tal que en un espesor de 22 mm no transmite más del 18% de luz entre 290 nm y 540 nm. Los compuestos con grupos cromóforos, tales como nitro, cetonas, sulfonas, nitroso, dobles y triples ligaduras conjugadas son sensibles a la radiación, tanto más su máximo de absorción se encuentre cercano a la región visible del espectro electromagnético.

Las radiaciones catalizan: ruptura de enlaces, oxidaciones, isomerizaciones, reordenamientos y racemizaciones. Un ejemplo de reacción fotoquímica lo constituye la cobamida que se destruye completamente en un corto tiempo de exposición.

2.3.2. MECANISMOS DE DEGRADACION DE OXITETRACICLINA.

Tanto la base como la sal (Clorhidrato) de este antibiotico son estables a temperatura ambiente por dos años, cuando son protegidos en recipientes adecuados herméticos de la luz y humedad.

Entre los productos de degradación conocidos existen dos que se sabe poseen actividad toxica (49); la anhidrooxitetraciclina y la epianhidrooxitetraciclina. Hasta ahora no se conocen la formación de productos de degradación por exposición a temperaturas de 40 a 60 ° C o mayores, así como por exposición a la Luz Ultravioleta, Artificial y Natural (posibles rutas, mecanismo y estructuras de los mismos, si es que los hubiere), pero debido a la complejidad de la Molécula de OTC, este fármaco sufre una serie de degradaciones por rutas conocidas que solo se dan bajo ciertas condiciones de reacción específicas.

Se conocen varias vías de degradación (50, 51) de las cuales las tres primeras son comunes, así tenemos:

- 1.- Degradación en Medio Alcalino.
- 2.- Degradación en Medio Acido.
- 3.- Degradación Reductiva.
- 4.- Degradación Oxidativa.
- 5.- Isomerización.- Ésta no se considera como vía exactamente, ya que solo se obtiene un producto. (Formación del epímero).

A continuación en forma breve se describirán las vías de degradación, los productos de degradación conocidos y sus estructuras.

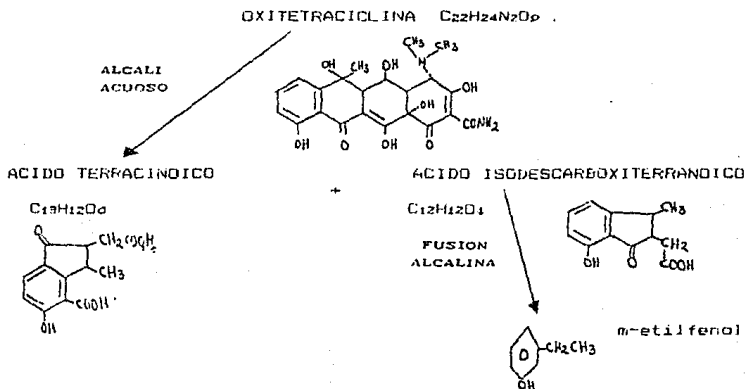
2.3.2.1. DEGRADACION EN MEDIO ALCALINO (50)

La Oxitetraclina es susceptible a degradarse cuando se somete a la acción de las bases. Los alcalis acuosos provocan la formación de la mezcla racémica de un compuesto: El Acido terracínico (50). Ver Esquema No.1.1.

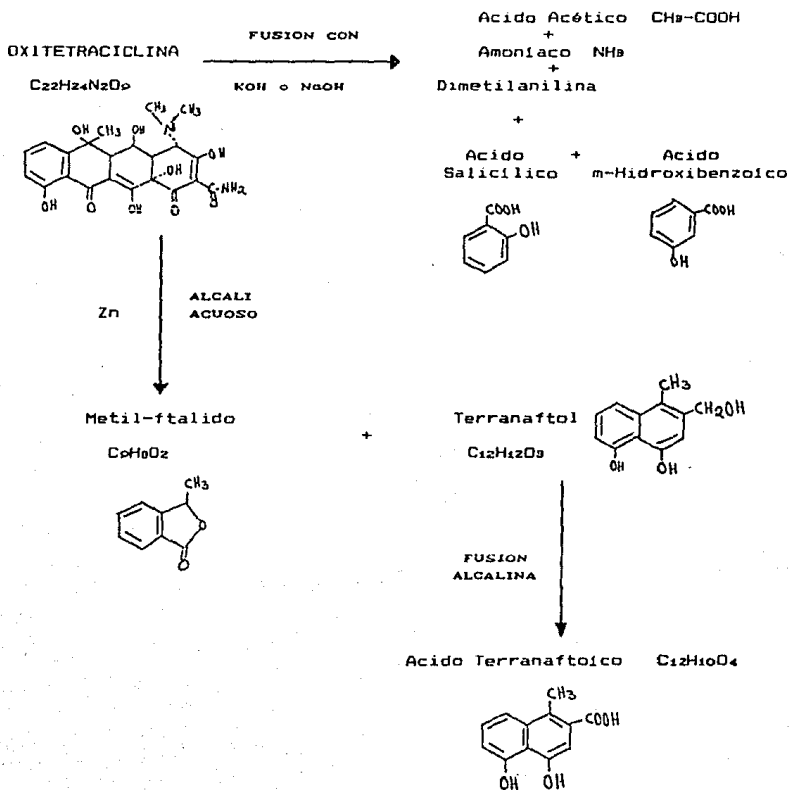
Cuando la OTC se somete a la acción de los alcalis acuosos en presencia de Zinc metálico se forman dos compuestos: El metilftalido y el Terranaftol (50). Sometiendo este último a fusión alcalina se obtiene el Acido Terranaftoico (Ver Esquema No.1.2.).

Fundiendo directamente la OTC con bases fuertes como KOH y NaOH se obtienen como productos de la reacción: Acido acético, Acido succínico, Acido salicílico, Acido α -acetil salicílico y Acido *m*-hidroxibenzoico.(50). Ver Esquema No.1.2.

ESQUEMA No.1.1. Serie de degradación de Oxitetraclina en medio Alcalino



ESQUEMA No.1.2. Serie de Degradación de Oxitetraciclina en medio Alcalino.



2.3.2.2. DEGRADACION EN MEDIO ACIDO (50).

La Oxitetraclina sometida a la acción química de ácidos fuertes se degrada, de acuerdo a la serie de degradación ácida, el primer compuesto formado es la anhidrooxitetraclina, una sustancia muy lábil que en condiciones ácidas se convierte fácilmente en una mezcla de dos compuestos: Las α y β apooxitetraclinas, las que a su vez se interconvierten muy fácil entre si en medio ácido o básico (Ver Esquema No.2.1.).

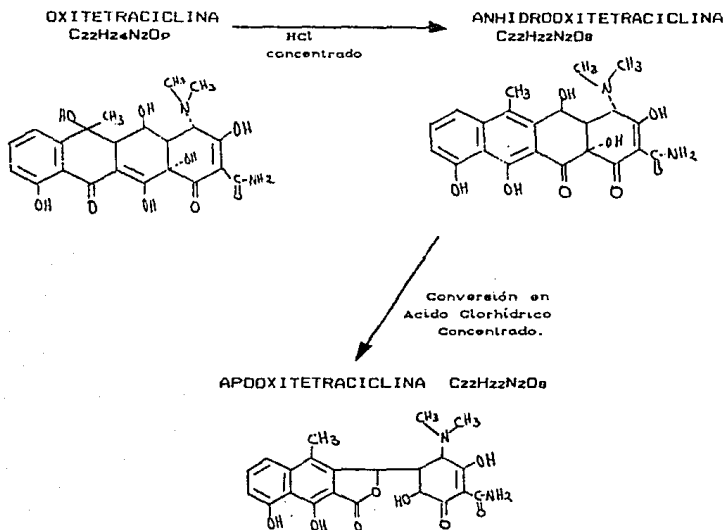
Estos estereoisómeros tienen propiedades fisicoquímicas y químicas muy similares, tales como espectros de absorción UV, misma solubilidad, etc., además que su transformación a terrinólidos ocurre bajo condiciones químicas similares, y aunque poseen la misma estructura desarrollada difieren en la orientación del sistema enol-dicarbonílico y del grupo amida.(50).

Las alfa y beta apooxitetraclinas a su vez en ácido sulfúrico 12 normal y expuestas por 72 horas, dan origen a otro compuesto llamado Descarboximidoterrinólido (Esquema No.2.2.).

Las formas estereoisoméricas de la Apooxitetraclina en condiciones ácidas también forman otro compuesto el 1,8-dihidrobenzofalido (Esquema No.2.2.).

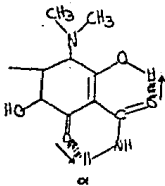
La Apooxitetraclina sometida a fusión alcalina da origen al ácido terranaftoico (Ver Esquema No.2.2.).

ESQUEMA No.2.1. Serie de Degradación de Oxitetraciclina en Medio Acido.

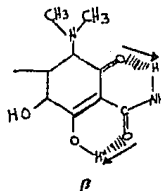


Estructura química de las formas Estereoisoméricas de la Apooxitetraciclina (Apoterramicina).

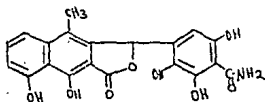
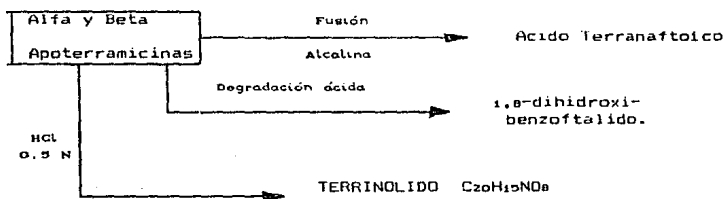
Alfa-apoterramicina



Beta-apoterramicina

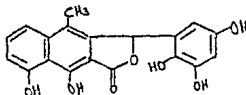


ESQUEMA No.2.2. Serie de Degradación de Oxitetraciclina en medio
Acido



H_2SO_4 12 Normal
72 horas

DESCARBOXIMIDDTERRINOLIDO $C_{19}H_{17}O_7$



2.3.2.3. DEGRADACION REDUCTIVA (50).

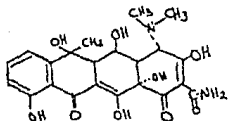
La Oxitetraciclina puede ser objeto de reacciones de reducción con agentes adecuados, lograndose eliminar el grupo dimetilamino y, dependiendo de las condiciones de la reacción, uno de los grupos hidroxilo.

Mezclando Oxitetraciclina con polvo de Zinc y ácido acético glacial a 30 °C durante 8 horas, se obtiene un compuesto: el desdimetilamino-oxitetraciclina (Ver Esquema 3.1.).

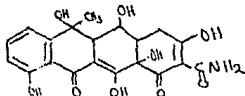
Bajo las mismas condiciones pero expuesto durante 4 días, se obtiene el desoxi-desdimetilamino-oxitetraciclina.

Este compuesto en condiciones alcalinas da origen a isodesoxi-desdimetilamino-oxitetraciclina (50). (Ver Esquema No.3.2.)

ESQUEMA No.3.1. Via de Degradación Reductiva para Oxitetraciclina.

OXITETRACICLINA $C_{22}H_{24}N_2O_8$.

ACIDO ACETICO
Zn, 8 horas

DESDIMETILAMINOXITETRACICLINA $C_{20}H_{18}NO_8$ 

ESQUEMA No.3.2. Via de Degradación Reductiva para OTC.

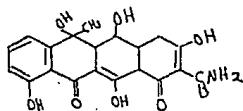
OXITETRACICLINA



ACIDO ACETICO
Zn, 30 °C.
4 días.

DESOXI-DESDIMETILAMINO-OXITETRACICLINA

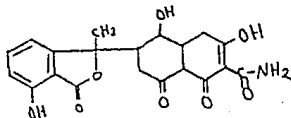
$C_{20}H_{19}NO_8$



KOH
ETANOL

ISODESOXI-DESDIMETILOAMINO-OXITETRACICLINA

$C_{20}H_{17}NO_8$



2.3.2.4. DEGRADACION OXIDATIVA (50).

En ninguno de los casos al someterse a condiciones extremas de degradación por vía oxidativa se pudo identificar algún producto de degradación conocido, obtenidos por las vías anteriores; sin embargo, en la mayoría de ellos se obtuvieron compuestos comunes conocidos como Acido Oxálico, Iodoformo, Amoniaco, Dimetilamina (50).

ESQUEMA No.4. Vías de Degradación oxidativas para Oxitetraciclina.

UTC $\xrightarrow[\text{Acetona}]{\text{sol. KMnO}_4}$ Dimetilamina + Amoniaco + Producto de Degradación no identificado.
 $\text{H}_3\text{C-NH-CH}_3$
 NH_3

UTC $\xrightarrow[2 \text{ hrs. } 25^\circ \text{C}]{8 \text{ IO}_4^-}$ No se identificaron aldehidos ni posibles productos de degradación.

UTC $\xrightarrow{\text{IO}^-}$ Iodoformo + Ningún otro producto de degradación logro identificarse.
 CHI_3

UTC $\xrightarrow{\text{HNO}_3 \text{ al } 15\%}$ Acido Oxálico + Cantidades pequeñas de un Acido fenólico nitrado (No se conoce estructura)
 HOOC-COOH
 p.f. = 217.5-218.5 °C

2.3.2.5. ISOMERIZACION (FORMACION DEL EPIMERO).

La Oxitetraciclina es susceptible a la reacción de epimerización en el carbono 4 originando una nueva serie de compuestos, las 4-epitetraciclinas (puesto que también lo forman las demás Tetraciclinas) denominadas también cuatrimicinas.

La reacción de epimerización se lleva a cabo en una variedad de sistemas de disolventes en un intervalo de pH entre 2 y 6, la velocidad de reacción se incrementa en presencia de ciertos aniones tales como fosfato, citrato y acetato (51). También se ve afectada por cationes polivalentes y urea (52).

Mc Cormick y colaboradores (51) reportan un método de epimerización de oxitetraciclina utilizando como disolvente una mezcla de: Tetrahidrofurano (THF), Dimetilformamida (DMF) y en otro caso ácido acético.

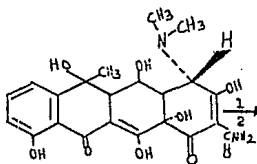
Las condiciones de reacción para ambos casos son las siguientes:

1. THF-DMF-Na₂HPO₄ 1M pH=5.3, 20 horas a 25 °C, obteniendo un 38% de 4-epioxitetraciclina.
2. Ácido Acético glacial a 25 °C, durante 20 horas se obtiene un 27% del compuesto epimero.

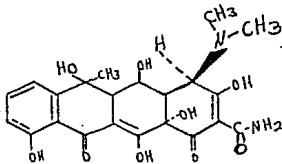
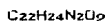
La reacción de Epimerización se muestra en el esquema No.5.

ESQUEMA No.5. Formación del Epímero de Oxitetraciclina.

OXITETRACICLINA



EPIOXITETRACICLINA



En comparación con la Oxitetraciclina, la Epioxitetraciclina tiene mayor absorbancia en la región UV del espectro (50), mayor estabilidad en soluciones acuosas alcalinas y ácidas, menor poder rotatorio óptico y por supuesto menor actividad antimicrobiana "in vitro" contra Staphylococcus aureus (51).

CAPITULO 3.
PARTE EXPERIMENTAL.

3.1. DESARROLLO DEL METODO.

3.1.1. MATERIAL Y EQUIPO

Microjeringa Hamilton 25 microlitros

Balanza analítica Mettler (Precisión ± 0.01 mg).

Cromatografo de Liquidos equipado con una bomba Waters Modelo 6000

Inyector manual Waters Modelo U6K. Detector Ultravioleta Waters

Modelo 440 integrado por filtro y monocromador de longitud de onda

fija 254 nm, acoplado a un integrador Hewlett-Packard Modelo 3390 A.

Potenciómetro Beckman Modelo Φ - 4B

Columna Hypersil MOS C8 5 micras. (100 x 2.1 mm ϕ interno) Hewlett-Packard.

3.1.2. REACTIVOS.

Metanol grado HPLC Baker

Acido Fosfórico R.A. Baker.

Agua destilada grado HPLC.

Hidroxido de Amonio grado R.A. Baker. (concentrado 28-30%).

Acido Clorhidrico grado R.A. Baker. (concentrado 36.9%).

Agua oxigenada grado R.A. Baker.

Solución reguladora de Citrato-Acido Citrico. pH = 4.00 ± 0.02 . Merck.

Solución reguladora de Fosfatos. pH = 7.00 ± 0.02 . Merck.

Clorhidrato de Oxitettraciclina. Materia Prima. Pureza 0.987 g DTC base por grano de la sal.

Clorhidrato de Oxitettraciclina grado patrón de Referencia. Pureza química 92.0% DTC base seca.

Fenacetina grado materia prima.

Acido Ascórbico grado FNEUM.

Muestras del producto estudiado.

Muestras comerciales diferentes del producto comercial fabricado por laboratorio (Terramicina y Oxigricol).

3.1.3. PREPARACION DE SOLUCIONES.

3.1.3.1. ACIDO FOSFORICO 0.1 MOLAR.

Colocar 6.8 ml de Acido Fosforico grado analitico en un matraz volumetrico de 1000 ml, que contenga aproximadamente 500 ml de agua grado HPLC. Agitar bien y diluir con agua grado HPLC hasta el aforo.

El pH de esta solución es igual a 1.74 ± 0.04 .

3.1.3.2. FASE MOVIL.

Preparar 500 ml de fase móvil: Metanol-Acido Fosfórico 0.1 Molar (10:90) en un matraz erlenmeyer de 1000 ml, para ello mezclar por medición en diferentes probetas 50 ml de Metanol grado HPLC y 450 ml de Acido Fosfórico 0.1 Molar. Agitar bien. Filtrar a través de membrana Millipore de 0.22 micras. Desgasificar con Helio o vacío y/o agitación magnética por 10 minutos cubriendo con papel parafilm el matraz erlenmeyer. El pH final de esta fase móvil preparada es igual a 1.84 ± 0.04 .

3.1.4. PREPARACION DE SOLUCIONES PATRON DE REFERENCIA.

3.1.4.1. PATRON DE REFERENCIA INTERNO (FENACETINA).

Pesar 10 mg de fenacetina reactivo analitico, transferirla a un matraz de material plástico volumétrico de 100 ml y lavar con 10 ml

de Metanol grado HPLC la cara interna del papel. Agitar para disolver la Fenacetina en metanol, aforar con agua grado HPLC y mezclar perfectamente. (concentración 0.2 mg. ml^{-1}). Esta es la solución A.

De la solución A tomar 5 ml y transferir a otro matraz de material actínico volumétrico de 100 ml. Aforar con fase móvil. Esta es la solución A.L. (concentración 0.01 mg.ml^{-1}).

3.1.4.2. SOLUCION DE CLORHIDRATO DE OXITETRACICLINA.

Pesar del Clorhidrato de Oxitettraciclina (Patrón de Referencia) el equivalente a 20 miligramos de Oxitettraciclina base anhidra (2) y transferirlo a un matraz de material actínico volumétrico de 100 ml.

Lavar la cara interna del papel con 20 ml de agua grado HPLC y disolver con ultrasonido durante cinco minutos. Enfriar a temperatura ambiente, aforar con agua y mezclar bien. Esta es la solución B.

De la solución B tomar una alícuota de 5 ml y transferir a un matraz volumétrico de 100 ml (material actínico), aforar con fase móvil y mezclar perfectamente. (esta es la solución B.1).

De la solución B transferir una alícuota de 5 ml a un matraz volumétrico de 100 ml (material actínico) que contenga 5 ml de solución A (patrón de referencia interno), aforar con fase móvil y mezclar bien (Concentración final de los solutos: 0.01 mg. ml^{-1}).

Esta es la solución AB.

3.1.5. PREPARACION DE MUESTRAS.

Pesar del producto fabricado por el laboratorio, el equivalente a 20 mg de OTC base seca y transferir a un matraz de material actínico volumétrico de 100 ml. Lavar la cara interna del papel con 20 ml de agua grado HPLC y disolver con ultrasonido durante 5 minutos. Enfriar a temperatura ambiente, aforar con agua y mezclar bien (esta es la solución C).

NOTA: Para productos comerciales sólidos diferentes al estudiado (Terramicina^R) se pesan 20 mg de OTC base seca, utilizar papel Whatman No.42 si es necesario filtrar.

Para productos comerciales líquidos diferentes al estudiado (Oxigricol^R) tomese la alícuota correspondiente a 20 mg de OTC base seca

Transferir 5 ml de la solución C a otro matraz volumétrico de material actínico de 100 ml, aforar con fase móvil y mezclar bien. Esta es la solución C.1.

Tomar 5 ml de la solución C y transferirlos a otro matraz de material actínico volumétrico de 100 ml que contenga 5 ml de la solución Patron de Referencia interno (solución A). Aforar con fase móvil y mezclar bien. (concentración final de los solutos: 0.01 mg.ml⁻¹). Esta es la solución AC.

3.1.5.1. SOLUCION PLACEBO

Pesar 26.98 mg de Acido Áscórbico y transferir la pesada a un matraz volumétrico de 100 ml, aforar con agua y agitar bien. Esta es la solución R. De la solución anterior transferir 5 ml a otro matraz volumétrico de 100 ml y aforar con fase móvil. Esta es la solución R.1.

3.1.6. CONDICIONES CROMATOGRAFICAS.

Después de realizar estudios de diferentes condiciones cromatográficas (fase móvil, pH, velocidad de flujo, tipo de columna, etc.), las condiciones óptimas encontradas que presentan mayor Eficiencia (Platos Teóricos (N) para OTC.HCl = 51 626.56 y N Fenacetina = 20 909.16) y Resolución (entre ambas señales de interés $R_s = 4.67$) fueron las siguientes:

TECNICA SELECCIONADA: CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE FASE INVERSA
 MECANISMO DE SEPARACION: PARTICION
 TIPO DE ELUCION: ISOCRATICA
 FASE MOVIL: METANOL:ACIDO FOSFORICO 0.1 M (10:90).
 pH de la Fase Móvil = 1.84 ± 0.04 .
 TEMPERATURA: AMBIENTE.
 LONGITUD DE ONDA: 254 nanómetros.
 COLUMNA: HYPERSIL MOS C₈ (100 x 2.1 mm de diámetro interno) 5 micras. Hewlett-Packard.
 VELOCIDAD DE FLUJO: 0.9 ml/min.
 PRESION: Aproximadamente 3000 psi.
 VOLUMEN DE INYECCION: 10 microlitros.

PARAMETROS DE INTEGRACION

ATENUACION: 4 (16).
 VELOCIDAD DE CORRI: 0.2 cm/min.
 AMPLITUD DE LA SEÑAL: 0.04 - 0.16 cm.

Con estas condiciones se inyectaron en el orden siguiente: 10 mcl de solución placebo (solución R.1.).

10 mcl de solución patrón de referencia (solución B.1).

10 mcl de solución patrón de referencia interno (solución A.1.).

10 mcl de una mezcla de solución de Patrones: Referencia Interno (solución AB).

y finalmente 10 mcl de solución muestra (solución C.1).

3.1.6.1. PROCEDIMIENTO.

Purgar el sistema con fase móvil y dejar estabilizar utilizando una velocidad de Flujo de 0.9 ml/min.

Inyectar al menos 4 veces 10 mcl de la solución patrón de referencia y calcular el % de C.V.

Si el % C.V. es menor o igual al 2%, se procede a inyectar los 10 microlitros de muestra problema.

Nota: Debe seguirse éste procedimiento cada vez que se hagan análisis cuantitativos, de acuerdo al procedimiento de preparación del Sistema Cromatográfico marcado por la USP XXI (2).

3.2. VALIDACION DEL METODO

Una vez obtenidas las condiciones cromatográficas optimas se procedió a su validación. (ver Apéndice No.1 , pag.89).

Los parametros evaluados fueron los siguientes:

- 3.2.1. ESPECIFICIDAD
- 3.2.2. LINEALIDAD
- 3.2.3. EXACTITUD
- 3.2.4. PRECISION

3.2.1. ESPECIFICIDAD

Se sometió a degradación tanto el placebo como el fármaco de acuerdo al siguiente programa:

3.2.1.1. FARMACO SOLAMENTE

Muestras de Clorhidrato de Oxitetraciclina (materia prima) equivalente a 20 mg de UTC.base seca contenidas en diferentes matraces de material actinico volumetricos de 100 ml, se expusieron directamente a los siguientes factores de degradación (Tabla 1).

TABLA 1 DIFERENTES CONDICIONES DE DEGRADACION PARA OXITETRACICLINA.

FACTOR	VARIABLE	TIEMPO
ACIDO pH	3 ml de HCl concentrado	12 horas recien preparado recien preparado y hasta las 4 hrs.
	3 ml de HCl diluido. 5 ml de HCl 0.1 Normal.	
BA501.0	5 ml de NH4OH concentrado	12 horas
OXIDACION	0.5 ml de Agua oxigenada Solución de Prueba (2).	12 horas

Al término del período de degradación se procedió de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente (pág. 50).

Se acondicionó suficiente cantidad de clorhidrato de Oxitetra-
ciclina (materia prima) en diversas bolsas de plástico transparente,
las cuales fueron expuestas a los siguientes factores de degradación
(ver tabla No.2).

TABLA No.2 DIVERSAS CONDICIONES DE DEGRADACION PARA EL ESTANDAR
DE OXITETRACICLINA.

FACTOR	VARIABLE	TIEMPO
LUZ	Natural	30 - 45 días.
	Ultravioleta	30 - 45 días.
TEMPERATURA	a 60 °C	30 - 45 días.
	> 60 °C (Se flameo al mechero un tubo de ensaye que contenía muestra de OTC.HCl)	5 segundos.

Al terminar el período de degradación se procedió de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente (pág.50).

3.2.1.2. PLACEBO SOLAMENTE

Muestras de placebo equivalentes a las descritas en la
formulación comercial estudiada y contenidos en diferentes matraces
volumétricos de 100 ml, se expusieron directamente a los siguientes
factores de degradación. (tabla No.3).

TABLA No.3 DIVERSAS CONDICIONES DE DEGRADACION PARA EL PLACEBO DE LA FORMULACION DE OXITETRACICLINA.

FACTOR	VARIABLE	TIEMPO
pH	ACIDO 5 ml de HCl concentrado	12 horas.
	BASICO 5 ml de NH ₄ OH concentrado	12 horas.
OXIDACION	0.5 ml de agua oxigenada solucion de Prueba (2).	12 horas.

Al finalizar el periodo de degradación se procedio de acuerdo a lo mencionado anteriormente (página No.50).

Cantidad suficiente de placebo contenidas en diversas bolsas de polietileno transparente, se expusieron a los siguientes factores de degradacion. (Ver Tabla No.4).

TABLA No.4 CONDICIONES DE DEGRADACION PARA EL PLACEBO DE LA FORMULACION DE OXITETRACICLINA.

FACTOR	VARIABLE	TIEMPO
LUZ	Natural	30 - 45 dias.
	Ultravioleta	30 - 45 dias.
TEMPERATURA	a 60 C	30 - 45 dias.
	> 60 C (Se flameo al mechero un tubo ensaye que contenia placebo)	5 segundos.

Al finalizar el periodo de degradación se pesaron los mg necesarios de placebo equivalentes a los descritos en la formulación comercial estudiada y entonces se procedió de acuerdo al proced-

dimiento descrito en el inciso 3.1.5. Preparación de muestras (página No.50).

3.2.1.3. PLACERO y FARMACO

En diferentes matraces de material actínico volumétricos de 100ml se pesaron del producto estudiado , el equivalente a 20 mg de OIC base seca, exponiendolos a los factores de degradación señalados en la tabla No.3.

Al finalizar el periodo de degradación se procedió a lo descrito en el punto preparación de muestras (pág.50).

Cantidad suficiente de producto comercial estudiado fue puesto en diferentes bolsas de polietileno transparente , exponiendose a los factores de degradación señalados en la Tabla No.4.

Al terminar el periodo de degradación se peso el equivalente a 20 mg de OIC base anhidra , entonces se procedió a preparar las de la manera indicada (pág.50).

De las muestras sometidas a las diferentes condiciones de degradación (3.2.1.1. , 3.2.1.2. y 3.2.1.3.) se inyectaron de cada solución rinal volúmenes de 10 mcl, en las condiciones cromatográficas descritas (pág.51).

3.2.2. LINEALIDAD

Se determino preparando una curva de calibración y evaluando seis puntos de la misma en diferentes días. El rango de porcentajes del fármaco oscilo del 80% al 120% respecto al marbeto del producto comercial estudiado. Para ello se preparo solución patrón de Clorhidrato de Oxitetraciclina (solución B).

Solución patrón de referencia interna (solución A).

Solución de placebo (solución R.1).

A partir de las cuales se lleva a cabo el programa de trabajo esquematizado en la Tabla No.5 (Curvas de Linealidad 1,2,3,4 y 5).

TABLA No.5 CUADRO ESQUEMATICO DE PREPARACION DE LA CURVA PROBLEMA

	PLACEBO	UTC.HCl	PATRON INTERNO	
T	5 ml +	2.5 ml +	5 ml	Transferirlos a diferentes matraces volumétricos de 100 ml. Aforar con fase móvil y mezclar vigorosamente.
U	5 ml +	3.5 ml +	5 ml	
M	5 ml +	4.5 ml +	5 ml	
A	5 ml +	5.0 ml +	5 ml	
R	5 ml +	5.5 ml +	5 ml	
	5 ml +	6.0 ml +	5 ml	

Se inyectó de cada solución final 10 µl en las condiciones ----- cromatográficas descritas anteriormente (pág.51).

Gráficamente % encontrado vs % adicionado, se obtendrán datos tales como pendiente (m) , intercepto (b) y coeficiente de correlación (r). Los cuales se obtienen por tratamiento estadístico. Ver Apéndice No.1, en el inciso que habla de Linealidad (pág.42).

Los resultados de Linealidad se muestran en las páginas 71 y 73.

3.2.3. EXACTITUD

Se evaluó, utilizando los valores obtenidos para la Linealidad y aplicando el procedimiento estadístico descrito por Massart, Dijkstra y Kaufman (74). Vease el procedimiento estadístico para evaluar Exactitud en el Apéndice No.3 (pág.98).

3.2.4. PRECISION

Se evaluó por el grado de Reproducibilidad y Repetibilidad del método, de acuerdo a la tabla No.6 . Para determinar la Repetibilidad y Reproducibilidad del método se utilizó el mismo producto comercial en estudio con No.Lote 104098, analizando por triplicado en diferentes días y evaluada por dos diferentes analistas cada día.

TABLA No.6 PRECISION DEL METODO PARA LA DETERMINACION DE OTC

PARAMETRO	REPETIBILIDAD			
	DIA 1		DIA 2	
	MUESTRA	ANALISTA	MUESTRA	ANALISTA
R E P R O D U C I B I L I D A D	1	1	1	1
	2	1	2	1
	3	1	3	1
	1	2	1	2
	2	2	2	2
	3	2	3	2

Se siguió el procedimiento de preparación de soluciones y muestras mencionados y se analizaron inyectando para ello 10 µl de cada solución final, realizando el análisis en las condiciones seleccionadas (pág.99).

Finalmente se aplicará un procedimiento estadístico descrito por Massar, C. Dijkstra y Kaufman (20). Véase el Procedimiento estadístico para Precisión en el Apéndice No.4 (pág. 48).

Los resultados se muestran en las páginas 74 y 75.

3.3. APLICACIONES

Una vez validado el método experimental, se procedió a evaluar las posibles aplicaciones que pudiera tener éste de acuerdo al siguiente programa establecido:

3.3.1. APLICACION EN EL ANÁLISIS CUALITATIVO Y/O CUANTITATIVO DE OTRAS TETRACICLINAS DIFERENTES A LA DTG.

Para el análisis cualitativo se preparó una solución patrón de referencia. Pesando 20 mg de DTG.HCl y 20 mg de Tetraciclina.HCl respectivamente. Se transfirieron a un mismo matraz volumétrico de 100 ml, lavando la cara interna del papel con 20 ml de agua grado HPLC y se disolvieron con ultrasonido durante 5 minutos. Se cifó con agua grado HPLC y mezcló vigorosamente. De esta solución 5 ml se transfirieron a otro matraz volumétrico de 100 ml, diluyendo con fase móvil hasta el aforo, se mezcló bien. De la solución final se inyectaron 10 µl y se evaluó en las condiciones cromatográficas ya indicadas.

3.3.2. APLICACION EN EL ANÁLISIS CUANTITATIVO DE MUESTRAS COMERCIALES DIFERENTES AL PRODUCTO FARMACEUTICO ESTUDIADO - QUE CONTIENEN DTG.HCl

Para ello se utilizaron muestras comerciales de TERRAMICINA^R (Capsulas) y OXANTICOL^F (Solución inyectable), procediendo de

acuerdo a lo especificado en el párrafo de preparación de la muestra y patrones de referencia.

Nota: Dentro de los puntos de énfasis para la preparación de estas muestras cabe mencionar que: para Terramicina se utilizó agitación magnética por 15 minutos para disolver la muestra antes de añorar en la primera dilución. Para Oxigricol.- Se tomó alícuota de 1 ml equivalentes a 20 mg de OTC base seca, lavándose las paredes con agua, en la primera dilución a 100 ml.

De estas diferentes soluciones finales se inyectaron 10 µl y se evaluaron cuantitativamente de la manera indicada.

Los resultados se muestra en la página 76.

3.4. ANÁLISIS DE MUESTRAS EN ESTABILIDAD

Una vez validado el método se procedió al análisis de las diferentes muestras comerciales sometidas a degradación (El factor al que fueron expuestas fue la temperatura durante un periodo de 2 años, Ver Tabla No.7).

TABLA No. 7 LOTES ANALIZADOS EN ESTABILIDAD

LOTE	DESCRIPCION	TEMPERATURA
001	(100 mg OTC fase sólida)	T.A.
002	(50 mg OTC fase sólida)	37°C.
003-A	(50 mg OTC fase sólida)	T.A.
-B	(50 mg OTC fase sólida)	37°C.
004-A	(50 mg OTC fase sólida)	T.A.

T.A. = Temperatura ambiente

La preparación de muestras y las condiciones de trabajo son las mismas que las utilizadas en la parte de validación.

Nota: La cuantificación se hizo por Patrón de Referencia Interno.

CAPITULO 4.

RÉSULTADOS.

4.1. DESARROLLO DEL METODO

En los diversos cromatogramas obtenidos pueden observarse las diferentes señales correspondientes al placebo (figura 1), fármaco (figura 2) y fenacetina (patrón interno, figura 3).

Además la Eficiencia que existe en cada uno de ellos demuestra que las condiciones cromatográficas son adecuadas para efectuar los análisis. (Nota: fig. = figura).

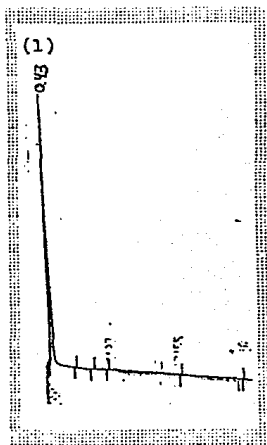


Fig.1- Cromatograma

correspondiente al placebo (1).

Nota: Fase móvil y placebo tienen el mismo tiempo de retención, por eso se incrementa la señal.

Fig.2-Cromatograma correspondiente a Oxitetraciclina (2).

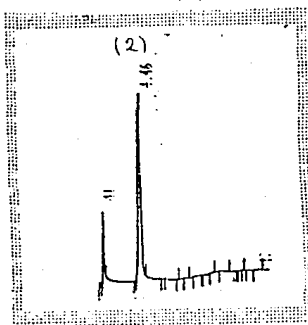
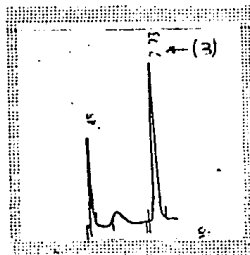


Fig.3-Cromatograma corres-

pondiente a la señal de Fenacetina (3).



En el cromatograma de la figura 4, se muestra la Resolución y la Eficiencia adecuadas que presentan las señales del placebo y el fármaco.

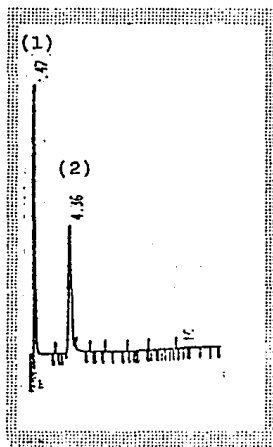


Fig.4-Cromatograma típico de una muestra, formada por el placebo (1) y Clorhidrato de Oxitetraciclina (2).

En el cromatograma de la figura 5, se observa que existe una Resolución adecuada (el valor de $R_{s \text{ exp.}} = 4.67 > 1.0$) entre las señales de interés, según lo reportado en la bibliografía (30) por lo que se procedió a su validación.

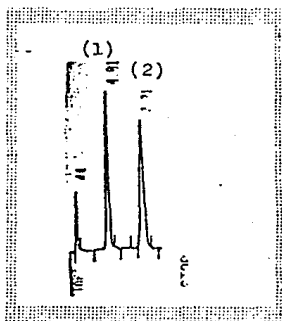


Fig.5-Cromatograma correspondiente al patrón de referencia y el patrón de referencia interno.

Señales del Clorhidrato de Oxitetraciclina (1) y Fenacetina (2) respectivamente.

4.2. VALIDACION DEL METODO

4.2.1. ESPECIFICIDAD

4.2.1.1. DEGRADACION DE OXITETRACICLINA.

Estudios de pH

En el cromatograma de la figura 6 y 7 se puede observar que hay total degradación del fármaco (OTC.HCl), expuesto a las condiciones acidas muy fuertes.

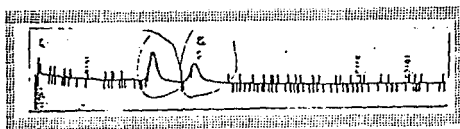


Fig.6-Señal correspondiente al Clorhidrato de Oxitetraciclina, expuesto en Acido Clorhidrico concentrado 12 horas.

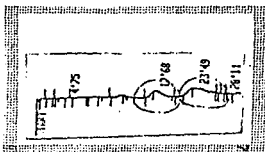


Fig.7-Señal correspondiente al Clorhidrato de Oxitetraciclina expuesto en Acido Clorhidrico diluido por 12 horas.

En los cromatogramas (8.1. y 8.2.) no se observó formación de productos de degradación, cuando el fármaco fue expuesto a condiciones acidas muy leves (HCl 0.1 Normal).

CROMATOGRAMAS

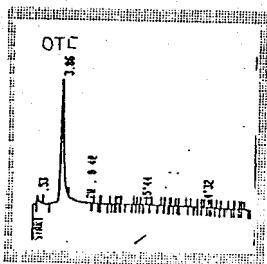


Fig.8.1.-Señal correspondiente a OTC.HCl expuesta en Acido Clorhídrico 0.1 Normal por 4 horas.

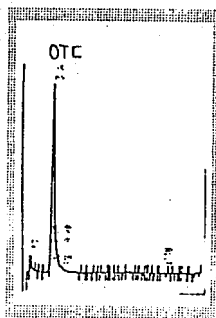


Fig.8.2.-Señal correspondiente a OTC.HCl expuesta en Acido Clorhídrico 0.1 Normal recién preparada.

En el cromatograma de la figura 9, se observaron productos de degradación que no interfieren en el análisis de OTC.HCl al ser expuesta a condiciones básicas fuertes.

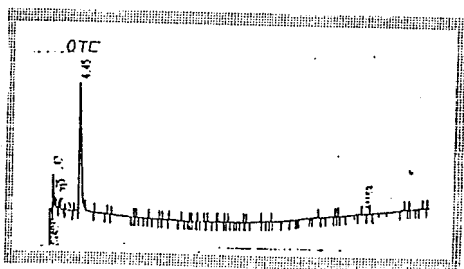


Fig.9.-Señal correspondiente a Clorhidrato de Oxitetra-ciclina, expuesta en Hidróxido de Amonio concentrado por 12 horas.

Estudios de Oxidación

En el cromatograma de la figura 10, se observaron productos de degradación que no interfieren en el análisis de OTC.HCl al ser expuesta a condiciones de oxidación muy fuertes.

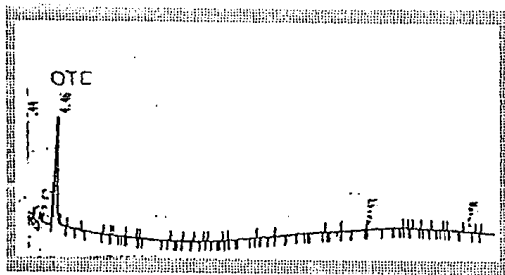


Fig.10.-Señal correspondiente a OTC.HCl expuesta en Agua oxigenada durante 12 horas.

Estudios Fotolíticos

En los cromatogramas de las figuras 11 y 12, no se detecto la formación de productos de degradación al ser expuestos en condiciones de luz natural y ultravioleta respectivamente.

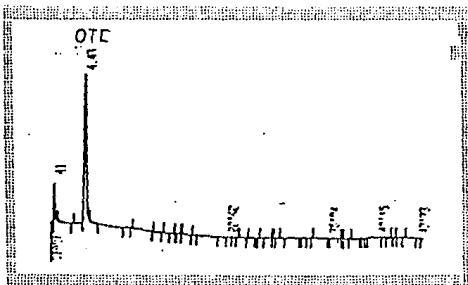


Fig.11.-Señal correspondiente a OTC.HCl expuesta a la luz natural por 45 días.

CROMATOGRAFAS

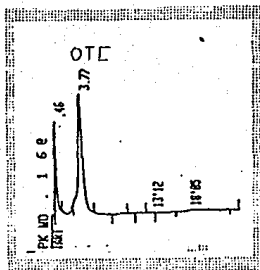


Fig.12.-Señal correspondiente a OTC.HCl expuesta a la luz ultravioleta por 45 días.

Estudios Termicos

En el cromatograma de la figura 13, no se detectó la formación de productos de degradación al ser expuesto el fármaco a temperatura de 60°C , sin embargo, a temperaturas mayores se forman productos de degradación los cuales no interfieren con la Oxitetraciclina (figura 14).

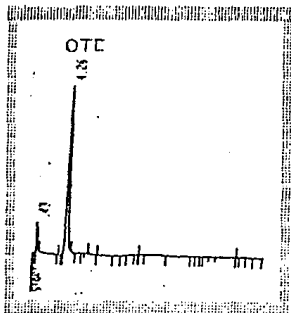


Fig.13.-Señal correspondiente a OTC expuesta a $t = 60^{\circ}\text{C}$ por 45 días.

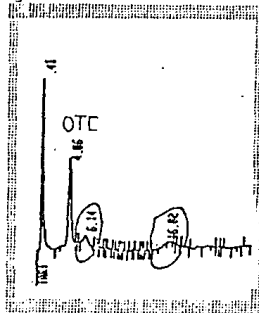


Fig.14.-señal correspondiente a OTC expuesta a $t =$ flama por segundos.

4.2.1.2. DEGRADACION DEL PLACEBO

Estudios de pH

No se observó la formación de productos de degradación al ser expuesto en condiciones ácidas (HCl concentrado), tal como se observa en el cromatograma de la figura 15.

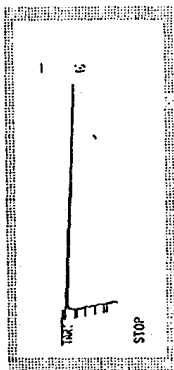


Fig.15.-Señal correspondiente al placebo expuesto en HCl concentrado por 12 horas.

Sin embargo, al exponer a condiciones alcalinas (hidróxido de Amonio concentrado) desaparece la señal del placebo, tal como se observa en la figura 16.

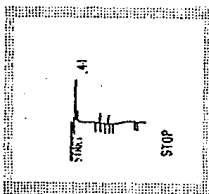


Fig.16.-Señal correspondiente al placebo expuesto en Hidróxido de Amonio concentrado por 12 horas.

Estudios de Oxidación

No se detectó la formación de productos de degradación al ser expuesto el placebo en condiciones de oxidación, tal como se demuestra el cromatograma de la figura 17.

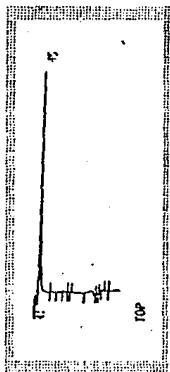


Figura 17.-Señal correspondiente al placebo expuesto en agua oxigenada por 12 horas.

Estudios Térmicos

No se observó formación de productos de degradación del placebo expuestos a temperatura de 60 °C y temperatura elevada, tal como se demuestra en los cromatogramas de la figura 18 y figura 19 respectivamente.

...

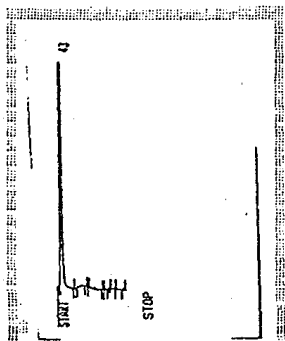


Fig.18.-Señal del placebo expuesto a temperatura = 60 °C por 45 días.

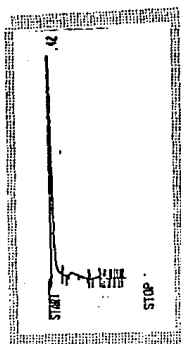


Fig.19.-Señal del placebo expuesto a t = flama por segundos.

Estudios Fotolíticos

No se detectaron productos de degradación al ser expuesto el placebo en condiciones de luz natural y ultravioleta, tal como lo demuestran los cromatogramas 20 y 21 respectivamente.

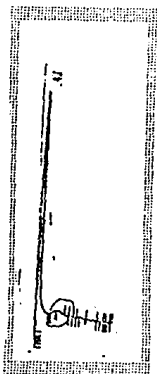


Fig.20.-Señal correspondiente al placebo expuesto a la luz natural por 45 días.

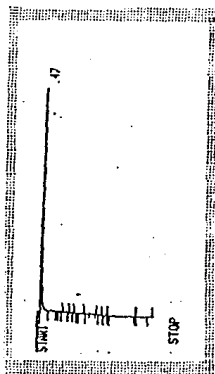


Fig.21.-Señal correspondiente al placebo expuesto a la luz ultravioleta por 45 días.

4.2.1.3. DEGRADACION DE OXITETRACICLINA Y PLACEBO.

Estudios de pH

En condiciones ácidas muy fuertes (HCl concentrado) la señal de OTC desaparece por completo, formando productos de degradación (figura 22).

Hay formación de productos de degradación que no interfieren con la señal de Oxitetraciclina al ser expuestos a condiciones básicas fuertes (Hidróxido de Amonio conc.) tal como se observa en el

cromatograma de la figura 23.

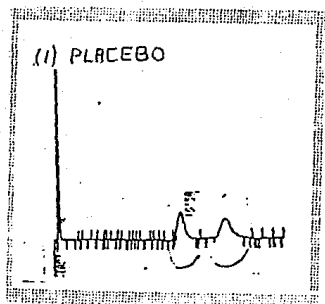


Fig.22. Señal correspondiente al placebo y fármaco expuestos a Acido Clorhídrico concentrado 12 horas.

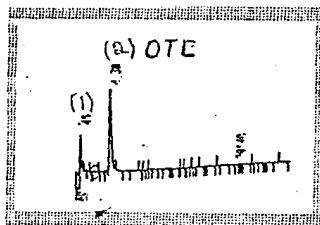


Fig.23.-Señal del placebo y fármaco expuestos a Hidróxido de Amonio concentrado por 12 horas.

Estudios Fotolíticos

No se observó formación de productos de degradación al ser expuestos placebo y fármaco en condiciones de luz natural y UV (ver figura 24).

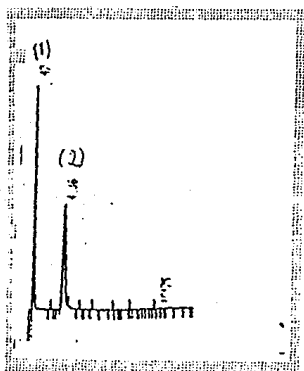


Fig.24.-Señales del placebo (1) y fármaco (2) expuestos a luz UV y natural por 45 días.

Estudios Térmicos

La temperatura a 60°C , no afectó al placebo ni tampoco al fármaco tal como se observa en la figura 25.

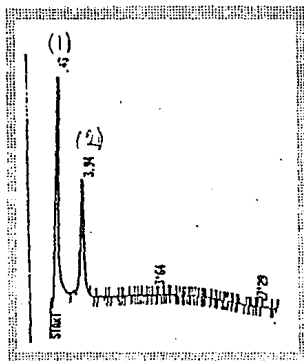


Fig.25.-Cromatograma correspondiente a las señales del placebo (1) y fármaco (3), expuestos a $t = 60^{\circ}\text{C}$ por 45 días.

Estudios de oxidación

Hubo formación de productos de degradación que no interfieren con la señal de OTC y placebo (ver figura 26). Por lo que puede decirse que el método es específico.

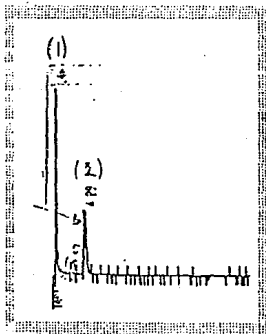


Fig.26.-Cromatograma correspondiente a la señal del placebo (1) y Oxite-traciclina (2) expuestos en Agua oxigenada por 12 horas.

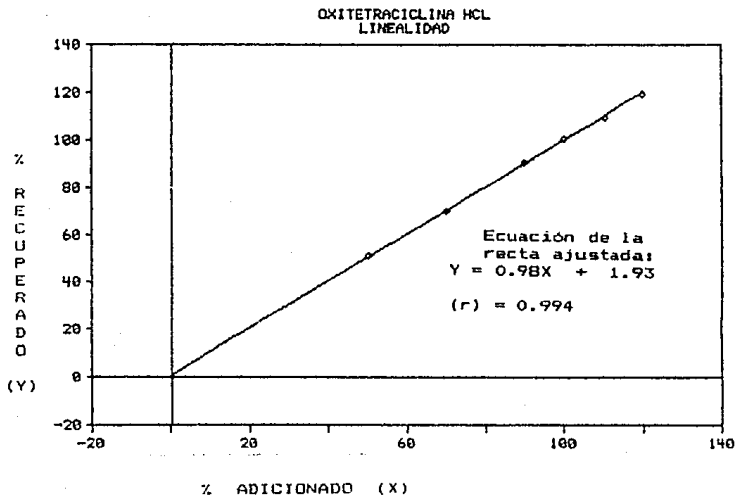
4.2.2. LINEALIDAD

TABLA No.8 CUADRO SINOPTICO DE RESULTADOS OBTENIDOS PARA LINEALIDAD (Ver Apéndice No.2 , pág.97).

Z ADICIONADO X	mg/ml ADICIONADOS X	Z ENCONTRADO Y	mg/ml ENCONTRADOS Y	CURVA No.
0	0	0	0	
50	5.0	52.1	5.2	I
50	5.0	52.4	5.2	II
50	5.0	50.3	5.0	III
50	5.0	49.8	5.0	IV
50	5.0	51.6	5.2	V
70	7.0	67.6	6.8	I
70	7.0	68.2	6.8	II
70	7.0	75.4	7.5	III
70	7.0	70.0	7.0	IV
70	7.0	69.7	7.0	V
90	9.0	93.1	9.3	I
90	9.0	90.5	9.0	II
90	9.0	89.9	9.0	III
90	9.0	89.8	9.0	IV
90	9.0	90.6	9.1	V
100	10.0	97.9	9.8	I
100	10.0	101.8	10.2	II
100	10.0	98.7	9.9	III
100	10.0	99.6	10.0	IV
100	10.0	103.9	10.4	V
110	11.0	109.5	10.9	I
110	11.0	110.3	11.0	II
110	11.0	109.4	10.9	III
110	11.0	109.8	11.0	IV
110	11.0	108.2	10.8	V
120	12.0	119.4	11.9	I
120	12.0	120.4	12.0	II
120	12.0	115.3	11.5	III
120	12.0	117.9	11.8	IV
120	12.0	122.8	12.3	V

Con estos resultados se calcularon los valores de pendiente (m), ordenada al origen (b) y coeficiente de correlación (r) para determinar la linealidad del método (ver Apéndice 1, pág.92-93).

GRAFICA No. 1 LINEALIDAD DEL METODO PARA DETERMINAR
CLORHIDRATO DE OXITETRACICLINA POR
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION.



Los valores obtenidos estadísticamente que definen si el método es lineal fueron los siguientes:

Pendiente (m) = 0.98

Intercepto (b) = 1.93

Coefficiente de Correlación = 0.994

4.2.3. EXACTITUD

Al evaluar estadísticamente los datos obtenidos para Linealidad, el método demostró ser Exacto. El valor de t experimental absoluto obtenido fue menor al valor de t tablas calculado, tal como se demuestra con el siguiente resultado estadístico: $|1.0186| < 2.0452$ (ver Apéndice No.3 ,pàq.98).

4.2.4. PRECISION

TABLA No. 9 PORCENTAJE CUANTIFICADO EN LA FORMULACION COMERCIAL (% OTC en la muestra analizada)		
ANALISTA DIA	1	2
1	95.2% 95.7% 95.6%	96.0% 95.4% 95.7%
2	102.7% 101.4% 103.5%	105.9% 105.7% 106.9%

Criterio estadístico: para métodos por CLAR, DER \leq 2%

$$n = 12$$

$$\bar{x} = 100.0 \%$$

$$s = 4.793$$

$$DER = C.V. = 4.8\%$$

$$DER \leq 2\%$$

4.8% > 2% . Por lo que no

es PRECISO el método.

Evaluando en diferentes días (1 y 2) al:

ANALISTA 1

$$N = 6, \bar{x} = 99.0\%$$

$$s = 3.93, C.V. = 3.96\%$$

DER > 2% . NO ES REPETIBLE

ANALISTA 2

$$N = 6, \bar{x} = 100.9\%$$

$$s = 5.74, C.V. = 5.69\%$$

DER > 2% . NO ES REPETIBLE

Sin embargo, al aplicar el análisis estadístico (ver Apéndice No.4 , pág.100) , el método demostró ser Reproducible entre analistas en diferentes días, mas no Repetible para los analistas día a día.

4.3. APLICACIONES

Existe una Resolución y Eficiencia adecuada entre la señales de OTC.HCl (1) y de Tetraciclina Clorhidrato (2) , tal como se aprecia en la Figura 27. Por lo que el método demostró ser aplicable para la separación e identificación de otras Tetraciclinas.

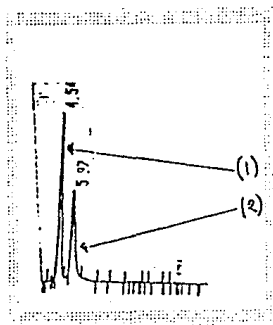


Figura 27.-Cromatograma típico correspondiente a las señales de OTC.HCl (1) y TC.HCl (2).
 Concentración de la solución final para ambos compuestos (0.01 mg/ml)
 Volumen inyectado : 10 µcl.

RESULTADOS DE LA APLICACION No.2

Muestra Comercial de TERRAMICINA^R

La Farmacopea de los Estados Unidos de America (USP XXI) especifica los límites que debe cumplir cualquier producto farmacéutico que contenga OTC. Los límites requeridos son

90.0% - 110.0% con respecto al marbete (2).

La Terramicina analizada demostró tener 104.1% de Oxitetraciclina base, es decir, 260.4 mg OTC/cápsula. Por lo que cumple las especificaciones oficiales (ver Apéndice No.5, pag.103).

Muestra Comercial de OXIGRICO^R

La solución inyectable demostró de acuerdo al método tener 89.4% de OTC en la muestra analizada (89.45 mg/ampolleta). Por lo que no cumple con especificaciones farmacopeicas (ver Apéndice 5, pag.104).

4.4. MUESTRAS ANALIZADAS EN ESTABILIDAD

En la Tabla 10 se observan los resultados de las muestras de estabilidad analizadas, mencionadas en Tabla No.7, los cinco lotes evaluados se encuentran dentro de los límites requeridos (90.0% - 110.0% respecto al marbete) por la USP XXI (2).

TABLA 10. % OTC CAUNTIFICADA EN LOS DIVERSOS LOTES DE LA FORMULACION ESTUDIADA

No.de LOTE	(% OTC ENCONTRADO / FRASCO)
001	T.A. = 107.9 %
002	37 ° C = 107.6 %
003 - A	T.A. = 104.3 %
- B	37 ° C = 95.2 %
004 - A	T.A. = 109.3 %
T.A. = temperatura ambiente.	

CAPITULO 5.
DISCUSION
DE
RESULTADOS.

5.1. DESARROLLO DEL METODO

Las condiciones cromatográficas propuestas demostraron ser las adecuadas para la evaluación de OTC en estabilidad. tal como lo demuestra la figura 5 (pág.62) donde se observó una Resolución y Eficiencia (30) adecuadas entre las señales de interés (OTC.HCl y Patrón de Referencia interno), descartandose la necesidad de utilizar columnas de intercambio iónico, polares, etc., o de otras sustancias necesarias para el análisis de OTC.HCl (sal disódica del Acido Etilendiamino Tetracético, Acetonitrilo, soluciones reguladoras o supresores iónicos) reportadas en los métodos por CLAR descritos en la parte de Generalidades del presente trabajo.

5.2. VALIDACION DEL METODO

5.2.1. ESPECIFICIDAD

FARMACO

Las condiciones ácidas muy drásticas destruyen totalmente al fármaco . En condiciones alcalinas (NH₄OH Conc.) , de oxidación y temperatura elevada se forman productos de degradación que no interfieren de manera alguna con el fármaco estudiado (OTC.HCl).

No se observó formación de productos de degradación por exposición a temperatura = 60 °C y luz (debiéndose tal vez al corto periodo de tiempo al que se sometieron las muestras).

PLACERO

La señal del placebo no degradado no interfiere con la del fármaco inalterado, en ninguna de las condiciones de degradación expuestas se observó formación de productos de

degradación debidos al placebo, esto se explica debido a que el método fue diseñado para cuantificar y separar OTC.HCl solamente. Solo cuando se expuso en medio alcalino la señal del placebo desapareció, esto pudo ser debido a una reacción entre el placebo (características ácidas) y el Hidróxido de Amonio formandose un complejo no detectable en las condiciones cromatograficas descritas.

OTC.HCl y PLACEBO

No se observó formación de productos de degradación del fármaco y placebo estudiado en condiciones de temperatura a 60°C y Luz, pero si la formación de los mismos al exponer a condiciones de oxidación, de temperatura elevada, condiciones ácidas y básicas (en esta última desapareció la señal debida al placebo) muy fuertes. Estos productos de degradación no interfieren de ninguna manera con el fármaco estudiado.

Podemos decir que el método analítico demostró ser Especifico.

5.2.2. LINEALIDAD

Comparando los valores reportados (54.55,59.63) que determinan si un método es Lineal con los obtenidos experimentalmente tenemos:

<u>Valor Reportado</u>	<u>Valor obtenido Experimental</u>
Pendiente (m) = 1.00 ± 0.02	Pendiente (m) = 0.98
Intercepto (b) = 0 ± 2	Intercepto (b) = +1.93
Coefficiente de Correlación (r) = 1.00 ± 0.01	(r) = 0.99

Como se observa estos valores experimentales estan dentro de los limites reportados, por lo que, se puede decir que también el método es Lineal.

5.2.3. EXACTITUD

Evaluando los datos obtenidos para Linealidad entre los límites de 50% y 120% , estadísticamente demostro el método analítico ser EXACTO , tal como lo demuestra el valor obtenido de t .
 $t_{\text{experimental}} = / 1.0186/ < t_{\text{tablas}} = 2.0452.$

5.2.4. PRECISION

El método estadísticamente demostro ser Reproducible entre analistas en el mismo día, pero no Repetible entre ellos a diferentes días.

5.3. APLICACIONES

5.3.1. El método es aplicable para el análisis cualitativo de Tetraciclina Clorhidrato (como se demostró en el cromatograma de la figura No.27 (página 73), observandose una Resolución y Eficiencia adecuadas.

5.3.2. Aunque las formas farmacéuticas comerciales (inyectable y cápsulas) se valoraron sin problemas, se determinó que los resultados obtenidos no fueron confiables. (89.4% y 104 % respectivamente).
Debido a que no se probó con placebos de esos productos que pudieran haber verificado y comprobado que realmente el método podría ser utilizado para el análisis cuantitativo de Oxitetraciclina.

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

5.4. ANALISIS DE MUESTRAS EN ESTABILIDAD

Como se observa en la Tabla 10 , no se detectaron cambios apreciables en la concentración de OTC en las muestras estudiadas.

TABLA No.10 % OTC CUANTIFICADA EN LOS DIFERENTES LOTES DE LA FORMULACION ESTUDIADA.

No. de LOTE	(% OTC ENCONTRADA / FRASCO)
001	T.A. = 107.9%
002	37 C = 107.6%
003 - A	T.A. = 104.3%
- B	37 C = 95.2%
004 - A	T.A. = 109.3%

CAPITULO 6.

CONCLUSIONES.

- 1.- EL METODO DEMOSTRO SER: ESPECIFICO PARA EL PRODUCTO COMERCIAL ESTUDIADO, LINEAL, EXACTO, REPRODUCIBLE MAS NO REPETIBLE.
- 2.- FACTORES TALES COMO pH , OXIDACION Y TEMPERATURAS ELEVADAS INFLUYEN MARCADAMENTE EN LA ESTABILIDAD DEL PRODUCTO FARMACEUTICO.
- 3.- EN MEDIO ALCALINO SE FORMAN PRODUCTOS DE DEGRADACION DE LA OXITETRACICLINA , QUE NO INTERFIEREN DE MANERA ALGUNA CON LA CUANTIFICACION DEL FARMACO.
- 4.- SE CONCLUYE QUE NO FUE SUFICIENTE EL TIEMPO DE EXPOSICION DEL FARMACO A FACTORES TALES COMO LUZ Y TEMPERATURA (60^oC) PARA DETERMINAR SI SE FORMAN PRODUCTOS DE DEGRADACION Y SI ESTOS INTERFERIRAN EN SU ANALISIS.
- 5.- EL METODO ES APLICABLE PARA EL ANALISIS CUALITATIVO DE TETRACICLINA.
- 6.- EL METODO ES APLICABLE SOLO PARA EL ANALISIS CUANTITATIVO DEL PRODUCTO COMERCIAL ELABORADO POR EL LABORATORIO. PARA APLICACIONES ANALITICAS CUANTITATIVAS , EL METODO DESARROLLADO SOLO MOSTRO BUENOS RESULTADOS. SIN EMBARGO, SI SE APLICA PARA VALORAR OTROS PRODUCTOS COMERCIALES ES NECESARIO VALIAR ESTE.

CAPITULO 7.

BIBLIOGRAFIA.

1. Windholz Martha. "The Merck Index". Tenth Edition. Merck and Co., Inc. USA., (1983). p.1001.
2. "The United States Pharmacopeia". 21th rev., Mack Publishing Co., Easton, Pa., (1970), p.769-773, 1187.
3. Clarke, E.G.C. "Isolation and Identification of Drugs". The Pharmaceutical Press, London (1969). p.463-464.
4. Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, 4a.ed., México, SSA, (1974).
5. Martin, A., and Swarbrick, J., "Physical Pharmacy: Physical Chemical Principles in The Pharmaceutical Sciences." 3th ed. Lea and Febiger Co., (1983). p.334, 363-364.
6. "The National Formulary" 12th rev., American Pharmaceutical Association. Washington D.C. (1965).
7. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, Goodman G.A., Gilman A., Goozman L.S. 6a.ed. Médica Panamericana S.A. de C.V. Mexico (1982). pp.1158-1168.
8. Bases Bioquímicas y Patológicas. Aplicaciones clínicas, Bowman W.C. 2a.ed. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. México (1984).
9. Prontuario de Especialidades Veterinarias, Berenguer Antonio. 10a.ed. Centro Profesional de Publicaciones S.A. de C.V. Mexico (1987).
10. Hughes, D.W., and Wilson, W.L.
"Chemical and Physical Analysis of Antibiotics. Part I. Introduction and the Tetracyclines"
Canadian Journal of Pharmaceutical Sciences
8(3), 1973: 67-74
11. Grove, D.C., and Randall, W.A.
"Assay Methods for Antibiotics, a Laboratory Manual."
Medical Encyclopedia Inc., N.Y. (1955) p.48
12. Chatten, L.G., and Krause, S.I.
"Colorimetric Assay of Tetracycline Antibiotics"
Journal of Pharmaceutical Sciences
60(1). 1971: 107-110
13. Ragazzi, E., and Veronese, G.
"Simple Method for The Quantitative Analysis of Tetracyclines by Direct Fluorimetry after Thin-Layer Chromatography on Cellulose Plates"
Journal of Chromatography
132. 1977: 105-114

14. Willekens, S.J.
"Rapid and Sensitive Direct TLC Fluorometric Method for Evaluation of Impurities in Oxytetracycline"
Journal of Pharmaceutical Sciences
66(10), 1977: 1419-1422
15. Sina, A. et al.
"Paper Chromatographic Determination of Oxytetracycline"
Journal of Pharmaceutical Sciences
60(10), 1971: 1544-1547
16. Ragazzi, E., and Veronese, G.
"Gel Chromatography of Tetracycline antibiotics"
Journal of Chromatography
134, 1977: 223-229
17. Szabo, A. et al.
"Thin-layer Chromatographic Assay of Tetracyclines"
Journal of Chromatography
151, 1978: 259-262
18. Gyanchandani, N.D. et al.
"Improved Thin-layer Chromatographic Identification of Tetracyclines and Their Degradation Products. Application to an Epimerization Study"
Journal of Pharmaceutical Sciences
59(2), 1970: 224-228
19. Herbst, D.
"Detection of Penicillin G and Ampicillin as Contaminants in Tetracyclines and Penicillamine"
Journal of Pharmaceutical Sciences
66(11), 1977: 1646-1648
20. Alvarez, A. et al.
"Simultaneous Separation and Quantitative Determination of Tetracyclines in Degraded Tetracyclines by Thin-layer Chromatography"
Journal of Pharmaceutical Sciences
58(4), 1969: 443-446
21. "Handbook of Chromatography" .Gupta Ram. Vol.II., CRC Press, Inc., USA (1981).
22. Lotscher, K.M., Brander, B.
"Liquid Chromatographic Analysis of Antibiotics"
Varian Instrument Applications
9(1), 1975: 12-15

23. "Introduction to High Performance Liquid Chromatography"
Hamilton, R.J., and Sewell, P.A.
Chapman and Hall. Great Britain. (1977). p.142-145
24. Sharma, J.P., and Beville, R.F.
"High-Pressure Liquid Chromatographic Determination of
Tetracyclines in Urine"
Journal of Pharmaceutical Sciences
66(9), 1977: 1319-1322
25. Wagman, G.H., and Marvin, J.W.
"Chromatography of Antibiotics". Vol. 26. Journal of Chromato-
graphy Library. 2th ed. Publishers B.V. Holanda (1984).
p.366-381
26. Kiyoshi, T. et al.
"High Pressure Liquid Chromatographic Determination of
Tetracyclines"
Analytical Chemistry
46(4), 1974: 539-543
27. Kiyoshi, T., and Robertson, J.H.
"Analysis of Tetracycline in Pharmaceutical Preparations by
Improved High-Performance Liquid Chromatographic Method"
Journal of Pharmaceutical Sciences
65(3), 1976: 400-404
28. "GLC and HPLC Determination of Therapeutics Agents"
Vol. 9., Part. II., Marcel Dekker Inc., New York (1978).
p.767-773
29. Mack, G.D., and Ashworth, R.B.
"A High Performance Liquid Chromatographic System for
the Analysis of Tetracycline Drug Standards, Analogs,
Degradation Products and other Impurities"
Journal of Chromatographic Science
16, 1978: 93-101
30. "Introduction to Modern Liquid Chromatography"
Snyder, L.R., and Kirkland, J.J.
2th ed. John Wiley and Sons Inc.
New York (1979). p.473-477
31. Hermansson, J., and Andersson, M.
"Reversed Phase Ion-Pair Chromatography of Tetracycline,
Tetracycline Analogs, and Their Potential Impurities"
Journal of Pharmaceutical Sciences
71(2), 1982: 222-229

32. Mouro, D., et al.
"Reversed-Phase Ion Pair Chromatography of Oxytetracycline, Epioxytetracycline and Anhydroxytetracycline"
Journal of Chromatography
190, 1980: 486-488
33. Ekstord, S.
"Reversed-Phase Ion-Pair Chromatography of Tetracyclines on a Lichrosorb NH₂ column"
Journal of Chromatography
209, 1981: 78-82
34. Sharma, J.P. et al.
"Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Tetracyclines in Urine and Plasma"
134, 1977: 441-450
35. De Gyves Aurelio. "Desarrollo de un Metodo Analitico Microbiológico para la Cuantificación de Clorhidrato de Oxitetraciclina en una Formulación de uso Veterinario." Tesis Profesional, México, D.F., 1988. UNAM (Facultad de Química).
36. Chatten, L.G., et al.
"dc Polarographic Assay of Tetracyclines"
Journal of Pharmaceutical Sciences
65(9), 1976: 1315-1322
37. Kavanagh, F. "Analytical Microbiology." Vol. II. (1972).
38. Pelczar M., Reid R. y Chan E. "Microbiología."
4a. ed. Mc Graw Hill. México, (1973).
39. Vera Avila, L.E., and Rosset, R.
"Chromatographie de paires d'ions"
Analisis
10(1). 1982: 36-42
40. Majors, R.E.
"Review of High Performance Liquid Chromatography. Practical Considerations in the Use of High Performance Liquid Chromatography Columns"
Journal of the AOAC
60, 1977: 186
41. Grimm, W.
"Stability Testing in Industry for Worldwide marketing"
Drug Development and Industrial Pharmacy
12(8 y 9). 1986: 1259-1292

42. Carstensen, J.J., and Rhodes, C.I.
"Cyclic Testing in Stability Programs"
Drug Development and Industrial Pharmacy
12(8 y 9), 1986: 1219-1225
43. Boudreau, C.F.
"Handling Stability Data Via The Computer"
Drug Development and Industrial Pharmacy
10(8 y 9), 1984: 1527-1547
44. Nash, R.A.
"A new Linear Model for Stability Prediction"
Drug Development and Industrial Pharmacy
3(3), 1987: 487-499
45. Dukes, G.R.
"Stability Programs for formulation studies"
Drug Development and Industrial Pharmacy
10(8 y 9), 1984: 1413-1424
46. Rhodes, C.T.
"An overview of kinetics for the evaluation of the stability
of Pharmaceutical Systems"
Drug Development and Industrial Pharmacy
10(8 y 9), 1984: 1163-1174
47. Monkhouse, D.C.
"Stability aspects of Preformulation and Formulation of Solid
Pharmaceuticals"
Drug Development and Industrial Pharmacy
10(8 y 9), 1984: 1373-1412
48. Food Drug Administration Center for drugs and Biologics.
Office of Drug Research and Review.
"Guideline for Submitting Documentation for the Stability of
human Drugs and Biologics"
USA., 1987.
49. Osol, A., and Pratt, R. "The United States Dispensatory"
Lippincott Co., 27th ed., Philadelphia.
50. Hochstein, F.A. et al.
"The Structure of Terramycin"
Journal of The American Chemical Society
75(22), 1953: 5455-5475
51. Mc Cormick, J.R. et al.
"Studies of the Reversible Epimerization Occuring in the
tetracycline Family. The Preparation, Properties and Proof
of Structure of some 4-epi-tetracyclines"
Journal American Chemical Society
79, 1957: 2849-2858

52. Higuchi, T., and Sanford, B.
The Solubility and Complexing Properties of Oxytetracycline
and Tetracycline III
Journal of the American Pharmaceutical Association
48(10), 1959: 557-564
53. Boehlert, J.F.
"Assay Development in Stability Test Methods"
Drug Development and Industrial Pharmacy
10(8 y 9), 1984: 1343-1371
54. Vanderwielen, A.J., and Hardwidge, E.A.
"Guidelines for Assay Validation"
Pharmaceutical Technology
4(8), 1980: 45-49
55. Guerra, J., and Finkelson, M.J.
"Validation of Analytical Methods by FDA Laboratories"
Pharmaceutical Technology
3(3), 1986: 76-84
56. Debesis, E. et al.
"Submitting HPLC Methods to the Compendia and Regulatory
Agencies"
Pharmaceutical Technology
6(9), 1982: 120-137
57. ACS Committee on Environmental Improvement
"Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation
in Environmental Chemistry"
Analytical Chemistry
52(14), 1980: 2242-2249
58. Long, G.L., and Winefordner, J.D.
"Limit of Detection. A closer look at the IUPAC Definition"
Analytical Chemistry
55(7), 1983: 712A-724A
59. Van Breendonk, M.D. et al.
"Correlation Coefficients for Evaluation of Analytical
Calibration Curves"
Analytical Chemistry
53, 1981: 2349-2350
60. Kirschbaum, J., and Adamovics, J.
"Ensuring Accuracy of HPLC Assays"
Journal of Chromatographic Science
22, 1984: 27-30

APENDICES.

APENDICE 1.

VALIDACION DE METODOS ANALITICOSA.1.1. DESARROLLO

Cuando un medicamento y/o fármaco es sometido a condiciones extremas de degradación (pH , temperatura , luz , oxidación , etc.) se requiere de métodos analíticos indicadores de estabilidad para monitorear el comportamiento de las formas farmacéuticas durante la fase de investigación , desarrollo y proceso comercial (53).

El método analítico seleccionado debe: a) distinguir eficazmente al producto de degradación del fármaco original. b) Presentar sensibilidad del orden de 10^{-7} a 10^{-9} gramos. c) cuantificar la cantidad de fármaco remanente y/o la detección de productos de degradación (53).

Una vez seleccionada la técnica y desarrollado el método analítico, el aspecto más importante es la Validación del mismo.

A.1.2. VALIDACION DE UN METODO ANALITICO

Es el proceso por el cual queda establecido por estudios experimentales; que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

El proceso de Validación de un método en particular esta basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición. La capacidad se expresa en este caso en términos de parámetros (54-62).

Los parámetros que conforman la Validación son:

A.1.2.1. ESPECIFICIDAD

Es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida unicamente al compuesto de interés y no a otros componentes de la muestra. Para evaluar este parámetro se procede a:

- 1.- Analizar placebos del producto con el método propuesto.
- 2.- Identificar las respuestas de los activos y excipientes (esto en caso de tenerlas).
- 3.- Si se cuenta con los posibles productos de degradación, se preparan muestras de estos con excipientes, la sustancia de interés conexcipientes también y se analizan por el método propuesto.

En caso de no tener los productos de degradación se somete a condiciones de degradación tales como:

- pH

Medio Acido (pH entre 1 y 2).

Medio Básico (pH entre 10 y 12).

- Temperatura

40°, 60°, 80° y 120° C. Periodo usual de 2 a 4 semanas.

- Luz

Exposición a la luz ultravioleta, natural o artificial.

Periodo usual de 2 a 4 semanas.

- Oxidación.

Por adición de agua oxigenada (concentrada o diluida).

de la manera siguiente:

- 1.- El principio activo solamente.

2.- Solo Placebo.

3.- Principio activo + Placebo.

Y así observar si existe interferencia por parte de los productos de degradación o del mismo placebo en la identificación de la sustancia de interés. (53,54,57).

Si después de someter a degradación por un periodo de tiempo al principio activo y/o excipientes, no se detecta productos de degradación se procederá a hacer lo siguiente:

Por ejemplo en Cromatografía Líquida de Alta Resolución (56).

1.- Modificar condiciones de análisis como velocidad de flujo, temperatura, composición de la fase móvil, variación de la longitud de onda de detección.

2.- Someter todavía a condiciones mayores de degradación.

- pH < 1 ó > 12

- Temperatura > 120 °C. Ejemplo: Punto de fusión de la sustancia, o temperaturas elevadas (de flama).

Si aún así no se detectan estos, podemos decir entonces:

A) Los productos de degradación no absorben por ejemplo en la región del Ultravioleta y por lo tanto no interferirá en el análisis.

B) El principio activo de interés es muy estable.

A.1.2.2. LINEALIDAD

La Linealidad de un método analítico.- Es la relación que se establece mediante una recta (dependencia lineal entre 2 variables) entre una propiedad medible (cantidad de fármaco recuperado) y el valor real de esa propiedad (cantidad de fármaco añadido). (51,62,63).

de su capacidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un rango determinado.

Usualmente se expresa en términos de la varianza alrededor de la pendiente de la línea de regresión calculada de acuerdo a una relación matemática establecida, a partir de los resultados obtenidos al analizar muestras conteniendo concentraciones variables y conocidas de los principios activos de interés.

El rango de concentraciones generalmente utilizadas es del 50% al 120% con respecto a la dosis del fármaco especificado en la etiqueta (50), debiendo cumplir con los siguientes requisitos para ser lineal: pendiente (m) ≥ 1

Intercepto (b) ≈ 0 (ordenada al origen).

Coefficiente de correlación (r) ≥ 0.99 .

Estadísticamente pueden determinarse por las fórmulas matemáticas (63) que se describen a continuación:

$$\text{DESVIACION ESTANDAR (DE)} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}} = S$$

DESVIACION ESTANDAR RELATIVA (DER) = DE / \bar{x} (100), denominado también coeficiente de variación (C.V.).

$$\text{PENDIENTE (m)} = \frac{(n) (\sum xy) - (\sum x) (\sum y)}{[(n) (\sum x^2) - (\sum x)^2]}$$

$$\text{INTERCEPTO (b)} = \frac{\sum y - m (\sum x)}{n} = y - mx$$

$$\text{COEFICIENTE DE CORRELACION (r)} = \frac{[(n) (\sum xy) - (\sum x) (\sum y)]}{\sqrt{[(n) (\sum x^2) - (\sum x)^2] [(n) (\sum y^2) - (\sum y)^2]}}$$

Intervalo de confianza al 95% de Probabilidad: $\bar{X} \pm t_{95\%} \frac{S}{\sqrt{n}}$

A.1.2.3. EXACTITUD.

De un método analítico.- Es la concordancia que existe entre un valor determinado experimental y el valor aceptado de referencia, se expresa como el % de recobro (% encontrado) obtenido en el análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia de interés (% adicionado). Se procede a evaluarla estadísticamente con los datos obtenidos para Linealidad (54,55,60,63).

Intervalo de confianza (I.C.) = $\bar{Y} \pm t (n-1, 0.975) S / \sqrt{n}$ y el valor de t de Student.

$$| t_{exp} | = (\bar{Y} - Y) / \sqrt{n} / S = Y - \mu / (S / \sqrt{n})$$

\bar{Y} = Valor real promedio de recobro.

Y = Valor real adicionado

μ = Valor teórico.

S = Desviación estándar.

n = Número de muestras.

Si el valor de t experimental es menor que el valor de t teórico reportado en tablas, podemos decir que el método analítico cumple con los requisitos de exactitud.

A.1.2.4. PRECISION

De un método analítico.- Es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a una muestra homogénea única. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del Coeficiente de Variación.

La Precisión es una medida del grado de Reproducibilidad y/o Repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación (63).

A.1.2.4.1. REPRODUCIBILIDAD

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones realizadas por diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o diferente(s) laboratorio (s) utilizando el mismo y/o diferentes equipos (62).

A.1.2.4.2. REPETIBILIDAD.

Es la Precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes por un solo analista, usando los mismos aparatos y técnicas (62).

Las Reproducibilidad y Repetibilidad se determinan por fórmulas matemáticas que involucran la Desviación estándar o valiéndose para ello de Modelos Estadísticos (63), como la Tabla de Análisis de Varianza (ANOVA).

A.1.2.5. SENSIBILIDAD.

Se define como la relación entre la pendiente de una curva de calibración y la variabilidad de los puntos experimentales (60,62).

Matemáticamente se expresa de la manera siguiente:

$$\text{Sensibilidad del Método } (b) = \frac{S}{\frac{\Delta}{S_{y/x}} \cdot n} = \frac{S}{S_{y/x} \cdot n}$$

Error típico de estimación modificado

$$\frac{\Delta}{S_{y/x}} = \sqrt{\frac{n}{n-2}} \cdot S_{y/x}$$

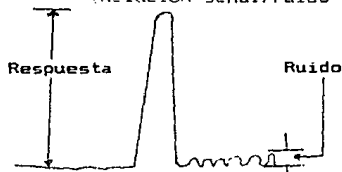
Error típico de estimación = $S_{y/x} = \sqrt{\frac{(\sum y^2) - b(\sum y) - m(\sum xy)}{n}}$

Error estándar de la regresión $S_{y/x} = \frac{(\sum y^2) - b(\sum y) - m(\sum xy)}{n-2}$

La Sensibilidad esta expresada en terminos:

A.1.2.5.1. LIMITE DE DETECCION.

(Relacion señal/ruido = 2/1 ó 3/1)



Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra, la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada bajo

las condiciones de operación establecidas (58).

Se calcula de acuerdo a la siguiente expresión $A = \epsilon \cdot C \cdot D$

$$\text{LMD} = 2 (\text{ruido}) / \epsilon \cdot D$$

ϵ = Absorptividad Molar a la Longitud de onda establecida.

C = Concentración Molar

D = Longitud de la celda óptica (cm).

LMD = concentración molar mínima detectable.

A.1.2.5.1. LIMITE DE CUANTIFICACION (Concentración).

Es un parametro de ensayos cuantitativos para bajos niveles de sustancias contenidas en una muestra. Tales como impurezas de materias primas y productos de degradación en productos farmacéuticos (52).

La determinación se hace por una serie de diluciones a partir de una solución patrón de referencia.

A.1.2.6. TOLERANCIA.

La Tolerancia de un método analítico.- Es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación (55,57,60,61), tales como: A) Variación en la composición de la fase móvil.

B) Variación del pH (En el caso de usar soluciones reguladoras).

C) Cambios en la longitud de onda de detección.

D) Uso de diferentes lotes de reactivos y grados de pureza.

E) Diferentes temperaturas.

F) Misma columna, columna a columna de las mismas características y/o diferentes tipos de empaque, tamaño, proveedor, etc.

G) Variación en la velocidad de flujo.

ANEXO 2. CÁLCULO DE LINEALIDAD DEL MÉTODO

Tenemos que: 450.44 g/mol Oxitetraciclina base seca equivalen a 476.7 g/mol Clorhidrato de Oxitetraciclina, como 0.0100 g/mol oxitetraciclina base anhidra equivalen a 0.010792 g/mol OTC.HCl. La solución muestra problema fue preparada a partir de las pesadas de OTC.HCl muestra (24.20 mg equivalentes a 20 mg de OTC base seca) y de Ácido Ascórbico (26.98 mg, equivalentes al contenido del mismo en el producto comercial estudiado) nechaspara la evaluación de linealidad (ver página 57).

Los patrones de referencia utilizados para la evaluación de Linealidad del método propuesto, se mencionan en las paginas 48 y 49 .

Los Calculos efectuados para la cuantificación interna se muestran a continuación :

$$\frac{\text{Dividiendo}}{\left[\frac{\text{Área patrón Ref.}}{\text{Área patrón Int.}} \right] \left[\frac{\text{Peso patrón interno}}{\text{Peso patrón Ref.}} \right]} \quad \text{Obtenemos:} \quad \text{Factor de Respuesta del Patrón de Referencia.}$$

$$\frac{\text{Además dividiendo}}{\left[\frac{\text{(Área de la muestra)} \quad \text{(Peso Patrón interno)}}{\text{(Área patrón interno)} \quad \text{(Peso de la muestra)}} \right]} \quad \text{Obtenemos:} \quad \text{Factor de Respuesta del Problema}$$

$$\frac{\text{Finalmente dividiendo:}}{\left[\frac{\text{Factor de respuesta del problema}}{\text{Factor de respuesta del patrón de ref.}} \right]} \times 100 = \% \text{ ENCONTRADO}$$

APÉNDICE No. 3 PROCEDIMIENTO ESTADÍSTICO RELACIONADO CON LA CUESTA

1.- Tabular los resultados del % recuperado (Y)

A	Y	Y al 100%
50	104.2	104.2
	104.8	104.8
	100.5	100.5
	99.6	99.6
	103.2	103.2
70	96.5	96.5
	97.7	97.7
	107.7	107.7
	100.0	100.0
	97.5	97.5
90	103.4	103.4
	100.5	100.5
	99.9	99.9
	99.8	99.8
	100.7	100.7
100	97.9	97.9
	101.8	101.8
	98.7	98.7
	99.6	99.6
	103.9	103.9
110	99.5	99.5
	100.3	100.3
	99.5	99.5
	99.6	99.6
	98.4	98.4
120	99.5	99.5
	100.4	100.4
	96.1	96.1
	98.3	98.3
	102.3	102.3

2.- Calcular la suma del porcentaje recuperado (ΣY).

La suma de cuadrados del porcentaje recuperado (ΣY^2).

La suma del % recuperado al cuadrado (ΣY^2) y el número total de muestras (n).

$$n = 30$$

$$\Sigma Y = 303020.9$$

$$\Sigma Y^2 = 9085038.1$$

$$\Sigma Y^2 = 3014.1$$

Calcular la Media Aritmética (\bar{Y}) y la Desviación estándar (S) del

% recuperado. De acuerdo a las siguientes ecuaciones: $S = 2.534369$

$$\bar{Y} = \frac{\Sigma Y}{n} = \frac{303020.9}{30} = 10100.7$$

$$S = \sqrt{\frac{\Sigma Y^2}{n} - (\bar{Y})^2} = \sqrt{\frac{9085038.1}{30} - (10100.7)^2}$$

4.- Determinar en la tabla de Distribución de "t" de Student, el valor de t (q1 = n - 1 , $\alpha = 0.025$) t w 95% (0.975).

$$t \text{ tablas} = q1 = 30 - 1 = 29$$

$$t \text{ tablas} = 2.0452$$

5.- Calcular el intervalo de confianza para el por ciento recuperado (IC), con la siguiente ecuación: $IC = \bar{Y} \pm t (n-1, 0.975) S/n$

$$IC = 100.4717 \pm 0.94633$$

$$\text{Limite superior de confianza al 95\%} = 101.4$$

$$\text{Limite de confianza inferior al 95\%} = 99.5$$

6.- Calcular el valor de "t" de Student con la siguiente ecuación:

$$/ t \text{ experimental} / = (Y - \bar{Y}) \sqrt{n} / S = Y - \bar{\mu} / S \sqrt{n}$$

$$/ t \text{ experimental} / = \text{Valor de t experimental o calculada.}$$

$$\bar{Y} = \text{Valor promedio de recobro} \quad S = \text{Desviación estándar}$$

$$Y = \text{Valor adicionado} \quad n = \text{Numero total de muestras}$$

$$/ t \text{ experimental} / = 1.0106$$

7.- Comparar el valor de t experimental con el valor de t tablas (n-1 , 0.975) y establecer la regla de decision en base a lo siguiente: Si $/ t \text{ exp.} / \geq t \text{ tablas}$ Si $/ t \text{ exp.} / < t \text{ tablas}$

EL METODO NO ES EXACTO

EL METODO ES EXACTO

Por lo que $1.0106 < 2.0452$ Por lo tanto:

EL METODO ANALITICO ES EXACTO.

APENDICE No.4 PROCEDIMIENTO ESTADISTICO DE REPRODUCIBILIDAD

1.- Tabular los resultados conforme al siguiente formato:

		ANALISTA (1)	
		1	2
D I A	1	95.2 %	96.0 %
		95.7 %	95.4 %
		95.6 %	95.7 %
	2	102.7 %	105.9 %
		101.4 %	105.7 %
		103.5 %	106.9 %

2.- Calcular la suma de las combinaciones: analista - día (ΣY_{ij}), así como la suma para cada analista ($\Sigma Y_{i..}$). La suma total de los datos ($\Sigma Y_{...}$) y la suma de cada dato elevado al cuadrado ($\Sigma \Sigma \Sigma Y_{ijk}^2$)

$\Sigma Y_{11} = 286.5$	$\Sigma Y_{1.} = 394.2$ ($Y_{1..}$)
$\Sigma Y_{12} = 307.7$	$\Sigma Y_{2.} = 605.5$ ($Y_{2..}$)
$\Sigma Y_{21} = 287.1$	$\Sigma Y_{i.} = 1199.7$ ($Y_{i...}$)
$\Sigma Y_{22} = 318.4$	$\Sigma \Sigma \Sigma Y_{ijk}^2 = 120196.7$
$\Sigma \Sigma Y_{ij}^2 = 360\ 580.3$	

3.- Calcular la suma de cuadrados del analista (SC_a) con la siguiente ecuación: $SC_a = (\Sigma Y_{i..})^2 / (d.r) - (\Sigma Y_{...})^2 / (d.r.a)$

Donde: "a" = número de repeticiones (3)

"d" = número de días (2)

"r" = número de analistas (2)

$$SC_a = [(394.2)^2 / (2)(3)] - [(1199.7)^2 / (2)(3)(2)]$$

$$SC_a = 10.7$$

- 4.- Calcular la suma de cuadrados del día interente al análisis (SCd), por medio de la siguiente ecuación:

$$SCd = \left[\frac{(\sum Y_{ij})^2}{(r)} \right] - \left[\frac{(\sum Y_{i..})^2}{(r)(d)} \right]$$

$$SCd = \left[\frac{(360580.303)^2}{(3)} \right] - \left[\frac{(194.18)^2}{(3)(2)} + \frac{(605.54)^2}{(3)(2)} \right]$$

$$SCd = 238.7$$

- 5.- Calcular la suma de cuadrados del error (SCe), con la siguiente ecuación: $SCe = (\sum \sum Y_{ijk}^2) - (\sum Y_{ij.})^2 / (r)$

$$SCe = (120176.677) - \left[\frac{(360580.303)^2}{(3)} \right]$$

$$SCe = 3.2$$

NOTA: Para calcular el parametro Reproducibilidad se utilizo el estadístico F de Senecor al 95% de confianza ($F_{0.05} = 161.4$).

- 6.- Construir la Tabla de Analisis de Varianze (ANADEVa o ANDEVA)

TABLA DE ANDEVA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA
Analista	a - 1	SCa	MCa = SCa / q1 a	MCa/MCe
Día	(d-1)a	SCd	Mcd = SCd / q1 d	Mcd/MCe
Error	(r-1)a.d	SCe	Mce = SCe / q1 e	-

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA
Analista	1	SCa = 10.7	MCa = 10.7	Fa = 26.7
Día	2	SCd = 238.7	Mcd = 119.3	Fd = 298.2
Error	3	SCe = 3.2	Mce = 0.4	-

Fa > F tabla (26.7 < 161.4) por lo que hay reproducibilidad entre analistas día a día.

Fd > F tabla (298.2 > 161.4) por lo que se comprueba que no hay Repetibilidad de los analistas en diferentes días. Para comprobarlo se continua el análisis del procedimiento estadístico.

7.- Calcular la Repetibilidad del método para el analista (Rep)

con base en la siguiente ecuación:

$$\text{Rep} = 100 \pm (1.96) \sqrt{(MDe)}$$

$$\text{Rep} = 100 \pm (1.96) \sqrt{(0.4)}$$

$$\text{Rep} = 100 \pm 1.24$$

Por lo tanto el método analítico no es repetible.

8.- Calcular la Reproducibilidad interdía para los analistas

(Rep-d) con base en la siguiente ecuación:

$$\text{Rep-d} = 100 \pm (1.96) \sqrt{\frac{(MCD - MDe)}{(r)}}$$

$$\text{Rep-d} = 100 \pm 12.34$$

Por lo tanto hay Reproducibilidad interdía para los analistas.

9.- Calcular la Reproducibilidad entre analistas (Rep-a), de

acuerdo a la ecuación siguiente:

$$\text{Rep-a} = 100 \pm (1.96) \sqrt{[(MCa) - (MCD)] + (r.d) /}$$

$$\text{Rep-a} = 100 \pm (1.96) \sqrt{[-18.0971] /}$$

$$\text{Rep-a} = 100 \pm 8.54$$

Hay Reproducibilidad entre analistas.

PROYECTO No. 5 CÁLCULOS EFECTUADOS PARA EL ANÁLISIS CUANTITATIVO
DE MUESTRAS COMERCIALES, SIMILARES A LA ESTUDIADA.

2. RELACIONES

R

2.1. FARMACIA Capsulas.

Fórmula: Cada capsula contiene Clorhidrato de Oxitetraciclina
equivalente a 250 mg de Oxitetraciclina base anhidra.

El peso total de 10 capsulas llenas fue 4.53402 g

El peso total de 10 capsulas vacias fue 0.69898 g

Peso Neto Total fue 3.83504 g

Peso Neto Total / 10 = Peso Neto Promedio de muestra por capsula

$\bar{x} = 383.5$ mg muestra / capsula. = 0.3835 g MUESTRA / capsula.

Cálculos del peso muestra equivalentes a los mg de OTC.Base

Tenemos que 383.5 mg de muestra contienen 250 mg OTC.Base

Como 15.34 mg muestra contienen 10 mg OTC.Base

Se pesaron 30.68 mg de muestra equivalentes a 20 mg de OTC.Base

siguiendose las indicaciones del inciso 3.1.b. Preparación de
muestras.

Cálculos realizados para el Análisis Cuantitativo

Tenemos

Obtenemos

$$\frac{(\text{Área Patrón Referencia})}{(\text{Área Patrón Interno})} \cdot \frac{(\text{Peso Patrón Interno})}{(\text{Peso Patrón de Ref.})} = \text{FACTOR DE RESPUESTA DEL PATRÓN DE REFERENCIA}$$

$$\frac{(\text{Área de la muestra})}{(\text{Área Patrón Int.})} \cdot \frac{(\text{Peso Patrón Interno})}{(\text{Peso de la muestra})} \cdot \frac{(30.68 \text{ mg muestra})}{(20 \text{ mg de OTC.Base})}$$

$$\times \frac{(19.25 \text{ mg OTC Base})}{(10 \text{ mg OTC.BC: patrón de Ref.})} = \text{FACTOR DE RESPUESTA DEL PROBLEMA.}$$

$$\frac{(\text{FR Problema})}{(\text{FR Patrón de Ref.})} \times 100 = \% \text{ Encontrado en la muestra}$$

Así tenemos que:

$$\frac{204/300}{1700180} \times 100 = \frac{104.15\% \times 250 \text{ mg OTC/cáp.}}{100} = 260.4 \text{ mg OTC / cápsula}$$

Los límites especificados son 90.0% - 110.0% (225 mg - 275 mg) con respecto a la etiqueta (2).

2.2. OXIGRICAL^R Solución inyectable.

Fórmula: La ampollita No.1 contiene Oxitetraciclina base 100 mg, Lidocaína 50 mg, Cloruro de Magnesio 20 mg, vehículo c.b.p. 2 ml.

Se tomó alícuota de 1 ml equivalente a 50 mg OTC. Se transfirió a un matraz volumétrico de material actínico de 100 ml. De esta solución aforada se tomaron 2 ml, llevándose a un volumen final de 100 ml. Los cálculos efectuados para el análisis cuantitativo se muestran a continuación:

$$\frac{(\text{Área Patrón Referencia})}{(\text{Área Patrón Interno})} \times \frac{(\text{Peso Patrón Interno})}{(\text{Peso Patrón de Ref.})} = \text{FACTOR DE RESPUESTA DEL PATRÓN DE REFERENCIA.}$$

$$\frac{(\text{Área de la muestra})}{(\text{Área Patrón Int.})} \times \frac{(\text{Peso Patrón Interno})}{(\text{Peso de la muestra.})} \times \frac{(\text{Alíc. 5 ml P. Int.})}{(\text{Alíc. 2ml muestra})}$$

$$\times \frac{(9.25 \text{ mg OTC})}{(10 \text{ mg OTC/ml P.Ret.})} = \text{FACTOR DE RESPUESTA DEL PROBLEMA.}$$

$$\frac{(\text{FR PROBLEMA})}{(\text{FR PATRÓN DE REF.})} \times 100 = \% \text{ OTC / Ampollita.}$$

$$\frac{171/300}{1700180} \times 100 = 99.45 \% \text{ OTC} = 99.45 \text{ mg OTC / Ampollita.}$$