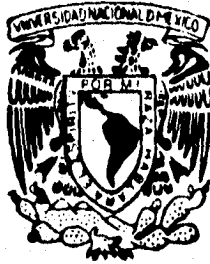


57
2ij



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

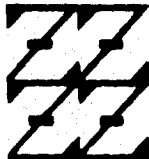
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**"DESARROLLO DE UN NUCLEO-EQUIPO DE
MEBROFENIN-S_n PARA EL MERCADO INSTANTANEO
CON Te-99m"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
TRINIDAD SALAZAR MURO

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HOMBRO OJA
DE NUESTRA NELLEION

MEXICO, D. F.

ABRIL, 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"**

JEFATURA DE LA CARRERA DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACION DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

TRINIDAD SALAZAR MURO

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: "Desarrollo de un núcleo-equipo de Mebrofenin-Sn para el mercado instantáneo con Tc-99m".

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE	Q.F.B. JOSE PONCE GUERRERO	
VOCAL	DRA. RAQUEL LOPEZ ARELLANO	
SECRETARIO	Q.F.B. GUILLERMINA FERRO FLORES	
SUPLENTE	Q.F.B. JOSE ANGEL ROJAS ZAMORANO	
SUPLENTE	Q.F.B. ENRIQUETA CASTREJON LOPEZ	

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

México, D.F. a, 29 de NOVIEMBRE de 1995

Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES
JEFE DE LA CARRERA

c.c.p. Departamento de Control de Egresados
c.c.p. Interesado

En Memoria de mi querida hermana Emilia, quién siempre motivó mi estudio por las Ciencias.

A Juana y José, siempre con infinito amor, siempre con gratitud por permitirme estar aquí y darme una familia tan poco común.

A Severino y María de Jesús, con agradecimiento y todo mi cariño por apoyar durante toda mi vida mi formación intelectual.

A Felicitas con amor, por enseñarme y apoyar siempre mi gusto por la Química.

**A Eloisa, Héctor, Víctor y Genaro , con cariño por ser
la compañía de toda mi vida.**

**A Jorge con amor, por su cariño, solidaridad y apoyo durante
todo este tiempo.**

**A Guillermo que además de profesor, fue un gran motivador
en esta carrera y un gran amigo.**

Gracias en especial a la Q.F.B Guillermina Ferro Flores por haber dirigido y apoyado este trabajo; al ingeniero José I. Tendilla Del pozo por el apoyo y las facilidades brindadas para la realización de esta Tesis en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.

Agradesco la colaboración y paciencia de la Dra. Raquel López Arellano de la Especialidad en Farmacia Industrial de la FES-Zaragoza por haber dirigido y asesorado este trabajo de tesis.

Agradesco a la Universidad Nacional Autónoma De México, especialmente a la FES- Zaragoza, el haberme formado profesionalmente.

INDICE GENERAL

	PÁG.
INTRODUCCIÓN.....	i
I. ANTECEDENTES.....	1
1. Radiofármacos.....	2
1.1. Desarrollo de un nuevo radiofármaco.....	3
1.2. Degradación de radiofármacos.....	4
1.3. Gammagrafía.....	5
1.4. Radiofármacos hepatobiliares.....	7
2. Conceptos de estabilidad.....	8
2.1. Estudios de estabilidad acelerada.....	8
2.2. Factores que afectan la estabilidad de los radiofármacos.....	10
3. Conceptos de validación.....	12
3.1. Historia de la validación.....	12
3.2. Definición de la validación de procesos.....	13
3.3. Objetivo de validar.....	14
3.4. Tipos de validaciones.....	14
3.5. Componentes de una validación.....	15
3.6. Departamentos responsables en la validación.....	16
3.7. Organización de la validación.....	17
3.8. El plan maestro de validación.....	23
3.9. Ventajas y limitaciones de la validación en procesos.....	24
3.10. Optimización de procesos.....	25
4. Monografía de ^{99m} Tc-Mebrofenin.....	26
4.1. Descripción.....	26
4.2. Historia.....	27
4.3. Síntesis y propiedades físicas.....	28
4.4. Espectro de resonancia magnética.....	29
4.5. Análisis cromatográfico.....	30
4.6. Método de análisis del complejo.....	31
4.7. Afinidad biológica.....	31
4.8. Farmacocinética.....	32
4.9. Aplicaciones clínicas.....	35
4.10. Aplicación y dosis.....	36
5. Monografía del ^{99m} Tecnecio.....	38

	PÁG.
5.1. Descripción.....	38
5.2. Historia.....	38
5.3. Obtención.....	39
5.4. El anión pertecneiato.....	41
5.5. Constantes físicas.....	41
5.6. Propiedades químicas.....	42
5.7. Compuestos de coordinación.....	44
5.8. Aplicaciones.....	44
5.9. Aplicación clínica.....	44
II. PARTE EXPERIMENTAL.....	45
1. Planteamiento del problema.....	46
2. Objetivos.....	47
3. Hipótesis.....	48
4. Materiales.....	49
4.1. Reactivos.....	49
4.2. Equipo.....	49
4.3. Material de laboratorio.....	50
4.4. Material biológico.....	50
5. Métodos.....	51
5.1. Síntesis del ácido 3-bromo-2,4,6-trimetilfenilcarbamoil metil iminodiacético o Mebrofenin.....	51
5.2. Definición de las características de calidad del núcleo-equipo.....	54
5.3. Selección de la formulación y elaboración del núcleo-equipo.....	55
5.4. Marcaje con Tc- ^{99m}	56
5.5. Evaluación de pureza radioquímica.....	57
5.6. Producción piloto de Mebrofenin-Sn ⁺² y optimización del proceso.....	58
5.7. Distribución biológica.....	63
5.8. Desarrollo del método analítico.....	64
5.9. Validación del sistema cromatográfico CLAR.....	66
5.10. Evaluación de la precisión (reproducibilidad) del sistema cromatográfico CCF.....	68

	PÁG.
5.11. Estudio de estabilidad.....	69
5.12. Validación del proceso.....	71
6. Resultados.....	73
6.1. Síntesis de Mebrofenin.....	73
6.2. Selección de la formulación.....	74
6.3. Optimización del proceso.....	76
6.4. Desarrollo del método analítico.....	79
6.5. Validación del sistema cromatográfico CLAR.....	81
6.6. Evaluación de la precisión (reproducibilidad) del sistema cromatográfico CCF.....	83
6.7. Estudio de estabilidad.....	85
6.8. Validación del proceso.....	88
7. Discusión de resultados.....	91
III. CONCLUSIONES.....	98
IV. BIBLIOGRAFIA.....	101
V. ANEXOS.....	107
1. Glosario.....	108
2. Cromatogramas del desarrollo del sistema analítico por CLAR.....	110
3. Resultados detallados de la validación del sistema.....	120
4. Análisis estadístico de optimización, estabilidad acelerada y validación del proceso a través del paquete estadístico "SAS".....	128
5. Documentación para la producción y para la evaluación de controles de calidad de Mebrofenin-Sn ⁺²	138
6. Certificados de calidad de los tres lotes finales de Mebrofenin-Sn ⁺²	147

INDICE DE TABLAS

I.	Rfs. para el Análisis del Complejo.....	31
II.	Concentración plasmática del ^{99m} Tc-Mebrofenin.....	32
III.	Parámetros de Biodistribución del ^{99m} Tc-Mebrofenin.....	33
IV.	Excreción urinaria del ^{99m} Tc-Mebrofenin.....	33
V.	Datos de Estudios dinámicos con ^{99m} Tc-Mebrofenin.....	34
VI.	Diseño factorial para la Optimización del Proceso.....	59
VII.	Diseño factorial para la Optimización de condiciones cromatográficas.....	65
VIII.	Resultados del análisis de puntos de fusión de tres lotes de Mebrofenin.....	73
IX.	Variación de la masa de SnCl ₂	74
X.	Resultados de la Optimización del proceso.....	76
XI.	Análisis de regresión lineal de la optimización del proceso.....	77
XII.	Valores calculados para la optimización del Proceso.....	78
XIII.	Evaluación de condiciones del CLAR con respecto a la composición de fase móvil y velocidad de flujo.....	79
XIV.	Análisis de regresión lineal de la optimización de condiciones para el método analítico por CLAR.....	80
XV.	Valores calculados para la optimización de condiciones del método analítico.....	81
XVI.	Resultados de la Linearidad del Sistema.....	81
XVII.	Resultados de la Precisión del Sistema.....	82
XVIII.	Resultados de Exactitud y Repetibilidad del Sistema.....	82
XIX.	Análisis por sextuplicado de un mismo lote de ^{99m} Tc-Mebrofenin por CCF-SA.....	83
XX.	Análisis por sextuplicado de un mismo lote de ^{99m} Tc-Mebrofenin por CCF-SG.....	84
XXI.	Estabilidad Acelerada del liofilizado Mebrofenin-Sn ⁺²	85
XXII.	Comparación de Estabilidad a diferentes Temperaturas.....	86
XXIII.	Resultados de la Pureza Radioquímica.....	88
XXIV.	Resultados del Contenido de Sn ⁺²	89

INDICE DE FIGURAS

1.	Diagrama de la gamma camara	6
2.	Validación prospectiva.	18
3.	Diagrama de flujo para la producción del núcleo-equipó liofilizado de Mebrofenin-Sn⁺².	20
4.	Diagrama causa-efecto.	21
5.	Plan maestro de validación.	23
6.	Estructura de Mebrofenin.	26
7.	Estructura del complejo ^{99m}Tc-Mebrofenin.	27
8.	Generador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$.	40
9.	Equipo para la elaboración de Mebrofenin-Sn⁺².	61
10.	Gráficas de la variación en la masa de SnCl₂.	75
11.	Superficie de respuesta del estudio de estabilidad acelerada.	87

ABREVIATURAS

KeV.	Kiloelectrovolts
Tc-99m	Tecnecio 99 metaestable
IDA	Ácido fenilcarbamoilmetil iminodiacético
FDA	Administración de Fármacos y Alimentos
S.S.A.	Secretaría de Salubridad y Asistencia
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
CCF	Cromatografía de capa fina
CCF-SG	Cromatografía de capa fina en silica gel
CCF-SA	Cromatografía de capa fina en ácido silícico
D.E.	Desviación estándar
mCi	millicurie
Mbq	Megabecquerel
U.V	Ultravioleta
C.V	Coficiente de variación
R²	Factor de correlación
rpm	Revoluciones por minuto
P.R	Pureza Radioquímica
D.B	Distribución biológica
cpm	Cuentas por minuto
Tr	Tiempo de retención
K	Factor de capacidad
R	Resolución
SELEC.	Factor de selectividad

INTRODUCCIÓN

La contribución de la Medicina Nuclear al diagnóstico temprano de gran número de enfermedades ha sido considerable y ha posibilitado la pronta aplicación del tratamiento apropiado. Esta especialidad utiliza técnicas extraordinariamente sensibles para demostrar los cambios fisiológicos presentes en los procesos patológicos, in vivo e in vitro, mucho antes de que tales procesos provoquen alteraciones anatómicas, a veces irreversibles. Es por eso que su empleo se ha difundido por todo el mundo.

Dentro de las actividades del Departamento del Reactor y Materiales Radiactivos del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), están la producción rutinaria de Núcleo-equipos y radiofármacos, así como el desarrollo de nuevos productos más eficientes, confiables y seguros para el diagnóstico. El ININ surte alrededor del 60 a 65% de los radiofármacos utilizados a nivel nacional, el resto son productos de importación y por supuesto de un costo mayor, de ahí la necesidad de producir productos de calidad a menor costo.

En la Medicina Nuclear se debe también asegurar que los procedimientos de diagnóstico, determinen la condición real del paciente y, que los recursos invertidos no se malgasten, para esto es necesario implantar programas de Garantía de Calidad.

En estos últimos años, el programa de la Organización Mundial de la Salud dedicado a radiodiagnóstico y Medicina nuclear se ha ocupado sobre todo de mejorar la cobertura de esos servicios y aumentar su eficiencia. Esto es importante para países en desarrollo, como el nuestro, que sólo pueden destinar recursos limitados a la atención de salud. Con frecuencia complica el problema la escasez de personal bien capacitado y las dificultades para obtener el equipo y los suministros de radionúclidos.

Con la Garantía de Calidad en radiofarmacia, se trata de asegurar que sólo se administrarán radiofármacos inocuos y efectivos, de calidad uniforme y en las

dosis prescritas. Así, el aseguramiento de la calidad debe incluir estudios de Estabilidad que garanticen, la eficiencia del radiofármaco, especificaciones físicas, químicas, microbiológicas, diagnósticas y de seguridad durante cierto período de tiempo de almacenamiento y durante su reconstitución.

El grado de calidad entonces estará determinado fundamentalmente por:

- a) las especificaciones establecidas en el prototipo durante la etapa de concepción del producto;
- b) el control del proceso durante la fabricación y cumplimiento de las especificaciones preestablecidas.

Para garantizar que un proceso específico producirá constantemente un producto que cumpla las especificaciones y atributos de calidad predeterminados, es necesario "Validar el proceso de fabricación". La importancia de validar un proceso radica en el hecho de que las industrias deben cumplir con aspectos legales apeándose a las Prácticas Adecuadas de Manufactura actuales; las normas legales y los reglamentos oficiales establecidos por la Secretaría de Salud.

Por otra parte el aspecto económico es fundamental, un buen negocio se hace al garantizar que no se tendrán lotes rechazados o productos que deban ser retirados del mercado, evita reprocesos y garantiza calidad a un costo reducido.

En el presente trabajo se presenta el desarrollo de un Núcleo-equipos para diagnóstico hepatobiliar que según estudios de Nurn y Cols.(12) y de Subramanian (13), presenta las mejores propiedades de especificidad hepática, en comparación con otros núcleo-equipos para este tipo de estudios. El complejo llamado ^{99m}Tc -Mebrofenin o ^{99m}Tc -BromotrimetilIDA, derivado del ácido fenilcarbamoil metil iminodiacético (IDA).

El objetivo general de la tesis fue el desarrollo de un núcleo-equipos de Mebrofenin-Sn⁺² que cumpliera con los controles de calidad radioquímicos necesarios para diagnóstico; el desarrollo se llevó a cabo desde la obtención de la materia prima (Mebrofenin), realizando la síntesis del mismo (Ferro G. y Cols.8) y comprobando su reproducibilidad. Se realizaron la formulación del núcleo-

equipo con el agente reductor y excipientes, el estudio de estabilidad acelerada para el producto final liofilizado determinando su fecha de caducidad o tgo, así como el estudio de estabilidad del complejo formado. Se llevó a cabo la optimización del proceso de producción del núcleo-equipo y la validación del mismo. También en este trabajo se incluye el desarrollo y la validación del sistema cromatográfico por CLAR para el análisis de la materia prima, la evaluación de la precisión del sistema para la determinación de la pureza radioquímica, un análisis fundamental para los núcleo-equipos. Tanto el objetivo general como los objetivos específicos se cumplieron satisfactoriamente, obteniendo un producto liofilizado utilizado para diagnóstico hepatobiliar con excelentes características de calidad, y con las características radioquímicas necesarias para la formación del complejo ^{99m}Tc -Mebrofenin.

I. ANTECEDENTES

1. RADIOFÁRMACOS

En 1986 la Asociación Latinoamericana de Sociedades de Biología y Medicina Nuclear, define a un radiofármaco de la manera siguiente:

"Son aquellos verdaderos trazadores radiactivos que son administrados con el fin de visualizar la anatomía de un órgano o sistema, evaluar el comportamiento fisiopatológico a nivel de los tejidos, analizar a través de su metabolismo el comportamiento bioquímico o determinar cuantitativamente sus parámetros farmacocinéticos. Comparando estos resultados con los obtenidos en una población de seres humanos normales voluntarios" (2).

Las características deseables en un radiofármaco son :

a) El radionúclido empleado debe tener una vida media radiactiva corta, sólo lo suficientemente larga para permitir la preparación, purificación, entrega y aplicación médica; ya que esto minimiza la dosis de radiación absorbida. El radionúclido no debe emitir preferentemente partículas alfa, beta y fotones gamma de baja energía.

b) La vida media efectiva también debe ser corta, ya que el metabolismo es muy rápido; el tiempo que permanezca el radiofármaco en el cuerpo debe ser lo más corto posible.

c) Cuando el radiofármaco va a ser empleado para visualización externa, debe utilizar un núclido de emisión gamma pura, de una energía aproximada de 200 Kev.

d) Las propiedades físicas deben ser compatibles con su uso, por ejemplo, el tamaño de partícula es uno de los criterios que determina el bloqueo de los capilares de un órgano específico, bien sea por partícula de macroagregados o captación de coloides por el sistema retículo endotelial. El tamaño de partícula promedio debe tener un intervalo restringido de variación.

Los radionúclidos principalmente utilizados a nivel mundial para la producción de radiofármacos por sus propiedades físicas y químicas, así como por su fácil obtención son: el Tecnecio-99m y el Indio-113m (1, 2).

1.1 Desarrollo de un nuevo Radiofármaco

La necesidad de buscar nuevos radiofármacos procede de la necesidad de introducir posibilidades diagnósticas y terapéuticas aún desconocidas, mejorar productos ya conocidos consiguiendo la aproximación al radiofármaco ideal.

Al diseñar un nuevo radiofármaco para explorar una función o un órgano concreto hay que partir de un perfecto conocimiento de la fisiología del órgano blanco que se quiere estudiar para considerar los posibles mecanismos de acción que se podrán aprovechar y que condicionarán la estructura del futuro radiofármaco; por ejemplo agentes particulados para exploraciones de órganos que sean capaces de ser endocitados por la célula y de bloqueo capilar, quelatos de eliminación renal para estudios de función renal, etc. (5).

El radionúclido a emplear dependerá en parte de la estructura de la molécula, de que sea posible su marcaje y de que éste no la modifique induciendo cambios en su actividad y en sus propiedades biológicas, fisico-químicas, etc.

El estudio previo del radiofármaco debe incluir cuidadosas investigaciones relacionadas con la conservación y degradación de la molécula marcada, influencia de la radiolisis, posible utilización de agentes conservadores, fecha de caducidad, etc. (5)

Otros factores que influyen en el diseño de un radiofármaco y que deben considerarse son:

- 1. Compatibilidad** entre el compuesto químico a "marcar" y el radionúclido marcador.
- 2. Estequiometría** de la formulación, esto es encontrar la relación molar adecuada entre el compuesto químico, el agente reductor y el radionúclido.
- 3. Carga de la molécula**, a mayor carga disminuye la solubilidad en disoluciones acuosas.
- 4. Tamaño de la molécula** dependiendo del órgano blanco y su mecanismo de absorción.

5. **Enlace a proteínas**, al ser de inyección intravenosa la afinidad a proteínas plasmáticas debe ser mínima (salvo que el estudio sea para componentes sanguíneos).
6. **Solubilidad** debido a que se aplica como un inyectable debe ser soluble en agua, a un pH compatible con la sangre aproximadamente de 7.4 y poseer una osmolalidad adecuada.
7. **Estabilidad** química, física y biológica del radiofármaco tanto en anaquel como reconstituido; y finalmente
8. **Distribución biológica**, es decir que sea lo más afin al órgano blanco (3).

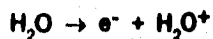
1.2 Degradación de Radiofármacos

Los radiofármacos, al igual que cualquier compuesto no radiactivo, pueden verse alterados por diversos factores químicos, tales como hidrólisis, oxidación, etc. Pero por la misma naturaleza radiactiva del fármaco, además de las reacciones normales de degradación actúan mecanismos de radiólisis. La radiación emitida por un radionúclido, al interactuar con las moléculas del medio, es capaz de inducir reacciones de oxidación-reducción.

La interacción de la radiación sobre el medio, especialmente sobre las moléculas del solvente, puede dividirse en tres fases:

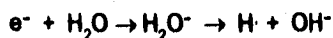
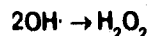
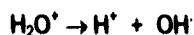
1. Fase física

Absorción de la radiación con ionización y excitación de moléculas. En esta fase las moléculas de agua resultan ionizadas



2. Fase físico-química

Reaccionan los productos del agua originando radicales libres muy oxidantes



3. Fase química

Los radicales libres formados actúan sobre otras moléculas induciendo reacciones redox

Además de este mecanismo de degradación debido al efecto de la radiolisis, los radiofármacos pierden su eficacia por decaer la radiactividad del radionúclido que los marca. Para aumentar la estabilidad de las preparaciones farmacéuticas se puede añadir algunos agentes conservadores, como aditivos (5).

1.3 Gammagrafía

La Gammagrafía consiste en la reproducción sobre una placa fotográfica o radiográfica de la radiación gamma emitida por el órgano blanco después de la inyección de un radiofármaco capaz de ser captado selectivamente por este órgano (1).

La exploración se realiza previa inyección del elemento o compuesto marcador registrando la radiación que emite cada zona del órgano en estudio mediante una cámara Anger, la cual es un sistema que detecta a los rayos gamma y rayos X que genera una imagen bidimensional. Consiste en un detector de cristal de yoduro de sodio activado con Talio, el cual recibe las radiaciones del radioisótopo depositado en el órgano. Entre la fuente de radiación y el cristal se encuentra un colimador de plomo; la señal generada en el cristal del detector es localizada de acuerdo con las coordenadas X-Y por medio de tubos fotomultiplicadores (fototubos). Esta información se procesa en el sistema electrónico y se proyecta

en un tubo de rayos catódicos, acumulada en un sistema procesador de datos, o bien es registrada en película fotográfica, en cintas o discos magnéticos para su análisis ulterior (3,16).

Diagrama de la Gamma Cámara

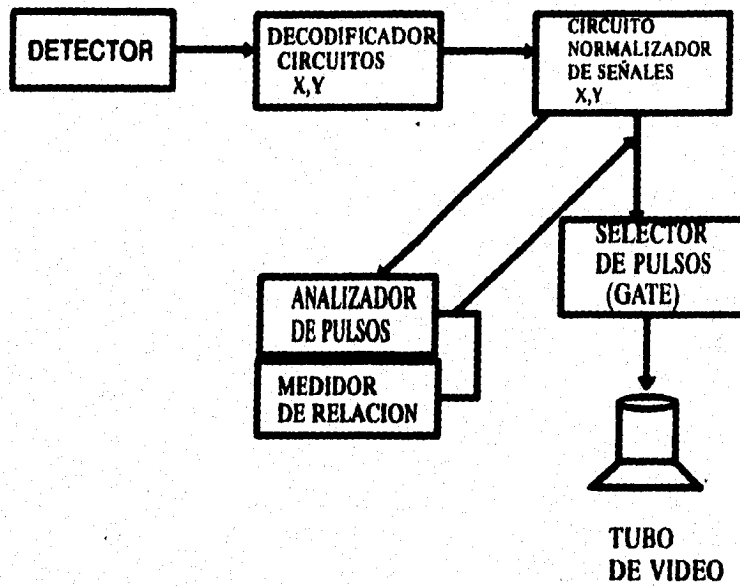


Figura 1.

1.4 Radiofármacos hepatobiliares

El estudio y desarrollo de este tipo de radiofármacos se inicia en 1955 al sintetizar Taplin el ^{131}I -rosa de bengala, aunque tuvo poca aplicación clínica, impulsó lo suficiente el desarrollo de otros compuestos marcados con I-131, como lo fue la bromosulfaleína y el verde de indocianina.

Posteriormente Tubis, en 1972, marcó penicilamina con Tecnecio-99m, desarrollando un nuevo agente colescintigráfico, a partir de esta fecha han aparecido alrededor de 30 nuevos agentes hepatobiliares marcados con Tecnecio-99m. Estos pueden clasificarse en dos clases, los derivados del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -PG (piridoxilidenglutamato) y del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IDA (fenil-carbamoilmetil-imino diacético), presentando estos últimos mayor especificidad hepatobiliar (8).

El mecanismo de acción de estos agentes hepatobiliares se basa en su comportamiento bioquímico. Los hepatocitos captan el quelato lipófilo que pasa a la vesícula biliar y al intestino.

En 1983 se estudió la relación estructura química-distribución biológica de 33 derivados del IDA. (Nunn y Cols.12). Evaluaron sus características lipofílicas y las correlacionaron con la unión a proteínas, la especificidad hepatobiliar, la cinética intrahepática y la excreción renal. Se encontró que los sustituyentes ORTO en el anillo fenólico disminuyen la lipoficidad de los compuestos, mientras que el aumento en el tamaño de las cadenas alquílicas y la posición PARA aumentan dicha lipofilia. Con estos estudios la mayor especificidad hepática, un rápido tránsito hepatobiliar, menor excreción renal y la mejor competencia con las bilirrubinas por la excreción hepatocelular, la tiene el radiofármaco $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -(bromotrimetilIDA), hasta la fecha sólo ha aparecido como otro agente nuevo el IodotrimetilIDA, pero la única modificación ha sido la sustitución del yodo por el bromo pero los parámetros farmacocinéticos son similares (11 y 13). Prácticamente concluyó la búsqueda del radiofármaco ideal para las evaluaciones hepatobiliares.

2. CONCEPTOS DE ESTABILIDAD

A la estabilidad de un producto farmacéutico se le puede definir como la capacidad de una fórmula en particular, en un sistema específico de envase y cierre, para mantenerse dentro de sus especificaciones físicas, químicas, microbiológicas, terapéuticas y toxicológicas (18).

A la estabilidad de un fármaco también se le puede definir como el tiempo transcurrido desde la fabricación y envasado de la formulación hasta que su actividad química o biológica no desciende por debajo de un nivel de potencia determinado de antemano y sus características físicas no se han modificado de manera apreciable ni nociva (32).

Aunque existen excepciones, por lo general, se reconoce que el nivel de potencia aceptable mínimo es el 90 % de la potencia rotulada. Por lo consiguiente, la fecha de expiración se define " como el tiempo en que el preparado habrá de mantenerse estable si se le almacena en las condiciones recomendadas" (18).

2.1 Estudios de Estabilidad Acelerada

De acuerdo con la naturaleza del fármaco o mediante un estudio preliminar de estabilidad se decide cuales son los factores que más influyen en la degradación de la molécula. Mediante la temperatura pueden acelerarse la mayoría de los procesos que producen degradación en los fármacos y esta es la base de gran parte de los métodos de envejecimiento. Si se trata de la temperatura, se puede seguir el método de Arrhenius, o el diagrama de estabildades de Tootill para predecir el período útil a temperatura normal.

La fecha de caducidad o de expiración puede ser calculada a partir de la ecuación de Arrhenius también llamado método de Garrett ya que este ultimo la aplicó al cálculo de estabilidad de productos farmacéuticos:

$$K = A e^{-\Delta H^*/RT}$$

$$\ln k = \ln A - \Delta H^*/RT$$

donde ΔH^* es la entalpía de activación, A es una constante relacionada con el número de colisiones entre las moléculas, R la constante de los gases y T la temperatura absoluta. De la ecuación se deduce que si se representa $\ln K$ en función de $1/T$ se obtiene una recta con pendiente $\Delta H_a^*/RT$ (32).

Asimismo si se conocen A y ΔH^* se puede calcular la velocidad de reacción a la temperatura que se desee.

Para lograr la predicción de estabilidad a partir de la fórmula, se aplica la ecuación que describe la cinética de la reacción de degradación, estas son reacciones de primer orden (es decir, reacciones en las cuales la ocurrencia de la reacción depende de una única molécula en cada momento). La fórmula que describe la cinética de la reacción en cada momento es:

$$\ln C_0/C_t = -k t$$

Donde: C_0 es la concentración inicial; C_t la concentración en cada momento; t es el tiempo y k la constante específica que se obtiene experimentalmente.

La manera de proceder es la siguiente: como es prácticamente imposible medir la concentración de una sustancia que interviene en una reacción química (degradación) instantáneamente, se hace por tanto una aproximación que es estudiada a partir de una propiedad del agente (puede ser la actividad biológica del radiofármaco, la pureza radioquímica, etc.) que sea directamente proporcional a la concentración en función del tiempo y de la temperatura. Con los resultados se elaboran gráficas y se obtiene la pendiente para cada temperatura según corresponda la cinética de degradación. Con las pendientes obtenidas se realizan una gráfica con respecto a $1/\text{Temperatura}$ (en grados Kelvin) y de ahí se obtiene otra pendiente ($m = -E/R$) y el intercepto ($\ln A$). Finalmente se realiza el cálculo de la constante a cualquier temperatura de acuerdo a:

$$\ln K = -E/RT + \ln A$$

Entre los factores que pueden acelerar la degradación de un fármaco en general, a parte de la temperatura se encuentran los siguientes:

1. La Humedad

Considérense las fuentes de humedad: el agua residual que contiene el producto elaborado y la atmosférica. La influencia del envase es fundamental al respecto. El efecto de la humedad sobre la velocidad de reacción depende directamente de la temperatura, la cual acelera, en la gran mayoría de los casos, todas las reacciones provocadas por aquélla. Es decir que si tenemos un recipiente hermético que contiene un fármaco con cierto porcentaje de agua residual, por ejemplo un liofilizado, será posible acelerar el proceso de degradación aumentando la temperatura.

2. La Luz

Las reacciones fotolíticas no se aceleran por aumento de la temperatura, ya que su energía de activación es muy baja (2-4 Kcal/mol), sino por un aumento de la intensidad lumínica.

3. Los gases atmosféricos

La estabilidad también está afectada por gases atmosféricos ocasionando reacciones de oxidación o carbonatación. En estos casos la velocidad de reacción es acelerada por procesos de difusión. Por ello los estudios de estabilidad se realizan con una prueba de empaques de diferentes permeabilidades a distintas presiones de oxígeno o anhídrido carbónico (32). El fenómeno de difusión se puede evitar empacando herméticamente o en atmósfera inerte al fármaco que así lo requiera, esto puede aplicarse a productos liofilizados.

2.2 Factores que Afectan la Estabilidad de los Radiofármacos

En cuanto a la estabilidad del producto liofilizado, esta se ve afectada por:

1. la concentración del agente reductor
2. la atmósfera de nitrógeno durante la preparación
3. las condiciones de elaboración
4. la temperatura de almacenamiento
5. la naturaleza de la molécula acarreadora

La estabilidad de los compuestos marcados (esto es el liofilizado reconstituido con la solución que contiene el radionúclido) depende de:

1. el radioisótopo empleado
2. empleo de agente reductor
3. la actividad específica del preparado
4. la naturaleza de la molécula acarreadora
5. las reacciones de radiolisis

3. Conceptos de Validación

Sin duda los fabricantes de medicamentos han tratado por muchos años de asegurar que los productos que preparan tengan la calidad deseada de una manera reproducible. En la presente década se han observado cambios significativos en la forma de apreciar y conseguir la calidad de los productos farmacéuticos, dos hechos han contribuido de manera especial a que dicho cambio se realizara:

Por una parte, la complejidad de los procesos que se efectúan en una moderna planta farmacéutica dificulta en gran medida tener una visión real de su funcionamiento, sobre todo cuando se llevan a cabo operaciones cuyos posibles errores no pueden ser detectados con los controles normales realizados durante el proceso o en el producto terminado.

Por otra parte, en algunas operaciones de manufactura, especialmente en el caso de productos estériles, la estadística ha puesto en evidencia la dificultad de encontrar un número reducido de unidades defectuosas.

A la fecha, los conceptos de Control Total de Calidad, de Validación, la normativa internacional sobre Prácticas Adecuadas de Manufactura son, sin lugar a dudas, herramientas que permiten conocer mejor los productos y los factores que afectan su calidad, de tal manera que cuando se aplican adecuadamente, nos llevan a lograr lo que ha sido objetivo primordial de todo fabricante de medicamentos: asegurar que cada unidad de dosificación elaborada cumpla con las características de calidad diseñadas.

3.1 Historia de la Validación

Los orígenes de "Validar" desde un punto de vista regulatorio se localizan en los Estados Unidos, y se remontan a la década de los 70. En esos años se desea verificar de manera documentada, la confiabilidad de las Técnicas analíticas.

Posteriormente la necesidad de validar surge como respuesta a un problema de contaminación presentado en un producto parenteral de gran volumen que ocasionó daños a la población. Ya para 1976 la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA) menciona por primera vez dentro de una revisión de las Buenas Prácticas de Manufactura, el concepto de validación aplicado específicamente a la esterilización. Dado el interés despertado por el tema, la FDA decide establecer directrices de tipo informativo para orientar acerca de la validación de procesos farmacéuticos en un sentido general. A partir de 1985, dicha administración considera que todo proceso que no este validado esta fuera de control. Consideraciones similares se han venido presentando en países de la comunidad europea y latinoamericana, aunque basados principalmente en los antecedentes establecidos por Estados Unidos (22, 23).

3.2 Definición de Validación de Procesos

Varias definiciones han sido expuestas tanto por portavoces de la industria como por representantes universitarios o por la FDA. En general se plantea la misma cuestión pero con otras palabras y la esencia de ello es que Validar un proceso es tener la prueba documentada de que "un proceso debe hacer lo que pretende hacer".

Desde 1978 la FDA emitió la siguiente definición antes de la publicación de la revisión de sus Buenas Prácticas de Manufactura dentro de un programa de habilitación de inspección de procesos:

"Un proceso de manufactura validado es aquel que ha probado hacer lo que pretendía hacer. La prueba de la validación se obtiene a través de la recopilación de datos, preferiblemente iniciando desde la fase de desarrollo del proceso y continuando dentro de la fase de producción" (20).

Comenta que la validación necesariamente incluye la calificación del proceso (calificación de materiales, equipo, sistemas, edificios, personal) y también incluye el control íntegro del proceso para repetir lotes o corridas.

En 1987 finalmente la FDA termina un conjunto de guías de principios generales de procesos de validación, en las cuales define la validación de un proceso:

"es un programa documentado que prueba con un alto grado de seguridad, que un proceso específico puede producir consistentemente un producto de acuerdo a sus especificaciones y atributos de calidad predeterminados"(21).

De manera similar a FDA, las guías generales de validación de la S.S.A publicadas en 1989, coinciden con el concepto anterior.

3.3 Objetivo de Validar

El objetivo primordial que requiere la industria farmacéutica al validar, es la de fabricar productos con calidad a bajo costo, además de cumplir con normas oficiales.

Las ventajas obtenidas con la validación de procesos son la reducción de costos, optimización del proceso, determina las variables críticas de un proceso y la posibilidad de control de estas, cumplimiento de normas legales y garantía de calidad. Hace posible también, que se cuente con procedimientos analíticos más rápidos y precisos.

Un proceso validado es un proceso más eficiente, que produce menores reprocesos, rechazos, pérdidas, etc. Un programa de garantía de calidad y de mejoras en la productividad no debe estar exento de una parte fundamental que es la validación de procesos.

3.4 Tipos de validaciones

De acuerdo a las circunstancias en que se lleva a cabo la validación esta se clasifica en:

La validación prospectiva se refiere a comprobar a través de un plan experimental denominado "protocolo de validación", que un proceso realiza lo que está destinado a hacer antes de comercializar un producto y requiere normalmente de un alto grado de experimentación a nivel de desarrollo.

La validación retrospectiva se refiere a validar un proceso a través del examen crítico de información sobre condiciones de operación y controles analíticos acumulados a lo largo de la fabricación del producto.

Hablamos de validación concurrente cuando nos referimos a un tipo de validación prospectiva que se aplica exclusivamente en productos y procesos que se realizan esporádicamente en los que puede decirse que están bajo control con el análisis de muestras representativas de distintas etapas del proceso cada vez que se fabrique un lote.

Se denomina revalidación a un tipo de validación prospectiva que se desarrolla en procesos ya validados en los que se ha efectuado una modificación (20).

3.5 Componentes de una Validación

Los elementos comunes en una validación de procesos son los siguientes:

- 1. Diseño del producto.** Se estudia la formulación, los procedimientos básicos de fabricación, especificaciones de control de calidad y metodología. Esto es importante ya que un producto mal diseñado puede hacer el control de un proceso o la validación imposible.
- 2. Materias primas y material de empaque.** Implica la calificación de proveedores y de materiales, estableciendo las especificaciones requeridas.
- 3. Instalaciones.** La calificación de una instalación que incluye: diseño, construcción, verificación y mantenimiento preventivo. Debe proporcionar seguridad al producto cumpliendo con las buenas prácticas de manufactura.
- 4. Equipo.** Se califica el diseño, su instalación y comprobación de buen funcionamiento. Todo equipo debe contar con procedimientos escritos de

operación, mantenimiento, y sanitización validados; así mismo con personal entrenado que opere el equipo.

5. Calibración de Instrumentos. Este es un factor crítico para el proceso. Todo el equipo de medición que intervenga en la producción de un producto farmacéutico debe estar calibrado; esto es debe ser exacto en su medición de acuerdo con un estándar de comparación conocido.

6. Sistemas de apoyo crítico. Estos se refieren a suministros de agua purificada, aire limpio, aire comprimido, nitrógeno, luz, sistemas de filtración, etc. La calificación de un sistema de apoyo crítico se divide en tres etapas: diseño, instalación y desafío; y comprobación o revisión periódica.

7. Procedimientos analíticos. Son procedimientos metodológicos empleados en la valoración de principios activos, productos de degradación, etc. Deben ser validados para asegurar la confiabilidad, exactitud, precisión, sensibilidad y reproducibilidad.

8. Calificación del operador. Un operador debe poseer entrenamiento y experiencia para que la validación tenga el éxito esperado. Estará calificado en todos los aspectos de su trabajo, esencialmente en las Prácticas de Adecuadas de Manufactura (21).

3.6 Departamentos Responsables en la Validación

La validación de procesos no es necesariamente una actividad individual, sino de un grupo de personas, grupos o comités organizados; que se dividen las responsabilidades específicamente para estructurar el plan de validación.

Las responsabilidades específicas para cada estructura organizacional pueden ser las siguiente:

1. Departamento de Ingeniería; se encarga de instalar, calificar y certificar la planta, equipo e instaurar un sistema de soporte.

2. Departamento de Desarrollo; diseña, optimiza y califica el proceso de manufactura con límites y especificaciones, es decir establece la información sobre la capacidad del proceso.

3. Producción; se encarga de operar y dar mantenimiento a la planta, facilitar el equipo, proporcionar los sistemas de soporte, así como mantener el proceso dentro de especificaciones o de acuerdo con los requerimientos establecidos.

4. Control de Calidad; establece los protocolos de validación y conduce la validación del proceso, monitoreando, muestreando, inspeccionando que el proceso de producción cumpla con especificaciones, requerimientos y límites diseñados (21).

3.7 Organización de la Validación

El esquema que se presenta en la figura 2, es la secuencia seguida en la organización de la validación Prospectiva (22).

Los pasos para realizar una validación prospectiva son los siguientes:

1. Desarrollo del Producto. Esto incluye el desarrollo de la formulación y el desarrollo del proceso.

a. Desarrollo de la formulación se incluye la actividad química, fórmula, interacción de materias primas o excipientes, perfil de preformulación y formulación, efectos de biodisponibilidad, métodos de análisis, formulación óptima, especificaciones o atributos, etc..

b. Desarrollo del proceso se tienen los objetivos de:

Desarrollar procesos deseables que cumplan las especificaciones, identificación de parámetros en el proceso que afectan a los atributos del producto, especificaciones en proceso y métodos de análisis, condiciones del equipo necesario.

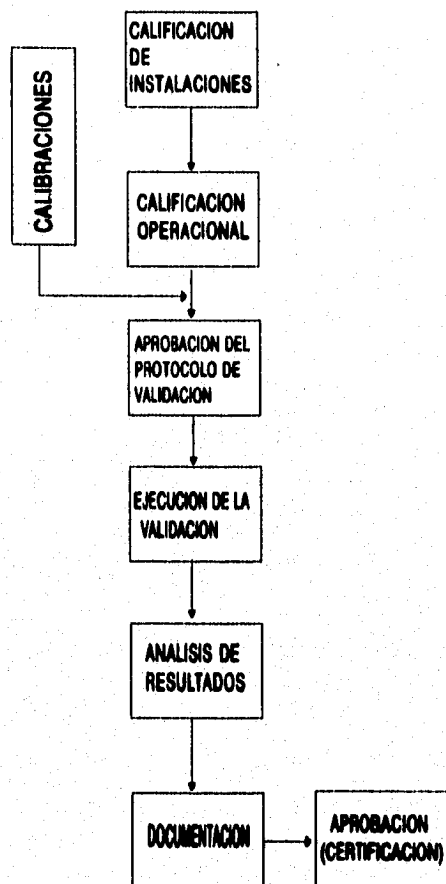


Figura 2. Validación Prospectiva

El desarrollo del proceso puede ser dividido en las siguientes partes:

I. Diseño. Es el primer estado de planeación se realizan diagramas de flujo y diagramas causa efecto. El diagrama de flujo permite identificar las operaciones unitarias, equipo, adición de materias primas, planeación de actividades, etc.

A continuación en la figura 3, se presenta un ejemplo de Diagrama de Flujo para la producción de un núcleo-equipos liofilizado de Mebrofenin-Sn⁺².

Mediante las cartas de control de variables se escriben las diferentes operaciones unitarias, las condiciones de operación, los controles durante el proceso y los productos obtenidos en cada etapa.

Los diagramas causa-efecto son una representación de la relación existente entre las variables de formulación (causa) y la respuesta (efecto). Un ejemplo de este diagrama se ilustra en la figura 4.

II. Capacidad. Permite la identificación de parámetros críticos del producto y proceso, es un estado de transición entre el laboratorio y el proyecto final del proceso.

III. Caracterización. Es un examen sistemático de las variables críticas que existen en la fabricación. Los objetivos del estudio son: confirmar las variables de control del proceso y cuantificar sus efectos; establecer las condiciones para cada operación unitaria y; determinar los límites de operación garantizando un producto aceptable.

IV. Verificación. Es necesaria la verificación cuando el proceso se va a transferir a producción asegurando las condiciones de manufactura y determinando su reproducibilidad.

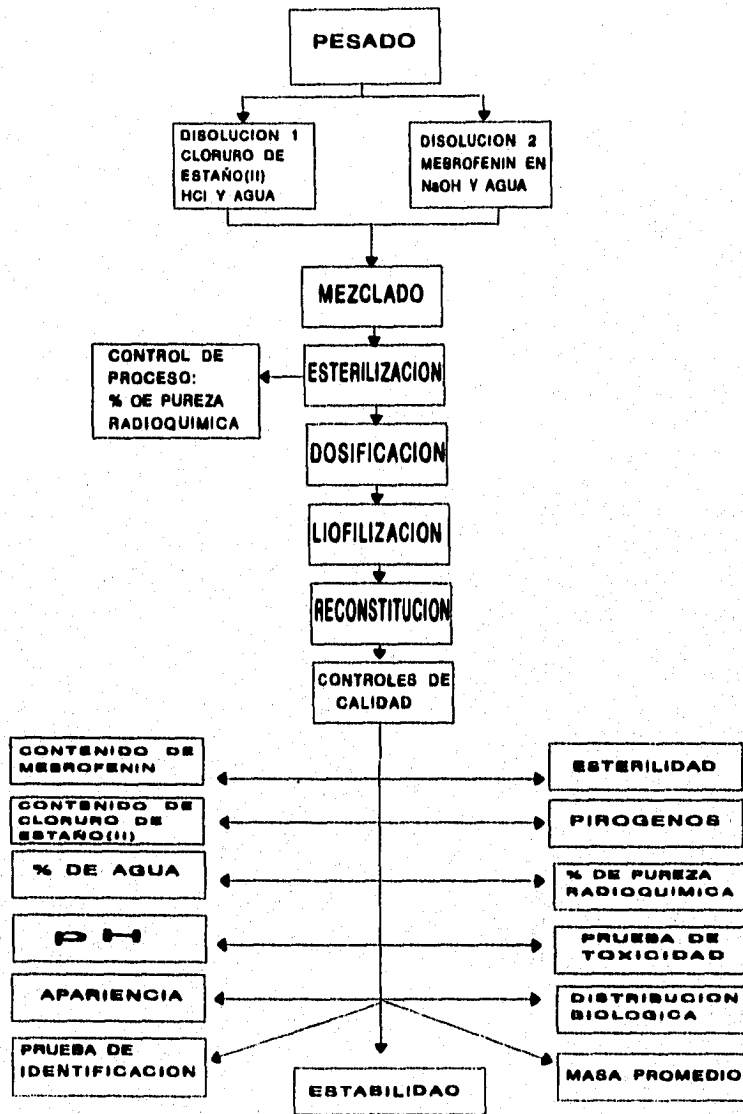
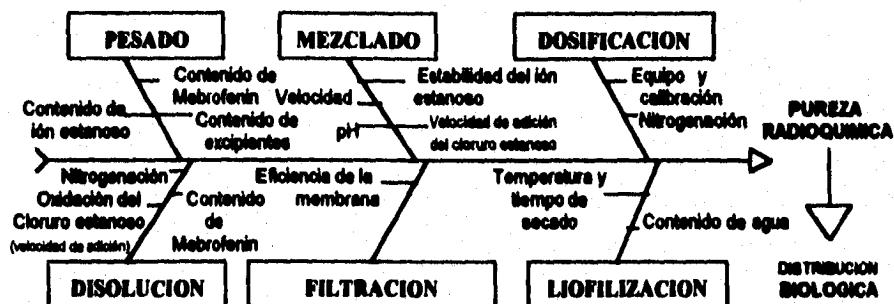


Figura 3. Diagrama de Flujo para la producción de un núcleo-equipos liofilizado de Mebrofenin-Sn⁺²



FACTORES QUE AFECTAN LA PUREZA RADIOQUÍMICA DEL ^{99m}Tc -MEBROFENIN DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE NÚCLEO-EQUIPOS DE MEBROFENIN-8n

Figura 4.

v. Desarrollo de la documentación. La documentación es el soporte de la validación y puede incluir lo siguiente:

- Desarrollo de lote
- Especificaciones de materia prima
- Lista de equipo
- Diagrama de flujo del proceso
- Tolerancia de variables
- Instrucciones de operación para el equipo
- Programa de control de calidad que incluye intervalos de muestreo
- Métodos de análisis y operaciones unitarias críticas
- Especificaciones del producto final
- Condiciones de riesgo
- Requisitos especiales de producción
- Perfil de estabilidad del producto
- Especificaciones del material de empaque primario

2. Transferencia a producción. El proceso de escala a nivel de producción sigue las fases de : estudio de transferencia, proceso de calificación operacional y calificación del proceso.

Para la transferencia a nivel de producción se debe realizar una calificación del equipo, los estudios de laboratorio deben ser suficientes para producir con las especificaciones y definir los parámetros del proceso. Después de los estudios de transferencia se elabora un protocolo, donde se describen: instrucciones, restricciones, equipo, materias primas, formulación, proceso de manufactura, muestreo y análisis y definición de criterios de calificación.

3. Calificación del Proceso. Durante cada fase de desarrollo y calificación del proceso de producción final, se genera una extensa cantidad de documentos, que están directamente relacionados con la manufactura final del proceso e incluye: proceso de manufactura, fórmula maestra, diagrama de flujo del proceso, instrucciones de manufactura, instrucciones del empaque, especificaciones, muestreo, métodos de análisis y el proceso de calificación de los datos (21).

Cubiertos los prerrequisitos anteriores se definen las responsabilidades para llevar a cabo la validación prospectiva. Entonces se prepara el protocolo de validación y contiene los siguientes elementos:

- Objetivos.
- Método de Estudio (número de lotes a validar).
- Condiciones para la revalidación.
- Antecedentes y referencias.
- Descripción de fórmula, técnica detallada de manufactura y recomendaciones.
- Condiciones de operación
- Descripción de pruebas selectivas de producto intermedio y producto terminado.
- Indicaciones de métodos de muestreo, inspección y análisis en cada etapa.
- Nombres de operarios, supervisores y autorizaciones correspondientes.

- Cartas de control que permitan establecer los límites para el proceso.
- Anexo de verificaciones y de análisis específicos de las materias primas que tengan mayor importancia en el producto.

3.8 El Plan Maestro de Validación

La validación comienza cuando se decide ¿qué es exactamente un proceso dado?, ¿para qué es?, ¿qué se supone que hará?. Una vez que esto se ha formulado y respondido de manera razonable, entonces se puede preparar un plan maestro para validación. A continuación se presenta un ejemplo en la figura 5, para un proceso de fabricación de liofilizados inyectables, situando el agua purificada como parte de sistemas críticos ligados a los procesos y sistemas analíticos.

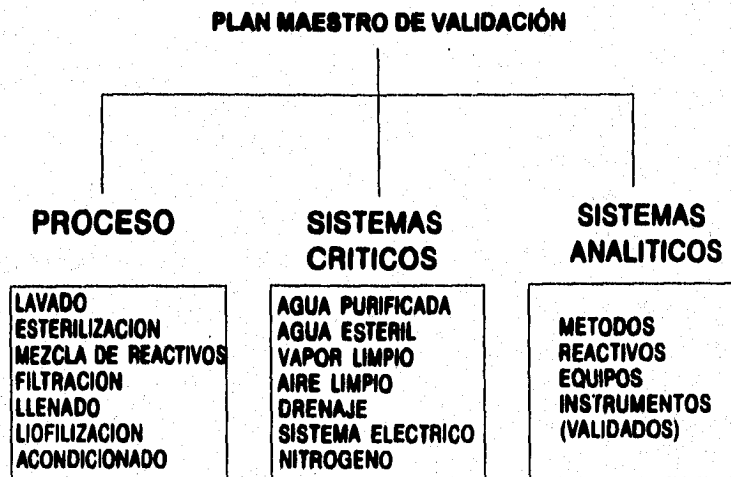


Figura 5.

El plan maestro de validación muestra cómo un proceso para un liofilizado inyectable inicia desde la preparación de los materiales para su lavado y termina con su acondicionamiento. Por ello es muy importante hacer la validación de sistemas críticos en el orden apropiado y que esté relacionado con los sistemas analíticos.

3.9 Ventajas y limitaciones de la Validación en Procesos

1. Ventajas

La validación del proceso total prevee ventajas en costos, calidad, y cumplimiento de regulaciones, tales como:

- a) Optimiza el proceso, para conseguir, la máxima eficiencia manteniendo la calidad.
- b) Determina las variables particulares del mismo, marca límites para estas variables y establece los controles de proceso adecuados.
- c) Proporciona un programa documentado que da una alta seguridad, de que un proceso dado, producirá de manera consistente un producto que cumple con las especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos.

El valor de la validación, es el beneficio que se obtiene en costo de calidad, en prevención de fallas, y evaluación. Para mejorar el proceso y que la validación sea efectiva, éste deberá estudiarse muy a fondo para encontrar la optimización y que sea tan útil como sea posible, al mínimo costo.

La experiencia ha demostrado que la validación del proceso hace posible, por ejemplo: la reducción de tiempos en lavado de ampollas y esterilización, como consecuencia de estudios de la carga biológica con validación y control del autoclave, de tiempos de mezcla, sobrellenado de líquidos conociendo los límites y posibilidades del equipo de llenado.

Hace también posible procedimientos analíticos más rápidos y más exactos.

Mejora en las especificaciones para producto y componentes como resultado de cuestionar y desafiar las especificaciones mismas.

2. Limitaciones

Existen limitantes dentro de una validación en proceso que son significativas si no se toman en cuenta, algunas de éstas son: el personal-operador debe estar entrenado y capacitado para que siga las instrucciones de los procedimientos, tal cual, y haga su trabajo sin errores. La tecnología inadecuada, costos, imposibilidad de instalaciones y equipos así como las deficiencias de los supervisores y jefes, son las más significativas.

3.10 Optimización de procesos

La optimización de procesos es una de las ventajas obtenidas al validar; la optimización de instalaciones, equipo, sistemas, materiales, etc. da como resultado un producto que cumple con las especificaciones de calidad a menor costo. Algunos aspectos que se pueden optimizar como resultado de los estudios de validación son los siguientes:

1. Tamaño de lote óptimo en relación a la disponibilidad de equipo, personal y tamaño de instalaciones.
2. Reducción de los tiempos de paro de maquinaria.
3. Reducción de tiempos de esterilización como resultado de estudios de carga biológica, control de autoclaves, etc.
4. Reducción de tiempos de mezclado.
5. Reducción de sobrellenado de líquidos
6. Procedimientos analíticos más rápidos y precisos
7. Desarrollo estándar para el proceso, mano de obra, equipo, rendimientos, etc, que da como resultado una mejor producción y distribución de los recursos.
8. Mejores especificaciones para productos.
9. Reducción de tiempos energéticos (21).

2. Limitaciones

Existen limitantes dentro de una validación en proceso que son significativas si no se toman en cuenta, algunas de éstas son: el personal-operador debe estar entrenado y capacitado para que siga las instrucciones de los procedimientos, tal cual, y haga su trabajo sin errores. La tecnología inadecuada, costos, imposibilidad de instalaciones y equipos así como las deficiencias de los supervisores y jefes, son las más significativas.

3.10 Optimización de procesos

La optimización de procesos es una de las ventajas obtenidas al validar; la optimización de instalaciones, equipo, sistemas, materiales, etc. da como resultado un producto que cumple con las especificaciones de calidad a menor costo. Algunos aspectos que se pueden optimizar como resultado de los estudios de validación son los siguientes:

1. Tamaño de lote óptimo en relación a la disponibilidad de equipo, personal y tamaño de instalaciones.
2. Reducción de los tiempos de paro de maquinaria.
3. Reducción de tiempos de esterilización como resultado de estudios de carga biológica, control de autoclaves, etc.
4. Reducción de tiempos de mezclado.
5. Reducción de sobrellenado de líquidos
6. Procedimientos analíticos más rápidos y precisos
7. Desarrollo estándar para el proceso, mano de obra, equipo, rendimientos, etc, que da como resultado una mejor producción y distribución de los recursos.
8. Mejores especificaciones para productos.
9. Reducción de tiempos energéticos (21).

4. MONOGRAFÍA DE ^{99m}Tc-MEBROFENIN.

4.1 DESCRIPCIÓN

1. Nombre

El radiofármaco es denominado como ^{99m}Tc-(3-Bromo-2,4,6-trimetilfenil carbamoilmetil-iminodiacetato)₂; ^{99m}Tc-BromotrimetilIDA; ^{99m}Tc-Mebrofenin.

El precursor se denomina ácido 3-bromo-2,4,6-trimetilfenilcarbamoilmetil iminodiacético; bromotrimetilIDA; Mebrofenin.

2. Estructura Química de Mebrofenin

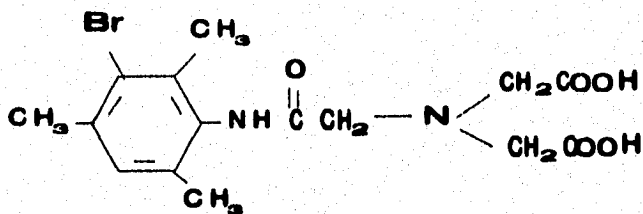


Figura 6.

Peso molecular : 387.32 g/mol

Formula molecular : C₁₅ H₁₉ O₅ N₂ Br

3. Formación del Complejo

Se hace reaccionar una solución de pertechnetato de sodio ($^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$) con la mezcla liofilizada del ácido 3-bromo-2,4,6-trimetilfenilcarbamoilmetiliminodiacético y cloruro estano, el pertechnetato es reducido instantáneamente y compleja a dos moléculas de Mebrofenin que actúan como ligantes tridentados formando un dímero con número de coordinación de 6 y con un número de oxidación para ^{99m}Tc de +4 (8).

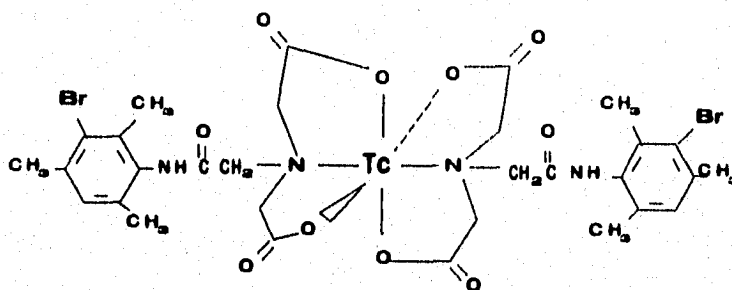


Figura 7.

4. Apariencia

Solución estéril, incolora, apirógena e isotónica del complejo ^{99m}Tc -Mebrofenin.

4.2 HISTORIA

Nunn, Loberg y Conley (12), estudiaron la relación estructura- distribución de 33 derivados del IDA; midieron la característica lipofílica y la correlacionaron con la unión a proteínas, la especificidad hepatobiliar, cinética intrahepática y extracción renal, encontrando que los sustituyentes orto en el anillo fenólico son menos lipofílicos y afectan el tiempo de tránsito hepatocelular, relación inversa con el

aumento de tamaño de las cadenas alquílicas y la posición para en dicho anillo. Según estos estudios el ^{99m}Tc-(3-bromo-2,4,6-trimetilIDA) , Mebrofenin, tiene la mayor especificidad hepática, tránsito hepatocelular rápido y compete mejor con las bilirrubinas para la excreción hepatobiliar.

Así este radiofármaco ha sido considerado en los últimos años el de elección para realizar estudios hepatobiliares en medicina nuclear. Para 1993 , Ferro y col. modifican la síntesis de Argüelles y col. reportada en 1988, con el fin de obtener un mejor rendimiento en el producto final (8,13).

4.3 SÍNTESIS Y PROPIEDADES FÍSICAS

La síntesis de Mebrofenin incluye tres etapas: en la primera se obtiene la Cloro-2,4,6-trimetilacetanilida. Se hace reaccionar 2,4,6-trimetilanilina, recientemente destilada y disuelta en ácido acético glacial, con cloruro de cloroacetilo disuelto también en éste ácido, adicionado con embudo y en baño de hielo. Una solución saturada de acetato de sodio se adiciona al matraz de reacción y se agita; el precipitado formado se filtra y disuelve en etanol caliente, al filtrado se le añade agua en relación 5:1 con respecto al volumen del filtrado de etanol. Se obtienen cristales ligeros blanquecinos con punto de fusión de 177- 178°C

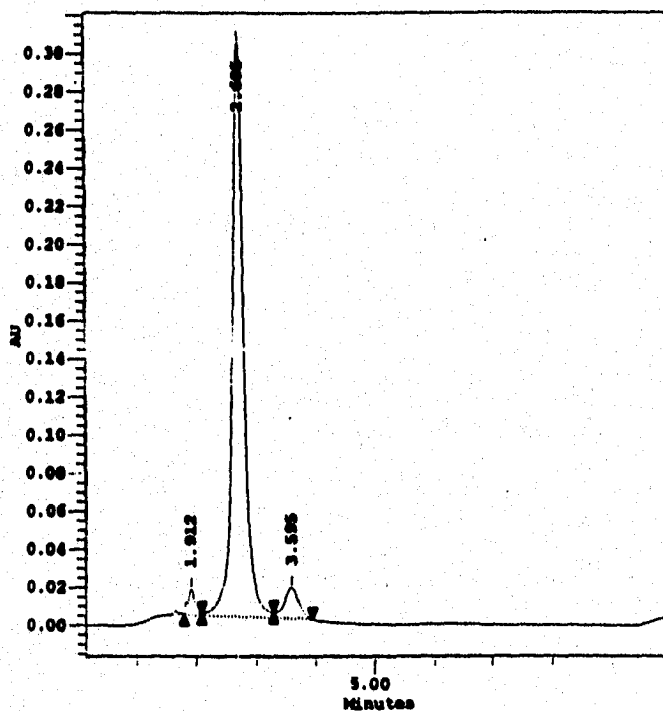
En la segunda etapa se obtiene la cloro-3-bromo-2,4,6-trimetilacetanilida. Se disuelve el producto obtenido en la primera etapa en ácido acético glacial y se calienta a 80°C, se deja enfriar aproximadamente a 50°C, se adiciona FeCl₃ y bromo disuelto en ácido acético glacial. Al terminar la bromación, se vierte la mezcla de reacción en agua fría con un poco de hielo, si los cristales presentan un ligero color naranja, este desaparece agregando bisulfito de sodio. Se recristaliza en etanol-agua 5:1 y el punto de fusión de los cristales es de 173-175°C.

En la tercera etapa finalmente se obtiene el ácido 3-bromo-2,4,6-trimetilfenil-carbamoilmetiliminodiacético (Mebrofenin). Se disuelve el reactivo obtenido en la

4.5 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

El Mebrofenin es caracterizado por un análisis de Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Una solución de 0.1 mg/ml de mebrofenin en metanol (grado CLAR) se hace pasar a través de una columna Bondapak C₁₈; utilizando como fase móvil una solución de metanol y de ácido fosfórico 0.2% en agua en proporción de 75 : 25. Utilizando un flujo de 1.5 ml/min. se obtiene el pico de mebrofenin con un tiempo de retención de 2.695 a 2.713 minutos, empleando una longitud de onda de 215 nm.

1. METANOL:AC.FOSFÓRICO 0.2% 75:25; FLUJO 1.5 mL/min,



4.6 MÉTODO DE ANÁLISIS DEL COMPLEJO

La pureza radioquímica del complejo formado es determinada por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando los siguientes sistemas;

Tabla I
Rf's para el Análisis del Complejo

SOPORTE	CCF-SG	CCF-SA
SOLVENTE	metanol 85%	NaCl 20%
Rf ^{99m} TcO ₄ ⁻	1.0	1.0
Rf ^{99m} Tc (hidrolizado)	0.0	0.0
Rf ^{99m} Tc-mebrofenin	0.9-1.0	0.0

El complejo no debe contener más de 10% de impurezas.

4.7 AFINIDAD BIOLÓGICA

Se evalúa mediante la administración intravenosa del radiofármaco en ratones blancos de laboratorio de 25 a 30 gramos de peso, los cuales se sacrifican a diferentes intervalos de tiempo (5, 30, 60, y 90 minutos), extrayéndoles la sangre, hígado, vesícula biliar, riñones, estómago, intestino, bazo, pulmones, vejiga y colectando la orina. La actividad en cada órgano se determina en un detector de NaI (Ti). Con el dato de peso por órgano se calcula la actividad por gramo de órgano. Con estos datos se determina la depuración sanguínea y la concentración del radiofármaco en el sistema hepatobiliar en función del tiempo.

Noventa minutos después de la inyección no más del 5 % de la dosis inyectada debe permanecer en el torrente sanguíneo y el 90 % de la actividad debe estar distribuida en hígado (8 % ± 5 %), vesícula biliar (de 1% a 25%) e intestino (70% ± 10 %). La concentración de la actividad en la vesícula biliar es producto de la variabilidad biológica por lo que se considera como parámetro que en cualquiera de los tiempos del estudio dinámico la relación gramo de

vesícula/gramo de hígado sea mayor a 20 y la relación gramo de vesícula/gramo de sangre mayor a 50 (8).

4.8 FARMACOCINÉTICA

Una vez que se administra por vía intravenosa una solución de ^{99m}Tc-Mebrofenin, ésta se une a proteínas plasmáticas y posteriormente es captado por los receptores de la membrana del hepatocito, se concentra en el mismo y finalmente experimenta excreción biliar a través de un mecanismo de transporte activo. Mediante este proceso, el radiofármaco provoca un constante flujo radiactivo que permite una adecuada visualización de detalles anatómicos tales como los ductos intrahepáticos y vesícula biliar.

El ^{99m}Tc-Mebrofenin se concentra en el parénquima hepático con niveles de bilirrubinas tan altos como 20 mg/dL.

En las tablas II, III, IV y V se muestran los resultados de los parámetros farmacocinéticos obtenidos en seis sujetos voluntarios a los cuales se les administró el ^{99m}Tc-Mebrofenin (8).

Tabla II
Concentración Plasmática del ^{99m}Tc-mebrofenin
(% Dosis/Litro)

SUJETOS	1 Hr.	2 Hr.	3 Hr.	4 Hr.	24 Hr.
RJA	8.38	5.95	4.99	4.06	2.49
RCH	9.71	6.96	6.53	5.72	3.43
PCP	12.67	8.88	8.29	7.49	3.00
GLS	8.35	6.24	4.63	3.88	1.39
LMR	7.34	5.60	4.94	3.63	1.82
RTE	3.73	2.71	2.34	1.89	0.77
MEDIA	8.36	6.06	5.29	4.45	2.15
DE.	2.93	2.01	1.99	1.93	1.01

Tabla III
Parámetros de Biodistribución del ^{99m}Tc-mebrofenin

COMPARTIMENTO CENTRAL						
SUJETO	VOLUMEN (litros)	ACLARAMIENTO (ml/min)	T _{1/2} RAPIDO (Hrs.)	T _{1/2} LENTO (Hrs.)	V.A.D (L/Kg)	U.P (%)
RJA	7.64	8.57	0.88	28.44	0.34	89.70
RCH	6.85	5.94	0.83	27.02	0.22	79.60
PCP	5.31	8.11	0.63	15.16	0.20	93.20
GLS	6.31	16.00	0.72	13.49	0.38	89.60
LMR	10.58	12.70	1.35	20.14	0.43	92.10
RTE	18.69	30.40	0.95	15.50	0.70	93.10
MEDIA	9.23	13.62	0.89	19.94	0.38	89.55
DE.	4.97	8.98	0.25	6.44	0.18	5.13

V.A.D = Volumen Aparente de Distribución

U.P = Unión del Complejo a Proteínas

Tabla IV
Excreción Urinaria del ^{99m}Tc-mebrofenin
(% Dosis / Tiempo)

SUJETO	0-1 hr.	1-2 hrs.	2-3 hrs.	3-4 hrs.	4-24 hrs	0-24 hrs	A.R. (ml/min)
RJA	5.44	2.93	2.08	1.84	9.00	21.29	3.23
RCH	4.86	2.66	1.91	1.44	5.28	16.15	2.58
PCP	5.19	3.17	1.80	1.30	8.83	20.29	3.78
GLS	6.58	3.50	2.92	1.75	2.58	17.13	6.28
LMR	3.92	2.61	1.92	1.87	8.25	18.57	3.08
RTE	3.19	1.13	0.99	0.83	3.71	9.85	4.61
MEDIA	4.86	2.67	1.94	1.51	6.28	17.25	3.93
DE.	1.19	0.82	0.62	0.40	2.60	4.08	1.35

A.R = Aclaramiento Renal

Tabla V
Datos de Estudios Dinámicos con ^{99m}Tc-mebrofenin

SUJETOS	HIGADO T _{máx} [min]	HIGADO T ₅₀ [min]	V.B To [min]	V.B./HIGADO (A LOS 35 MIN)
RJA	11.47	34.00	14.67	5.51
RCH	13.33	33.00	12.50	7.91
PCP	12.26	62.00	10.22	2.53
GLS	11.73	26.00	18.67	2.74
LMR	13.07	35.00	14.40	5.94
RTE	10.66	14.00	17.60	5.12
MEDIA	12.09	34.10	14.68	4.96
DE.	1.01	15.70	3.14	12.04

V.B = Vesícula Biliar

De estos resultados se concluye lo siguiente:

- a) El radiofármaco es rápidamente distribuido en el compartimento central y rápidamente captado por el hígado, alcanzando una máxima concentración (T_{máx}) en dicho órgano a los 12 minutos;
- b) La radiactividad en el hígado decrece a la mitad (T₅₀) en 34 minutos;
- c) La vesícula biliar fue perfectamente visualizada (T_o) 14 minutos después de la administración intravenosa del radiofármaco;
- d) La radiactividad en la vesícula biliar fue 6 veces mayor que en una área similar de la porción superior derecha del hígado al final del estudio dinámico (35 minutos).

4.9 APLICACIONES CLÍNICAS

1. Evaluación Anatómica y Funcional de la Via Biliar

a. Colestasis.

La diferenciación entre colestasis intrahepática y extrahepática es de capital importancia, pues las colestasis extrahepáticas son ictericias que exigen una terapéutica quirúrgica, mientras las colestasis intrahepáticas son, generalmente subsidiarias de tratamiento médico y en ellas las intervenciones quirúrgicas representan en principio un riesgo que debe ser evitado. En la gammagrafía hepatobiliar es posible apreciar las características del árbol biliar (principalmente el calibre), lográndose, de esta forma, diagnosticar obstrucciones de los conductos intrahepáticos y obstrucciones totales o parciales del colédoco.

b. Estudios de ictericias prolongadas del recién nacido.

El caso más común es la diferenciación de anomalías congénitas como la atresia de vías biliares de una hepatitis neonatal, en la primera imagen gammagráfica está caracterizada por una buena extracción por parte de los hepatocitos del radiofármaco, existe un mínimo decremento de la actividad a lo largo del estudio dinámico, de forma que aún a las 24 horas no es detectada actividad intestinal. En la hepatitis neonatal la imagen es caracterizada por una ausencia de acumulación hepática del trazador (8).

2. Evaluación Anatómica y Funcional de la Vesícula Biliar

a. Colecistitis aguda.

Es consecuencia de una obstrucción calculosa del conducto cístico seguida de una infección bacteriana de sus paredes. La imagen se caracteriza por la no visualización de la vesícula biliar.

b. Tamaño y colocación de la vesícula biliar.

Existe una serie de anomalías morfológicas; varias congénitas, que podrían dificultar la evacuación de la vesícula biliar o muy rara vez ocasionar colecistitis al permitir el estancamiento e infección biliar intravesical; las más comunes son: vesícula péndula o ptósica o colgante, sifonopatía, tabique y divertículos (8).

3. Evaluación de Traumatismos abdominales**4. Evaluación Post-operatoria del sistema hepatobiliar****4.10 ADMINISTRACIÓN Y DOSIS****1. Reconstitución**

Al frasco que contiene el reactivo liofilizado de mebrofenin y cloruro de estaño, se le añade de 3 a 5 ml de solución de ^{99m}TcO₄Na estéril y libre de pirógenos con una actividad no mayor de 30 mCi. Se agita unos segundos y se incuba por 10 minutos a temperatura ambiente. Se aplica por vía intravenosa. Cuando no se utilice inmediatamente debe guardarse en refrigeración (2-8°C). No debe emplearse después de 18 horas de su reconstitución. Debe tenerse la precaución de no utilizar disoluciones de pertecneciato de sodio que contengan agentes oxidantes o que hayan sido obtenidas de generadores que no hayan sido eluidos en las últimas 24 horas (8).

2. Dosis

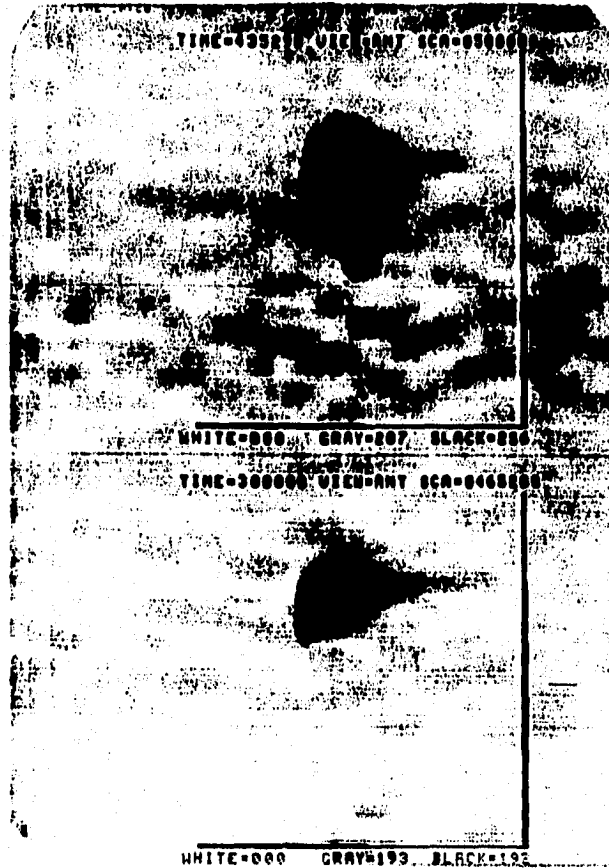
La dosis sugerida para un paciente con un peso promedio de 70 Kg es de 185 a 370 MBq (5 a 10 mCi).

3. Contraindicaciones

Ninguna. No es aconsejable el uso de sustancias radiactivas en mujeres embarazadas o en periodos de lactancia, ni en pacientes menores de 18 años, a menos que el beneficio resultante del examen sea superior a los riesgos potenciales.

4. Gammagrafía

Gammagrafía Hepatobiliar de un individuo sano al que se le administró ^{99m}Tc -mebrofenin



6. MONOGRAFÍA DEL ^{99m}Tc

6.1 DESCRIPCIÓN

1. Nombre

Tecnecio 99 metaestable, Tc-99m, ^{99m}Tc .

2. Apariencia

Polvo color gris brillante, se oxida lentamente al aire húmedo.

3. Estructura y Actividad

Forma cristales hexagonales compactos, con un radio metálico de 1.358 Armstrongs para coordinación de 12.

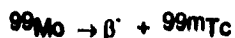
6.2 HISTORIA

Se produjo por primera vez en 1937. C.Perrier y E. Segre lo producen con el ciclotrón de los laboratorios de Berkeley, en California, a partir de una hoja de Molibdeno irradiada con neutrones y deuterones; le llamaron Tecnecio, del griego "TECHNETOS" que significa artificial, puesto que fue el primer elemento preparado artificialmente. Este Tecnecio aislado fue una mezcla de ^{95m}Tc con vida media de 60 días y el ^{97m}Tc de 91 días. Poco después en 1939 se sintetizó ^{99}Tc con vida media de aproximadamente 214 000 años.

El ^{99m}Tc con vida media de 6.04 horas fue investigado por vez primera en 1957 por Powell Richards de los laboratorios de Brookhaven a partir de un generador de Molibdeno 99 (2).

5.3 OBTENCIÓN

El ^{99m}Tc se obtiene por la desintegración beta negativa espontánea del Molibdeno 99:



A este sistema se le llama generador de Tecnecio.

El Tecnecio se puede separar del Molibdeno a medida que se va produciendo o bien cada 24 horas para que la cantidad de Tecnecio separado sea mayor proporcionalmente (2).

La separación de los dos elementos es posible debido a algunas diferencias físicas importantes, como son: el diferente coeficiente de adsorción de sus sales sobre óxidos metálicos, la temperatura de sublimación de sus óxidos y el diferente coeficiente de distribución en solventes orgánicos o extracción (2).

Generador de adsorción de Tc-99m: el molibdeno como molibdato se adsorbe fuertemente a la superficie de las partículas de algunos óxidos metálicos (óxido de aluminio) y en cambio el Tecnecio, como pertechnetato, no se adsorbe, sino que queda libre y puede ser separado o acarreado por el eluyente (NaCl 0.9 %), que pasa a través del óxido metálico-Mo. Esta solución llamada eluido, arrastra el $^{99m}\text{TcO}_4^-$, que se recoge en frasco estéril para uso en medicina nuclear (2, 5).

GENERADOR DE ⁹⁹Mo/^{99m}Tc

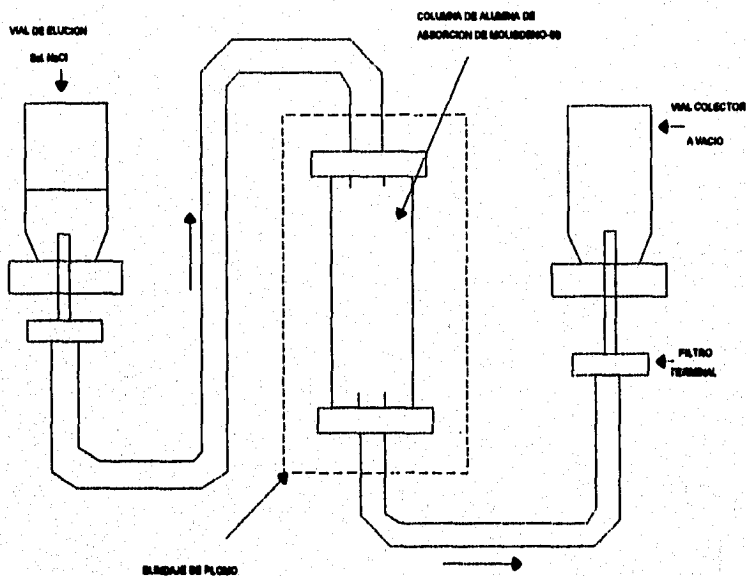
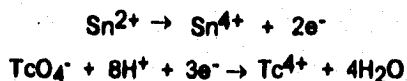


Figura 8.

5.4 EL ANIÓN PERTECNECIATO

El anión pertecneciato se reduce muy fácilmente en presencia de soluciones ácidas de Sn^{2+} .



El grado de reducción dependerá de :

- el oxígeno presente
- la relación estequiométrica Sn/Tc
- las condiciones en las que se lleve a cabo la reacción
- la presencia de un ligante
- la naturaleza química del ligante

Así, si la disolución está saturada con oxígeno, será mayor la cantidad de Sn^{2+} que se necesite para efectuar la reducción. El oxígeno oxida al estaño (II) a estaño (IV) y por lo tanto disminuye la cantidad de estaño +2 que puede reducir al tecnecio.

Esta competencia del oxígeno se evita burbujeando N_2 para tener una atmósfera inerte, además, también es posible que el oxígeno ataque a las diferentes entidades o especies químicas de Tecnecio reducido y las reoxide hasta Tc+7 (2).

6.6 CONSTANTES FÍSICAS

El Tecnecio 99 posee las siguientes constantes físicas (2):

Número atómico:	43
Peso atómico:	98.913
Número másico:	99 (del radioisótopo más conocido)

Radio iónico:	56 pm
Radio atómico:	127 pm
Potencial de ionización:	7.28 eV
Densidad:	11.5 g/cm ³
Punto de fusión:	2250° ± 50°C
Calor de fusión:	5.5 Kcal / mol
Punto de ebullición:	4877°C
Temperatura crítica:	7.7° K
(superconductor)	

5.6 PROPIEDADES QUÍMICAS

La química del Tecnecio metaestable por el número de átomos presentes en solución no está aún completamente estudiada. Se sabe que el Tecnecio por ser metal de transición presenta muchos estados de oxidación o valencias (2).

Números de oxidación más estables:	+7, +4 y +3 pero también puede funcionar con +6, +5, +2, +1, cero, -1
Configuración electrónica:	(Kr) 5s ² 4d ⁵
Electronegatividad:	1.9 en la escala de Pauling
Radioisótopos conocidos:	29
Número de coordinación:	4 y 6

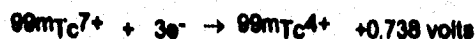
En el estado de oxidación (VII) encontramos al anión pertechnetato $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y a los compuestos iónicos como el heptaóxido $^{99m}\text{Tc}_2\text{O}_7$ y el heptasulfuro $^{99m}\text{Tc}_2\text{S}_7$ que se piensa son semejantes a los compuestos correspondientes de ^{99}Tc .

Hasta la fecha, todos los isótopos conocidos del Tecnecio son radiactivos. Los 29 radioisótopos del Tc, van desde el Tecnecio 90 al 110 e incluyen 8 parejas de isómeros nucleares que son: 90m-90, 93m-93, 94m-94, 95m-95, 96m-96, 97m-97, 99m-99 y 102m-102.

La reducción del Tecnecio es un proceso fácil de realizar ya que pasa de un estado de oxidación a otro rápidamente:



La reducción con el catión estenoso, en medio ácido, es el prototipo que se ha usado más en medicina nuclear, específicamente, la sal de cloruro de estaño (II):



En suma:



El tiempo de vida media del ^{99m}Tc es de 6.04 horas. Con una emisión gamma monoenergética de 140 Kev (el 87%) y ausencia de decaimiento beta (2).

El Tecnecio-99 tiene una actividad específica de 629 MBq/g (17 mCi/g).

5.7 Compuestos de coordinación

Los compuestos de coordinación o quelatos del ^{99m}Tc (IV) tienen 6 ligantes en forma de octaedro y tienen 3 electrones no apareados en el orbital 4d, algunos complejos incluyen otro átomo metálico y otros nada más el Tecnecio (3).

5.8 APLICACIONES

El Tecnecio 99 se ha usado en (2):

- a) química analítica y en química de coordinación para estudiar el comportamiento de este metal e interpolar los resultados al diseño y producción de radiofármacos.
- b) en la industria se emplea como anticorrosivo para proteger láminas de acero, en sistemas de fase con V, Ta, Cr, Fe, Pt y tierras raras, así como en amalgamas con el Hg,
- c) en electrónica las aleaciones con Mo, Zr y Nb tienen propiedades de superconductores.
- d) en química nuclear para controlar la combustión de combustible en los reactores nucleares, y para preparación de fuentes de energía beta de 292 Kev.

5.9 APLICACIÓN CLÍNICA

El Tecnecio 99 metaestable, se utiliza en medicina nuclear desde 1960, debido a su fácil obtención; se usa en varias formas químicas para Gammagrafía de cerebro, tiroides, glándulas salivales, estómago, pulmón, hígado, bazo, riñón, hueso y, para estudios dinámicos y cinéticos del flujo sanguíneo en corazón, pulmón, riñón, etc. (4).

II. PARTE EXPERIMENTAL

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El costo de Núcleo-equipos de diagnóstico es cada vez más alto, debido a que la mayoría de los que se emplean en los hospitales Mexicanos son productos de importación. Esto hace cada vez más importante la necesidad de producir núcleo-equipos Nacionales, más eficientes, más baratos y que cumplan con todos los requisitos necesarios para ser registrados por la Secretaría de Salud.

Dentro del área de desarrollo del Departamento del Reactor y Materiales Radiactivos del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, donde se producen diversos núcleo-equipos nacionales, se pretende producir, registrar y poner a la venta un nuevo radiofármaco a nivel nacional, cuyas características de captación hepatobiliar supera a cualquier otro núcleo-equipo de diagnóstico de este tipo en el mercado mexicano.

El objeto de estudio es un núcleo-equipo de Mebrofenin-Sn⁺² envasado en frasco tipo penicilina cuyo aspecto es un sólido de color blanco en forma de liofilizado, estéril y libre de pirógenos. Para su uso el núcleo-equipo de Mebrofenin-Sn⁺² se reconstituye con solución isotónica, estéril y libre de pirógenos de pertechnetato de sodio (^{99m}TcO₄Na), para proveer una solución acuosa transparente, estéril, incolora, isotónica y no tóxica de ^{99m}Tc-Mebrofenin adecuada para ser administrada intravenosamente.

El fin es elaborar el principio activo para la producción del núcleo-equipo; Optimizar el procedimiento de obtención del radiofármaco, realizar un estudio de estabilidad acelerada para dar una fecha lógica de caducidad y finalmente, validar el proceso de producción para garantizar la reproducibilidad del proceso planteado para la elaboración del núcleo-equipo para ^{99m}Tc-Mebrofenin, así como los atributos de calidad predeterminados del producto.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un Núcleo-equipio de Mebrofenin-Sn⁺² para la preparación del complejo ^{99m}Tc-Mebrofenin para ser utilizado en los servicios de Medicina Nuclear para diagnóstico hepatobiliar, que presente :

Una distribución biológica después de 90 minutos de inyección en hígado, vesícula e intestino no menor al 90% de la dosis y una Pureza radioquímica mínima del 90%.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1 Realizar la síntesis del principio activo, Mebrofenin.
- 2.2.2 Elaborar un procedimiento estándar para obtener el núcleo-equipio liofilizado para la preparación de ^{99m}Tc-Mebrofenin.
- 2.2.3 Definir las características de calidad deseables del núcleo-equipio de ^{99m}Tc-Mebrofenin.
- 2.2.4 Desarrollar un método analítico para la caracterización y cuantificación de Mebrofenin por CLAR para Control de Calidad.
- 2.2.5 Evaluar las condiciones de producción del núcleo-equipio y optimizarlas en su caso.
- 2.2.6 Realizar un estudio de Estabilidad acelerada para el núcleo-equipio liofilizado.
- 2.2.7 Calificar los materiales, equipos, instalaciones y procedimientos de operación que pueden afectar la calidad de conformidad del producto.
- 2.2.8 Elaborar un protocolo de validación prospectiva y documentar si el proceso producirá de manera consistente un producto con las características de calidad predefinidas.

3. HIPÓTESIS

Se llegará al desarrollo de la formulación adecuada para preparar el Núcleo-equipos liofilizado de Mebrofenin-Sn⁺², cuando la relación entre ambos cumpla con los controles de calidad radioquímicos una vez que haya sido marcado con ^{99m}TcO₄Na, la optimización de las condiciones de proceso en la elaboración del núcleo-equipos, quedarán definiendo: la velocidad de mezclado, temperatura de mezclado y velocidad de adición del reactivo cloruro de estaño (II); Permitiendo un estudio de estabilidad acelerada para calcular una fecha de caducidad lógica. Así al tener la evidencia documental de 3 lotes consecutivos del núcleo-equipos para ^{99m}Tc-Mebrofenin obtenidos según las condiciones determinadas en la etapa de optimización del proceso, será posible demostrar la estabilidad y uniformidad en la calidad del producto así como la robustez del proceso de fabricación.

4. MATERIALES

4.1 REACTIVOS

2,4,6-trimetilanilina, $C_9H_{13}N$ (Aldrich lote 13,217-9); Cloruro de cloroacetilo, $C_2H_2Cl_2O$, $d = 1.4202$ g/ml (Sigma lote C9767); Acetato de sodio, $C_2H_3NaO_2$ (Merck); Bromo $d = 3.119$ g/ml (Aldrich lote 32,813-8); Ácido acético glacial, $d = 1.053$ g/ml (Baker Analyzed lote 9707-62); Bisulfito de sodio, $NaHSO_3$ (Merck); Iminodiacetato de sodio, $C_4H_5Na_2N$ (Merck); Cloruro férrico, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Merck); Cloruro de estaño (II) anhidro (Sigma lote S2752); Nitrógeno de alta pureza (LINDE); Solución salina estéril y libre de pirógenos (TRAVENOL); Pluronic 450 (Poliol S.A.); Eluato de $^{99m}TcO_4Na$ obtenido de un Generador $^{99}Mo/^{99m}Tc$ (GETEC-ININ); Ácido clorhídrico concentrado, 38%, $d = 1.19$ g/ml (Baker); Hidróxido de sodio (Sigma); tiras de fibra de vidrio impregnadas de sílica gel (ITLC-SG) y ácido silícico (ITLC-SA) Gelman Sciences Inc.; Metanol absoluto grado CLAR (Omnisolv EM Science lote 34122); Ácido fosfórico, H_3PO_4 , 85%, $d = 1.71$ g/ml (Merck); Acetona (Baker).

4.2 EQUIPO

Rotavapor, Buchi, modelo RE 121; Potenciómetro, Titriskop E516; Fusiómetro, Buchi 510; Liofilizadora, Hull Corporation BFS12; Campana de flujo laminar, Veco GHFL-A-12; Bomba de vacío, Feli Welch 1400; Dosificador, Wheaton Modelo J1, semiautomático; Calibrador de dosis, Capintec CRC-IOR; Detector de centelleo sólido, NaI(Tl) Nuclear Medical Laboratories Inc; Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC), con detector de arreglo de fotodiodos 996, Bomba waters 510, Columna C_{18} de dimetiloctadecilsilil enlazado al amorfo alcohol sílica metil (Bondapak), software Millenium 2000; Espectrofotómetro de Infrarrojo (Beckman modelo 4230); Balanza analítica digital, Sartorius modelo 1602; Parrilla de

calentamiento con agitación, Corning modelo PC-351; Termómetros de -10° a 150°C; Detector electrónico de vacío de alta frecuencia (Modelo BD-60).

4.3 MATERIAL DE LABORATORIO

- * Matraz bola con juntas esmeriladas 24/40 de 1 litro
- * Embudo de adición de 100 ml
- * Matraz kitazato de 500 ml
- * Matraz erlenmeyer de 500 ml
- * Refrigerante recto
- * Matraz bola de 500 ml con junta esmeritada
- * Soporte universal
- * Bureta graduada de 10 ml
- * Pinzas para bureta
- * Pinzas de tres dedos con nuez
- * Pipetas graduadas de 2, 5, 10 y 20 ml
- * Probetas de 50 y 100 ml
- * Matraces aforados de 10, 25, 50, 100 y 1000 ml
- * Vasos de precipitados de 50, 100 y 500 ml
- * Papel Whatman No. 1
- * Cubas cilíndricas de vidrio de 10 cm de altura con diámetro de 2.2 cm
- * Contenedores de plomo
- * Jeringas para insulina de 1 ml
- * Frasco de vidrio tipo ampollita (vial) de 10 ml
- * Papel indicador de pH (0-14), Merck

4.4 MATERIAL BIOLÓGICO

- * Ratones blancos cepa Balb-C de 25-30g de peso.

5. MÉTODOS

En la actualidad el Mebrofenin o BromotrimetilIDA, no se encuentra en México comercializado por alguna casa de productos químicos por lo que fue necesario para realizar el desarrollo del núcleo-equipo de Mebrofenin-Sn⁺², sintetizar la materia prima (Ferro y cols. 8).

5.1 SÍNTESIS DEL ÁCIDO 3-BROMO-2,4,6-TRIMETILFENILCARBAMOIL METIL IMINODIACÉTICO O MEBROFENIN

5.1.1 Obtención de la cloro-2,4,6-trimetilacetanilida (C₁₁H₁₄Cl NO)

Se destilaron 37.7 mL (0.29 moles) de 2,4,6-trimetilanilina (C₉H₁₃N), los cuales fueron disueltos en 160 mL de ácido acético glacial contenidos en un matraz bola con junta esmeritada de 500 ml al que se le adaptó un embudo de adición de 250 ml conteniendo 24.5 mL (0.29 moles) de cloruro de cloroacetilo (C₂H₂Cl₂O) en 80 mL de ácido acético glacial. El sistema fue colocado en un baño de hielo durante una hora, tiempo en que se añadió el contenido del embudo.

Por separado se prepararon 400 mL de una solución saturada de acetato de sodio y se agregó al matraz de reacción con agitación durante un periodo de 30 minutos, con lo cual se formó un precipitado blanquecino cristalino que se filtró y se lavó con agua destilada dos veces. El sólido obtenido se disolvió en la mínima cantidad posible de etanol caliente y se filtró inmediatamente. Al filtrado colectado se le añadió agua en relación 5:1 V/V en relación al volumen filtrado de etanol obtenido formándose, de inmediato, cristales ligeros de color blanquecino. Esta suspensión se dejó en refrigeración por unas horas para que cristalizara totalmente, posteriormente fue filtrada y los cristales obtenidos se dejaron secar al vacío. Rendimiento 53.6 g (93%), p.f. 177-178°C.

5.1.2 Obtención de la cloro-3-bromo 2,4,6-trimetilacetanilida ($C_{11}H_{13}BrCl$ NO)

En un matraz bola de 200 mL se disolvieron 19.9 g (0.1 moles) de la cloro-2,4,6-trimetilacetanilida $C_{11}H_{14}Cl$ NO en 50 mL de ácido acético glacial, dado que la disolución es un proceso endotérmico, la mezcla fue calentada aproximadamente a 80°C, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta que alcanzó los 50°C y entonces se adicionaron 0.1 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ y 5.5 mL (0.1 moles) de una disolución de Bromo en 20 mL de ácido acético glacial por un período de 15 minutos. Un indicio de que la bromación ha terminado es la ausencia del color rojo del bromo (7-8 minutos). Posteriormente la mezcla de reacción fue vertida en 300 mL de agua fría observándose la formación de cristales con un aparente color naranja, mismo que se elimina al agregar 1.5 g de bisulfito de sodio. Se obtienen cristales blancos que se filtraron y se recrystalizaron en etanol:agua 5:1 V/V siguiendo el mismo procedimiento que para la cloro-2,4,6-trimetilacetanilida. Rendimiento 27 g (97%), p.f. 173-175°C.

5.1.3 Síntesis del ácido 3-bromo-2,4,6-trimetilfenilcarbamoil metiliminodiacético ($C_{15}H_{19}BrN_2O_5$)

En un matraz bola de dos bocas de 250 mL se disolvieron 7 g (0.025 moles) de cloro-3-bromo 2,4,6-trimetilacetanilida ($C_{11}H_{13}BrCl$ NO) en 250 mL de una solución etanol:agua 1:1 V/V. Posteriormente se incorporaron 5.3 g (0.03 moles) de iminodiacetato de sodio con agitación constante. A este sistema se le adaptó un refrigerante para reflujo y un embudo de adición conteniendo 20 mL de una solución 1.5 N de NaOH. Con un goteo lento se fue adicionando el contenido del embudo al matraz por un período de aproximadamente 3 horas, tiempo en el que el sistema se mantuvo a reflujo. La reacción se siguió por cromatografía en capa fina de sílica gel utilizando como sistema eluyente butanol: ácido acético: agua 4:1:1 V/V ($R_f = 0.3, 0.9$ y 0.45 para el iminodiacetato, la bromotrimetilacetanilida y

el bromotrimetilIDA respectivamente), y en base a este análisis el reflujo se continuó por tres horas más. La mezcla de reacción se dejó enfriar y el etanol se eliminó utilizando un rotavapor. La solución restante se filtró y el filtrado se ajustó a pH = 1 con HCl 2 N, se dejó en refrigeración (4°C) por 24 horas. Los cristales que se formaron fueron filtrados y recristalizados en etanol: agua 2:1 V/V. P.f. 200-202°C.

5.1.4 Determinación de Puntos de Fusión

Se determinaron los puntos de fusión de tres lotes diferentes de Mebrofenin realizados en tres diferentes semanas.

1. Con un tubo capilar sellado por uno de sus extremos, se tomó una muestra del polvo seco y distribuyó en el fondo del tubo, ocupando una altura de 5mm.
2. Se colocó el tubo en una de las entradas del fusiómetro, se enciende y programa hasta una temperatura de 205°C aproximadamente, con un incremento de 0.5°C /min.
3. Se registra la temperatura en la que el producto comienza a fundir y en la que termina
4. Se registraron las temperaturas y si éstas estaban por debajo del punto de fusión reportado en la literatura (200-202°C), se recristalizaba el producto y repetía la determinación

5.1.5 Espectros de Infrarrojo

1. Se disolvieron 50 mg de cada lote de Mebrofenin en 10ml de acetona grado CLAR.
2. Se depositó gota a gota cada una de las soluciones independientemente, sobre ventanas-celdas de NaCl de 0.1 mm de espesor.
3. Se dejaron secar y se continuó adicionando gotas hasta la obtención de una fina capa adherida sobre la celda, saturada con el compuesto.

4. El espectrofotómetro de infrarrojo se ajustó a las siguientes condiciones:
Velocidad del papel de $300 \text{ cm}^{-1}/\text{min.}$, Ganancia de 260, Período de 1segundo.
5. Se introdujeron cada una de las celdas por separado en el espectrofotómetro de Infrarrojo y se dejó correr el espectro

5.2 DEFINICIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD DEL NÚCLEO-EQUIPO

Se consideraron las características de calidad que debe cumplir un producto liofilizado para diagnóstico clínico marcado con un isótopo radiactivo, llevándose a cabo la revisión bibliográfica de diferentes manuales de control de calidad de núcleo-equipos o radiofármacos, así como de diversas farmacopeas. Así se definió lo siguiente:

1. Contenido de Mebrofenin..... $10.0 \pm 2 \text{ mg/vial}$
2. Contenido de Sn^{+2} $0.2 \pm 0.1 \text{ mg/vial}$
3. Contenido de agua..... $< 5 \%$
4. pH..... 6.5 ± 1.0
5. Apariencia..... solución acuosa transparente e incolora
6. Prueba de identificación..... tiempo de retención $2.8 \pm 0.2 \text{ min.}$
7. Esterilidad..... Positiva
8. Pirógenos por LAL..... no más de 21 eu/ml
9. Pureza radioquímica..... no menos del 90%
10. Prueba de toxicidad..... inócua
11. Masa promedio..... $12 \pm 2 \text{ mg/vial}$

12. Distribución Biológica después de 90 minutos

< 5% en sangre

8 ± 5% hígado

1 A 25 % vesícula

70 ± 10% intestino

La relación dosis gramo de vesícula/dosis gramo de hígado debe ser mayor a 20 y la relación dosis gramo de vesícula/dosis gramo de sangre mayor a 50.

5.3 SELECCIÓN DE LA FORMULACIÓN Y ELABORACIÓN DEL NÚCLEO-EQUIPO

La bibliografía reporta que la relación estequiométrica adecuada para elaborar un núcleo-equipo de Mebrofenin-cloruro de estaño (II) es de 10mg por 0.2mg respectivamente, se menciona que con estas cantidades se obtiene la pureza radioquímica más alta. En el presente trabajo se evaluaron varias relaciones de masa para verificar que dicha formulación era la adecuada. Así pues se procedió de la manera siguiente:

1. En condiciones de asepsia y bajo atmósfera de nitrógeno, se disolvieron 100 mg del Mebrofenin sintetizado en agua inyectable saturada con nitrógeno más 0.5 ml de hidróxido de sodio 3N en matraz volumétrico de 25 ml.
2. Una vez homogénea la solución (pH= 10) se colocaron 2.5 ml en 6 diferentes viales.
3. Se ajustó el pH= 6 con HCl 6N.
4. Por otra parte se preparó una solución de cloruro de estaño (II) anhidro de 1mg/ml añadiendo 1 ml de HCl concentrado para disolver al cloruro antes de ajustar el volumen.
5. Esta última disolución se adicionó a los viales (del paso 2) a diferentes volúmenes de 5, 10, 20, 40, 60 y 100 microlitros respectivamente equivalentes a 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.60 y 1.0 mg.

6. Se homogeneizó la mezcla y posteriormente se ajusta el pH entre 5.5 - 6.0 con una solución de hidróxido de sodio 1N, burbujeando continuamente nitrógeno.
7. Se filtró cada uno por membrana millipore de 0.22 μ , se taparon los viales en atmósfera de nitrógeno.
8. Se evalúa la Pureza radioquímica en cromatografía de capa fina colocando cada vial en contenedores de plomo y se Marca con 5ml de una solución de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (actividad de 74 MBq/ml = 2 mCi/ml).
9. Con los resultados de pureza radioquímica se verificó la fórmula adecuada.

5.4 MARCAJE CON Tc- 99m

El Tc- 99m se produce a partir de un generador que contiene Molibdeno-99 producido por fisión como se indica en la monografía de Tc- 99m .

1. Se tomó un frasco con eluyente de NaCl al 0.9% , se desprendió la retapa de aluminio y se limpió el centro con alcohol.
2. Se retira el frasco protector de la cavidad de menor diámetro del generador y se colocó en su lugar el frasco con solución eluyente.
3. Se retira el frasco protector de la cavidad de mayor diámetro del generador y se colocó en su lugar un frasco al vacío con blindaje de plomo.
4. En unos segundos se observa burbujeo en la solución del frasco con salina, lo cual indicó que la elución se está llevando a cabo.
5. Al terminar de vaciarse la solución salina, se midió la radiactividad del eluato de pertecneato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) en un calibrador de dosis.
6. Se diluye el eluato con NaCl al 0.9% hasta ajustar a una actividad de 74 MBq/ml esto es una actividad de 2.0 mCi/ml.
7. Se colocan los frascos del núcleo-equipo en contenedores de plomo y se adicionó 1ml de la solución de pertecneato a cada uno.

8. Se mezcló cada frasco en su contenedor suavemente y se incubó a temperatura ambiente ($25^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$) por 15 minutos para completar el marcado.

5.5 EVALUACIÓN DE PUREZA RADIOQUÍMICA

Una vez marcado el núcleo-equipo se procedió de la forma siguiente:

1. En dos tiras para CCF-SG (silica gel) de 10 x 100 mm, se colocó en cada una, 1 μ L. de muestra de cada uno de los viales a analizar.
2. Se desarrolló la cromatografía ascendente a un frente de 8 cm en un sistema eluyente de metanol al 85% en agua destilada.
3. Por otra parte, en dos tiras para CCF-SA (ácido silícico) de 10 x 100 mm, se colocó en cada una 1 μ L. de muestra de cada uno de los viales a analizar.
4. Se desarrolló la cromatografía ascendente a un frente de 8 cm en un sistema eluyente de solución salina al 20%
5. Se dejaron secar las cuatro tiras al aire y posteriormente se envolvieron en cinta adhesiva.
6. Se cortan en dos fracciones por la mitad y se deposita cada una en tubo para contador
7. Se midió la distribución de la radiactividad en un analizador monocanal acoplado a un detector de NaI(Tl).
8. El porcentaje de cada especie radiactiva se determinó de acuerdo con lo siguiente :

SOPORTE	CCF-SG	CCF-SA
SOLVENTE	metanol 85%	NaCl 20%
Rf ^{99m} TcO ₄ ⁻	1.0	1.0
Rf ^{99m} Tc (hidrolizado)	0.0	0.0
Rf ^{99m} Tc-mebrofenin	0.9-1.0	0.0

9. No menos del 90% de la radiactividad debe encontrarse como ^{99m}Tc-mebrofenin y no más del 10% como ^{99m}Tc hidrolizado y ^{99m}TcO₄⁻ libre.

5.6 PRODUCCIÓN PILOTO DE MEBROFENIN-Sn⁺² Y OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO

Una vez que se encontró la relación estequiométrica adecuada entre el principio activo (Mebrofenin) y el agente reductor (Sn⁺²), se procedió a elaborar lotes de 50 ml (2ml/ vial), variando las siguientes condiciones que se consideraron críticas para continuar con la optimización del proceso de producción:

- a) Velocidad de Mezclado de los componentes de la formulación,
- b) Temperatura de Mezclado de los componentes y,
- c) Velocidad de adición del componente Cloruro de estaño (II).

5.6.1 Optimización

Se planteó la elaboración de un diseño experimental de 3 factores a 2 niveles de evaluación, con cinco variables de respuestas: la pureza radioquímica y la distribución biológica de la dosis inyectada (en sangre, hígado, vesícula e intestino) para encontrar las condiciones óptimas de manufactura. El análisis de los resultados se realizó a través del paquete estadístico "The SAS System" (versión 6.08, licenciado al laboratorio de Especialización en farmacia Industrial de la FES-Zaragoza, UNAM), empleando el Procedimiento General de Modelos lineales, para determinar la correlación existente entre las variables Xi con respecto a las variables de respuesta Yi; esto para definir la influencia de dichas variables en la calidad del producto y encontrar a su vez los valores óptimos en los cuales se obtiene el producto con la calidad requerida. Enseguida se plantea la matriz experimental:

Tabla VI

Diseño Factorial para la Optimización del Proceso

EXP	VELOCIDAD DE MEZCLADO X3 (rpm)	TEMPERATURA DE MEZCLADO X2 (°C)	VELOCIDAD DE ADICIÓN DE SnCl ₂ X3 (ml/min)	P.R % Y1	S % Y2	H % Y3	V % Y4	I % Y5
1	250	23	0.2					
2	500	23	0.2					
3	250	28	0.2					
4	500	28	0.2					
5	250	23	0.5					
6	500	23	0.5					
7	250	28	0.5					
8	500	28	0.5					

Donde Y1= pureza radioquímica
 Y2= % de dosis en sangre
 Y3= % de dosis en hígado
 Y4= % de dosis en vesícula
 Y5= % de dosis en intestino

5.6.2 PROCEDIMIENTO DE MANUFACTURA

1. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE SnCl₂ EN HCl

- a. Con una pipeta se midieron 2.5 mL de ácido clorhídrico concentrado y se colocaron en un matraz erlenmeyer de 25 mL.
- b. Se pesaron 125 mg de cloruro de estaño (II) anhidro y se añadieron al matraz que contiene el ácido clorhídrico, se agitó hasta disolver completamente bajo atmósfera de nitrógeno.
- c. Se ajustó a un volumen total de 25 ml con agua inyectable purgada con nitrógeno.
- d. Se filtró a temperatura ambiente* por membrana millipore de 0.22 µm y se recibió el filtrado en un matraz erlenmeyer, se aplicó nitrógeno.

* Cuando se menciona temperatura ambiente es 23°C ± 2°

2. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE MEBROFENIN

- a. Se saturaron con nitrógeno 100ml de agua inyectable, estéril y libre de pirógenos, mediante el burbujeo de este gas durante 15 minutos.
- b. Se pesaron 0.25g de Mebrofenin (BromotrimetilIDA) y se disolvieron a temperatura ambiente en un volumen aproximado de 15ml de agua inyectable saturada con nitrógeno en un matraz bola de tres bocas de 500 ml. Se saturó el matraz con nitrógeno por 5 minutos.
- c. Con agitación a 500 o 250 rpm (según correspondía al experimento) y barra magnética de 2 pulgadas, se adicionaron 4ml de NaOH 3N hasta la completa disolución del compuesto (pH=12) y finalmente se ajustó el pH a 6.0 con HCl 6N.
- d. Se saturó el matraz con nitrógeno por 7 minutos tapando dos de las bocas y se colocó en una tercera la microbureta con el cloruro de estaño (II) (figura 9).

EQUIPO PARA LA ELABORACIÓN DE MEBROFENIN-Sn²⁺

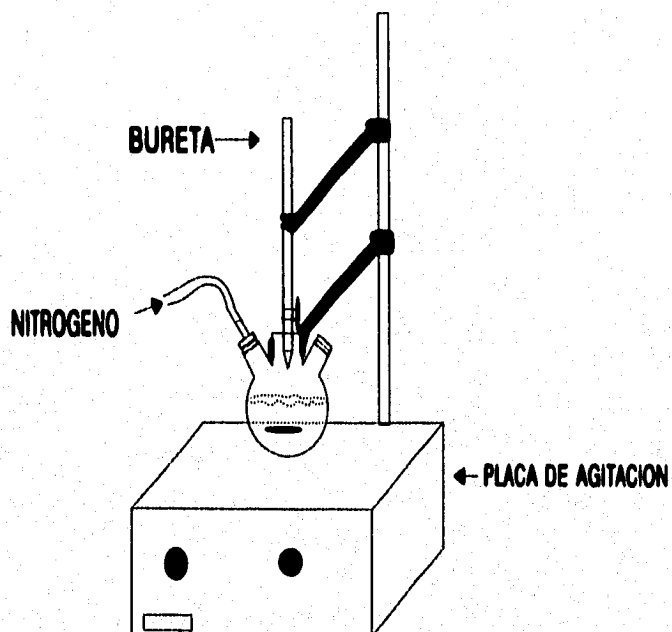


Figura 9.

3. PREPARACIÓN DE LA MEZCLA

- a. Se agregaron con microbureta 1ml de la solución de cloruro de estaño (II) anhidro a la solución de Mebrofenin a una velocidad de 0.5ml/min o 0.2ml/min (según correspondiera al experimento), burbujeando nitrógeno en la bureta por 2 minutos. La temperatura se reguló con la placa de calentamiento y un baño maría alrededor del matraz midiendola con termómetro, de acuerdo a la temperatura a la que correspondiera la experiencia (23° o 28°C).
- b. Se continuó agitando a las rpm correspondientes y se midió el pH el cual fue de aproximadamente 1.
- c. Se ajustó cuidadosamente el pH en el intervalo de 5.5-6.0 utilizando únicamente NaOH 1N, la mezcla debe ser translúcida.
- d. Se agregaron 50mg de pluronic en polvo y se agitó hasta obtener una disolución completa.
- e. Se filtró por membrana millipore de 0.22 μ utilizando el equipo de filtración y con ambiente de nitrógeno.
- f. Se vertió a una probeta de 50ml la solución y se completó el volumen a 50ml con agua inyectable, libre de pirógenos y saturada con nitrógeno.
- g. Se filtró nuevamente por membrana millipore de 0.22 μ utilizando el equipo de filtración y con ambiente de nitrogenando.

4. DOSIFICACIÓN

Se dosificó colocando 2ml de la solución final en cada uno de los viales de 10 ml.

5. LIOFILIZACIÓN

Se procedió a liofilizar de acuerdo al ciclo: -40°C a -10°C, por 3 horas y -10° a 15°C, 17 horas método utilizado para todos los productos liofilizados que en la planta se producen.

Una vez terminado el proceso de producción y liofilizado el producto se procedió a la evaluación de los controles de calidad: pureza radioquímica y distribución biológica. La evaluación de pureza radioquímica se realizó de acuerdo con el punto 5.5 de los métodos aquí descritos.

6.7 DISTRIBUCIÓN BIOLÓGICA

1. Se seleccionaron 8 ratones blancos de la cepa Balb-C (uno para cada diferente experiencia) de 25 a 30 g de peso.
2. Se inyectó en la vena marginal de la cola 0.1ml de la solución de ^{99m}Tc-Mebrofenin (actividad de 370 MBq/ 5ml = 10 mCi/5ml) y se sacrificaron a los 90 minutos posteriores a la inyección.
3. Se extrajo por punción cardíaca la mayor cantidad posible de sangre y se coloca en una bolsa de plástico, previamente tarada, así mismo, se tomó con un algodón la excreción urinaria y se colocó en una bolsa de plástico.
4. Se extrajeron la vesícula biliar, los riñones, bazo, estómago, intestinos, hígado y pulmones; cada órgano se colocó en bolsa de plástico previamente taradas, así como el resto del cuerpo.
5. Se cortó la cola aproximadamente a 20-30 mm arriba del sitio de la inyección y se descartó.
6. Se determinó la actividad en cuentas por minuto (cpm) en cada uno de los órganos, excreción urinaria y resto del cuerpo, en un sistema de detección gamma.
7. Se realizaron los cálculos para determinar el % de dosis de radiactividad inyectada en los distintos órganos, sangre y orina.

$$\%D.B = \text{radiactividad en el órgano específico} \times 100 / \text{radiactividad total}$$

La eliminación del radiofármaco de la sangre debe ser rápida y su excreción principal por el sistema hepatobiliar. Las características de calidad en distribución biológica son las reportadas en el punto 5.2.

5.8 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

Una vez terminada la optimización del proceso y encontrados los parámetros óptimos para la producción se procedió a desarrollar un método de análisis de la materia prima: Mebrofenin.

Se realizó el análisis vía cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR). De acuerdo con la polaridad de nuestra molécula se escogió metanol como fase móvil.

1. Se realizó un barrido en espectrofotómetro de UV para observar el pico de máxima absorción a diferentes longitudes de onda.
2. Una vez encontrada la longitud de máxima absorción se procedió a encontrar las condiciones adecuadas para el análisis cromatográfico.
3. Para el análisis cromatográfico se optó por la fase reversa adicionando ácido fosfórico al 0.2% V/V para evitar la presencia de "cola" en el cromatograma.
4. Para encontrar la concentración adecuada de la fase móvil (basada en el coeficiente de partición del mebrofenin entre la columna C-18 y la proporción de la mezcla metanol:agua), se probaron 2 concentraciones de la mezcla de metanol:ácido fosfórico al 0.2% (80:20 y 75:25 V/V), a dos niveles en cuanto a la velocidad de flujo (1.0 y 1.5 ml/min); se mantuvieron constantes la temperatura del sistema igual a 22°C, la longitud de onda de máxima absorción de 215 nm, el tiempo de corrida del cromatograma de 10 minutos, la concentración de la muestra de mebrofenin de 0.1mg/ml y el volumen inyectado de 20µL; analizando como variables de respuesta (por duplicado), los siguientes parámetros cromatográficos: Tiempo de retención (Tr); Sigma o platos teóricos; Factor de capacidad (K); Resolución (R); Factor de Selectividad

y el Área bajo la curva. El diseño factorial 2x2x6 descrito a continuación se analizó mediante el paquete estadístico de análisis "The SAS System" por el procedimiento de generación de modelos lineales (GLM):

Tabla VII

Diseño Factorial para la Optimización de condiciones Cromatográficas

FASE MOVIL (ml/min) X1	VELOCIDAD DE FLUJO X2	Tr (min) Y1	SIGMA Y2	K Y3	RESOLUCIÓN Y4	SELECTIVIDAD Y5	ÁREA % Y6
1.5	80:20						
1.0	80:20						
1.5	75:25						
1.0	75:25						

5. Para el análisis se preparó una solución estándar de Mebrofenin disolviendo 100 mg de este en metanol y aforando en un matraz volumétrico de 100 ml (1mg/ml), se tomó 1 ml de esta solución con pipeta volumétrica y se llevó a un volumen de 10ml en matraz aforado obteniendo una concentración final de 0.1mg/ml.
6. Se preparó una disolución de 500ml de ácido fosfórico al 0.2% V/V .
7. Se preparó 100ml de una mezcla de metanol:ácido fosfórico al 0.2%, 80:20 V/V.
8. Se preparó 100ml de una mezcla de metanol:ácido fosfórico al 0.2%, 75:25 V/V.
9. Una vez encontradas las condiciones óptimas para el análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución se procedió a la validación del sistema.

Las características del equipo y reactivos empleados fue el siguiente:

- a. **Cromatógrafo:** Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR), con detector de arreglo de fotodiodos 996; Bomba waters 510; Inyector con loop de 20 μ L; Columna C₁₈ de dimetiloctadecilsilil enlazado al alcohol amorfo silica metil (Bondapak) con dimensiones de 125A 10 μ , 3.9 x 300 mm; software Millenium 2000; regulador de voltage electrónico (Vogar ER-10) 120 vac-60 Hz.
- b. **Espectrofotómetro U.V:** Espectrofotómetro de luz ultravioleta Beckman, modelo 35.
- c. **Reactivos:** METANOL grado CLAR; ensayo por cromatografía de gases pureza 99.91%; residuos de la evaporación 0.1 ppm; índice de refracción a 25°C 1.3283; contenido de agua 0.048%; filtrado por membrana de 0.2 μ m; Marca OmniSolv (EM Science) Lote 34122.
ÁCIDO FOSFÓRICO grado análisis químico; pureza 85%; ácidos volátiles 0.001%; Cl 0.0002% máx; d= 1.71 g/ml. Marca Merck.
AGUA destilada y purificada por un sistema MilliQ deionizador de 5 elementos marca millipore; conductividad de 0.14 μ ohms por cm a 25°C; pH 7.

5.9 VALIDACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO HPLC

La validación se llevó a cabo empleando como fase móvil la mezcla de metanol: ácido fosfórico 0.2% , 75:25 V/V y utilizando una velocidad de flujo de la fase móvil de 1.5ml/min. La longitud de onda máxima fue de 215 nm. El tiempo de corrida del cromatograma fue de 5 minutos. La bomba funcionó con una presión menor a 1000 psi. Las muestras se disolvieron en metanol grado CLAR y se filtraron por membrana de 0.22 micras.

5.9.1 Linealidad del Sistema

La linealidad del sistema se determinó construyendo una curva de calibración (concentración contra respuesta medida) utilizando 40, 80, 100, 120 y 150% de una misma solución estándar de mebrotfenin. El 100% correspondió a 0.1mg/ml de concentración de mebrotfenin.

1. Se llevaron a cabo las diluciones correspondientes para la obtención de cada nivel
2. Se inyectaron en el CLAR por cuadruplicado, 20 microlitros de cada nivel para la cuantificación de la concentración
3. Con los datos obtenidos se calculó a través del software Millenium 2000; la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación (la ecuación de la recta); además los promedios de respuesta para cada nivel, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

5.9.2 Precisión del Sistema

Se determinó por octuplicado de una misma solución estándar de 0.1mg/ml correspondiente al 100%

1. Se preparó la solución de mebrotfenin de 0.1 mg/ml en metanol
2. Se realizó el análisis por octuplicado de la solución mediante la inyección de 8 muestras de 20 μL al CLAR
3. Con los datos obtenidos se calculó el coeficiente de variación

5.9.3 Exactitud y Repetibilidad

Se determinó por septuplicado en muestras independientes al 100%

1. Se pesaron siete muestras de 100 mg de mebrotfenin y se aforaron a 100ml con metanol (concentración de 1.0mg/ml), posteriormente por separado, se tomó 1ml de cada una y se aforó a 10ml (concentración final de 0.1mg/ml)

2. Se inyectaron en el CLAR, 20 microlitros de cada solución para su cuantificación
3. Con los datos obtenidos se calculó el coeficiente de variación

5.10 EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN (REPRODUCIBILIDAD) DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO CCF

La determinación de Pureza Radioquímica de los diferentes radiofármacos se lleva a cabo por Cromatografía de Capa Fina, ya sea SA o SG.

Las condiciones y materiales para esta determinación fueron las siguientes: Tiras de fibra de vidrio impregnadas con Sílica Gel (CCF-SG) o impregnadas con ácido silícico (CCF-SA) de 1 x 10 cm (Gelman Sciences, lote 9743); cubas de vidrio para elución de 2.2 cm de diámetro x 10 cm de altura; volumen de fase móvil de 1 ml; volumen de muestra de 1 microlitro μ L; contador de pozo de NaI (Berthold LB9516); conteo en Cuentas Por Minuto; detector ^{57}Co ; Kev 50/180; fondo 100.00 CPM.

1. Se realizó un análisis por sextuplicado de un mismo lote de mebropfenin- ^{99m}Tc ; el mismo día de su producción.
2. La pureza radioquímica se determinó de manera análoga con la técnica descrita en el punto 5.5.
3. Para la CCF-SA se empleó como fase móvil solución salina al 20% P/V; para la CCF-SG se empleó de fase móvil metanol al 85% en agua V/V.
4. Una vez cuantificados los resultados se calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada sistema.

5.11 ESTUDIO DE ESTABILIDAD

5.11.1 Estabilidad Acelerada

El estudio de estabilidad acelerada se llevó a cabo con el fin de obtener una fecha de caducidad lógica o vida de anaquel para el producto liofilizado envasado herméticamente Mebrofenin-Sn⁺². En este estudio se consideró sólo a la temperatura como acelerador de las reacciones de degradación.

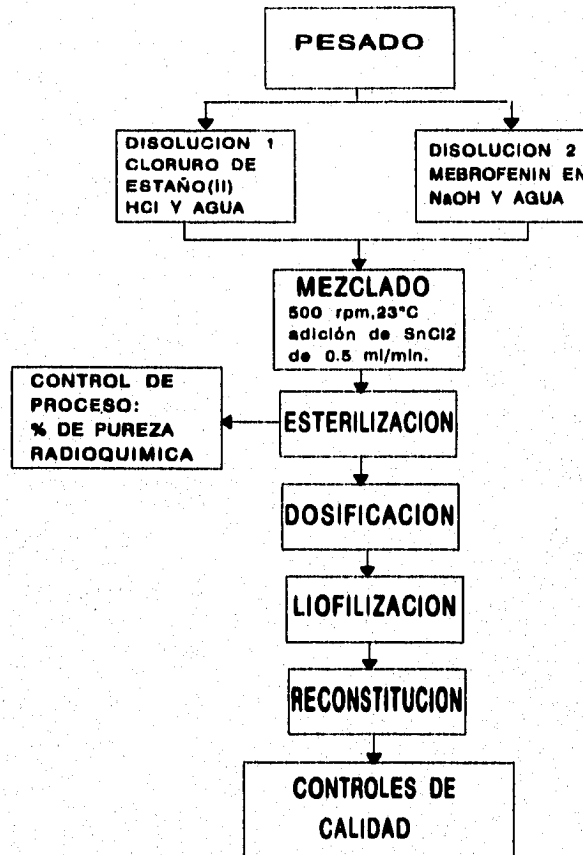
PROCEDIMIENTO:

1. Se elaboró un lote de 250 viales de Mebrofenin-Sn⁺² de acuerdo con la formulación:

mebrofenin.....10.0mg
cloruro de estaño (II)... 0.2mg
pluronic.....12.2mg

Con el siguiente orden:

DIAGRAMA DE FLUJO



2. Una vez terminados los controles de calidad para el 5% (12 viales) del lote, se retaparon con aluminio los viales y se realizó la prueba de vacío por unidad (vial) mediante un detector electrónico de vacío de alta frecuencia (Modelo BD-60) y se descartaron los viales que no pasaron la prueba.
3. Posteriormente se calibraron 3 estufas con termostato a 3 diferentes temperaturas: $45^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$; $60^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y $84^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
4. Se colocaron 50 viales en cada estufa y 50 se colocaron a temperatura ambiente, se optó por evaluar la pureza radioquímica cada 24 horas para cada temperatura durante la primera semana.
5. En la segunda semana se continuó con la determinación de pureza radioquímica muestreando cada 24 horas para la temperatura de 84°C , y cada semana para las temperaturas ambiente, 45°C y 60°C .
6. Las variables a evaluar para el estudio de estabilidad fueron el pH, la pureza radioquímica y la apariencia del liofilizado.
7. Debido a que una pureza radioquímica menor al 90% no es aceptable para el radiofármaco, se suspendió el estudio de estabilidad cuando el radiofármaco presentó una pureza radioquímica $<$ al 90%.
8. Terminado el estudio se graficaron y analizaron los resultados mediante el paquete estadístico "The SAS System", calculando el tgg o fecha de caducidad.

5.12 VALIDACIÓN DEL PROCESO

Terminada la optimización del proceso se llevó a cabo la elaboración de tres lotes de Mebrofenin-Sn⁺² en tres días consecutivos por el departamento de producción, posteriormente el departamento de Control de Calidad evaluó en su totalidad los controles de calidad muestreando el 5% de cada lote y expidiendo un certificado de calidad para cada uno.

Para nuestro análisis de uniformidad de lote a lote se recopilaron los resultados referentes a la pureza radioquímica y el contenido de Sn^{+2} (evaluado por el departamento de Análisis químicos del ININ).

El análisis de resultados se llevó a cabo mediante el paquete estadístico "The SAS System". Los resultados de la optimización, así como los de validación del proceso fueron reportados por escrito y anexados al protocolo de validación.

6. RESULTADOS

6.1 SÍNTESIS DE MEBROFENIN

El Rendimiento de la reacción final fue de 7.3g (78%); y un 20% se perdió en la recristalización final.

Tabla VIII
Puntos de Fusión de 3 lotes de Mebrofenin

LOTE	P.F °C	P.F °C X	C.V
Estándar	200-202 200-202	201	0
L-0195	200-202 200-202	201	0
L-0295	200-202 198-200	200	0.705
L-0395	200-202 200-202	201	0

MEDIA= 200.75

D.E = 0.5

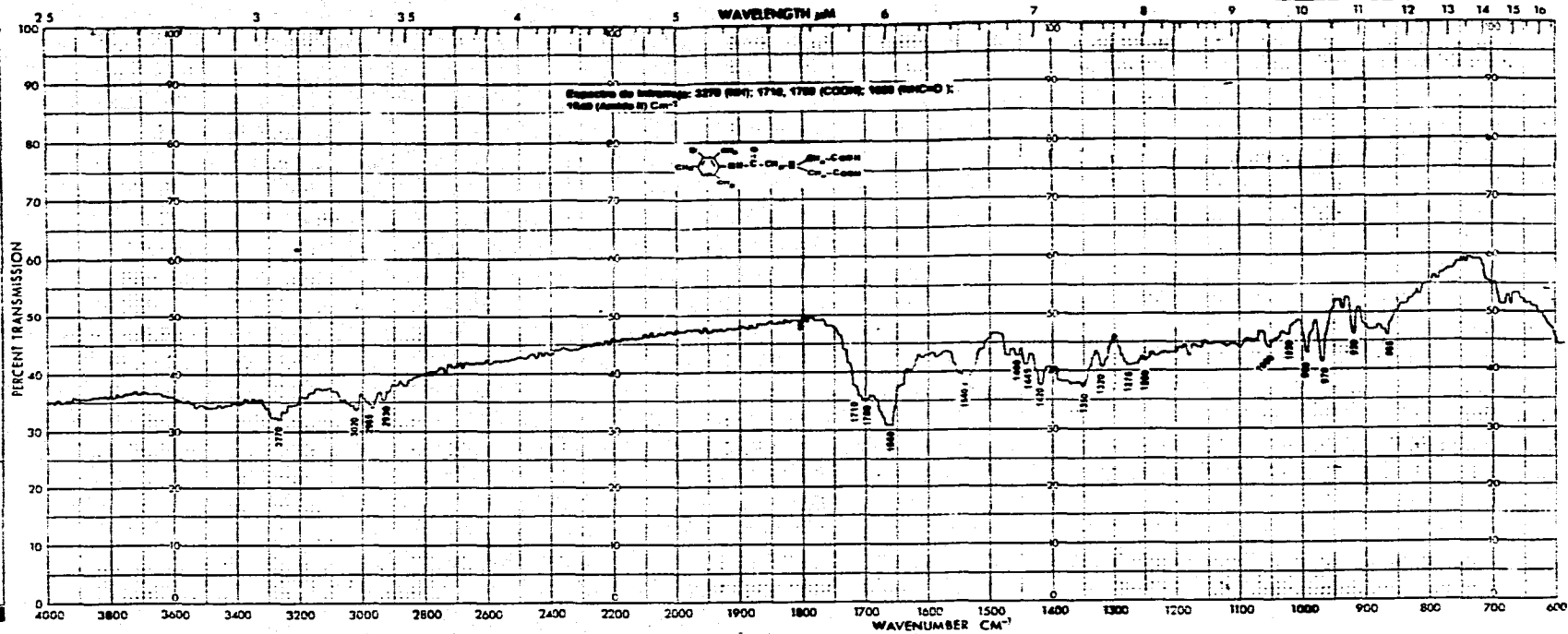
C.V = 0.249%

El coeficiente de variación entre lotes en cuanto a punto de fusión fue de 0.249%

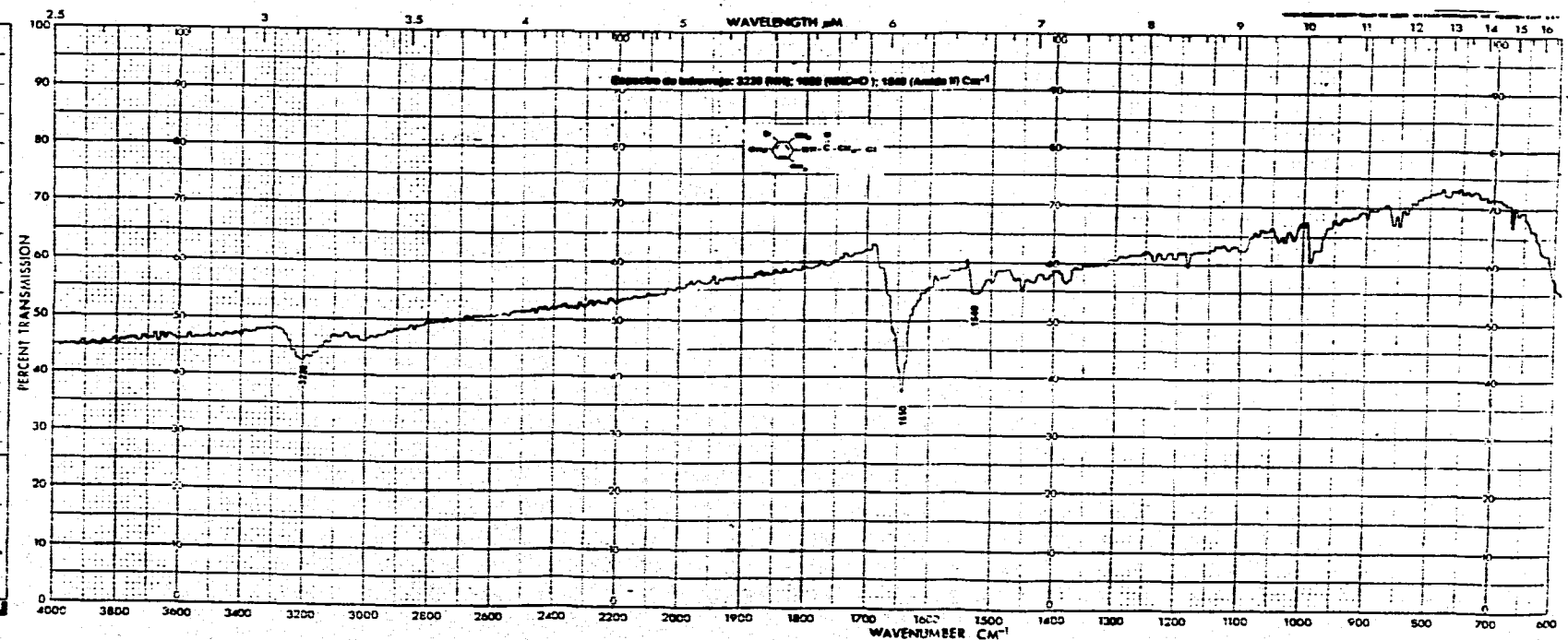
6.1.1 Espectros de Infrarrojo

Los espectros de infrarrojo para cada lote comparados con el estándar son los siguientes:

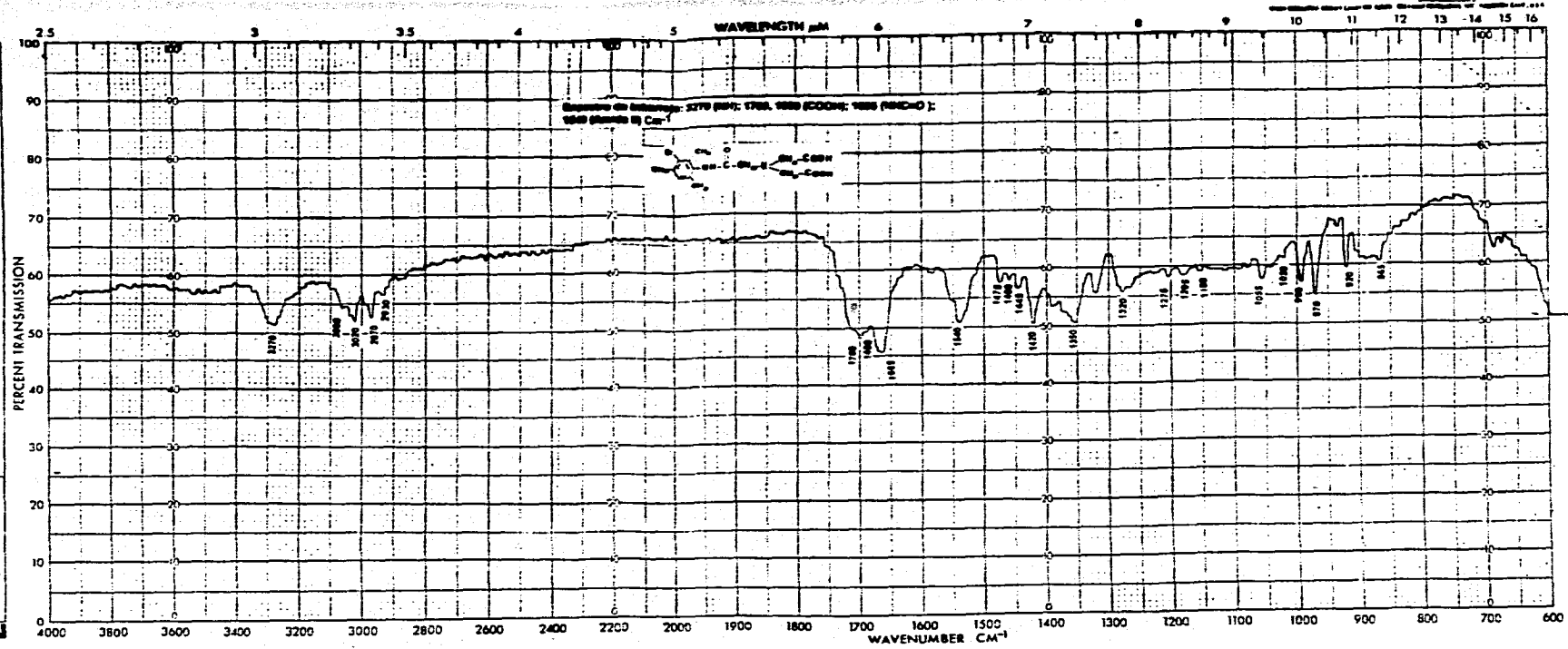
SPECTRUM NO. 3
 DATE 27-VII-93
 SAMPLE Hydroquinone
 SOURCE Esigonal
 STRUCTURE _____
 PATH _____
 SOLVENT Acetone
 CONC _____
 PHASE _____
 COMMENTS Soluto de 5mg/ml em acetona. Filtrado sobre papel de What. de 0.1 μm.
 ANALYST Camelia T. T. F.
 SPEED 300 cm⁻¹/min
 GAIN 200
 PERIOD 1.00 SEC
 SLIT WIDTH 0.3 mm
 @ 3000 cm⁻¹



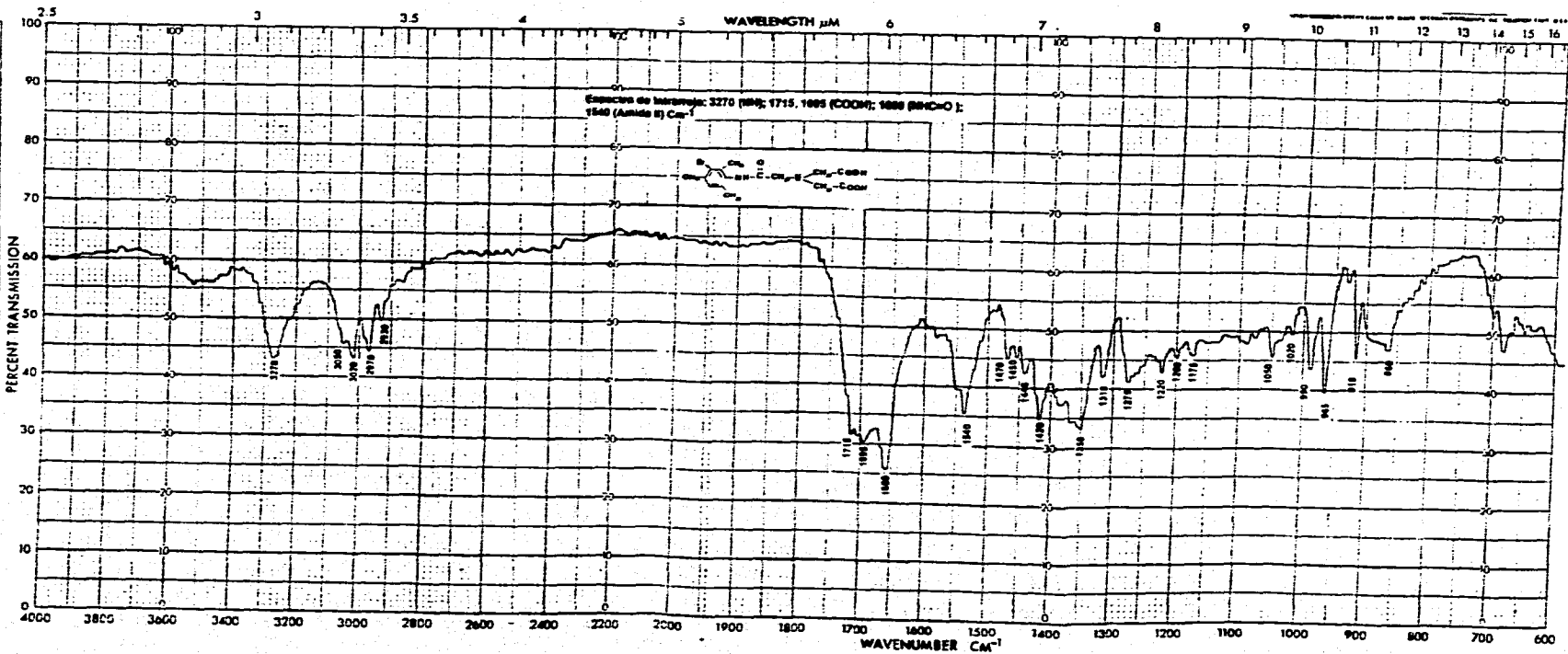
SPECTRUM NO. A
 DATE 25-VII-93
 SAMPLE U-487K-30000-2,2
6-hidroxiacetofenona
 SOURCE Truvenstar
 STRUCTURE _____
 PATH _____
 SOLVENT Acetone
 CONC _____
 PHASE _____
 COMMENTS Soluto de 5mg/ml em acetona. Filtrado sobre papel de What. de 0.1 μm.
 ANALYST Theresa M. S. A.
 SPEED 300 cm⁻¹/min
 GAIN 200
 PERIOD 1.00 SEC
 SLIT WIDTH 0.3 mm
 @ 3000 cm⁻¹



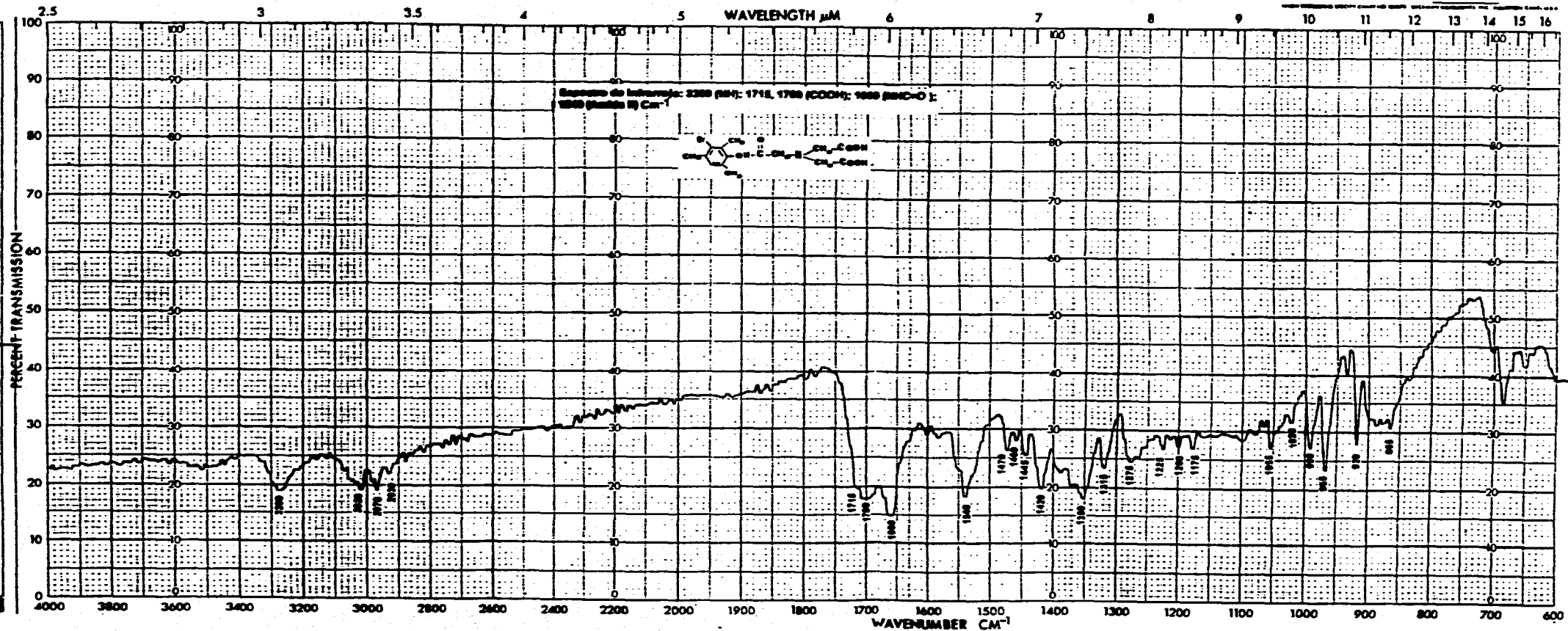
SPECTRUM NO. 3
 DATE 25-VII-95
 SAMPLE Hydrofenin
 SOURCE L-0195
 STRUCTURE _____
 PATH _____ mm
 SOLVENT Acetone
 CONC _____
 PHASE _____
 COMMENTS Soln. de solto
en acetona. Fijado sobre
calda de NaCl de 0.1mm.
 ANALYST Theresa Santos H.
 SPEED 300 cm⁻¹/min
 GAIN 260
 PERIOD 1.00 SEC
 SLIT WIDTH 0.3 mm
 @ 3000 cm⁻¹
BECKMAN
 SPECTROPHOTOMETER



SPECTRUM NO. 2
 DATE 25-VII-95
 SAMPLE Hydrofenin
 SOURCE L-0295
 STRUCTURE _____
 PATH _____ mm
 SOLVENT Acetona
 CONC _____
 PHASE _____
 COMMENTS Soln. de solto
en acetona. Fijado sobre
calda de NaCl de 0.1mm.
 ANALYST Theresa Santos H.
 SPEED 300 cm⁻¹/min
 GAIN 260
 PERIOD 1.00 SEC
 SLIT WIDTH 0.3 mm
 @ 3000 cm⁻¹
BECKMAN
 SPECTROPHOTOMETER



SPECTRUM NO. 1
 DATE 24-11-95
 SAMPLE MEDROPRIN
 SOURCE L-0395
 STRUCTURE _____
 PATH _____
 SOLVENT Acetone
 CONC. _____
 PHASE _____
 COMMENTS Standard
an acetone Ejecta
Solda de NaCl de 0.1mm
 ANALYST GABRIELA TARRA
 SPEED 500 cm⁻¹/min.
 GAIN 250
 PERIOD 1.00 SEC.
 SLIT WIDTH 0.3 mm
 @ 3000 cm⁻¹



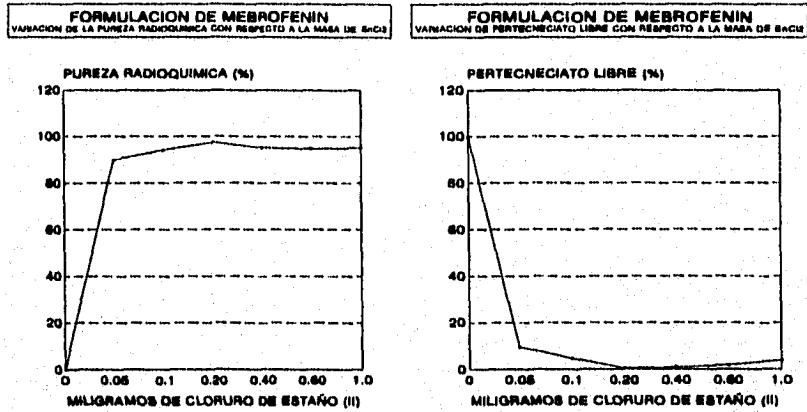
BECKMAN
 SPECTROPHOTOMETER

6.2 SELECCIÓN DE LA FORMULACIÓN

Para la formulación se fijó la masa de Mebrofenin en 10 mg y se varió la masa de cloruro de estaño (II).

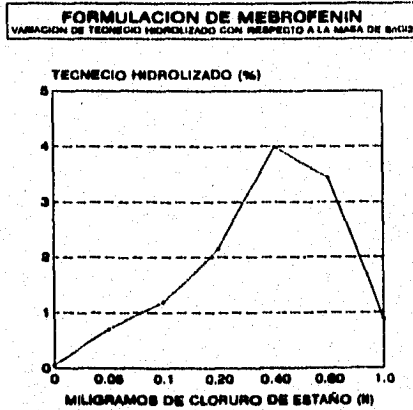
Tabla IX
Variación de la masa de SnCl_2

SnCl_2 (mg)	P.R%	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ %	$^{99\text{m}}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ %
0.05	89.76	9.52	0.71
0.10	94.02	4.77	1.20
0.20	97.30	0.53	2.15
0.40	95.06	0.94	3.99
0.60	94.72	1.84	3.43
1.00	95.14	3.96	0.89

6.2.1 Gráficas de Variación en la masa de SnCl₂

GRAFICA A

GRAFICA B



GRAFICA C

Figura 10.

6.3 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO

6.3.1 Pureza radioquímica y Distribución Biológica

Tabla X

Resultados Experimentales de la optimización del Proceso

	X1	X2	X3	P.R.% Y1	sangre % Y2	hígado % Y3	vesícula % Y4	intestino % Y5	Relación V/S	Relación V/H
1	-1	-1	-1	94.72	3.4365	5.5154	12.473	60.41	106.77	40.13
2	+1	-1	-1	98.53	2.30	4.50	10.20	71.30	78.00	102.0
3	-1	+1	-1	95.08	2.45	4.77	5.73	72.23	75.46	38.77
4	+1	+1	-1	96.47	1.92	6.20	16.40	67.3	384.37	29.90
5	-1	-1	+1	95.15	0.87	3.18	11.83	66.26	214.93	70.88
6	+1	-1	+1	99.00	1.85	4.50	15.30	70.70	238.91	60.44
7	-1	+1	+1	97.30	1.46	3.70	20.36	63.94	418.35	110.0
8	+1	+1	+1	98.16	1.71	3.0130	21.742	66.123	523.05	196.7

6.3.2 Análisis de Correlación y Regresión Lineal

El análisis de correlación entre las variables independientes X_i con respecto a las variables de respuesta Y_i es el siguiente :

DONDE:

X1= Velocidad de agitación de la mezcla (-1= 250 rpm; +1= 500 rpm)

X2 = Temperatura de mezclado (-1=23°C; +1= 28°C)

X3 = Velocidad de adición del SnCl₂ (-1= 0.2ml/min.; +1= 0.5ml/min)

Donde Y1= pureza radioquímica

Y2= % de dosis en sangre

Y3= % de dosis en hígado

Y4= % de dosis en vesícula

Y5= % de dosis en intestino

Tabla XI

**ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL DE
LA OPTIMIZACIÓN DE PROCESO**

RESPUESTA Y _i	MODELO	PROBABILIDAD DE COEFICIENTES	PROBABILIDAD DEL MODELO	R ²	C.V
PUREZA RADIOQUÍMICA	$Y_1 = 96.80 + 1.24X_1 + 0.60X_3 - 0.68X_1X_2 + 0.38X_3X_2$	$b_0 = 0.9999$ $x_1 = 0.9997$ $x_3 = 0.9978$ $x_1x_2 = 0.9984$ $x_3x_2 = 0.0012$	0.9993	0.99552	0.178568
DISTRIBUCIÓN EN SANGRE	$Y_2 = 2.00 - 0.53X_3 + 0.36X_3X_1$	$b_0 = 0.9999$ $x_3 = 0.9876$ $x_3x_1 = 0.9530$	0.9845	0.811052	19.49760
DISTRIBUCIÓN EN HÍGADO	$Y_3 = 4.42 - 0.82X_3$	$b_0 = 0.9999$ $x_3 = 0.9823$	0.9823	0.635963	16.27707
DISTRIBUCIÓN EN VESÍCULA	ver anexo 4 número 1	ver anexo 4 número 1	0.3553	0.856789	37.28077
DISTRIBUCIÓN EN INTESTINO	ver anexo 4 número 1	ver anexo 4 número 1	0.2623	0.796777	7.125455

De acuerdo el procedimiento general para modelos lineales tenemos :

1. Para la variable de respuesta Y₁ (Pureza radioquímica) el modelo lineal es:

$$Y_1 = 96.80 + 1.24X_1 + 0.60X_3 - 0.68X_1X_2 + 0.38X_3X_2$$

Si se fija X₂ = -1= 23°C resulta:

$$Y_1 = 96.80 + 1.92X_1 + 0.22X_3$$

Si se fija X₂ = +1= 28°C resulta:

$$Y_1 = 96.80 + 0.56X_1 + 0.98X_3$$

2. Para la variable de respuesta Y₂ (distribución en sangre) el modelo lineal es:

$$Y_2 = 2.00 - 0.53X_3 + 0.36X_3X_1$$

3. Para Y₃ (distribución en hígado) el Modelo lineal es:

$$Y_3 = 4.42 - 0.82X_3$$

4. Para Y₄ (distribución en vesícula) el modelo lineal no es probable.

5. para Y5 (distribución en intestino) el modelo lineal no es probable.

De acuerdo con las ecuaciones encontradas para las tres variables de respuesta en las cuales se encontró una influencia significativa al variar los factores, se calcularon los valores para cada una de las 8 experiencias.

En seguida se presentan los valores calculados con los modelos lineales considerando que X2 no tiene influencia significativa en la respuesta.

6.3.3 Valores Calculados para cada Variable de Respuesta

Tabla XII
Valores Calculados en la Optimización del Proceso

EXP.	Y1 (P.R)	Y2 (sangre)	Y3 (hígado)
1	94.65	2.88	5.24
2	98.49	2.16	5.24
3	95.26	2.88	5.24
4	96.38	2.16	5.24
5	95.11	1.11	3.59
6	98.95	1.83	3.59
7	97.22	1.11	3.59
8	98.34	1.83	3.59

La experiencia óptima encontrada es la número 6, ya que presenta alta pureza radioquímica, baja distribución en sangre y baja distribución en hígado después de 90 minutos. Los parámetros a del proceso son velocidad de mezclado de 500 rpm, temperatura de mezclado de 23°C y velocidad de flujo de adición del cloruro de estaño (II) de 0.5 ml/min.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA
TRINIDAD SALAZAR MUÑOZ

6.4 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

Tabla XIII

Evaluación de condiciones del CLAR con respecto a composición de Fase Móvil y Velocidad de Flujo

Exp	FACTORES		RESPUESTAS					
	X1	X2	Tr	SIGMA	K	R	SELEC.	ÁREA
1	+1	+1	2.382	556	1.588	2.013	2.213	90.17
			2.385	568	1.590	2.045	2.203	90.33
2	-1	+1	3.585	591	1.390	2.278	1.505	90.59
			3.598	576	1.399	2.283	1.501	90.62
3	+1	-1	2.695	538	1.797	2.149	3.025	91.35
			2.695	529	1.797	2.288	2.903	91.09
4	-1	-1	4.102	374	1.734	2.942	1.834	91.96
			4.192	492	1.794	2.602	1.889	93.27

Donde X1= velocidad de flujo (+1= 1-5 ml/min.; -1= 1.0 ml/min.) y,
 donde X2= concentración de fase móvil metanol: ácido fosfórico al 0.2%
 (+1=80:20 V/V ; -1=75:25 V/V).
 Ver en el Anexo 2 los cromatogramas para cada una de las experiencias.

Tabla XIV
ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL DE
LA OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES
PARA EL MÉTODO ANALÍTICO POR CLAR

RESPUESTA Y	MODELO	PROBABILIDAD DE COEFICIENTES	PROBABILIDAD DEL MODELO	R ²	C.V
TIEMPO DE RETENCIÓN	$Y1 = 3.2042 - 0.6650X1 - 0.2167X2 + 0.061X1X2$	bo = 0.9999 x1 = 0.9999 x2 = 0.9993 x1x2 = 0.9942	0.9999	0.99895	1.0039
SIGMA	$Y2 = 528 + 19.75X1 + 44.75X2 - 30.50X1X2$	bo = 0.9999 x1 = 0.742 x2 = 0.9595 x1x2 = 0.8884	0.9214	0.78717	8.0280
FACTOR DE CAPACIDAD K	$Y3 = 1.6361 + 0.0568X1 - 0.1443X2 - 0.04037X1X2$	bo = 0.9999 x1 = 0.9983 x2 = 0.9999 x1x2 = 0.9940	0.9999	0.99112	1.3117
RESOLUCIÓN	$Y4 = 2.3250 - 0.2012X1 - 0.1702X2$	bo = 0.9999 x1 = 0.9871 x2 = 0.9759	0.9881	0.83033	6.4827
SELECTIVIDAD	$Y5 = 2.1341 + 0.4518X1 - 0.2786X2 - 0.09937X1X2$	bo = 0.9999 x1 = 0.9999 x2 = 0.9993 X1*X2 = 0.9959	0.9999	0.99615	2.2241
ÁREA	$Y6 = 91.1725 - 0.7450X2$	bo = 0.9999 X2 = 0.9886	0.9732	0.87797	0.5217

6.4.1 Valores Calculados para cada Variable de Respuesta

Tabla XV

Valores Calculados en la optimización de condiciones del Método Analítico

Exp.	Tret	K	RESOL.	SELEC.	ÁREA
1	2.3835	1.5082	1.9536	2.2079	90.4275
2	3.5915	1.4753	2.356	1.5030	90.4275
3	2.6949	1.8775	2.294	2.9638	91.9175
4	4.1469	1.6832	2.6964	1.8615	91.9175

De acuerdo a lo anterior la experiencia óptima es la número 3, ya que presenta la mas alta selectividad y área bajo la curva, con una buena resolución y un tiempo de retención intermedio con respecto a las otras experiencias. La concentración de la fase móvil es 75:25 V/V y velocidad de flujo de 1.5 ml/min.

6.5 VALIDACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO CLAR

6.5.1 Linealidad del Sistema

Tabla XVI

Resultados de la Linealidad del Sistema

Nivel	CONCENTRACIÓN PROMEDIO (µg/mL) (X)	ÁREA PROMEDIO (Y)	%RECOBRO (Y/X)
1	40	2280658.1250	56016.453
2	80	4392048.9375	54900.611
3	100	5473199.1250	54731.991
4	120	6585191.1875	54876.593
5	150	8273772.5000	55158.483

$$R = 0.999804$$

$$R^2 = 0.999607$$

$$D.E = 515.175$$

$$MEDIA = 55136.826$$

$$C.V. = D.E / MEDIA \times 100 = 0.934\%$$

Dado que el coeficiente de variación es menor a 1.5%; R mayor a 0.99 y R^2 mayor a 0.98, se cumple con el criterio para considerar al sistema lineal.

6.5.2 Precisión del Sistema

Tabla XVII

Resultados de la Precisión del Sistema

Nivel	CONCENTRACIÓN %	ÁREA ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)
1	100	5664529
2	100	5660868
3	100	5692691
4	100	5619485
5	100	5829411
6	100	5738814
7	100	5726434
8	100	5767285

MEDIA = 5712440 ± 67153.8

C.V. = 1.176 %

El sistema es preciso dado que el coeficiente de variación es menor a 1.5%

6.5.3 Exactitud y Repetibilidad

Tabla XVIII

Resultados de Exactitud y Repetibilidad del Sistema

Nivel	CONCENTRACIÓN %	ÁREA ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)
1	100	5687883
2	100	5464640
3	100	5699600
4	100	5439992
5	100	5555965
6	100	5634516
7	100	5655223

MEDIA = 5591117 ± 105827

C.V. = 1.893 %

Dado que el coeficiente de variación es menor al 2% en 7 placebos cargados independientemente, se cumple con el criterio de exactitud y repetibilidad.

Ver en el Anexo 3 resultados de la validación del sistema.

6.6 EVALUACIÓN DE LA PRECISIÓN (REPRODUCIBILIDAD) DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO EN CAPA FINA

Tabla XIX
ANÁLISIS POR SEXTUPlicADO DE UN MISMO LOTE DE
^{99m}Tc-MEBROFENIN POR CCF-SA

	CCF-SA (% P.R.)
1	97.79
2	97.70
3	96.94
4	98.08
5	97.03
6	97.54

n= 6

MEDIA = 97.5133

D.E. = 0.446213

C.V. = $4.57 \times 10^{-3} = 0.45\%$

El sistema cumple con el criterio para ser considerado preciso (CV < 2%)

Tabla XX
ANÁLISIS POR SEXTUPLICADO DE UN MISMO LOTE DE
99mTc-MEBROFENIN POR CCF-SG

	CCF-SG (% P.R.)
1	99.25
2	99.18
3	99.25
4	99.20
5	99.24
6	99.21

n= 6

MEDIA = 99.2216

D.E. = 2.92×10^{-2}

C.V. = 0.02%

El sistema cumple con el criterio para ser considerado preciso (CV < 2%)

6.7 ESTUDIO DE ESTABILIDAD

6.7.1 Estabilidad Acelerada

Tabla XXI

Estabilidad acelerada del Liofilizado Mebrofenin-^{99m}Tc

TEMPERATURA (°C) ± 2 X1	TIEMPO (SEMANA) X2	PUREZA RADIOQUÍMICA ^{99m} Tc-Mebrofenin (%)
25	1	96.88, 96.58
25	2	96.67, 96.73
25	3	96.86, 96.97
45	1	96.77, 96.75
45	2	96.71, 96.45
45	3	96.63, 96.42
60	1	96.07, 96.61
60	2	95.15, 95.88
60	3	95.83, 95.50
84	1	92.22, 93.61
84	2	90.57, 91.19
84	3	89.34, 89.61

Estabilidad inicial promedio de 96.90 %.

Tabla XXII
COMPARACIÓN DE ESTABILIDAD A DIFERENTES TEMPERATURAS
(PROMEDIOS)

SEMANA X	P.R% 45 °C	P.R% 60 °C	SEMANA X	P.R% 84 °C
1	96.76	96.34	0.14	96.19
2	96.58	95.51	0.28	96.10
3	96.52	95.66	0.42	95.98
4	96.40	94.88	0.57	95.57
5	96.38	94.44	0.71	93.62
6	94.81	93.46	0.85	93.12
7	94.43	92.98	1.00	92.91
8	94.47	92.80	1.14	92.61
9	93.45	92.66	1.28	92.41
10	92.80	92.60	1.42	92.22
11	92.65	91.95	1.57	91.92
12	92.25	91.35	1.71	91.62
13	92.13	91.04	1.85	91.22
14	91.97	90.82	2.00	90.88
15	91.75	90.24	2.14	90.72
16	91.65	89.95	2.28	90.13
17	91.26	89.62	2.42	89.34
18	90.58	*	2.57	89.51
19	90.45	*	2.71	89.21
20	89.82	*	2.85	88.51
21	89.75	*	3.00	89.47
*	*	*	3.14	87.43

1. Superficie de Respuesta

SUPERFICIE DE RESPUESTA DE LA ESTABILIDAD DE MEBROFENIN-⁹⁹ LEFLEVARO

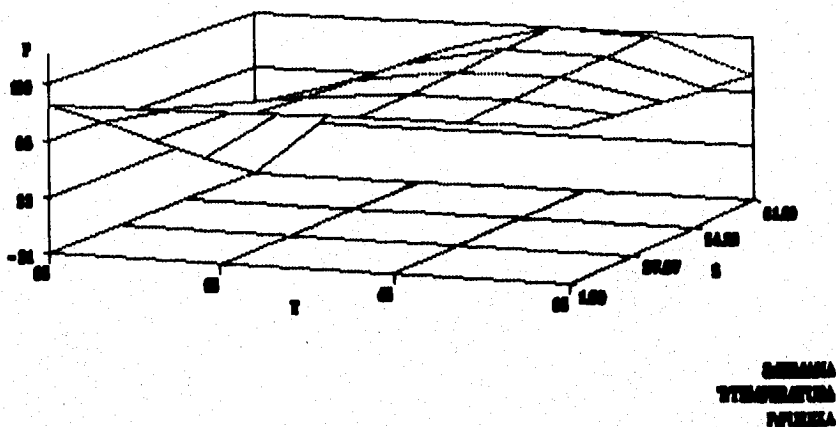


Figura 11.

2. Análisis de correlación y regresión lineal

Variable Dependiente: Pureza radioquímica

FACTORES	VALOR ESTIMADO DE LOS COEFICIENTES	PROBABILIDAD DEL COEFICIENTE
Intercepto	97.61204	0.9999
X2	-1.85261	0.9999
X1*X2	0.09005	0.9999
X1*X1	-0.00052	0.9999
X2*X1*X1	-0.00101	0.9999

La ecuación para el modelo supuesto es:

$$P.R.\% = 97.61204 - 1.85261X_1 + 0.09005X_1X_2 - 0.00052X_1^2 - 0.00101X_1^2X_2$$

Donde: X_1 = Temperatura;

X_2 = Tiempo (semanas)

Entonces la vida de anaquel (t_{90}) a 25°C será:

$$1.85261X_2 - 0.09005X_1X_2 + 0.00101X_1^2X_2 = 97.61204 - 90.00 - 0.00052X_1^2$$

$$X_2 = 7.28 / 0.23$$

$$X_2 = 31.65 \text{ Semanas} \approx 8 \text{ Meses}$$

Ver en el Anexo 4 el análisis del paquete estadístico "The SAS System"

6.8 VALIDACIÓN DEL PROCESO

6.8.1 Reproducibilidad del Proceso evaluando la Pureza Radioquímica

Tabla XXIII

Resultados de la Pureza Radioquímica

OBS	LOTE	PUREZA
1	L-01P95	98.16
2	L-01P95	97.98
3	L-01P95	98.50
4	L-02P95	97.72
5	L-02P95	98.88
6	L-02P95	98.20
7	L-03P95	98.10
8	L-03P95	98.15
9	L-03P95	97.90

1. Análisis de varianza

Variable Dependiente: Pureza radioquímica

H_0 : al menos un par de Medias son iguales

H_a : al menos un par de medias son diferentes

Pr > F	R ²	C.V	Pureza promedio
0.7731	0.082187	0.384263	98.1767

Las Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Diferencia mínima significativa 0.9451.

GRUPO TUKEY	MEDIA	N	LOTE
A	98.2667	3	2
A			
A	98.2133	3	1
A			
A	98.0500	3	3
A			

Debido a que $PrF > 0.05$, se acepta la hipótesis H_0 ; de acuerdo con los grupos de Tukey todas las medias son iguales. El proceso es repetible evaluando la pureza radioquímica de tres lotes elaborados en tres días diferentes.

6.8.1 Reproducibilidad del Proceso evaluando el Contenido de Estaño +2

Tabla XXIV
Resultados del Contenido de Estaño +2

OBS	LOTE	contenido de Sn ⁺²
1	L-01P95	0.18
2	L-01P95	0.18
3	L-01P95	0.16
4	L-02P95	0.18
5	L-02P95	0.18
6	L-02P95	0.20
7	L-03P95	0.16
8	L-03P95	0.18
9	L-03P95	0.18

1. Análisis de varianza

Variable Dependiente: Contenido de Sn⁺²

H₀: al menos un par de Medias son iguales

H_a: al menos un par de medias son diferentes

Pr > F	R ²	C.V	Estaño promedio
0.3318	0.307692	6.495191	0.17778

Las Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Diferencia mínima significativa 0.0289.

GRUPO TUKEY	MEDIA	N	LOTE
A	0.186667	3	2
A			
A	0.173333	3	1
A			
A	0.173333	3	3
A			

Debido a que $PrF > 0.05$, se acepta la hipótesis H₀; de acuerdo con los grupos de Tukey todas las medias son iguales. El proceso es repetible evaluando la concentración de Sn⁺² de tres lotes elaborados en tres días diferentes.

Ver en el Anexo 4 el análisis del paquete estadístico "The SAS System". En el Anexo 5 se presentan los certificados de calidad de los tres lotes finales de la validación.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La ruta de síntesis realizada para la obtención de Mebrofenin (BromotrimetilIDA) reportada en la literatura (ref.8), produjo un polvo blanco, cristalino, ligero, insoluble en ácido a pH 2 y soluble a pH > 9; presenta un punto de fusión de 197-200°C. El rendimiento de la reacción fue del 78%, al recrystalizarlo en etanol:agua se pierde un 20% del producto sin embargo es conveniente puesto que el punto de fusión se ve aumentado siendo de 200-202°C. El producto obtenido fue ampliamente identificado con el espectro de Infrarrojo que presentó las bandas características. Se identificó la formación del compuesto ya que el intermediario anterior del Mebrofenin es el Cloro-3-Bromo-2,4,6-trimetilacetanilida presentado en el primer espectro de infrarrojo, este no presenta la banda de COOH alrededor de 1700 cm^{-1} ; después de la reacción final aparecen las bandas de COOH en $1700, 1710\text{ cm}^{-1}$, corroborando la reacción nucleofílica del iminodiacetato de sodio al carbono de la amina secundaria.

En cuanto a los tres lotes realizados en tres días diferentes de Mebrofenin, con el fin de observar la reproducibilidad del método de síntesis se determinaron los puntos de fusión encontrándose que éstos son muy similares entre los 3 lotes, presentaron un coeficiente de variación de 0.249% lo que indica reproducibilidad en los puntos de fusión. Se realizó el espectro de Infrarrojo para cada lote; el Mebrofenin estándar presenta las bandas siguientes: 3270 cm^{-1} (NH); $1710, 1700\text{ cm}^{-1}$ (COOH); 1660 cm^{-1} (NHC=O); 1540 cm^{-1} (Amida II). Los tres espectros presentados para los lotes 0195,0295 y 0395; presentan ligeras variaciones de 2 a 3 cm^{-1} principalmente en la banda de COOH, sin embargo esta leve diferencia no es significativa ya que los tres espectros presentan bandas que caen dentro del rango de absorbancia de COOH. Con esto podemos afirmar que se trata del mismo producto sintetizado y por tanto la síntesis es reproducible bajo las mismas condiciones reportadas en el presente trabajo.

La figura 10 muestra en la gráfica A, las variaciones de masa probadas para la selección de la formulación del núcleo-equipo de Mebrofenin-Sn⁹². Se confirmó que la relación de 10 mg de Mebrofenin (ligante) y 0.2 mg de SnCl₂ es la adecuada puesto que presenta la más alta pureza radioquímica. La gráfica B, muestra que en este punto de 0.2 mg de SnCl₂ se presenta el más bajo porcentaje de pertecneiato libre, lo que implica una excelente reducción por parte del estaño. Esta masa de estaño que forma parte de la formulación no tiene ningún efecto tóxico en el organismo humano, pues la toxicidad del estaño se reporta en concentraciones por arriba de 250 mg/ Kg de peso del individuo (ref.36).

La optimización de condiciones de producción del Mebrofenin-Sn⁹² se llevó a cabo determinando con precisión la velocidad de mezclado, la temperatura de mezclado y la velocidad de adición del reactivo SnCl₂. Se evaluaron a dos niveles de acuerdo con los resultados generados por el análisis de regresión lineal aplicado: el 99.6% de la variación observada en la pureza radioquímica (Y1) se explica por la variación inducida en X1, X2 y X3 (la velocidad de mezclado, la temperatura de mezclado y la velocidad de adición del reactivo SnCl₂ respectivamente). Así mismo el 81.10% y el 63.59% de la variación observada en la distribución en sangre (Y2) y en la distribución en hígado (Y3) respectivamente se explica por la variación inducida en X1 y X3 principalmente. Los resultados muestran sin embargo, que X2 en cualquiera de los dos niveles (temperatura de 23° o 28°C) no causa influencia significativa en el proceso por sí misma sino sólo en combinación con los otros dos factores.

La distribución en vesícula y en intestino sugiere que estas variables de respuesta no se ven afectadas o no varían con respecto a X1, X2 o X3, puesto que la probabilidad de que fueran afectadas es de 0.3553 y de 0.2623 respectivamente, por lo que no se consideraron para determinar las variables óptimas.

De acuerdo con los valores calculados por las ecuaciones propuestas, la experiencia encontrada como óptima es la número 6; esto se concluye ya que

presenta alta pureza radioquímica, baja distribución en sangre y baja distribución en hígado después de 90 minutos lo que implica buena eliminación por los hepatocitos, cumpliendo con las especificaciones para un reactivo de diagnóstico hepatobiliar. Así el proceso de producción finalmente es realizado con una velocidad de mezclado de 500 rpm, a 23°C, y adicionando el cloruro de estaño (II) a una velocidad de 0.5 ml/min.

El complejo de ^{99m}Tc -Mebrofenin posee excelentes características radioquímicas para ser usado en el diagnóstico hepatobiliar, la calidad de las imágenes gamagrafías fue evaluada en el Instituto Nacional de Pediatría, en el Departamento de Medicina Nuclear. Un ejemplo de este estudio es la gamagrafía presentada en la monografía de ^{99m}Tc -Mebrofenin.

Dentro del desarrollo del método analítico de cuantificación de Mebrofenin, se escogió por la solubilidad de éste el metanol como disolvente. Una vez disuelto el Mebrofenin se realizó un barrido en un espectrofotómetro de U.V; se encontró que el pico de máxima absorbancia se presentaba a 215 nm (anexo 2). Con esto se encontró la longitud de onda adecuada para detectar el compuesto por CLAR. Para este tipo de cromatografía se optó por la fase reversa adicionando ácido fosfórico al 0.2% V/V para evitar la presencia de "cola" en el cromatograma. Para encontrar la concentración adecuada de la fase móvil (basada en el coeficiente de partición del mebrofenin entre la columna C-18 y la proporción de la mezcla metanol:agua), así como la velocidad de flujo a la cual debían correrse los cromatogramas para un análisis de materia prima, se desarrolló un diseño factorial $2 \times 2 \times 6$ donde las variables de respuesta fueron los parámetros cromatográficos: Tiempo de retención, Sigma o platos teóricos, Factor de capacidad (K), la Resolución, selectividad y el área bajo la curva.

De acuerdo con los resultados del análisis de regresión para este diseño: el 99.8% de la variación observada en el tiempo de retención y en el factor de capacidad, es debido a la variación inducida por la concentración de la fase móvil

(X2) y la velocidad de flujo (X1). Así mismo el 99.6% y el 83.03% de la variación presentada en la selectividad y en la resolución respectivamente es debido a la variación inducida por estas dos variables X1 y X2; Mientras que el 87.7% de la variación inducida en el área bajo la curva es debido únicamente a la concentración de la fase móvil. Respecto a la variable de respuesta Sigma, la probabilidad de que presente variación o correlación con respecto a las variables independientes es baja de 0.9214, lo que nos llevó a no considerarla al definir los valores óptimos de las variables, puesto que Sigma o los platos teóricos sólo depende del tipo de columna.

De acuerdo con los valores calculados por las ecuaciones para las variables, la experiencia óptima es la número 3 pues presenta la más alta selectividad al igual que el área bajo la curva, tiene buena resolución (>2), el factor de capacidad (K) es mayor con respecto a las otras tres experiencias y un tiempo de retención de 2.69 min. permitiendo dar una corrida al cromatograma de sólo 5 minutos ahorrando tiempo y reactivos en el análisis. Aunque la experiencia 4 tiene una resolución mayor no posee alta selectividad y el tiempo de retención es mayor lo que aumenta el tiempo de análisis. Las condiciones óptimas para realizar la validación del sistema cromatográfico por CLAR fueron el empleo de la fase móvil de concentración 75:25 V/V de metanol:ácido fosfórico al 0.2%, velocidad de flujo de 1.5 ml/min, corrida del cromatograma de 5 minutos a una longitud de onda de 215nm.

En la validación del sistema cromatográfico de líquidos de alta resolución para la cuantificación de Mebrofenin, se observa en la tabla XVI la evaluación de la linealidad, el coeficiente de correlación de 0.9998 indica que todos los puntos caen dentro de una línea recta. El coeficiente de variación de 0.934% indica que el sistema es lineal dado que el criterio para considerar un sistema cromatográfico lineal es C.V. $< 1.5\%$, esto entonces indica que los resultados analíticos son

proporcionales a la concentración de Mebrofenin dentro de un intervalo determinado.

En la evaluación de la precisión del sistema el análisis de los resultados se muestra en la tabla XVII, el coeficiente de variación de 1.17% menor al criterio C.V. < 1.5% determina que el sistema es preciso.

En la evaluación de exactitud y repetibilidad del sistema se muestra que el coeficiente de variación obtenido de los datos de la tabla XVIII es de 1.89%, dado que el criterio para considerar exactitud y repetibilidad es C.V. < 2%, en 7 placebos cargados independientemente entonces, se cumple con el criterio.

El sistema por lo tanto ha sido validado siendo óptimo para evaluar el contenido de Mebrofenin para un control de calidad de materia prima. Para utilizar este procedimiento analítico como análisis de contenido de principio activo para producto terminado queda a Control de Calidad la responsabilidad de validar el método e incluirlo como un análisis rutinario para productos liofilizados.

La pureza radioquímica, como se observó a lo largo de todo el trabajo experimental, es una prueba radioquímica fundamental para la evaluación de radiofármacos. Se utilizó tanto para la elección de la formulación, dentro de la optimización del proceso de producción del núcleo-equipo, los estudios de estabilidad, la validación del proceso y obviamente para cualquier control de calidad del producto final. Por su importancia se evaluó la precisión (reproducibilidad) del sistema cromatográfico con el que se evalúa la Pureza radioquímica. Para el análisis por sextuplicado de un mismo lote de Mebrofenin-Sn² el coeficiente de variación para el sistema CCF-SA fue de 0.45%. La tabla XX muestra los datos del análisis del sistema CCF-SG con un coeficiente de variación de 0.02%. Dado que el sistema se considera preciso si C.V. < 2% , ambos sistemas lo son lo que implica confiabilidad en los resultados.

El estudio de estabilidad acelerada permitió encontrar un modelo lineal con una probabilidad de 0.9999 con el cual se estimó la fecha de caducidad (t_{90}) lógica. El estudio a las diferentes temperaturas se siguió hasta que el producto liofilizado (Mebrofenin-Sn²⁺) decayó en un 89% de su pureza radioquímica. Debido a que la temperatura más alta de $84^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ llegó a este valor en 3 semanas, los datos empleados para predecir el modelo lineal se analizaron hasta las 3 semanas también para las otras 3 temperaturas como muestra la tabla XXI. Así la ecuación para predecir la Pureza Radioquímica es:

$$\text{P.R}\% = 97.61204 - 1.8521X_2 + 0.090005X_1X_2 - 0.00052X_1^2 - 0.0010X_1^2X_2$$

El modelo explica el 97.82% ($R^2 = 0.9782$) de la variación de la pureza radioquímica y por lo tanto su valor de predicción es inferior a 10%, dicho modelo muestra un coeficiente de variación de 0.429279%, donde X_1 es temperatura y X_2 el tiempo expresado en semanas. Así la vida media de anaquel o t_{90} calculada a 25°C es de 31.68 semanas esto es 8 meses a temperatura ambiente.

El núcleo-equipó liofilizado Mebrofenin-Sn²⁺ posee una estabilidad adecuada, pues cabe mencionar que a una temperatura de 45°C tarda 21 semanas en bajar a alrededor de un 89%, su pureza radioquímica; a 60°C 17 semanas y a 84°C 3 semanas como muestra la tabla XXII. Por otra parte un lote de prueba elaborado sin la optimización de condiciones de proceso, ha sido evaluado mensualmente durante 12 meses encontrándose que a una temperatura de 4°C su pureza a disminuído sólo 1%. Evaluar la pureza radioquímica en un estudio de estabilidad de un núcleo-equipó es lo más conveniente puesto que en esta determinación se evalúa la formulación en su totalidad (Mebrofenin-Sn²⁺), así como su capacidad para reducir al pertecneiato de sodio y la formación del complejo.

Dentro del Departamento del Reactor y Materiales radiactivos del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, se generó la documentación necesaria para el protocolo de validación del proceso de producción del núcleo-equipó de

Mebrofenin-Sn²⁺ empleado para el diagnóstico hepatobiliar. Dentro de la validación del proceso se incluyó la optimización del proceso ya mencionado anteriormente. Bajo las condiciones óptimas de producción se elaboraron 3 lotes de Mebrofenin-Sn²⁺ en 3 días diferentes y se generó el certificado de calidad para cada uno (ver Anexo 5). Los datos individuales que correspondieron a la evaluación de la Pureza Radioquímica para cada lote se presentan en la tabla XXIII, mediante un análisis de varianza se probó la hipótesis H_0 : al menos un par de medias son iguales. Esta hipótesis se aceptó puesto que $PrF = 0.7731 > 0.05$. Esto indicó que todas las medias son iguales, así mismo la prueba de Tukey lo confirma ya que no hay diferencia significativa entre las medias de los tres lotes, por lo que se concluye que el proceso es reproducible de acuerdo con el análisis del factor Pureza radioquímica.

Un análisis no rutinario que se aplicó a estos tres lotes de Mebrofenin-Sn²⁺ fue el contenido de Sn²⁺, determinado por el Departamento de Análisis Químicos del ININ, (determinación electroquímica). Con estos resultados de contenido de estaño (II) presentados en la tabla XXIV, se realizó un análisis de varianza, aceptando la hipótesis H_0 : al menos un par de medias son iguales, puesto que $PrF = 0.3318 > 0.05$. Así entonces podemos decir que no hay diferencia entre las medias, la prueba de Tukey comprueba que no hay diferencia y los tres lotes son iguales por lo tanto el proceso es reproducible de acuerdo con la prueba de contenido de estaño.

III. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se sintetizó Mebrofenin (BromotrimetilIDA) de acuerdo con la referencia 8 encontrándose que la síntesis es reproducible, obteniéndose en la reacción final un producto con excelentes características de pureza, identificado por su espectro de Infrarrojo y punto de fusión de 200-202°C.

2. La formulación determinada como óptima para la producción del núcleo-equipo de Mebrofenin-Sn² que proporciona las mejores características radioquímicas es la siguiente:

Mebrofenin.....	10.0 mg
Cloruro de estaño (II) anhidro.....	0.2 mg
Excipiente c.b.p.....	12.2 mg

3. Para llevar a cabo la producción del núcleo-equipo las condiciones óptimas encontradas para la producción son el mantenimiento de una velocidad de mezclado de 500 rpm, a 23°C, y adicionar el cloruro de estaño (II), concentración de 5 mg/ml, a una velocidad de 0.5 ml/min.

4. Las condiciones óptimas para realizar el análisis cromatográfico (CLAR), así como la validación del sistema cromatográfico para la materia prima Mebrofenin son: utilizar como fase móvil metanol:ácido fosfórico al 0.2% en una relación de 75:25 V/V, con una velocidad de flujo de la fase móvil de 1.5 ml/min, corrida del cromatograma de 5 minutos a una longitud de onda de 215nm. Bajo estas condiciones el mebrofenin tiene un tiempo de retención de 2.695 a 2.7 minutos. Se determinó además que este sistema cromatográfico de líquidos de alta resolución es lineal, preciso, exacto y repetitivo bajo las mismas condiciones.

5. El sistema de cromatografía de capa fina para evaluar la Pureza Radioquímica en los dos sistemas, soporte de sílica gel y de ácido silícico reveló ser preciso y

reproducible ya que el coeficiente de variación para el sistema CCF-SA fue de 0.45%; y para el sistema CCF-SG el coeficiente de variación es 0.02%. Dado que el sistema se considera preciso si C.V. < 2% , ambos sistemas lo son lo que implica confiabilidad en los resultados.

6. El estudio de estabilidad acelerada permitió encontrar un modelo lineal que tiene una probabilidad de 99.9% y explica el 97.87% de la variación de la pureza radioquímica; y permite predecir la respuesta con un error inferior al 10% determinando una fecha de caducidad (t_{90}) lógica. La fecha de caducidad determinada para un núcleo-equipos liofilizado de Mebrofenin-Sn² es de 8 meses a temperatura ambiente ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) y de hasta 1 año si se conserva en refrigeración (4°C).

7. Dentro del Departamento del Reactor y Materiales radiactivos del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, se generó la documentación necesaria para el protocolo de validación del proceso de producción del núcleo-equipos de Mebrofenin-Sn² empleado para el diagnóstico hepatobiliar. Analizando los resultados correspondientes a la pureza radioquímica y al contenido de estaño de tres lotes del producto elaborados en días diferentes se encontró mediante un análisis de varianza que no existía diferencia significativa entre las medias de estos lotes, por lo que se concluye que el proceso de producción optimizado produce de manera consistente un producto con las características de calidad deseadas.

IV. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. LOPEZ-MAJANO V; Nuclear Medicine Basics. Chairman-nuclear-medicine div, Cook Country Hospital. Chicago, Illinois. 645p. 19
2. ARTEAGA DE MURPHY C. El Tecneio en la Medicina Nuclear. Sociedad Mexicana de Medicina Nuclear. INNSZ. México, 1989.
3. SAHA B. GOPAL; Fundamentals of Nuclear Pharmacy. 3a.ed. Springer-Verlag. New York, Inc. 1992.
4. SAMPSON C; Textbook of Radiopharmacy. Gordon and Breach Science Publishers. London, 1990.
5. MALLOL ESCOBAR J; Radiofarmacia. Interamericana. España, 1989.
6. Farmacopea, Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios. 2a.ed partes I y II, Vol. 8. 125-1 a 125-15 págs. Madrid, España, 1991.
7. ARGÜELLES M.G; CAÑELLAS C.O; ARCIPRETE C; GROS G; MITTA A.E.A. Síntesis, controles químicos y radioquímicos de "Mebrofenin-Tc-99m". Estudios farmacológicos y usos en seres humanos. Acta Bioq Clin Lat XXII: 379-390. 1988.
8. G. FERRO, J. LEZAMA Y C.A. MURPHY. "Algunos aspectos sobre la síntesis, control de calidad y uso del ^{99m}Tc-Bromotrimetilhida". X Congreso de la Asociación Latinoamericana de Sociedades de Biología y Medicina Nuclear, Cd. de México, noviembre 1987.

9. LOBERG M.D, NUNN A.D and PORTER D.W; Developmen of Hepatobiliary Imaging Agents. In Nuclear Medicine annual, editors: Freeman LM and Weissmann HS. Raven Press, New York. p. 1; 1981.
10. MITTA A.E.A; POZZI O; ARCIPRETE C.P AND GROS E.G . An Improved Procedure for the Synthesis of 3-iodo-2,4,6-trimethylphenyl carbamoylmethyl iminodiacetic acid: An efficient complex agent for ^{99m}Tc. J. Lab. Compds Radiopharm. XXV: 1197-1200.1988.
11. MURPHY C.A; J.A.MICHEL; J.J. COO, M. MENDEZ; O. GONZALEZ; LUVIANO; J. MAISTERRENA Y J.VILLALOBOS. The Pharmacokinetic Characteristics of a Hepatobiliary ^{99m}Tc-radiopharmaceutical: comparison of the imported and national kit. La Rev. Invest. Clín. (Méx.) 41: 37-44. 1989.
12. NUNN A.D; LOBERG M.D and CONLEY R.A. A Structure, Distribution Relationship Approach Leading to the Development of Tc-^{99m} Mebrofenin: an Improved Cholescintigraphic Agent. J. Nucl. Med 24: 427-430.1983.
13. SUBRAMANIAN G; SCHNEIDER R.F; McAFEE J.G; FELD T; PALLADINO E; ZAPF-LONGO C. and THOMAS F.D . Synthesis and Evaluación of new Tc-^{99m} labeled Iodine Substituted Acetonilido Iminodiacetates. J. Lab Compds Radiopharm XIX: 1462-1463. 1982.
14. TUBIS M; KRISHNAMURTHY G.T; ENDOW J.S. ^{99m}Tc-Penicilamina, a new Cholescintigraphic Agent. J. Nucl Med 13: 652-654. 1972.
15. GALLI G; MAINI C.L. " ^{99m}Tc-labelled hepatobiliary radiopharmaceuticals. " Technetium in Chemistry and Nuclear Medicine. Vol. II ed. M. Nicolini and G. andolini. Ed. Cortina Internacional. New York, 1990.

16. FERRO FLORES G. "Estudio comparativo de reactivos marcados con Tc^{99m} en la evaluación de la función hepatobiliar". Tesis profesional para obtener el título de Q.F.B. UNAM., 1987.
17. CIPAM. Guía de Prácticas Adecuadas de Manufactura para cuartos limpios. Monografía Técnica No.1. Comisión Interinstitucional de Prácticas adecuadas de Manufactura. México, 1989.
18. REMINGTON; Farmacia. Vol.2. 16a. ed. Médica Panamericana, Argentina, 1984.
19. AFM. Validación de Procesos Farmacéuticos. Editor, Benito D. Couriel. México, 1982.
20. JAMES P. AGALLOCO. Validation of Aseptic Pharmaceutical processes. Edit. Frederick J. Carleton. Marcel Dekker, INC. New York, 1986.
21. ROBERT A. NASH. Pharmaceutical Process Validation (Drugs and Pharmaceutical Sciences Vol. 57). 2a.ed. Edit. Dekker, Inc. New York, 1993.
22. KENNETH CHAPMAN. " A History of Validation in the U.S.A: part I and II". Pharm. Technol. Oct, Nov .1991
23. Parenteral Drug Association, Inc. Regulatory Requirements for Process Validation in the U.S.A. International Validation Workshop. AFM. México, agosto, 1993.

24. SECOFI. Ley Federal sobre Metrología y Normalización. Cuadernos SECOFI, serie Jurídica. México, 1992.
25. Norma Oficial Mexicana. NOM-CC-6-1990. "Sistemas de Calidad, Gestión de la calidad y Elementos de un Sistema de Calidad Directrices Generales". SECOFI, DGN, 1990.
26. OMS; OPS. Garantía de la Calidad en Medicina Nuclear. Publicación Científica No.470. Organización Panamericana de la Salud, 1984.
27. Handbook of Radiopharmaceuticals Quality Control. Latinoamerican Association of Nuclear Biology and Medicine Societies (ALASBIMN). CINEA-NT 8/89. Montevideo, 1986. reedition 1989.
28. WEININGER J; TRUMPER J. Tc-99m Imaging Agents. Production and Quality Control. Israel Atomic Energy Commission. Soreq nuclear research centre; internal report. 88p. Enero, 1984.
29. COLOMBO M.B; Control of Physical Properties in Pharmaceutical Forms. Organización editorial Medico-Farmacéutica. Italia, 1976.
30. Farmacopea Mexicana. 5a. ed. Secretaría de Salubridad. México, 1988.
31. "Conclusiones de las mesas redondas sobre los requisitos mínimos para las pruebas de estabilidad para medicamentos". Secretaría de Salud, Colegio Nacional de químicos Farmacéuticos Biólogos. Rev. Mex. Cien. Farm. Vol. 18, No.3 Sept. 1987.

32. **SBARBATI DE NUDELMAN.** Estabilidad de medicamentos. El Ateneo, México, 1975.
33. **Proyecto de Norma Oficial Mexicana. NOM-073-SSAI-1993.** "Estabilidad de Medicamentos". 61-67 págs. Diario Oficial, Noviembre 4, 1994.
34. **MONTGOMERY C. D.** Diseño y Análisis de Experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica. México, 1991.
35. **BOX P. GEORGE; HUNTERG.W.** Estadística para investigadores. Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos. Reverté. España, 1988.
36. **CARSON L.B; HARRY V; ELLIS.** Toxicology and Biological Monitoring of Metals in Humans. Including Feasibility and Need. 3a.ed. Lewis Publishers, INC. U.S.A , 1991.

V. ANEXOS

1. GLOSARIO

Actividad:	Es el número de desintegraciones por unidad de tiempo, sus unidades son el Becquerel o el Curie. También puede ser expresada en Cuentas por minuto (cpm).
Becquerel:	Unidad de actividad que equivale a una desintegración nuclear por segundo (1 Ci = 3.7×10^{10} Bq).
Cromatografía:	Técnica analítica de separación por medio de la cual, los diferentes componentes de una mezcla son separados mediante un mecanismo dinámico diferencial de migración. Es un sistema que consiste en dos o más fases, una de las cuales se mueve continuamente en una dirección dada y en la cual las sustancias individuales exhiben diferentes movilidades por razón de diferencias de adsorción, partición, solubilidad o carga iónica.
Curie:	Unidad especial de actividad que equivale a 3.7×10^{10} desintegraciones nucleares por segundo.
Distribución Biológica:	Estudios que se realizan en animales de laboratorio, generalmente ratas o ratones, con el objeto de conocer el porcentaje de actividad inyectada de un determinado radiofármaco en los diferentes órganos a tiempos prefijados.
Excipiente :	Sustancia o mezcla de sustancias, tales como acarreadores, bases preservativas, estabilizantes o vehículos que pueden ser adicionados a los fármacos para aumentar su estabilidad o facilitar su preparación.

- Núcleo-equipo:** Nombre empleado para designar un vial o conjunto de viales de reacción estériles que contienen reactivos químicos no radiactivos requeridos para producir un radiofármaco.
- Pirógenos:** Sustancias que al ser inyectadas en un animal homotermo, provocan elevación de su temperatura basal.
- Prueba de toxicidad:** Ensayo que tiene por objeto excluir la posibilidad de que el radiofármaco en estudio, resulte tóxico al paciente debido a una concentración mayor de un componente que la debida o a una eventual contaminación química con alguna sustancia nociva.
- Pureza Radioquímica:** Porcentaje de la actividad del radionúclido en la forma química establecida (complejo), en relación a la actividad total de dicho radionúclido. Se abrevia como P.R. %.
- Radiofármaco :** Son aquellos verdaderos trazadores radiactivos que son administrados con el fin de visualizar la anatomía de un órgano o sistema para diagnóstico.
- Radionúclido :** Son radioisótopos o isótopos inestables como consecuencia de la deficiencia o exceso de neutrones y tiende a recuperar su estabilidad emitiendo alguna de las radiaciones : alfa, beta o gamma.
- R.f :** Notación utilizada en cromatografía que representa la relación que existe entre la distancia alcanzada por el centro de la mancha correspondiente a la sustancia en cuestión, considerada desde su punto de aplicación y la distancia alcanzada por la fase móvil.

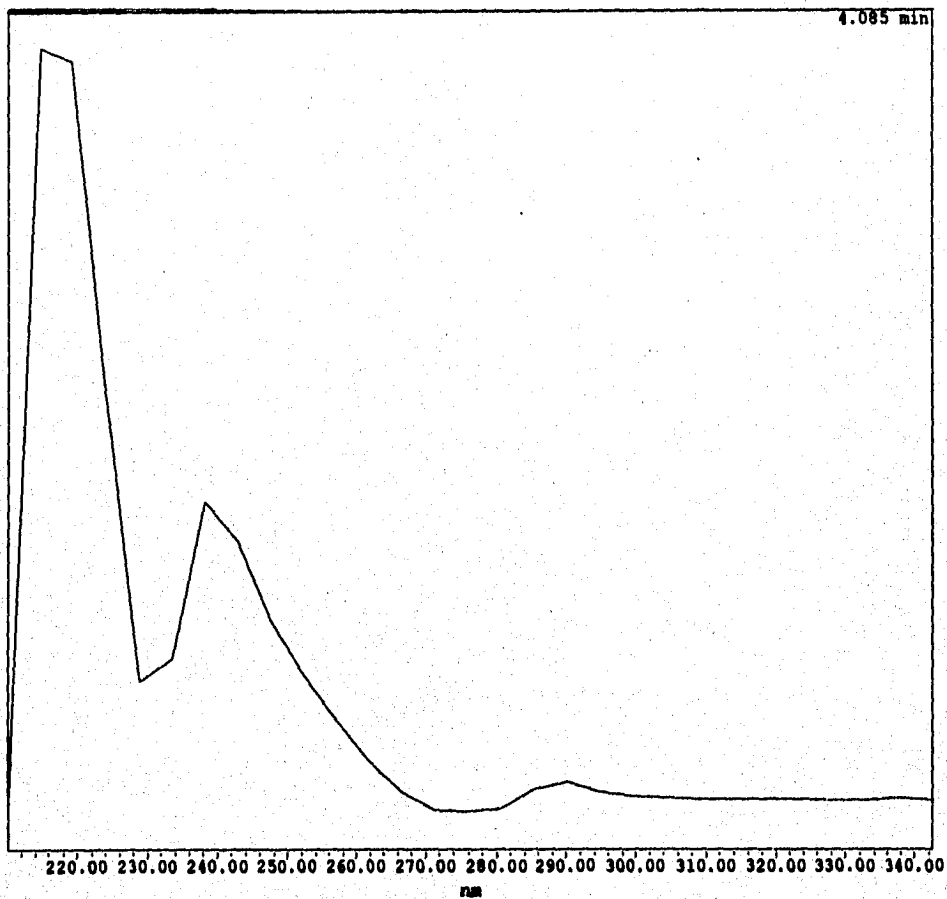
2. CROMATOGRAMAS DEL DESARROLLO DEL SISTEMA ANALÍTICO POR CLAR

Millennium Spectrum Review Report

Millennium v2.00

Date Printed: 1:55:08 pm, August 18, 1995

ESPECTRO DE U.V. DE MEBROFENIN



4.085 minutes, 210 - 350 @ 4.8 nm, from SampleName MEBROFENIN, Vial 6, Inj. 1

Longitud de Máx. Absorbancia 218 nm.

COLUMNNA μ -BONDAPAK 3.9 X 300 mm C-18

METANOL:AC.FOSFÓRICO 0.2% 75:25; FLUJO 1.0 mL/min,

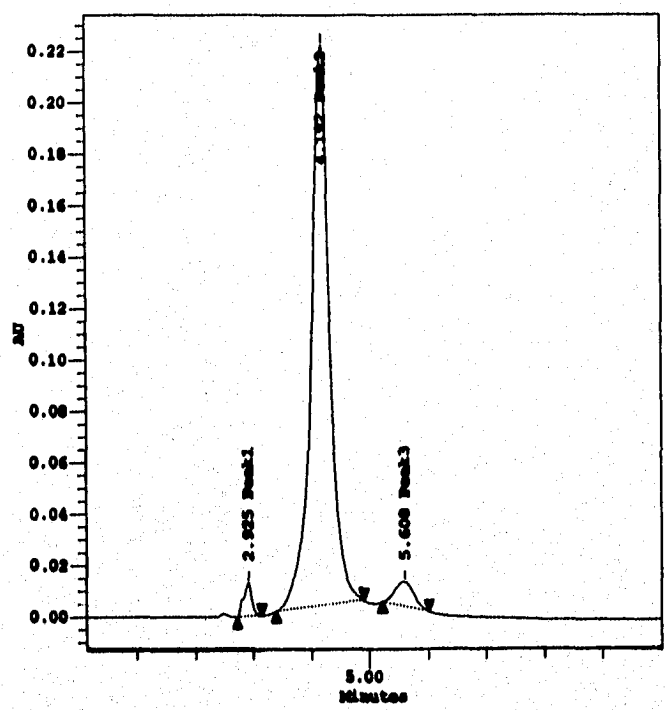


TABLA DE RESULTADOS

#	Nombre	T. Retención (min)	% Area	Area (uV*sec)	5 Sigma	Resolución	Selectividad	K Prima
1	Peak1	2.925	2.36	134011	1945			0.950
2	Peak2	4.192	93.27	4876166	492	2.602	1.889	1.794
3	Peak3	5.608	4.17	217894	1557	2.475	1.526	2.739

COLUMNA μ -BONDAPAK 3.9 X 300 mm C-18

2. METANOL:AC.FOSFÓRICO 0.2% 78:26; FLUJO 1.0 mL/min,

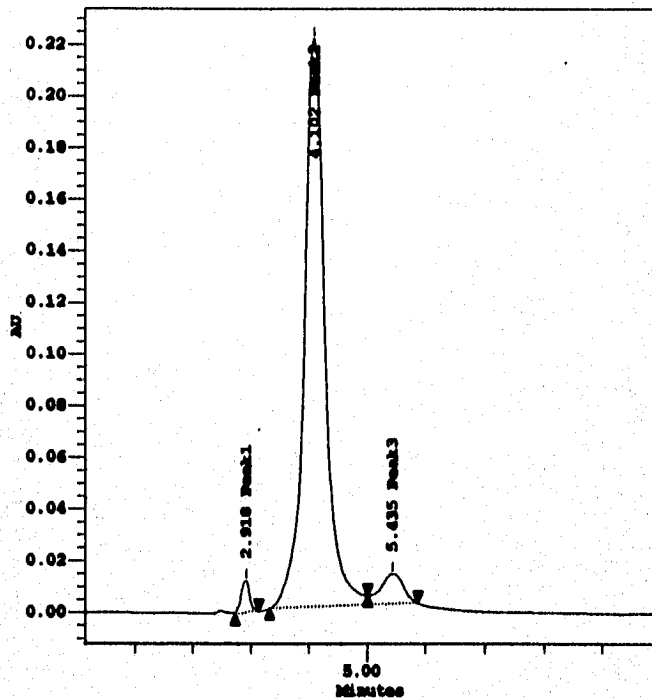


TABLA DE RESULTADOS

#	Nombre	T. Retención (min)	% Area	Area (uV*sec)	5 Sigma	Resolución	Selectividad	K Prima
1	Peak1	2.918	2.26	129567	1871			0.946
2	Peak3	5.435	5.78	331026		2.022	1.512	2.623
3	Peak2	4.102	91.96	5266939	374	2.942	1.834	1.734

COLUMNA μ -BONDAPAK 3.9 X 300 mm C-18

1. METANOL:AC.FOSFÓRICO 0.2% 75:25; FLUJO 1.5 mL/min,

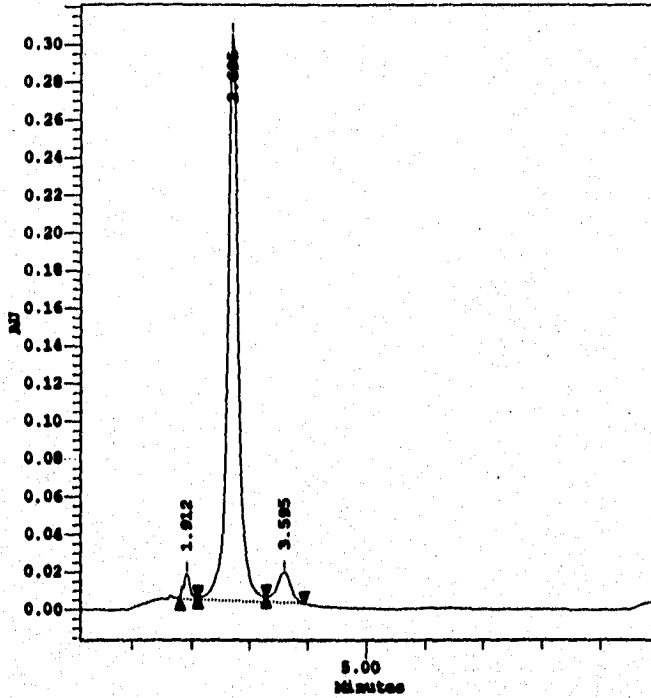


TABLA DE RESULTADOS

#	Nombre	T. Retención (min)	% Area	Area (uV*sec)	5 Sigma	Resolución	Selectividad	K Prima
1		1.912	2.53	111591				0.274
2		2.695	91.09	4010601	529	2.288	2.903	1.797
3	Peak1	2.925						
4		3.595	6.38	280951		2.345	1.753	1.387
5	Peak2	4.192						
6	Peak3	5.608						

COLUMN μ -BONDAPAK 3.9 X 300 mm C-18

2. METANOL:AC.FOSFÓRICO 0.2% 75:25; FLUJO 1.5 mL/min,

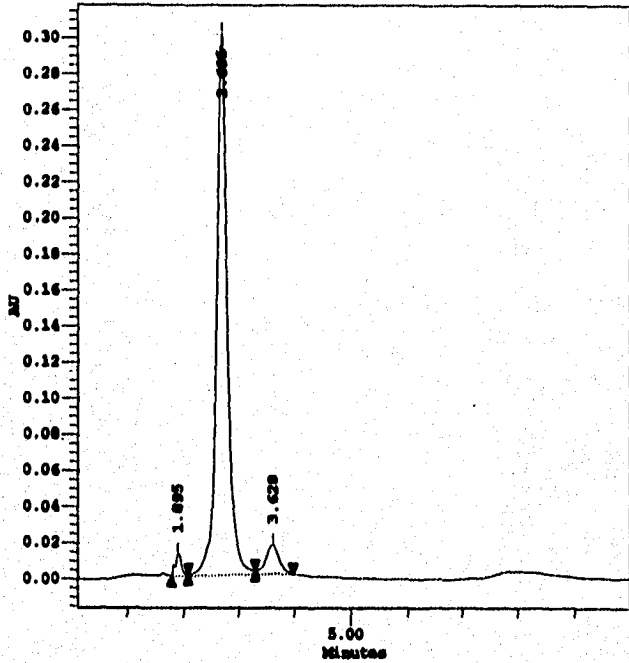


TABLA DE RESULTADOS

#	Nombre	T. Retención (min)	% Area	Area (uV*sec)	5 Sigma	Resolución	Selectividad	K Prima
1		1.895	2.24	98824				0.263
2		2.695	91.35	4021709	538	2.149	3.025	1.797
3	Peak1	2.925						
4		3.628	6.40	281846		2.413	1.781	1.419
5	Peak2	4.192						
6	Peak3	5.608						

COLUMNA μ -BONDAPAK 3.9 X 300 mm C-18

1. METANOL:AC.FOSFÓRICO 0.2% 80:20; FLUJO 1.0 mL/min,

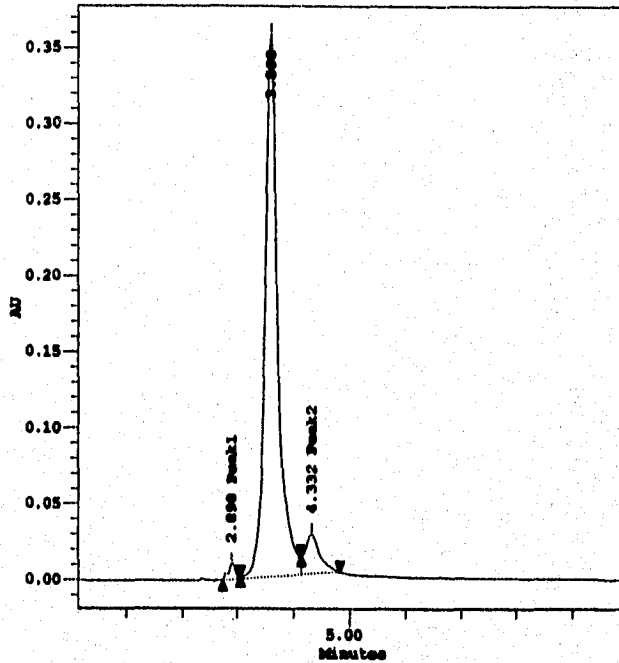


TABLA DE RESULTADOS

Nombre	T. Retención (min)	% Area	Area (uV*sec)	5 Sigma	Resolución	Selectividad	K Prima
Peak1	2.898	1.65	105999				0.932
	3.598	90.62	5804634	576	2.283	1.501	1.399
Peak2	4.332	7.73	495143		1.409	1.349	1.000
Peak3	5.600						

COLUMNA μ -BONDAPAK 3.9 X 300 mm C-18

2. METANOL:AC.FOSFÓRICO 9.2% 60:20; FLUJO 1.0 mL/min,

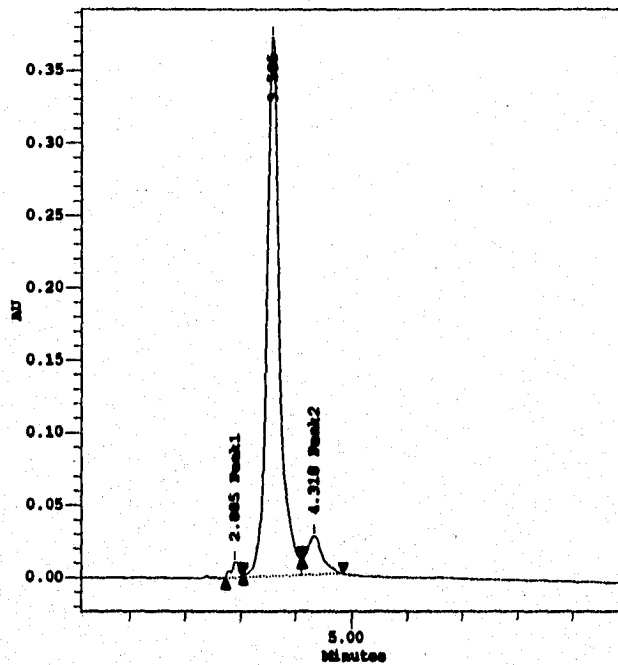


TABLA DE RESULTADOS

#	Nombre	T. Retención (min)	% Area	Area (uV*sec)	5 Sigma	Resolución	Selectividad	K Prima
1	Peak1	2.905	1.75	110022				0.923
2		3.585	90.59	6130790	591	2.278	1.505	1.390
3	Peak2	4.318	7.65	518670		1.437	1.352	1.079
4	Peak3	5.608						

COLUMNA μ -BONDAPAK 3.9 X 300 mm C-18

1. METANOL:AC.FOSFÓRICO 0.2% 80:20; FLUJO 1.5 mL/min,

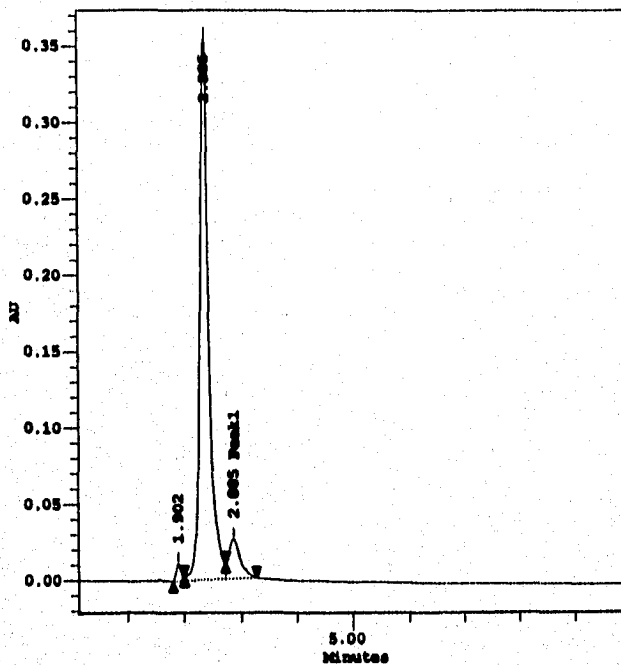


TABLA DE RESULTADOS

Nombre	T. Retención (min)	% Area	Area (uV*sec)	5 Sigma	Resolución	Selectividad	K Prima
	1.902	1.75	78857				0.268
	2.385	90.33	4061546	568	2.045	2.203	1.590
Peak1	2.885	7.92	356046		1.425	1.565	0.923
Peak2	4.192						
Peak3	5.608						

COLUMNA μ -BONDAPAK 3.9 X 300 mm C-18

2. METANOL:AC.FOSFÓRICO 0.2% 80:20; FLUJO 1.5 mL/min,

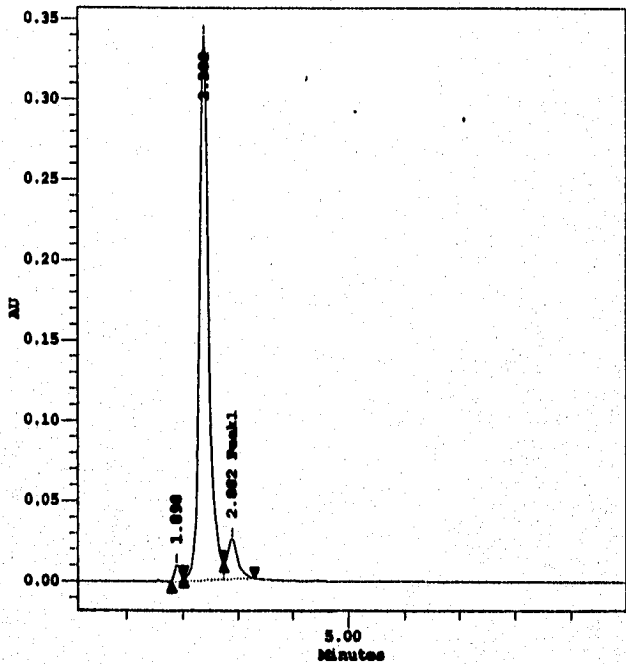
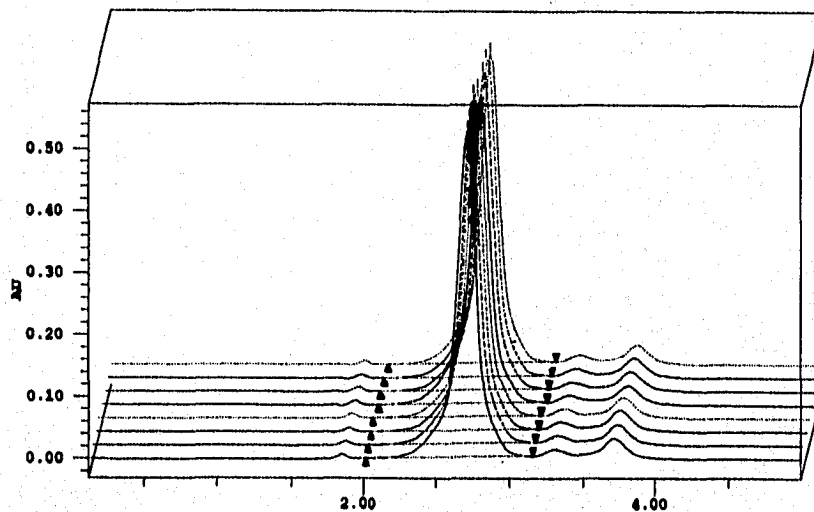


TABLA DE RESULTADOS

#	Nombre	T. Retención (min)	% Area	Area (uv*sec)	5 Sigma	Resolución	Selectividad	K Prima
1		1.898	1.71	73556				0.266
2		2.382	90.17	3876958	556	2.013	2.213	1.588
3	Peak1	2.882	8.12	348946		1.365	1.567	0.921
4	Peak2	4.192						
5	Peak3	5.608						

3. RESULTADOS DETALLADOS DE LA VALIDACIÓN DEL SISTEMA

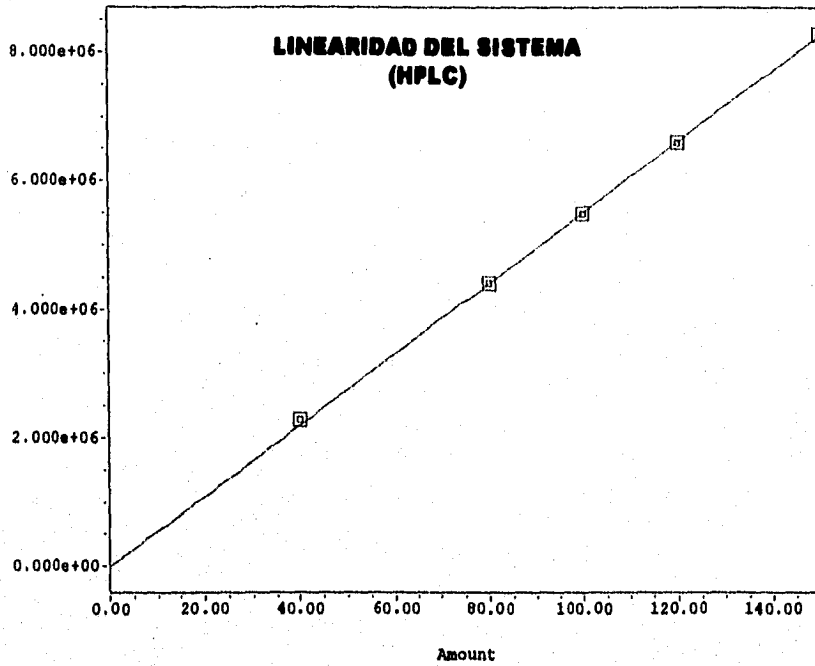


(0.53AU) SampleName: bromotrimat-1 Vial: 6 Injection: 1
 (0.53AU) SampleName: bromotrimat-1 Vial: 5 Injection: 1
 (0.55AU) SampleName: bromotrimat-1 Vial: 8 Injection: 1
 (0.53AU) SampleName: bromotrimat-1 Vial: 7 Injection: 1
 (0.50AU) SampleName: bromotrimat-1 Vial: 1 Injection: 1
 (0.52AU) SampleName: bromotrimat-1 Vial: 4 Injection: 1
 (0.52AU) SampleName: bromotrimat-1 Vial: 3 Injection: 1
 (0.50AU) SampleName: bromotrimat-1 Vial: 2 Injection: 1

Peak Results

#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1	mebrofenin	2.707	5660868	512240		BB
2	mebrofenin	2.707	5692691	512539		BB
3	mebrofenin	2.707	5767205	525490		BB
4	mebrofenin	2.708	5829411	541936		BB
5	mebrofenin	2.712	5619485	499772		BB
6	mebrofenin	2.713	5726434	528503		BB
7	mebrofenin	2.717	5664529	491477		BB
8	mebrofenin	2.717	5738014	528625		BB

VALIDACIÓN DEL SISTEMA (HPLC)
MEBROFENIN



JA Method mebifenin Component mebifenin at 2.800 min

Point Table

no	Level	Amount	Response	Manual	Ignore?
1	1	40.000000	227760.188	No	No
2	1	40.000000	2242743.78	No	No
3	1	40.000000	2221007.78	No	No
4	1	40.000000	2200299.78	No	No
5	2	60.000000	4501083.50	No	No
6	2	60.000000	4404410.00	No	No
7	2	60.000000	4500570.50	No	No
8	2	60.000000	4400740.78	No	No
9	3	100.000000	8401200.50	No	No
10	3	100.000000	8400300.50	No	No
11	3	100.000000	8400400.00	No	No
12	3	100.000000	8204710.00	No	No
13	4	120.000000	6600700.00	No	No
14	4	120.000000	6500040.00	No	No
15	4	120.000000	6501100.00	No	No
16	4	120.000000	6504000.50	No	No
17	5	180.000000	8200000.00	No	No
18	5	180.000000	8302000.50	No	No
19	5	180.000000	8200400.50	No	No
20	5	180.000000	823011.00	No	No

Calibration Table

#	Average Amount	Average Response	Standard Deviation	Repetitions
1	40.000000	2280658.125000	69047.620311	4
2	80.000000	4392048.937500	31587.234940	4
3	100.000000	5473199.125000	50707.986143	4
4	120.000000	6585191.187500	34562.268697	4
5	150.000000	8273772.500000	28833.497189	4

Component mebprofenin at 2.800 min
PDA Method mebprofenin
System 996
Channel 215

$$Y = 5.5e + 04 X$$

$$R = 0.999804$$

$$R^2 = 0.999607$$

$$\text{Standar Error} = 6.588153e + 04$$

No.	CONCENTRACION PROMEDIO($\mu\text{g/mL}$) (X)	AREA PROMEDIO(Y)	% RECOBRO (Y/X)
1	40	2280658.1250	56016.453
2	80	4392048.9375	54900.611
3	100	5473199.1250	54731.991
4	120	6585191.1875	54876.593
5	150	8273772.5000	55158.483

$$\text{D.E.} = 616.176$$

$$\text{MEDIA} = 56136.826$$

$$\text{C.V.} = \text{D.E.} / \text{MEDIA} \times 100 = 0.934 \%$$

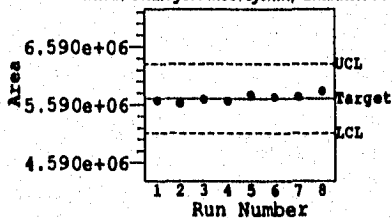
Dado que el C.V. es menor a 1.5 %, r mayor a 0.99 y r^2 mayor a 0.98, se cumple el criterio para considerar al sistema lineal.

DETERMINACION DE LA PRECISION DEL SISTEMA (HPLC)

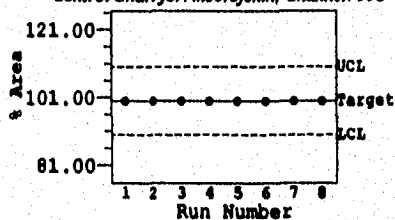
TABLA DE RESULTADOS

NOMBRE	NOMBRE MUESTRA	% Area	Area (uV ² sec)	TIEMPO. RET. (min)	Vial
mefrofenin	bromotrine	100.00	5664529	2.717	1
mefrofenin	bromotrine	100.00	5660868	2.707	4
mefrofenin	bromotrine	100.00	5692691	2.707	3
mefrofenin	bromotrine	100.00	5619485	2.712	2
mefrofenin	bromotrine	100.00	5829411	2.708	8
mefrofenin	bromotrine	100.00	5738814	2.717	7
mefrofenin	bromotrine	100.00	5726434	2.713	6
mefrofenin	bromotrine	100.00	5767285	2.707	5

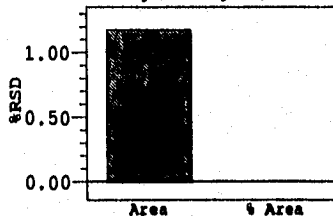
Control Chart for: mebrofenin, Channel: 996



Control Chart for: mebrofenin, Channel: 996



RSD Bar Plot for: mebrofenin, Channel: 996



Component Summary for Area

#	SampleName	Vial	Inj	Channel	mebrofenin (uV*sec)
1	bromotrimet-1	1	1	996	5664529
2	bromotrimet-1	4	1	996	5660060
3	bromotrimet-1	3	1	996	5692691
4	bromotrimet-1	2	1	996	5619405
5	bromotrimet-1	8	1	996	5029411
6	bromotrimet-1	7	1	996	5730014
7	bromotrimet-1	6	1	996	5726434
8	bromotrimet-1	5	1	996	5767285

-- Component Summary for Area Summary --

mebrofenin Mean: 5712440 +/- 67153.0 uV*sec
mebrofenin %RSD: 1.176

DETERMINACION DE LA PRECISION DEL SISTEMA (HPLC)

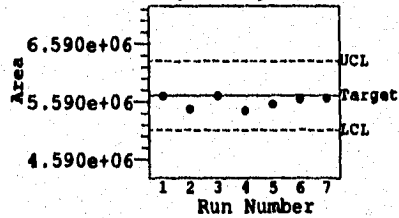
Se determinó por octuplicado de una misma muestra al 100 %. El sistema es preciso cuando % RSD (%CV) es igual o menor a 1.5 %. En este caso el % RSD = 1.176, por tanto se considera preciso.

**EXACTITUD Y REPETIBILIDAD
 (HPLC)**

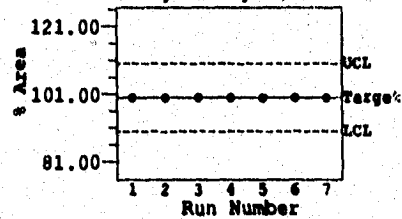
TABLA DE RESULTADOS

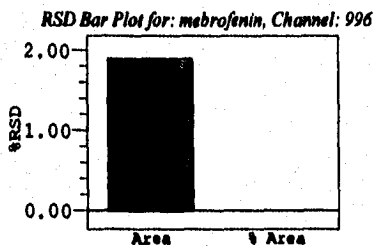
#	NOMBRE	NOMBRE MUESTRA	% Area	Area (uV*sec)	TIEMP. RET. (min)	Vial
1	mefrofenin	mefrofenin	100.00	5687883	2.808	1
2	mefrofenin	mefrofenin	100.00	5464640	2.843	1
3	mefrofenin	mefrofenin	100.00	5699600	2.852	2
4	mefrofenin	mefrofenin	100.00	5439992	2.847	2
5	mefrofenin	mefrofenin	100.00	5559965	2.857	3
6	mefrofenin	mefrofenin	100.00	5634516	2.852	3
7	mefrofenin	mefrofenin	100.00	5655223	2.848	1

Control Chart for: mebrofenin, Channel: 996



Control Chart for: mebrofenin, Channel: 996





Component Summary for Area

#	SampleName	Vial	Inj	Channel	mebrofenin (uV*sec)
1	mebrofenin	1	1	996	5687883
2	mebrofenin	1	2	996	5464640
3	mebrofenin	2	1	996	5699600
4	mebrofenin	2	1	996	5439992
5	mebrofenin	3	1	996	5555965
6	mebrofenin	3	2	996	5634516
7	mebrofenin	1	1	996	5655223

-- Component Summary for Area Summary --

mebrofenin Mean: 5591117 +/- 105827.0 uV*sec
mebrofenin %RSD: 1.893

DADO QUE EL C.V ES MENOR AL 2 % EN 7 PLACEBOS CARGADOS DE MANERA INDEPENDIENTE, SE CUMPLE CON EL CRITERIO DE EXACTITUD Y REPETIBILIDAD.

**4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE OPTIMIZACIÓN, ESTABILIDAD
ACELERADA Y VALIDACIÓN DEL PROCESO A TRAVÉS DEL
PAQUETE ESTADÍSTICO "SAS" (ver. 6.08).**

1. RESULTADOS DE LA OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE MEBROFENIN-Sn.

"The SAS System"

General Linear Models Procedure

Number of observations in data set = 8

Dependent Variable: Y1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	19.9590500	4.9897625	167.00	0.0007
Error	3	0.0896375	0.0298792		
Corrected Total	7	20.0486875			

R-Square	C.V.	Root MSE	Y1 Mean
0.995529	0.178568	0.17286	96.8012

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
X1	1	12.2760125	12.2760125	410.86	0.0003
X3	1	2.8920125	2.8920125	96.79	0.0022
X1*X2	1	3.6585125	3.6585125	122.44	0.0016
X3*X2	1	1.1325125	1.1325125	37.90	0.0086

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
X1	1	12.2760125	12.2760125	410.86	0.0003
X3	1	2.8920125	2.8920125	96.79	0.0022
X1*X2	1	3.6585125	3.6585125	122.44	0.0016
X3*X2	1	1.1325125	1.1325125	37.90	0.0086

Parameter	Estimate	T for H0: Parameter=0	Pr > T	Std Error of Estimate
INTERCEPT	96.80125000	1583.95	0.0001	0.06111379
X1	1.23875000	20.27	0.0003	0.06111379
X3	0.60125000	9.84	0.0022	0.06111379
X1*X2	-0.67625000	-11.07	0.0016	0.06111379
X3*X2	0.37625000	6.16	0.0086	0.06111379

Dependent Variable: Y2

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	3.25952500	1.62976250	10.73	0.0155
Error	5	0.75936250	0.15187250		
Corrected Total	7	4.01888750			

R-Square	C.V.	Root MSE	Y2 Mean

0.811052 19.49760 0.38971 1.99875

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
X3	1	2.21551250	2.21551250	14.59	0.0124
X3*X1	1	1.04401250	1.04401250	6.87	0.0470

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
X3	1	2.21551250	2.21551250	14.59	0.0124
X3*X1	1	1.04401250	1.04401250	6.87	0.0470

Parameter	Estimate	T for H0: Parameter=0	Pr > T	Std Error of Estimate
INTERCEPT	1.998750000	14.51	0.0001	0.13778266
X3	-0.526250000	-3.82	0.0124	0.13778266
X3*X1	0.361250000	2.62	0.0470	0.13778266

Dependent Variable: Y3

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	5.42851250	5.42851250	10.48	0.0177
Error	6	3.10737500	0.51789583		
Corrected Total	7	8.53588750			

R-Square C.V. Root MSE Y3 Mean
0.635963 16.27707 0.71965 4.42125

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
X3	1	5.42851250	5.42851250	10.48	0.0177

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
X3	1	5.42851250	5.42851250	10.48	0.0177

Parameter	Estimate	T for H0: Parameter=0	Pr > T	Std Error of Estimate
INTERCEPT	4.421250000	17.38	0.0001	0.25443463
X3	-0.823750000	-3.24	0.0177	0.25443463

Dependent Variable: Y4

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	6	168.937175	28.156196	1.00	0.6447
Error	1	28.237613	28.237613		
Corrected Total	7	197.174788			

R-Square C.V. Root MSE Y4 Mean
0.856789 37.28077 5.31391 14.2538

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
X1	1	21.9453125	21.9453125	0.78	0.5400
X2	1	26.0281125	26.0281125	0.92	0.5130
X3	1	74.6031125	74.6031125	2.64	0.3511
X1*X2	1	14.7153125	14.7153125	0.52	0.6019
X1*X3	1	1.5753125	1.5753125	0.06	0.8523
X2*X3	1	30.0700125	30.0700125	1.06	0.4900
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
X1	1	21.9453125	21.9453125	0.78	0.5400
X2	1	26.0281125	26.0281125	0.92	0.5130
X3	1	74.6031125	74.6031125	2.64	0.3511
X1*X2	1	14.7153125	14.7153125	0.52	0.6019
X1*X3	1	1.5753125	1.5753125	0.06	0.8523
X2*X3	1	30.0700125	30.0700125	1.06	0.4900

Parameter	Estimate	T for H0: Parameter=0	Pr > T	Std Error of Estimate
INTERCEPT	14.25375000	7.59	0.0834	1.87875000
X1	1.65625000	0.88	0.5400	1.87875000
X2	1.80375000	0.96	0.5130	1.87875000
X3	3.05375000	1.63	0.3511	1.87875000
X1*X2	1.35625000	0.72	0.6019	1.87875000
X1*X3	-0.44375000	-0.24	0.8523	1.87875000
X2*X3	1.93875000	1.03	0.4900	1.87875000

Dependent Variable: Y5

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	6	90.1139500	15.0189917	0.65	0.7377
Error	1	22.9842000	22.9842000		
Corrected Total	7	113.0981500			

R-Square	C.V.	Root MSE	Y5 Mean
0.796777	7.125455	4.79418	67.2825

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
X1	1	19.7820500	19.7820500	0.86	0.5239
X2	1	0.1058000	0.1058000	0.00	0.9569
X3	1	2.2260500	2.2260500	0.10	0.8079
X1*X2	1	40.8608000	40.8608000	1.78	0.4097
X1*X3	1	0.0544500	0.0544500	0.00	0.9690
X2*X3	1	27.0848000	27.0848000	1.18	0.4739
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
X1	1	19.7820500	19.7820500	0.86	0.5239

X2	1	0.1058000	0.1058000	0.00	0.9569
X3	1	2.2260500	2.2260500	0.10	0.8079
X1*X2	1	40.8608000	40.8608000	1.78	0.4097
X1*X3	1	0.0544500	0.0544500	0.00	0.9690
X2*X3	1	27.0848000	27.0848000	1.18	0.4739

Parameter	Estimate	T for H0: Parameter=0	Pr > T	Std Error of Estimate
INTERCEPT	67.28250000	39.69	0.0160	1.69500000
X1	1.57250000	0.93	0.5239	1.69500000
X2	0.11500000	0.07	0.9569	1.69500000
X3	-0.52750000	-0.31	0.8079	1.69500000
X1*X2	-2.26000000	-1.33	0.4097	1.69500000
X1*X3	0.08250000	0.05	0.9690	1.69500000
X2*X3	-1.84000000	-1.09	0.4739	1.69500000

2. RESULTADOS DEL MODELO SUPUESTO PARA ESTABILIDAD ACCELERADA

"THE SAS SYSTEM"

General Linear Models Procedure

OBS	TEMP	SEMANA	PUREZA
1	25	1	96.88
2	25	1	96.58
3	25	2	96.67
4	25	2	96.73
5	25	3	96.86
6	25	3	96.97
7	45	1	96.77
8	45	1	96.75
9	45	2	96.71
10	45	2	96.45
11	45	3	96.63
12	45	3	96.42
13	60	1	96.07
14	60	1	96.61
15	60	2	95.15
16	60	2	95.88
17	60	3	95.83
18	60	3	95.50
19	84	1	92.22

20	84	0	93.61
21	84	2	90.57
22	84	2	91.19
23	84	3	89.34
24	84	3	89.61

Number of observations in data set = 24

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: PUREZA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	142.078242	35.519561	213.20	0.0001
Error	19	3.165491	0.166605		
Corrected Total	23	145.243733			

R-Square	C.V.	Root MSE	PUREZA Mean
0.978206	0.429279	0.40817	95.0833

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
SEMANA	1	2.479853	2.479853	14.88	0.0011
SEMANA*TEMP	1	104.660798	104.660798	628.20	0.0001
TEMP*TEMP	1	17.852124	17.852124	107.15	0.0001
SEMANA*TEMP*TEMP	1	17.085467	17.085467	102.55	0.0001

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
SEMANA	1	6.0532548	6.0532548	36.33	0.0001
SEMANA*TEMP	1	11.9965375	11.9965375	72.01	0.0001
TEMP*TEMP	1	7.6964594	7.6964594	46.20	0.0001
SEMANA*TEMP*TEMP	1	17.0854671	17.0854671	102.55	0.0001

Parameter	Estimate	T for H0: Parameter=0	Pr > T	Std Error of Estimate
INTERCEPT	97.61204368	266.05	0.0001	0.36688910
SEMANA	-1.85261878	-6.03	0.0001	0.30735149
SEMANA*TEMP	0.09005760	8.49	0.0001	0.01061295
TEMP*TEMP	-0.00052992	-6.80	0.0001	0.00007797
SEMANA*TEMP*TEMP	-0.00101570	-10.13	0.0001	0.00010030

3. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS TRES LOTES FINALES DE MEBROFENIN-Sn

The SAS System

a. Evaluación de la variable P.R.%

OBS	LOTE	PUREZA
1	1	98.16
2	1	97.98
3	1	98.50
4	2	97.72
5	2	98.88
6	2	98.20
7	3	98.10
8	3	98.15
9	3	97.90

Analysis Variable : PUREZA

----- LOTE=1 -----				
N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
3	98.2133333	0.2640707	97.9800000	98.5000000

----- LOTE=2 -----				
N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
3	98.2666667	0.5828665	97.7200000	98.8800000

----- LOTE=3 -----				
N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
3	98.0500000	0.1322876	97.9000000	98.1500000

Analysis of Variance Procedure
Class Level Information
Class Levels Values

LOTE 3 1 2 3

Number of observations in data set = 9

The SAS System

Analysis of Variance Procedure

Dependent Variable: PUREZA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.07646667	0.03823333	0.27	0.7731
Error	6	0.85393333	0.14232222		
Corrected Total	8	0.93040000			

R-Square	C.V.	Root MSE	PUREZA Mean
0.082187	0.384263	0.37726	98.1767

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
LOTE	2	0.07646667	0.03823333	0.27	0.7731

Analysis of Variance Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: PUREZA

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ.

Alpha= 0.05 df= 6 MSE= 0.142322
 Critical Value of Studentized Range= 4.339
 Minimum Significant Difference= 0.9451
 Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	LOTE
A	98.2667	3	2
A	98.2133	3	1
A	98.0500	3	3

b. Evaluación de la variable contenido de estaño
"The SAS System"

OBS	LOTE	ESTANO
1	1	0.18
2	1	0.18
3	1	0.16
4	2	0.18
5	2	0.18
6	2	0.20
7	3	0.16
8	3	0.18
9	3	0.18

Analysis Variable : ESTANO

----- LOTE=1 -----				
N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
3	0.1733333	0.0115470	0.1600000	0.1800000

----- LOTE=2 -----				
N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
3	0.1866667	0.0115470	0.1800000	0.2000000

----- LOTE=3 -----				
N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
3	0.1733333	0.0115470	0.1600000	0.1800000

The SAS System
 Analysis Variable : ESTANO
 Analysis of Variance Procedure
 Class Level Information
 Class Levels Values
 LOTE 3 1 2 3

Number of observations in data set = 9

Dependent Variable: ESTANO

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.00035556	0.00017778	1.33	0.3318
Error	6	0.00080000	0.00013333		
Corrected Total	8	0.00115556			

R-Square	C.V.	Root MSE	ESTANO Mean
0.307692	6.495191	0.01155	0.17778

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
LOTE	2	0.00035556	0.00017778	1.33	0.3318

Analysis of Variance Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: ESTANO

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ.

Alpha= 0.05 df= 6 MSE= 0.000133
 Critical Value of Studentized Range= 4.339
 Minimum Significant Difference= 0.0289

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	LOTE
A	0.186667	3	2
A	0.173333	3	1
A	0.173333	3	3

**5. DOCUMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN Y PARA LA
EVALUACIÓN DE CONTROLES DE CALIDAD
DE MEBROFENIN-Sn⁺²**

**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES
MATERIALES RADIACTIVOS**

ORDEN DE PRODUCCION

PRODUCTO: _____ No. LOTE: _____
 FECHA DE PRODUCCION: _____ FECHA DE CADUCIDAD: _____
 LOTE: _____ FRASCOS

REACTIVO UTILIZADO	Nº. DE CONTROL	PESO O VOLUMEN TOMADO	VOLUMEN DE DILUCION
MEBROFENIN			
AGUA INYECTABLE			
ACIDO CLORHIDRICO			
HIDROXIDO DE SODIO			
PLURONIC F-68			

pH DE LA SOLUCION DE MEBROFENIN _____
 VELOCIDAD DE ADICION DE LA SOLUCION DE CLORURO ESTANOSO _____
 VELOCIDAD DE MEZCLADO _____
 pH DESPUES DE LA ADICION DE CLORURO ESTANOSO _____
 pH DE LA SOLUCION FINAL _____
 VOLUMEN FINAL _____

SE INICIA EL CONGELAMIENTO A LAS _____ DEL _____

SE INICIA EL CICLO DE LIOFILIZACION A LAS _____ DEL _____

TOTAL DE FRASCOS AL FINAL DEL PROCESO _____

MUESTRAS TOMADAS POR LA U. DE C.C. (%) _____

OBSERVACIONES _____

EJECUTO EL PROCESO: _____ SUPERVISO: _____

APROBO: _____

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES

AREA: DEPARTAMENTO DEL REACTOR Y MATERIALES RADIACTIVOS	No. RMIR-VAL-01	Rev. 0
PROTOCOLO DE VALIDACION DEL PROCESO DE PRODUCCION DE NUCLEO-EQUIPOS DE MEBROFENIN- ⁹⁰	FECHA DE EMISION: 24-MARZO-1995	HOJA: 15 DE: 24

D.3 PREPARACION DE LA MEZCLA.

PROCEDIMIENTO	CONDICIONES DE OPERACION		
D.3.1 Agregar en microbureta 10ml de la solución de cloruro estanoso a la solución de Mebrofenin. Verificar la velocidad del flujo durante la adición, manteniendo, durante ésta, un burbujeo nitrógeno en la bureta por 2 minutos.	V1 = V2 =		
D.3.2. Verificar la temperatura de la mezcla.	T1 = T2 =		
D.3.2 Continuar agitando verificando la velocidad de agitación del mezclado y medir el pH el cual debe ser aproximadamente de uno.	V1 = V2 =		
D.3.3 Ajustar cuidadosamente el pH a 5.5-6.0 utilizando NaOH 1N (Nunca sobrepasar un pH de 7 y luego querer ajustarlo con HCl).La solución debe ser translúcida.	pH =		
D.3.4 Agregar 500mg de pluronic en polvo y agitar hasta disolución completa (la solución debe ser translúcida completamente).			
D.3.5 Filtrar por membrana millipore de 0.22μ utilizando el equipo de filtración y nitrogenando.			
D.3.6 Pasar a una probeta de 500ml la solución y completar el volumen a 500ml con agua inyectable, libre de pirógenos y saturada con nitrógeno.			
D.3.7 Filtrar nuevamente por membrana millipore de 0.22μ utilizando el equipo de filtración y nitrogenando.			

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES

AREA: DEPARTAMENTO DEL REACTOR Y MATERIALES RADIATIVOS	No. RMR-VAL-01	Rev. 0
PROTOCOLO DE VALIDACION DEL PROCESO DE PRODUCCION DE NUCLEO-EQUIPOS DE MEBROFENIN- ^{99m} Tc	FECHA DE EMISION: 24 - MARZO - 1993	HOJA: 16 DE: 24

D.4. DOSIFICACION

D.4.1 Dosificar colocando 2ml de la solución final en cada uno de los frascos tipo penicilina de 10 ml.

D.4.2 Tomar muestra de frascos y evaluar pureza radioquímica, contenido de estaño y volumen por vial.

D.5 LIOFILIZACION.

D.5.1 Proceder a liofilizar de acuerdo al ciclo: -40°C a -10°C, por 3 horas y -10 a 15°C, 17 horas.



ININ

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES
DEPARTAMENTO DE MATERIALES RADIATIVOS
UNIDAD DE CONTROL DE CALIDAD

SOLICITUD DE CONTROL DE CALIDAD

PRODUCTO: _____ LOTE No. _____ No. DE FRASCOS o mls. POR LOTE _____
ISOTOPO: _____ FECHA DE PRODUCCION _____ FECHA DE CADUCIDAD _____
FECHA DE LIOFILIZACION _____

SE SOLICITA CONTROL DE:
MATERIA PRIMA CONTROL PROCESO CONTROL DE PRODUCTO TERMINADO INSPECCION

TIPO DE PRUEBA SOLICITADA

PRUEBAS FISICAS:	PRUEBAS QUIMICAS:	PRUEBAS BIOLÓGICAS:
APARIENCIA <input type="radio"/>	PUREZA QUIMICA <input type="radio"/>	ESTERILIDAD <input type="radio"/>
CONCENTRACION RADIATIVA <input type="radio"/>	PUREZA RADIOQUIMICA <input type="radio"/>	PIROGENOS <input type="radio"/>
PUREZA RADIONUCLIDICA <input type="radio"/>	pH <input type="radio"/>	DISTRIBUCION BIOLÓGICA <input type="radio"/>
TAMAÑO DE PARTICULA <input type="radio"/>		TOXICIDAD <input type="radio"/>
NUMERO DE PARTICULAS <input type="radio"/>		

MUESTRA ENVIADA DE _____ (frascos, mls.) CON UNA ACTIVIDAD DE _____ mCi.

CALIBRADA A LAS _____ hrs. DEL _____ DE _____ DE 19 _____

OBSERVACIONES: _____

RECIBIDA POR:

PREPARADA POR:

DEPARTAMENTO DE MATERIALES RADIACTIVOS
 UNIDAD DE CONTROL DE CALIDAD
 HOJA DE DISTRIBUCION BIOLÓGICA

FECHA: _____

KIT _____ Sol.Liof. LOTE _____ Fecha de Producción: _____ Fecha de Caducidad: _____
 Reconstituido con _____ ml de $^{99m}\text{TcO}_4$ de 1/2/3 elución diaria de un generador de _____ mCi de Fecha de Producción: _____
 Actividad del eluato _____ mCi/ml, diluido con salina a _____ uCi/ml. Incubación a temperatura ambiente: _____
 mins/hrs. Inyectado a ratón/rata. Peso: _____ g. Cantidad inyectada: _____ ml/animal= _____ Dosis humanas.
 Toxicidad y/o Signos de reacciones adversas: _____ Distribución efectuada a los _____ mins/hrs de la inyección intravenosa.

Fondo: _____ Ctas/ _____ Actividad en cola: _____

ORGANO	PESO MUESTRA	%	FACTOR EXTRAPOL	CUENTAS MUESTRA	MUESTRA SIN FONDO	CUENTAS EXTRAPOLACION	% DOSIS RADIACION POR ORGANO	% DOSIS RAD/g. ORGANO
SANGRE		8						
RIÑONES								
ESTOMAGO								
INTESTINO								
HIGADO								
BAZO								
VESICULA								
PULMONES								
CORAZON								
TIROIDES								
HUESO		6						
MUSCULO		45						
VEJIGA Y ORINA								
CUERPO								
CUENTAS TOTALES								

RELACIONES: HUESO/SANGRE: _____
 VESICULA/SANGRE: _____

VESICULA/INTESTINO: _____

HUESO/MUSCULO: _____
 VESICULA/HIGADO: _____

EXAMEN PRACTICADO POR: _____



INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES
DEPARTAMENTO DE MATERIALES RADIACTIVOS
UNIDAD DE CONTROL DE CALIDAD

ININ

PRODUCTO: _____ LOTE No. _____

FECHA DE PRODUCCION: _____ FECHA DE CADUCIDAD: _____

TECNICA: _____ Centro Nuclear a _____ de _____ de _____

SOPORTE: _____ SOLVENTE (SOLUCION ELECTROLITICA) _____	
VOLTAJE: _____ INTENSIDAD CORRIENTE: _____ DURACION (FRENTE) _____	
fondo : _____	fondo _____
1 _____	1 _____
2 _____	2 _____
3 _____	3 _____
4 _____	4 _____
5 _____	5 _____
6 _____	6 _____
7 _____	7 _____
8 _____	8 _____
9 _____	9 _____
10 _____	10 _____
11 _____	11 _____
12 _____	12 _____
13 _____	13 _____
14 _____	14 _____
15 _____	15 _____
16 _____	16 _____
17 _____	17 _____
18 _____	18 _____
fondo : _____	fondo : _____
Actividad total _____	Actividad total _____
R _f (V.M.) _____ COMPUESTO % _____	R _f (V.M.) _____ COMPUESTO % _____
R _f (V.M.) _____ IMPUREZA % _____	R _f (V.M.) _____ IMPUREZA % _____
R _f (V.M.) _____ IMPUREZA % _____	R _f (V.M.) _____ IMPUREZA % _____

PROMEDIO: % COMPUESTO : _____

% IMPUREZA : _____

% IMPUREZA : _____

EL PRODUCTO () CUMPLE ESPECIFICACIONES.

PRACTICO EL EXAMEN: _____



INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES
DEPARTAMENTO DE MATERIALES RADIATIVOS
UNIDAD DE CONTROL DE CALIDAD

PRODUCTO: _____ LOTE No. _____
FECHA DE PRODUCCION: _____ FECHA DE CADUCIDAD: _____
Centro Nuclear a _____ de _____ de 199 .

REGISTRO DIARIO DE PRUEBAS DE ESTERILIDAD			DETERMINACION DE PIROGENOS "IN VITRO"											
No. DE MUESTRAS ENSAYADAS: _____			LIMULUS Lote No. _____											
No. DE TUBOS SEMBRADOS: _____			SENSIBILIDAD: _____											
SEBRADO EL ____ DE _____ DE 199			<table border="1"><thead><tr><th>DILUCION</th><th>OBSERVACION</th></tr></thead><tbody><tr><td>MUESTRA</td><td></td></tr><tr><td>CONTROL NEGATIVO</td><td></td></tr><tr><td>CONTROL (+) AGUA</td><td></td></tr><tr><td>CONTROL (+) MUESTRA</td><td></td></tr></tbody></table>		DILUCION	OBSERVACION	MUESTRA		CONTROL NEGATIVO		CONTROL (+) AGUA		CONTROL (+) MUESTRA	
DILUCION	OBSERVACION													
MUESTRA														
CONTROL NEGATIVO														
CONTROL (+) AGUA														
CONTROL (+) MUESTRA														
A LAS _____ HRS.														
FECHA	MEDIO FLUIDO TIOGLICOLATO	MEDIO CASEINA- SOYA	RESULTADO: _____ Conc. de Endotoxina en muestra = Sensibi- lidad _____ X Mx. dilución _____ EL PRODUCTO _____ SATISFACE LA PRUEBA DE PIROGENOS.											
RESULTADO: _____														
OBSERVACIONES: _____														

EXAMENES PRACTICADOS POR: _____



ININ

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES

GERENCIA DE SERVICIOS TECNICOS NUCLEARES

DEPARTAMENTO DE ANALISIS QUIMICOS

SOLICITUD DE SERVICIOS

1.- NOMBRE DEL SOLICITANTE, NUMERO DE SU EXTENSION Y FIRMA. _____ _____	2.- NOMBRE Y NUMERO DEL PROYECTO O TAREA. _____ _____	3.- DESCRIPCION DE LA MUESTRA O PRODUCTO DE QUE SE TRATA. _____ _____	
4.- PRECAUCIONES DE CONSERVACION, MANEJO Y GRADO DE PUREZA DE LA MUESTRA <input type="checkbox"/> Tóxico <input type="checkbox"/> Corrosivo <input type="checkbox"/> Radioactivo <input type="checkbox"/> Microorgánicas <input type="checkbox"/> Volátil <input type="checkbox"/> Inestable <input type="checkbox"/> Explosivo <input type="checkbox"/> Ultra-puro <input type="checkbox"/> Industrial <input type="checkbox"/> Tóxico Otros, Especificos: _____			
5.- FORMA FISICA EN QUE SE ENCUENTRA LA MUESTRA. _____ _____	6.- NUMERO DE IDENTIFICACION DE LA(S) MUESTRA(S). _____ _____	7.- MAGNITUD DEL PESO O VOLUMEN DE LA(S) MUESTRA(S). _____ _____	
8.- TIPO DE ESTIMACION REQUERIDA. <input type="checkbox"/> Cualitativo <input type="checkbox"/> Cuantitativo <input type="checkbox"/> Semicuantitativo	9.- OTRO TIPO DE DETERMINACION SOLICITADA. <input type="checkbox"/> Humedad <input type="checkbox"/> Conductividad <input type="checkbox"/> pH <input type="checkbox"/> Densidad <input type="checkbox"/> Sólidos Totales Otros, Especificos: _____		
10.- ELEMENTOS QUIMICOS QUE SE SOLICITAN. _____ _____	11.- CANTIDAD APROXIMADA DEL ELEMENTO EN EL PRODUCTO POR ANALIZAR. _____ _____	12.- OBSERVACIONES: _____ _____	
Va. Sa. GERENCIA QUE SOLICITA EL SERVICIO. _____	Va. Sa. Recepción de Muestras _____	Va. Sa. Depto. de Análisis Químicos _____	
PARA USO EXCLUSIVO DEL DEPARTAMENTO DE ANALISIS QUIMICOS.			
_____ No. De Control	_____ Fecha De Recepción De La Solicitud	_____ Fecha De Recepción De La Muestra	_____ Fecha De Reporte De Los Resultados

IF-AD-02



ININ

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES

GERENCIA DE SERVICIOS TECNICOS NUCLEARES

DEPARTAMENTO DE ANALISIS QUIMICOS

SOLICITUD DE SERVICIOS

1.- NOMBRE DEL SOLICITANTE, NUMERO DE SU EXTENSION Y FIRMA. _____	2.- NOMBRE Y NUMERO DEL PROYECTO O TAREA. _____	3.- DESCRIPCION DE LA MUESTRA O PRODUCTO DE QUE SE TRATA. _____	
4.- PRECAUCIONES DE CONSERVACION, MANEJO Y GRADO DE PUREZA DE LA MUESTRA. <input type="checkbox"/> Tóxico <input type="checkbox"/> Corrosivo <input type="checkbox"/> Radioactivo <input type="checkbox"/> Microscópico <input type="checkbox"/> Volátil <input type="checkbox"/> Inestable <input type="checkbox"/> Explosivo <input type="checkbox"/> Urogénico <input type="checkbox"/> Industrial <input type="checkbox"/> Molesto Otros, Especificar: _____			
5.- FORMA FISICA EN QUE SE ENCUENTRA LA MUESTRA. _____	6.- NUMERO DE IDENTIFICACION DE LA(S) MUESTRA(S). _____	7.- MAGNITUD DEL PESO O VOLUMEN DE LA(S) MUESTRA(S). _____	
8.- TIPO DE ESTIMACION REQUERIDA. <input type="checkbox"/> Cualitativa <input type="checkbox"/> Cuantitativa <input type="checkbox"/> Semicuantitativa	9.- OTRO TIPO DE DETERMINACION SOLICITADA. <input type="checkbox"/> Humedad <input type="checkbox"/> Conductividad <input type="checkbox"/> pH <input type="checkbox"/> Densidad <input type="checkbox"/> Sólidos Totales Otros, Especificar: _____	10.- ELEMENTOS QUIMICOS QUE SE SOLICITAN. _____	
11.- CANTIDAD APROXIMADA DEL ELEMENTO EN EL PRODUCTO POR ANALIZAR. _____	12.- OBSERVACIONES: _____	13.- ELEMENTOS QUIMICOS QUE SE SOLICITAN. _____	
Va. Bn. GERENCIA QUE SOLICITA EL SERVICIO. _____	Va. Bn. Recepción de Muestras _____	Va. Bn. Depto. de Análisis Químicos _____	
PARA USO EXCLUSIVO DEL DEPARTAMENTO DE ANALISIS QUIMICOS.			
_____ No. De Control	_____ Fecha De Recepción De La Solicitud	_____ Fecha De Recepción De La Muestra	_____ Fecha De Reporte De Los Resultados

IF-AQ-02

6. CERTIFICADOS DE CALIDAD DE LOS TRES LOTES FINALES DE MEBROFENIN-Sn⁺2

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES
MATERIALES RADIACTIVOS

DOCUMENTO: *Certificado de calidad de producto liberado (nicho-equipos)* No. 01P95M

PRODUCTO: *Mebrofenin-Dn* **LOTE** No. 01P95 **FECHA DE CADUCIDAD:** 15 de Abril de 1996

PREPARO: <i>23B. Trinidad Salazar Muro</i>	FECHA: 15-08-95	SUPERVISO: <i>23B. Brullermina Jorro</i>	FECHA: 15-08-95
APROBADO POR CONTROL DE CALIDAD: <i>23B. Laura Rojas Narra</i>	FECHA: 18-08-95	APROB. RESPONSABLE ANTE S.S.A.: <i>23B. Carlos Cruz de León</i>	FECHA: 20-08-95

PRUEBA	ESPECIFICACION	RESULTADO
1. ESTERILIDAD	DEBE SER ESTERIL	<i>Estéril</i>
2. PIROGENOS POR LAL	NO MAS DE 21 EU/mL (negativo)	<i>negativo</i>
3. CONTENIDO DE MEBROFENIN	10 ± 2 mg/vial	<i>8.7 mg/vial</i>
4. CONTENIDO DE Sn ⁺² *	0.2 ± 0.1 mg/vial	<i>0.18 mg/vial</i>
5. CONTENIDO DE AGUA*	menor de 5 %	<i>5 %</i>
6. pH	6.5 ± 1.0	<i>7.0</i>
7. APARIENCIA (RECONSTITUIDO)	SOLUCION ACUOSA, TRANSPARENTE E INCOLORA	<i>Solución acuosa, transparente e incolora</i>
8. PRUEBA DE IDENTIFICACION	TIEMPO DE RETENCION 2.8 ± 0.2 MINUTOS (HPLC)	<i>t_r = 2.72 minutos</i>
9. PUREZA RADIOQUIMICA	NO MENOS DEL 90 %	<i>98.21 %</i>
10. TOXICIDAD	INOCUO	<i>Inocuo</i>
11. DISTRIBUCION BIOLOGICA (En no menos de dos ratones)	DESPUES DE 90 min.: 8 ± 5 % EN HIGADO 70 ± 10 % EN INTESTINO DE 1 A 25 % EN VESICULA LA RELACION gr. VESICULA/ gr. HIGADO DEBE SER MAYOR A 20 LA RELACION gr. VESICULA/ gr. SANGRE, DEBEN SER MAYORES DE 50.	<i>Después de 90 minutos: 3.015% En Hígado 66.12 % en Intestino 21.74 % en vesícula gr. vesícula/ gr. hígado = 196 gr. vesícula / gr. sangre = 523</i>
12. INSPECCION DEL EMPAQUE FINAL	CONFORME A LA DESCRIPCION DEL EMPAQUE (P.MR-PRI-22)	<i>Conforme a las especificaciones del empaque para producto.</i>

* PRUEBAS REALIZADAS COMO SERVICIO EXTERNO AL DEPARTAMENTO DEL REACTOR Y MATERIALES RADIACTIVOS POR EL DEPTO DE ANALISIS QUIMICOS DEL ININ. (PRUEBAS NO RUTINARIAS)

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES
MATERIALES RADIACTIVOS

DOCUMENTO: *Certificado de calidad de producto liberado (nidos-equipos) No. 02P95M*

PRODUCTO: *Mebrofenin-Dn* **LOTE No. 02P95** **FECHA DE CADUCIDAD:** *22 de Abril de 1996*

PREPARO: <i>278. Unidad de Preparación Mono</i>	FECHA: 22-08-95	SUPERVISO: <i>278. D. Ballesteros Ferraz</i>	FECHA: 22-08-95
APROBADO POR CONTROL DE CALIDAD: <i>278. Laura Rojas Novena</i>	FECHA: 24-02-95	APROB. RESPONSABLE ANTE S.S.A.: <i>278. Carlos Cruz de León</i>	FECHA: 25-02-95

PRUEBA	ESPECIFICACION	RESULTADO
1. ESTERILIDAD	DEBE SER ESTERIL	<i>Esteril</i>
2. PIROGENOS POR LAL	NO MAS DE 21 EU/mL (negativo)	<i>Negativo</i>
3. CONTENIDO DE MEBROFENIN	10 ± 2 mg/vial	<i>9.2 mg/vial</i>
4. CONTENIDO DE Sn^{+2} *	0.2 ± 0.1 mg/vial	<i>0.18mg/vial</i>
5. CONTENIDO DE AGUA*	menor de 5 %	<i>4%</i>
6. pH	6.5 ± 1.0	<i>7.0</i>
7. APARIENCIA (RECONSTITUIDO)	SOLUCION ACUOSA, TRANSPARENTE E INCOLORA	<i>Solución acuosa, transparente e incolora</i>
8. PRUEBA DE IDENTIFICACION	TIEMPO DE RETENCION 2.8 ± 0.2 MINUTOS (HPLC)	<i>$T_R = 2.8$ minutos</i>
9. PUREZA RADIOQUIMICA	NO MENOS DEL 90 %	<i>98.26</i>
10. TOXICIDAD	INOCUO	<i>Inocuo</i>
11. DISTRIBUCION BIOLÓGICA (En no menos de dos ratones)	DESPUES DE 90 min.: 8 ± 5 % EN HIGADO 70 ± 10 % EN INTESTINO DE I A 25 % EN VESICULA LA RELACION gr. VESICULA/ gr. HIGADO DEBE SER MAYOR A 20 LA RELACION gr. VESICULA/ gr. SANGRE, DEBEN SER MAYORES DE 50.	<i>Después de 90 minutos: 5.51 % En Hígado 60.40 % en Intestino 12.47 % en vesícula gr. vesícula/ gr. hígado = 40.13 gr. vesícula / gr. sangre = 106.77</i>
12. INSPECCION DEL EMPAQUE FINAL	CONFORME A LA DESCRIPCION DEL EMPAQUE (P.MR-PRI-22)	<i>Conforme a las especificaciones del empaque para producto.</i>

* PRUEBAS REALIZADAS COMO SERVICIO EXTERNO AL DEPARTAMENTO DEL REACTOR Y MATERIALES RADIACTIVOS POR EL DEPTO DE ANALISIS QUIMICOS DEL ININ. (PRUEBAS NO RUTINARIAS)

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES
MATERIALES RADIATIVOS

DOCUMENTO: *Certificado de calidad de producto liberado (muestras-equipos)* No. 03P95M

PRODUCTO: *Mebrofenin-In* LOTE No. 03P95 FECHA DE CADUCIDAD: 29 de Abril de 1996

PREPARO: <i>278. Ferialda Salazar Musa</i>	FECHA: 29-08-95	SUPERVISO: <i>278. Guillermo Jorro</i>	FECHA: 29-08-95
APROBADO POR CONTROL DE CALIDAD: <i>278. Laura Reyes Ximena</i>	FECHA: 30-03-95	APROB. RESPONSABLE ANTE S.S.A.: <i>278. Carlos Cruz de León</i>	FECHA: 31-08-95

PRUEBA	ESPECIFICACION	RESULTADO
1. ESTERILIDAD	DEBE SER ESTERIL	<i>Esteril</i>
2. PIROGENOS POR LAL	NO MAS DE 21 EU/mL (negativo)	<i>negativo</i>
3. CONTENIDO DE MEBROFENIN	10 ± 2 mg/vial	<i>8.8 mg/vial</i>
4. CONTENIDO DE Sn^{+2} *	0.2 ± 0.1 mg/vial	<i>0.17 mg/vial</i>
5. CONTENIDO DE AGUA*	menor de 5 %	<i>3 %</i>
6. pH	6.5 ± 1.0	<i>7.0</i>
7. APARIENCIA (RECONSTITUIDO)	SOLUCION ACUOSA, TRANSPARENT E INCOLORA	<i>Solucion acuosa, transparente e incolora</i>
8. PRUEBA DE IDENTIFICACION	TIEMPO DE RETENCION 2.8 ± 0.2 MINUTOS (HPLC)	<i>$T_r = 2.83$ minutos</i>
9. PUREZA RADIOQUIMICA	NO MENOS DEL 90 %	<i>98.05 %</i>
10. TOXICIDAD	INOCUO	<i>Inocuo</i>
11. DISTRIBUCION BIOLOGICA (En no menos de dos ratones)	DESPUES DE 90 min.: 8 ± 5 % EN HIGADO 70 ± 10 % EN INTESTINO DE 1 A 25 % EN VESICULA LA RELACION gr. VESICULA/ gr. HIGADO DEBE SER MAYOR A 20 LA RELACION gr. VESICULA/ gr. SANGRE, DEBEN SER MAYORES DE 50.	<i>Despues de 90 minutos: 3.1 % En Hgado 67.26 % en Intestino 11.83 % en vesicula gr. vesicula/ gr. hgado = 70.88 gr. vesicula / gr. sangre = 214.95</i>
12. INSPECCION DEL EMPAQUE FINAL	CONFORME A LA DESCRIPCION DEL EMPAQUE (P.MR-PRI-22)	<i>Conforme a las especificaciones del empaque para producto.</i>

*PRUEBAS REALIZADAS COMO SERVICIO EXTERNO AL DEPARTAMENTO DEL REACTOR Y MATERIALES RADIATIVOS POR EL DEPTO. DE ANALISIS QUIMICOS DEL ININ. (PRUEBAS NO RUTINARIAS)