

50524
97

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"



**CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA O POLARIMETRÍA, PARA LA IDENTIFICACIÓN DE
LOS PRODUCTOS DE LA SÍNTESIS DE AMIKACINA.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA
BEATRIZ VARGAS HERNÁNDEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:
QFB FRANCISCO TOMÁS DELGADO CRUZ**

**ASESOR:
Q. RODOLFO SALAZAR CEBALLOS**

MÉXICO D.F. 2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

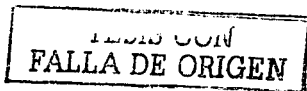
AGRADECIMIENTOS

A Dios.
Por darme la oportunidad de vivir
y estar conmigo en los momentos mas
dificiles de mi vida.

A la Universidad
Por darme la oportunidad de
integrarme a ella.

A los miembros del Jurado por contribuir al enriquecimiento
de este trabajo

A PROQUIFIN S.A. DE C.V.



B

DEDICATORIAS

A mis padres que gracias a su ejemplo y apoyo he comprendido que puedo hacer mucho más cosas de las que creo poder hacer. Gracias por creer en mí.

A mis hermanos por compartir los momentos más importantes de mi vida.

A ti Gabriel, por compartir mis fracasos, triunfos, tristezas y alegrías
Por tu apoyo incondicional y paciencia. Gracias por ser así.

A Gabriel y July por su amor, apoyo y paciencia.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

C

CONTENIDO

INTRODUCCION.....	2
CAPITULO I	
1. MARCO TEORICO	
1.1.1 Amikacina	
1.1.1.1 Origen	5
1.1.1.2 Nombres reportados y estructura química.....	5
1.1.1.3 Propiedades físicas.....	6
1.1.1.4 Propiedades farmacológicas.....	7
1.1.1.5 Síntesis	8
1.1.2 Métodos Analíticos	
1.1.2.1. Cromatografía	
1.1.2.1.1. Antecedentes.....	11
1.1.2.1.2. Cromatografía en capa delgada.....	12
1.1.2.2. Polarimetría	
1.1.2.2.1. Definición	13
1.1.2.2.2. Ley de Pasteur.....	13
1.1.2.2.3 Actividad Óptica	14
1.1.3.1 Factores físicos que afectan la actividad óptica.....	14
1.1.3.2 Factores que modifican la intensidad de la desviación.....	15
1.2. 1 Planteamiento del problema.....	16
1.2.2 Objetivos	17
CAPITULO II	
2.1. Diseño experimental	
2.1.1. Materiales	18
2.1.2 Equipos	18
2.1.3 Instrumentos	18
2.1.4 Reactivos.....	19
2.1.5 Estándares	19
2.1.6 Soluciones.....	19
2.2.Método (Diagrama de flujo).....	20
CAPITULO III "RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS".....	24
CAPITULO IV "CONCLUSIONES".....	44
"REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS".....	47
ANEXO.....	48

1

1985 JUN

FALLA DE ORIGEN

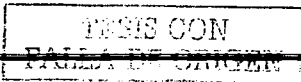
INTRODUCCIÓN

Debido al libre comercio y al proceso de globalización, en nuestro país y en particular la Industria Químico Farmacéutica debe fijar metas, objetivos claros y la manera de cómo lograrlos permitiendo la evolución en la calidad de sus productos y sus costos para poder mantenerse en el mercado. Por lo que, es de gran importancia para la empresa PROQUIFIN S.A. de C.V., producir fármacos con excelente calidad, bajo costo y así competir con empresas nacionales y transnacionales, siendo estas razones suficientes para crear, innovar, desarrollar tecnología, así como métodos de cuantificación costeables que permitan un autofinanciamiento.

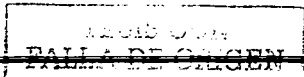
PROQUIFIN S.A. De C.V. es una empresa que produce biofármacos y farmoquímicos dentro de los cuales se encuentra Amikacina Sulfato siendo este un antibiótico aminoglucósido que por su resistencia a enzimas inactivadoras de aminoglucósidos es utilizado ampliamente en el tratamiento de infecciones sistémicas.

La empresa desde 1987 distribuye el antibiótico en el país y lo exporta a Latinoamérica y Europa con gran demanda, a finales del año 1999 disminuye la exportación a Europa debido a que en el mercado se encuentra Amikacina Sulfato de origen chino a un precio mas bajo, por lo que se requiere disminuir el costo de producción.

La síntesis del antibiótico es tomando como punto de partida Kanamicina, la cual se trata químicamente hasta obtener Amikacina Sulfato. En la síntesis no sólo se obtiene el antibiótico sino también se producen los isómeros de éste, dentro de los cuales, los que se obtienen en mayor concentración son: BBK6, BBK29 y BBK11. Para la purificación del antibiótico, en su primer paso se realiza cromatografía de intercambio iónico con un sistema de gradientes.



El análisis de costos de la síntesis de Sulfato de Amikacina, dio a conocer que el proceso de purificación en su primer etapa puede ser mas rentable. En este proceso, la solución final de la síntesis llamada solución hidrogenada es bombeada a columnas cromatográficas de 9 metros de largo por 50 cm de ancho, las fracciones obtenidas de la elusión son almacenadas en recipientes de 45 litros, posteriormente, es tomada una muestra de cada recipiente a la que se realiza cromatografía en capa fina para identificar sus componentes. Finalmente, los productos son reunidos en tanques distintos por producto para seguir su tratamiento. El proceso antes descrito requiere mucho tiempo de análisis y tiempo de manipulación, además se expone al producto a contaminaciones cruzadas y pérdidas. Por lo que, para poder bajar el costo de producción en la primera etapa de purificación, se propone aprovechar la propiedad física de la molécula de Amikacina e isómeros de desviar la luz polarizada como consecuencia de su quiralidad. Identificar los productos de la síntesis por polarimetría, después de ser separados por cromatografía en columna de intercambio iónico, permitirá automatizar el proceso, disminuir por lo tanto, tiempo de producción, riesgos de contaminación cruzada y con ello cumplir con un requisito más en el proceso de certificación.



CAPÍTULO I:

TEJIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Amikacina

1.1.1. Origen

Con el uso inapropiado de los antibióticos, se provoca el surgimiento de cepas de bacterias resistentes a los aminoglucósidos. El conocimiento del mecanismo enzimático para la inactivación de estos antibióticos y la comprensión de la estructura relacionada con la actividad microbiana formó la base para la síntesis de mejores aminoglucósidos.

En 1972 el Dr. Hiroshi Kawaguchi investigador de Bristol-Bayu describió el descubrimiento BB-K8 (Amikacina) y demostró su mejorada eficacia.¹

La Amikacina, es un aminoglucósido semisintético producido por la alteración química estratégica de Kanamicina A. En 1976, la FDA aprobó su comercialización, desde entonces se usa en el tratamiento de infecciones serias causadas por bacterias Gram-negativas.^{2,3}

1.1.2. Nombres reportados y estructura química.

Los nombres reportados en la USP son los siguientes:

D-Estreptamina, O-3-amino-3-desoxi-D-glucopiranosil (1→6)-O-[6-amino-6-desoxi-D-glucopiranosil (1→4)]-N1-(4-amino-2-hidroxi-1-oxobutil)-2-desoxi, (S). (S)-O-3-Amino-3-desoxi-α-D-glucopiranosil-(1→4)-O-[6-amino-6-desoxi-α-D-glucopiranosil-(1→6)]-N³-(4-amino-L-2-hidroxi-butiril)-2-desoxi-L-estreptamina.²

Existe Amikacina base y su fórmula condensada es $C_{22}H_{43}N_5O_{13}$, con un peso molecular de 585.61, también se conocen las sales de Amikacina y son:

Sulfato de Amikacina en una relación de 1:2 con la sal sulfato y Amikacina, su fórmula condensada es $C_{22}H_{43}N_5O_{13} \cdot 2H_2SO_4$ y peso molecular de 781.75.

Son reportadas Sulfato de Amikacina en una relación 1:1 con su sal y Carbonato de Amikacina en una relación 1:1

La estructura química de la Amikacina base se muestra en la figura 1.

AMIKACINA

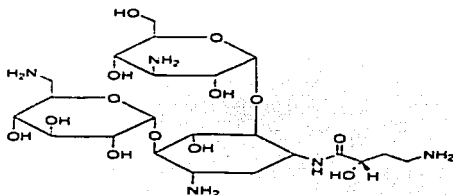


Figura No. 1. Estructura química de la Amikacina.

1.1.3. Propiedades físicas

La Amikacina es un polvo blanco cristalino con un intervalo de fusión reportado por H. Kawaguchi de 203-204 °C, posteriormente Kaplan y colaboradores reportaron un intervalo de fusión de la Amikacina comercial de 201-204 °C .

La rotación específica de Amikacina se tiene registrada de $[\alpha]_D^{20} +99^\circ$, y para la sustancia seca de $[\alpha]_D^{20} +97^\circ$ a $[\alpha]_D^{20} +105^\circ$.

La solubilidad en agua a 25°C es de 185 mg/mL. Las soluciones preparadas con la sal de sulfato, contienen hasta 250 mg/mL de Amikacina.

El contenido de humedad no debe ser más de 8.5%, determinada por titulación con Karl Fischer.^{4,5}

1.1.4. Propiedades farmacológicas

La Amikacina, se ha vuelto el compuesto preferido en el tratamiento inicial de infecciones graves por bacilos Gramnegativos, en hospitales en que la resistencia a gentamicina se ha vuelto un problema importante.

La Amikacina actúa directamente sobre los ribosomas (subunidades 30S), disminuye la síntesis protéica y altera la calidad de reproducción de código genético de bacterias susceptibles. No es inactivada por tres de las cuatro enzimas que inactivan a gentamicina y por dos de las tres que inactivan a tobramicina. Por esto su espectro bacteriano es muy amplio en el sector de los bacilos gramnegativos, como son *Proteus*, *Providencia*, *E. Coli*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Salmonella*. También, es activa contra estafilococos, estreptococos y neumococos.

La Amikacina es semejante a la kanamicina en relación con sus dosis y propiedades farmacocinéticas.

La dosis recomendada de Amikacina es de 15 mg/kg/día en una sola dosis o en dos o tres fracciones iguales. En sujetos con insuficiencia renal, es importante modificar la dosis individual o el intervalo que media entre una y otra.

Siendo un aminoglucósido, no se absorbe por vía oral, por lo que tiene que ser administrada por vía parenteral para obtener los efectos deseados. Casi no se une a proteínas del plasma. No es biotransformada, por lo que es excretada sin cambio en la orina, y es filtrada por el glomérulo; se ha demostrado algún grado de reabsorción tubular renal. En adultos con función renal normal se excreta casi en su totalidad en 24 horas y su vida media biológica es aproximadamente de 2 horas.

Los efectos tóxicos más graves son la nefro y la ototoxicidad y están relacionados con la dosis y la duración del tratamiento, con mayor frecuencia. Las reacciones nefrotóxicas pueden ser desde lesión renal moderada hasta insuficiencia renal; el daño al VIII par craneal se manifiesta por pérdida auditiva bilateral, vértigo y nistagmo. La recuperación puede ser parcial o completa. También, se han observado reacciones de hipersensibilidad.^{6,7,8}

1.1.5. La Síntesis de Amikacina base⁹ realizada en PROQUIFIN es resumida en la Figura No.2.

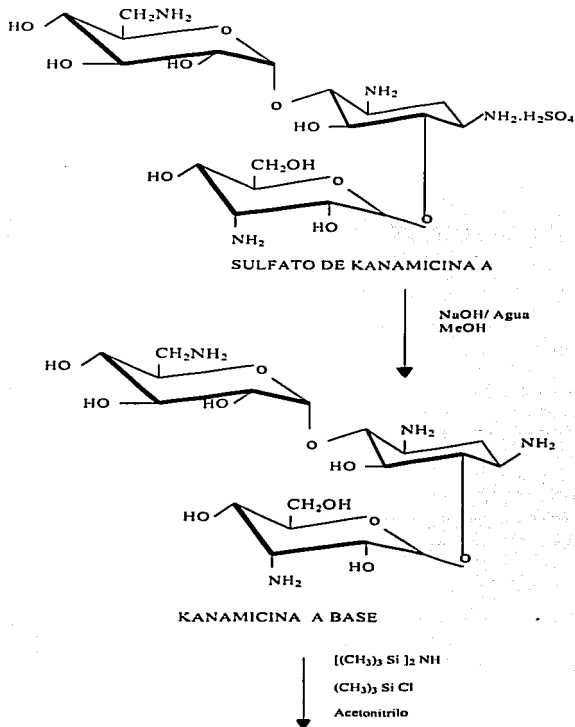


Figura No. 2. Síntesis de Amikacina base.

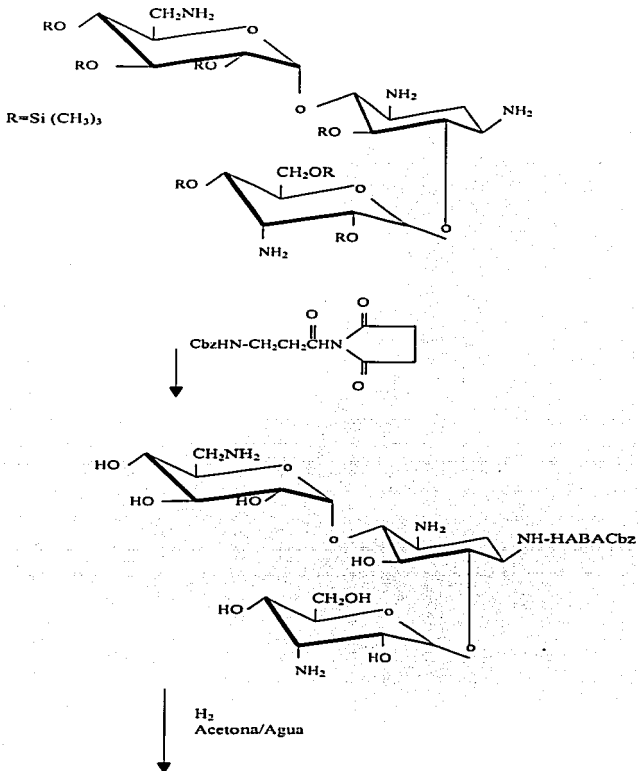
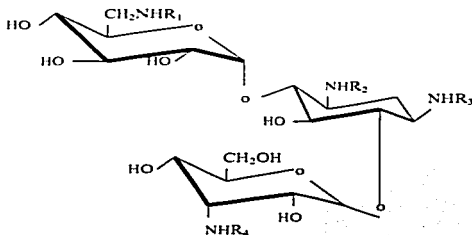


Figura No. 2. Síntesis de Amikacina base.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN



ISOMEROS POTENCIALES

BBK - 8 (AMIKACINA)	$R_3 = \text{CO}-\underset{\text{HO}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$; $R_1 = R_2 = R_4 = \text{H}$
BBK - 6	$R_1 = \text{CO}-\underset{\text{HO}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$; $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$
BBK - 29	$R_2 = \text{CO}-\underset{\text{HO}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$; $R_1 = R_3 = R_4 = \text{H}$
BBK - 11	$R_4 = \text{CO}-\underset{\text{HO}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$; $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$

Figura No. 2. Síntesis de Amikacina base.

1.2. MÉTODOS ANALÍTICOS

1.2.1. CROMATOGRAFÍA

1.2.1.1. Antecedentes

Cromatografía es un término general aplicado a una amplia gama de técnicas de separación que esencialmente se basan en la distribución de los componentes a separar entre dos fases; una de ellas es una fase móvil, la cuál puede ser un gas o un líquido, y la otra es una fase estacionaria, la cuál a su vez puede ser un líquido o un sólido.

El proceso cromatográfico tiene lugar como resultado de repetidas adsorciones o repartos durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo del lecho estacionario, alcanzándose la separación gracias a las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos componentes de la muestra.¹⁰

La cromatografía como técnica de separación fue descubierta por el botánico y químico ruso Mijaíl S. Tswett, quién eligió el nombre de las palabras griegas que significa "escritura en color", al observar la formación de anillos coloreados al verter un extracto de hojas verdes en una columna llena de carbonato de calcio en polvo.

La cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil, gas o líquido y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido. De acuerdo con la naturaleza de las fases involucradas y a los mecanismos de separación, la cromatografía se divide como lo indica el diagrama No. 1.^{10,11}

1.2.1.2. Cromatografía en capa delgada:

Esta técnica es una forma de cromatografía de adsorción que consiste en un adsorbente sólido (fase estacionaria) distribuido uniformemente sobre una superficie plana. Este adsorbente presenta cierta capilaridad dada por las partículas finamente divididas y permite que la fase móvil pase entre las partículas del adsorbente.

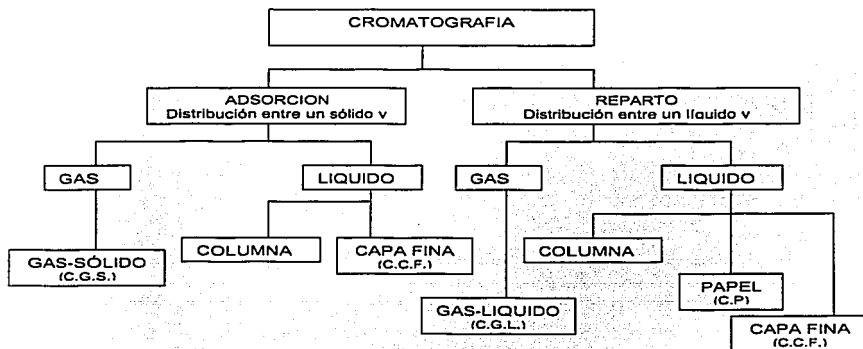


Diagrama No. 1 Clasificación de la cromatografía ^{11,12}

La separación ocurre cuando uno de los componentes de la mezcla es retenido en mayor grado por la fase estacionaria que los otros componentes.

El movimiento de cada sustancia en un determinado sistema es característico y es un dato valioso en la identificación de ella, esta característica se conoce como R_f (Relación al frente), representa la distancia recorrida por el compuesto, en relación a la distancia recorrida por la fase móvil.¹³

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por un compuesto desde el origen}}{\text{Distancia recorrida por el frente de la fase móvil}}$

1.2.2. POLARIMETRÍA

1.2.2.1. Definición

La polarimetría es un método de medición física, que utiliza la propiedad de las sustancias de hacer girar el plano de la luz polarizada.

1.2.2.2. Ley de Pasteur

En 1848, en la Ecole Normale de París, el químico Louis Pasteur hizo un conjunto de observaciones que pocos años más tarde le condujeron a formular una proposición que es la base de la estereoquímica. Pasteur en aquella época, para adquirir alguna experiencia en cristalografía, estaba repitiendo el trabajo anterior de otro químico sobre sales del ácido tartárico, cuando observó algo que nadie había notado antes: el tartrato de sodio y amonio, ópticamente inactivo, existía como una mezcla de dos clases diferentes de cristales. Empleando una lupa y pinzas, separó la mezcla cuidadosa y laboriosamente en dos montones minúsculos. Si bien la mezcla original era ópticamente inactiva, cada grupo de cristales, una vez disueltos en agua, era ahora ópticamente activo. Es más, las rotaciones específicas de ambas soluciones eran iguales, pero de signo contrario.

Puesto que la diferencia en rotación óptica fue observada en solución, Pasteur concluyó que no se trataba de una característica de los cristales, sino de las moléculas, por lo tanto, propuso que:

- Una molécula que desvía la luz polarizada admite un isómero que difiere en su poder rotatorio: es igual en valor absoluto pero de signo contrario.

LEÍDSE CON
FALLA DE ORIGEN

-
- Una mezcla equimolecular de los dos isómeros ópticos da un producto inactivo ópticamente, el cual se denomina racémico. En general, el producto que se obtiene por síntesis química es racémico,

diferente de los productos de origen natural constituido de uno de los isómeros ópticos.

- Las formas racémicas pueden descomponerse en sus isómeros ópticos.^{14,15}

1.2.2.3. Definición de actividad óptica

La actividad óptica se define como:

- El ángulo de rotación óptica de un líquido es el ángulo de rotación α expresado en grados del plano de polarización a la longitud de onda de la línea espectral D del sodio ($\lambda=589.3\text{nm}$) determinado a 20°C bajo un espesor de capa de 1 decímetro.
- La rotación específica $[\alpha]_{20}^D$ de un líquido se define por el ángulo de rotación α expresado en grados del plano de polarización a la longitud de onda de la línea espectral D del sodio determinado a 20°C en el líquido que se analiza, con respecto a un espesor de capa de 1 decímetro y dividido entre la densidad en gramos por centímetro cúbico.
- La rotación específica $[\alpha]_{20}^D$ de una sustancia en solución se define por el ángulo de rotación α expresado en grados del plano de polarización a la longitud de onda de la línea espectral D del sodio determinado a 20°C en una solución de la sustancia que se analiza, con respecto a un espesor de capa de 1 decímetro y a una concentración de 1 miligramo de sustancia por mililitro.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.2.2.4. Factores físicos que afectan la actividad óptica.

- **Temperatura:** el efecto de la temperatura tiene poca importancia si no se modifica en más de un grado en relación con la temperatura de 20 °C.
- **Longitud de onda de la luz:** la rotación específica es inversamente proporcional al cuadrado de la longitud de onda, en consecuencia, se debe especificar para todas las determinaciones.

1.2.2.5. Factores que modifican la intensidad de la desviación

Se expresan en la ley de Biot: el ángulo de desviación es proporcional a la longitud de la muestra de la sustancia que se atraviesa y además, en el caso de soluciones de sustancias activas, a la concentración.

Concentración: es básica para aplicar la polarimetría en la determinación de sustancias ópticamente activas. Para las principales sustancias analizadas por este método (azúcares, aminoácidos) existen tablas en donde los resultados se expresan directamente en unidades de concentración.

Espesor de la sustancia o solución que atraviesa la luz polarizada: las determinaciones se hacen comúnmente en tubos de 10 o 20 centímetros.^{16,17}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PROQUIFIN S.A de C.V. produce Sulfato de Amikacina desde 1987, el antibiótico es consumido en México y exportado a Europa y Latinoamérica con gran demanda, a finales del año 1999 disminuye la exportación a Europa debido a que en el mercado se encuentra Sulfato de Amikacina de origen chino a un precio más bajo, por lo que PROQUIFIN se ve en la necesidad de disminuir el costo de producción del antibiótico, se realizó un estudio económico de cada paso de la producción encontrando que en la síntesis y el proceso de purificación en su primera etapa, puede disminuir costos, se buscaron otras rutas de síntesis en donde se obtuvo éxito.

Desde que se produce el antibiótico en PROQUIFIN la purificación se lleva a cabo en su primer etapa por cromatografía en columna de intercambio iónico utilizando un sistema de gradientes, en columnas de nueve metros de largo por cincuenta centímetros de ancho. La síntesis se realiza en reactores de 1000 litros y a la solución obtenida al finalizar el proceso se le llama solución hidrogenada, la cual es bombeada a las columnas descritas anteriormente para su purificación. Las fracciones obtenidas de las columnas son recibidas en recipientes de 45 litros, de los cuales se toma una muestra y se realiza cromatografía en capa fina para conocer sus componentes. Ya identificados, los productos son concentrados y almacenados en tanques de acero inoxidable para continuar con su tratamiento.

Identificar los productos de la síntesis solo por cromatografía en capa fina lleva mucho tiempo de análisis, manipulación manual de las fracciones, expone al producto a contaminación y pérdidas, reflejándose todo esto en un largo tiempo de producción y por lo tanto en lo económico.

Con el fin de disminuir costos en la primer etapa de purificación del antibiótico se propone utilizar para su identificación la propiedad física de desviar la luz polarizada de la Amikacina e impurezas. La polarimetría como técnica de identificación permitirá automatizar el proceso antes descrito, dando como beneficios disminuir el tiempo de producción y aumentar el rendimiento.

2.2. OBJETIVOS

- Demostrar que es posible utilizar la rotación óptica de los productos de la síntesis de Amikacina para su identificación y que además esta técnica ofrece mayores ventajas que la técnica de cromatografía en capa fina.
- Realizar estudios del comportamiento óptico de la Amikacina, variando pH, concentración y mezclas.
- Comparar los resultados obtenidos en la identificación del antibiótico e isómeros por rotación óptica y cromatografía en capa fina en lotes piloto y lotes normales de producción.

2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

2.3.5. MATERIALES

1 Bureta de 10 mL
1 Bureta de 25 mL
1 Pipeta volumétrica de 5 mL
1 Pipeta volumétrica de 10mL
5 Matraz volumétrico de 50mL
2 Matraz volumétrico de 250mL
14 Vasos de precipitados de 80 mL
1 Vaso de precipitados de 1 litro
1 Vaso de precipitados de 2 litros
1 Columna de vidrio de 65cm de altura x 4.7 cm de diámetro interno
1 Pizeta
120 frascos de vidrio de 500 mL c/ tapa de plástico
1 Probeta de 100mL
100 Viales de 3mL con tapón
1 Rociador
2 Cámaras de elución
Capilares abiertos
Mangueras de plástico
Abrazaderas
Cromatofolios Merck 5553

2.3.6 EQUIPO

Estufa con vacío Lab-line No. 3620
Bomba peristáltica Ismatec Model 7331-00
Bomba de aire.

2.3.7 INSTRUMENTOS

Balanza analítica Mettler AE200
Polarímetro Perkin-Elmer 243-B
Potenciómetro Metrohm 691

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.3.8 REACTIVOS

Hidróxido de amonio R.A. J.T. Baker Lote: K14453
Formamida R.A. J.T. Baker Lote: K25168284822
Resina virgen ER-120 Alta pureza Sigma Lote: ER234928
Ácido acético R.A. J.T. Baker Lote: N40C51
Cloruro de sodio R.A. J.T. Baker Lote: 40339
Ninhidrina R.A. Merck Lote: NO54462835
Tetrahidrofurano R.A. Mellin Ckrodf Lote: 8498
Acetonitrilo R.A. J.T. Baker Lote: 56210
Acetona R.A. Merck Lote. 5006615852
Metanol R.A. Tecsiquim Lote: MT018
Agua deionizada

2.3.9 ESTANDARES SECUNDARIOS

Amikacina base	Lote No. AKB-31	621.0	µg/mg
Kanamicina sulfato	Lote No. 980201-3	779.0	µg/mg
Isómero BBK6	Lote No. RS-III-81	441.3	µg/mg
Isómero BBK29	Lote No. ES-VI-63	449.0	µg/mg
Isómero BBK11	Lote No. RS-III-81-BIS	427.2	µg/mg

Los estándares secundarios de Amikacina base y Kanamicina sulfato fueron evaluados a partir de estándares primarios USP.

2.3.10 SOLUCIONES:

Solución hidrogenada de 3 lotes piloto de la síntesis de Amikacina.
Muestra de cada una de las fracciones de 22 lotes normales de producción.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.4. MÉTODO

2.4.1 ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO ÓPTICO

2.4.1.1 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN

Se realizó una curva de referencia con 14 diluciones a intervalos similares. Preparada con 25g de Amikacina base en 250mL de agua deionizada



De la solución anterior se tomaron las siguientes alícuotas por separado 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5 y 25 mL. se aforaron a 50 mL cada una.



A las soluciones finalmente obtenidas se determinó rotación óptica; el análisis se realizó 5 veces.

2.4.1.2 EFECTO DEL pH.

Se preparó una solución de 20 mg/mL de Amikacina base en agua destilada.



De la solución anterior se tomaron 5 alícuotas de 50mL por separado y se ajustó el pH a 8, 9, 10, 11 y 12 con soluciones de Hidróxido de Amonio o HCl



Se leyó la rotación óptica de las soluciones anteriores.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.4.1.3 MEZCLAS

SE PREPARARON LAS
SIGUIENTES SOLUCIONES EN
AGUA DESTILADA.



1g de Amikacina base en 50mL.
1g de Kanamicina en 50mL.
100 mg de Kanamicina y 900 mg de
Amikacina base, en 50 mL.
200 mg de Kanamicina y 800 mg de
Amikacina base, en 50 mL.
300 mg de Kanamicina y 700 mg de
Amikacina base, en 50 mL.
400 mg de Kanamicina y 600 mg de
Amikacina base, en 50 mL.
500 mg de Kanamicina y 500 mg de
Amikacina base en 50 mL.



Determinación de rotación óptica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.4.2. ESTUDIOS DE SOLUCIÓN HIDROGENADA

Se solicitó solución hidrogenada de 3 lotes piloto de la síntesis de Amikacina base.



Se activó resina virgen ER-210 y se lavó con agua destilada hasta pH 7.



Se adaptó un recipiente colector a la columna y una bomba peristáltica para regular el flujo.



Se cargó la resina en una columna de vidrio de 65cm de altura x 4.7 cm de diámetro interno.



Se pasó la solución hidrogenada a través de la columna a un flujo de 45 mL/30 minutos.



Al terminar la adición de la solución hidrogenada se adaptó inmediatamente el gradiente de concentración de amoníaco.



Se colectó cada fracción en frascos etiquetados con números consecutivos



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

De las fracciones finalmente obtenidas se realizaron placas cromatograficas como se indica a continuación:

Sistema de eluyentes:

Solución A: Se pesaron 30g de NaCl y se disolvieron en 70mL de agua deionizada, se adicionaron 30mL de solución amoniacal concentrada.

Solución B: Se mezclaron 80mL de tetrahidrofurano + 10mL de acetona + 10mL de Metanol.

Mezcla de eluyentes: se mezclaron 20mL solución A + 10mL solución B.

Revelador: Solución de ninhidrina al 1.0% p/v en formamida-ácido acético glacial

Estándar: Solución a 3mg/mL de Amikacina base, kanamicina, isómero BBK6, BBK29, BBK11

Se aplicaron 10 μ L de estándar y muestras en cromatofolios Merck 5553 en banda de 1cm.

Después de eluir la placa se calentó en estufa de vacío a 105°C por 5 minutos, se dejó enfriar y se roció con solución reveladora, se calentó nuevamente durante 30 segundos apareciendo manchas azules de las muestras aplicadas.



Se leyó rotación óptica a las fracciones sin olvidar correr un blanco. Y se discutieron resultados comparando con la cromatografía en capa fina de las mismas.



Se adaptó el polarímetro a la salida de la columna para leer directamente la rotación a las fracciones de los siguientes lotes piloto.

Se analizaron resultados y se procedió con el estudio en lotes de normales producción.



Se muestreó cada fracción de las diferentes columnas de la planta de 22 lotes de producción, se determinó rotación óptica y Cromatografía en capa fina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPÍTULO III:

"RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS"

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.0 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 ESTUDIOS DEL COMPORTAMIENTO ÓPTICO DE AMIKACINA BASE.

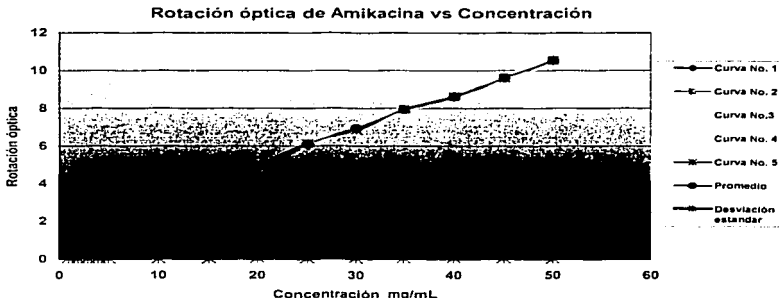
3.1.1. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN.

Para conocer el efecto de la concentración sobre la rotación óptica se elaboró una curva estándar, preparando una solución patrón de 100mg/mL y posteriormente se hicieron diluciones a intervalos similares, evitando así el posible error de pesada entre dilución y dilución, se realizó 5 veces el análisis determinando la rotación óptica de cada solución a 20 °C, se calculó la desviación estándar para cada concentración, la cual se mantuvo entre un 4 y 5%, los resultados se muestran en la Tabla No. 1.

Concentración en mg/mL	ROTACIÓN ÓPTICA					Desviación Estándar
	1	2	3	4	5	
1	+1.75	+1.6	+1.65	+1.6	+1.6	0.058
2	+1.95	+2.05	+2.0	+1.95	+1.95	0.040
3	+2.1	+2.1	+2.15	+2.05	+2.1	0.031
4	+2.25	+2.3	+2.3	+2.2	+2.2	0.044
5	+2.35	+2.35	+2.3	+2.35	+2.4	0.031
10	+3.35	+3.35	+3.3	+3.3	+3.25	0.037
15	+4.2	+4.25	+4.15	+4.2	+4.2	0.031
20	+4.75	+4.85	+4.85	+4.95	+4.95	0.074
25	+6.05	+6.1	+6.15	+6.05	+6.15	0.044
30	+6.95	+7	+6.9	+6.95	+6.85	0.050
35	+7.85	+8	+7.85	+7.95	+7.95	0.060
40	+8.65	+8.5	+8.5	+8.7	+8.65	0.083
45	+9.6	+9.6	+9.7	+9.55	+9.6	0.048
50	+10.5	+10.5	+10.5	+10.6	+10.55	0.040

Tabla No. 1. Rotación óptica y desviación estándar de 5 ensayos a diferentes concentraciones de Amikacina base en agua.

A los datos de las cinco ensayos se les realizó regresión lineal por el método de mínimos cuadrados, se graficaron (gráfica No. 1) y para evaluar la linealidad del método se calculó pendiente, coeficiente de correlación, coeficiente de determinación, finalizando con la prueba de F, la cual comprobó que los datos obtenidos están relacionados, los resultados se discuten a continuación.



Gráfica No. 1 Efecto de la concentración sobre la rotación óptica de la Amikacina base en solución y desviación estándar de los cinco ensayos.

Coeficiente de correlación: La tabla No. 2 muestra los coeficientes de correlación y determinación de las curvas generadas.

Considerando que la relación es lineal cuando el coeficiente de correlación se encuentra entre 0.98 y 1.0, y que la linealidad es mayor, cuanto más cercano a 1 sea el coeficiente, se concluye que la curva de Rotación óptica vs Concentración de Amikacina es lineal ya que los coeficientes de correlación cumplen con este requerimiento (Tabla No.2).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Pendiente: Indica la sensibilidad de calibración del método y se expresa en unidades de respuesta sobre unidades de concentración. La sensibilidad analítica relaciona la aleatoriedad de la respuesta con la aleatoriedad debida a la variación de la concentración. La tabla No. 3 muestra las pendientes obtenidas para cada curva, se considera que a mayor pendiente mayor sensibilidad y que mientras más pequeño sea el C.V. de la pendiente mayor será la linealidad, el coeficiente de variación de la pendiente mayor al 5%, indica falta de linealidad.

El coeficiente de variación para las pendientes de los datos obtenidos es de 0.0063, por lo que se concluye que la curva es lineal .

Curva	Coefficientes de determinación	Coefficientes de correlación
1	0.99938	0.9987
2	0.99913	0.9982
3	0.99924	0.9984
4	0.99971	0.9994
5	0.99962	0.9992

Tabla No. 2 Coeficientes de determinación y correlación de las cinco curvas generadas.

Curva	Pendiente	Ecuación de la curva
1	0.1783	$Y = 0.1783 X + 1.5195$
2	0.1790	$Y = 0.1790 X + 1.5378$
3	0.1791	$Y = 0.1791 X + 1.5176$
4	0.1814	$Y = 0.1814 X + 1.4780$
5	0.1806	$Y = 0.1806 X + 1.4930$

Tabla No.3 Pendientes y ecuación de las cinco curvas obtenidas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Prueba F.

Ho: No existe relación entre la variable independiente (concentración) y la variable dependiente (rotación óptica).

Ha :Existe relación entre la variable independiente (concentración) y la variable dependiente (rotación óptica).

Criterio: Rechazar Ho si F calculada > F tablas.

Estadífrago: F y nivel de significancia al 5%.

Curva	F calculada
1	9.677
2	6.506
3	7.449
4	20.295
5	14.596

Tabla No. 4 valor del estadígrafo F para las cinco curvas obtenidas.

Los valores de F calculada (Tabla No.4) son mayores a 2.53 (F de tablas) por lo que se rechaza Ho y se concluye que:

Existe relación entre la variable independiente (concentración) y la variable dependiente (rotación óptica).

3.1.2 EFECTO DEL pH EN LA DETERMINACIÓN.

La solución sometida a estudio tenía una concentración de 20mg/mL, la cual se conservó fija a una temperatura de 20 °C, y se modificó el pH de la solución, considerando el rango de variación de las fracciones obtenidas después de eluir la solución Hidrogenada a través de la columna.

Los pH's que se manejaron fueron de 8 a 12 ajustados con soluciones de Hidróxido de Amonio o HCl, repitiendo 5 veces la determinación, se obtuvieron los resultados que muestra la Tabla No. 5

pH	ROTACIÓN ÓPTICA				
	1	2	3	4	5
8	+5.1	+5.15	+5.2	+5.15	+5.1
9	+5.1	+5.15	+5.15	+5.1	+5.1
10	+5.05	+5.15	+5.1	+5.1	+5.15
11	+5.1	+5.15	+5.1	+5.1	+5.15
12	No es posible leer las muestras ya que presentan opacidad.				

Tabla No. 5. Rotación óptica de cinco ensayos a diferente pH de Amikacina base, manteniendo una concentración constante (20 mg/mL).

Para comprobar si interfiere o no el pH en la determinación se realizó un análisis de varianza considerando:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$$

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4$$

Estadígrafo: F con $\alpha = 0.05$

La hipótesis nula se rechaza si F calculada es mayor que F de tablas con $\alpha = 0.05$.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados (SC)	Variación o cuadrados medios	F calculada	F teórica
pH	3	SC pH = 0.002375	CMpH = 0.00079	0.6333	3.24
Error residual	16	SC error = 0.02	CM error = 0.00125		
Total	19	SC total = 0.022	-----		

Tabla No.6 Análisis de varianza para el efecto del pH en la determinación.

En Tabla No. 6 se muestran los resultados del análisis de varianza, como F calculada es menor que F teórica (F de tablas) se acepta H_0 , por lo que concluimos que el pH no afecta la determinación de rotación óptica de la Amikacina en solución al 5% de significancia.

3.1.3. EFECTO DE LA MEZCLA AMIKACINA BASE-KANAMICINA.

Para este propósito se prepararon varias mezclas en diferentes porcentajes en peso de Amikacina base y Kanamicina a una concentración total de 20mg/mL. La temperatura de la determinación se controló a 20 °C. Las soluciones probadas se describen en la tabla tres.

Solución	Porcentaje de Amikacina base	Porcentaje de Kanamicina
1	100	0
2	90	10
3	80	20
4	70	30
5	60	40
6	50	50
7	0	100

Tabla No. 7. Composición de las mezclas probadas.

Los resultados de rotación óptica obtenidos se muestran en la Tabla No. 7, a los cuales se realizó un análisis de varianza.

Concentración	ROTACIÓN ÓPTICA					
	1	2	3	4	5	PROMEDIO
Kanamicina al 100%	+6.35	+6.3	+6.3	+6.35	+6.3	+6.32
Amikacina al 100%	+5.05	+5.05	+5.05	+5.0	+5.05	+5.04
Kanamicina al 10%	+5.15	+5.2	+5.2	+5.15	+5.2	+5.18
Kanamicina al 20%	+5.3	+5.3	+5.3	+5.25	+5.35	+5.3
Kanamicina al 30%	+5.5	+5.55	+5.55	+5.4	+5.5	+5.51
Kanamicina al 40%	+5.65	+5.6	+5.6	+5.55	+5.6	+5.6
Kanamicina al 50%	+5.85	+5.85	+5.8	+5.85	+5.8	+5.83

Tabla No. 8. Resultados de rotación óptica de cinco ensayos al mezclar amikacina y kanamicina en porcentajes diferentes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para comprobar si interfiere o no mezclar la Kanamicina y Amikacina en la determinación, se realizó un análisis de varianza considerando:

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5$

Ha: $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5$

Estadígrafo: F con $\alpha=0.05$

La hipótesis nula se rechaza si F calculada es mayor que F de tablas con $\alpha=0.05$.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados (SC)	Variación o cuadrados medios	F calculada	F teórica
pH	6	SC pH = -1194.078	CMpH = -199.013	7.6473	2.92
Error residual	13	SC error = -333.984	CM error = -25.691		
Total	19	SC total = -1528.062	-----		

Tabla No.9 Análisis de varianza para las mezclas realizadas.

En la Tabla No.9 se muestran los resultados del análisis de varianza para el efecto de las mezclas Amikacina-Kanamicina, como F calculada es mayor que F teórica (F de tablas) se rechaza Ho, por lo que concluimos que al mezclar Amikacina base con Kanamicina la rotación óptica será afectada.

3.2 ESTUDIOS DE SOLUCIÓN HIDROGENADA A NIVEL PILOTO

Se obtuvo solución hidrogenada de 3 lotes piloto, de la síntesis de Amikacina base. Los productos de la síntesis se purificaron en el laboratorio con el equipo que se describe a en la figura No. 3.

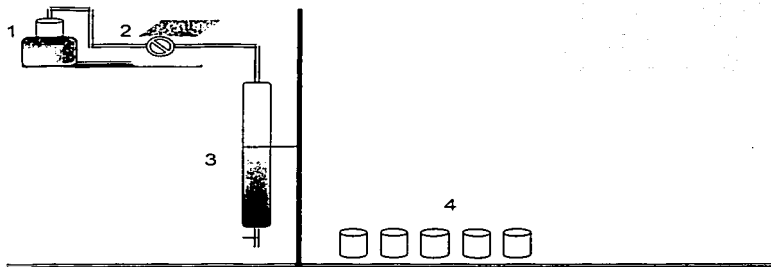


Figura No.3. Primer equipo utilizado en los estudios a nivel piloto de solución hidrogenada. 1- Frasco que contiene la solución, 2- Bomba peristáltica, 3-Columna cromatográfica, 4-Frascos para almacenar las fracciones.

El sistema fue modificado al incluir un polarímetro electrónico, el sistema quedó como se ilustra en la figura No.4.

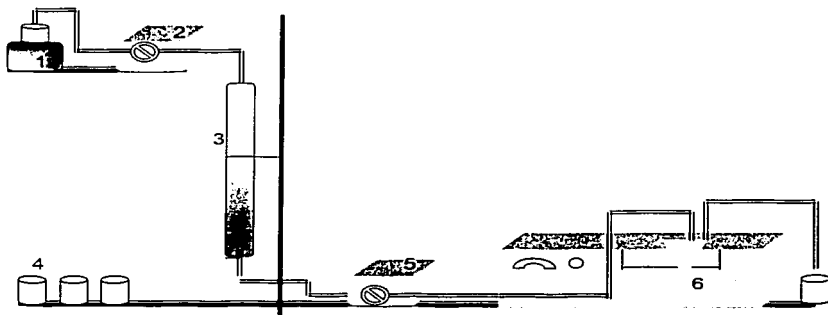


Figura No. 4. 1-Frasco que contiene la solución, 2- Bomba peristáltica, 3-Columna cromatográfica, 4-Frascos para almacenar las fracciones, 5-Bomba peristáltica, 6-Polarímetro electrónico Perkin-Elmer.

Con la ayuda del sistema columna-polarímetro se obtuvo la rotación óptica de los productos de Amikacina (la solución sometida a estudio se conservó a una temperatura de 20 °C) los cuales se fueron colectando en fracciones a las que posteriormente se realizó cromatografía en capa fina.

Los resultados del primer lote piloto analizado por cromatografía en capa fina, muestran que el lote AKD-99002 no fue purificado, en la cromatoplaqa se observan productos mezclados y se decide no determinar rotación óptica.

Para el lote AKD-99007 las placas cromatograficas muestran una separación mejor, pero aun hay mezclas, al graficar los resultados de rotación óptica (Anexo, gráfica No. 3) se observan tres picos, dos de los cuales no logran separarse completamente y esto es por que de la fracción 47 a la 53 la Kanamicina e isómero BBK29 se mezcla con Amikacina base, por los resultados obtenidos se requiere hacer ajustes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El lote AKD-99007 fue diluido 1:2 con agua por lo que fue separado en dos columnas y se asigno la siguiente identificación: AKD-99007 CC4 y AKD-99007 CC2, los resultados de cromatografía en capa fina muestran que el antibiótico es separado de sus impurezas lo que se puede comprobar con la gráfica de rotación óptica (gráfica No 4, del anexo).

En las placas cromatograficas de los lotes AKA-99007 CC4 y AKA-99007 CC2 se observa que la Kanamicina esta mezclada con el isómero BBK29, en la gráfica de rotación óptica se aprecian dos picos, un pico deformado que comienza en la fracción 39 y termina en la 53 (pico que representa la mezcla de Kanamicina e isómero BBK29), el segundo pico correspondiente a la Amikacina base comienza a salir en la fracción 63 y termina en la 104, el isómero BBK6 sale a partir de la fracción 100 y termina en la 113, a partir de la fracción 109 y hasta la 115 sale el isómero BBK11.

Se analizó un lote piloto mas (AKD-99010) y los resultados de cromatografía en capa fina muestran que la Kanamicina es mezclada en algunas fracciones con el isómero BBK29 y se localizan de la fracción 38 ala 50, la Amikacina base (producto de interés) comienza a identificarse en la fracción 62 y termina en la 103, el isómero BBK6 y el BBK11 se localizan después de la fracción 110. Al graficar los datos de rotación óptica (gráfica No. 4) se observa el mismo comportamiento.

La gráfica de rotación óptica de los mismos muestra dos picos, el primero corresponde a la Kanamicina que normalmente se mezcla con el isómero BBK29, de acuerdo a la concentración de estos se definirán dos picos o uno ligeramente deformado. El pico mayor y más pronunciado corresponde a Amikacina base, el isómero BBK6 y BBK11 no es posible apreciarlos en la gráfica por su mínima concentración.

Las fracciones después de identificarlas fueron almacenadas en tres recipientes uno correspondiente a Amikacina base, el segundo para los isómeros y en el tercero se almacena la Kanamicina para posteriormente recuperarla.

Al juntar las fracciones de Amikacina base de los lotes piloto analizados se realizó una análisis adicional de cromatografía en capa fina para confirmar que en la solución solo haya Amikacina, los resultados comprueban la correcta separación de fracciones, la cromatoplaqa (Figura No. 5) permite observar un solo producto, por lo que se concluye que es posible identificar las fracciones de Amikacina base por cromatografía en capa fina o rotación óptica en lotes piloto de la síntesis.

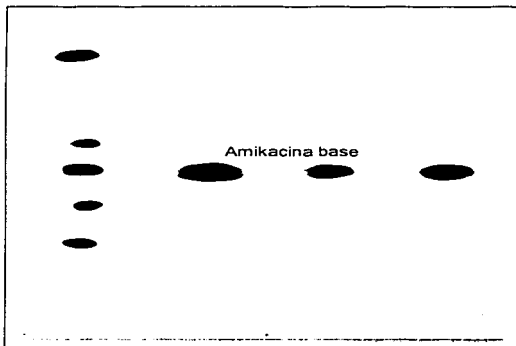


Figura No. 5 Cromatoplaqa de la integración de las fracciones correspondientes a Amikacina base de los lotes piloto analizados.

3.3 RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS DE SOLUCIÓN HIDROGENADA EN LOTES NORMALES DE PRODUCCIÓN

La síntesis de Amikacina se realiza por una modificación estratégica de la estructura química de la Kanamicina base, en la síntesis además de la Amikacina base se obtienen tres de sus isómeros BBK11, BBK6 , BBK29, una impureza intermedia y la kanamicina que no reacciona, todos en pequeñas concentraciones ya que el proceso de síntesis es manipulado para evitar la formación de estas impurezas (Síntesis de Amikacina, Figura No.2), el primer paso de purificación de la Amikacina es separarla por cromatografía en columna de intercambio iónico utilizando sistema de gradientes, después de eluir la solución obtenida de la síntesis por la columna cromatográfica las fracciones son almacenadas en recipientes de 45 litros de los cuales se toma una muestra a la que se realiza cromatografía en capa fina y rotación óptica a 20°C.

Se analizaron un total de 22 lotes normales de producción.

Los resultados de cromatografía en capa fina de los 22 lotes analizados son parecidos y en la figura No. 6 se muestra el del lote AKC-99073, los datos de rotación óptica se describen en el anexo de la gráfica No.5 a la 26.

La cromatografía en capa fina para los 22 lotes de producción muestran que los productos de la síntesis son separados por las columnas cromatográficas, presentando ocasionalmente excepciones en mezclas, que no presentan mayor problema ya que las mezclas encontradas son de Kanamicina y el isómero BBK29.

Al gráficar los resultados de rotación óptica (gráficas de la No 5 a la No. 26) para los 22 lotes analizados se observa gran semejanza. Comparando las gráficas de rotación óptica con los resultados de cromatografía en capa fina se identifican los productos de la síntesis en el siguiente orden:

Como primer producto de la elución se encuentra la Kanamicina que regularmente se mezcla con el isómero BBK29 (primeros dos picos de izquierda a derecha en las gráficas del anexo).

El siguiente producto que eluye de la columna cromatográfica es una impureza llamada impureza intermedia, la cual debido a su concentración variable generalmente muy baja, no logra definirse con claridad (tercer pico de las gráficas de rotación óptica, anexo).

En seguida eluye el producto de interés Amikacina base, el cual en las gráficas de rotación óptica forma el pico mas grande, definido y completamente separado.

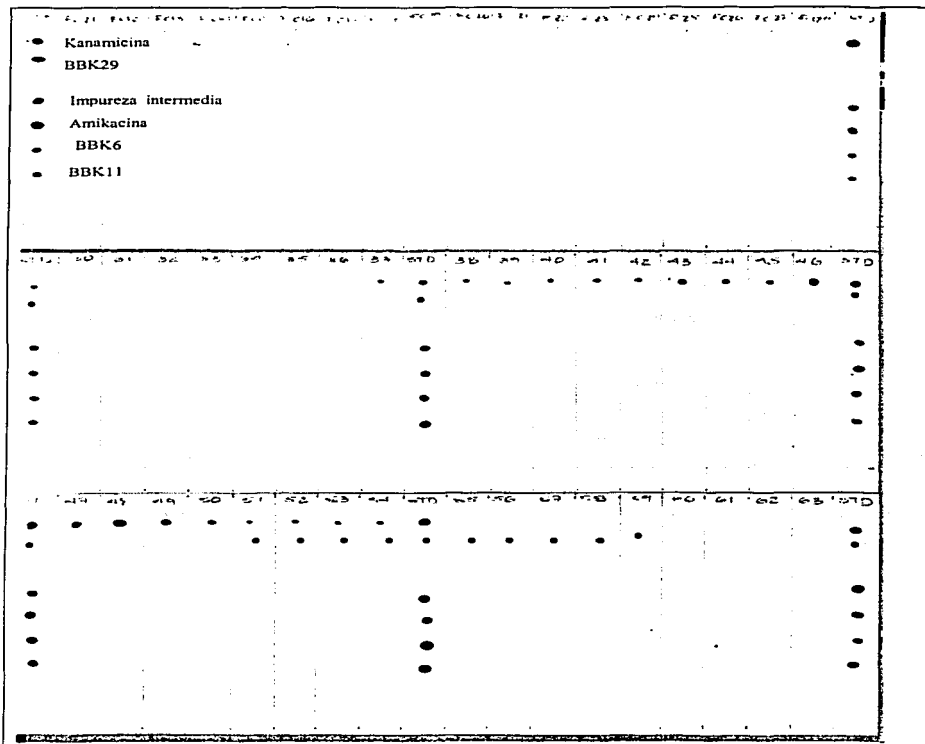


Figura No. 6 Cromatografía en capa fina de las fracciones del lote AKC-99073 (REPRESENTA A LOTES NORMALES DE PRODUCCIÓN)

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

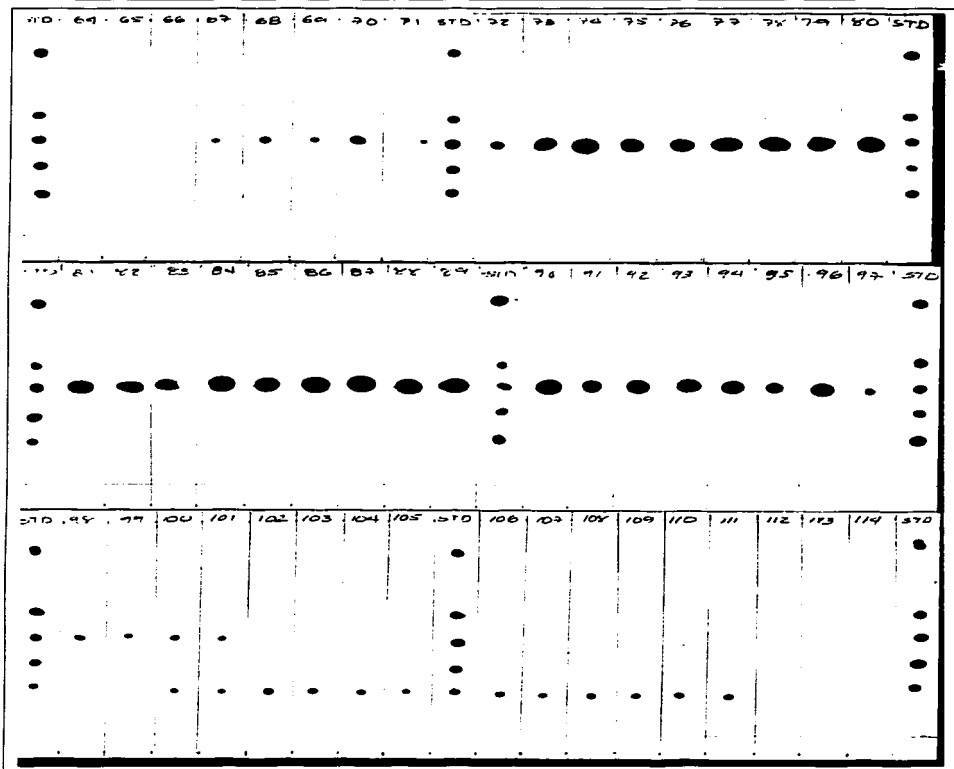


Figura No. 6 Cromatografía en capa fina de las fracciones del lote AKC-99073 (REPRESENTA A LOTES NORMALES DE PRODUCCIÓN)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Finalmente se obtiene el isómero BBK29 y el isómero BBK6, que por encontrarse en concentraciones muy bajas no es posible apreciarlo en las gráficas de rotación óptica.

Los picos observados en las gráficas de rotación óptica tienen forma gaussiana debido a que la rotación óptica de las sustancias depende de la concentración; la elución de los productos a través de la columna cromatográfica lo hacen de una mínima concentración a una concentración máxima que vuelve a disminuir, por lo tanto, los isómeros producidos en la síntesis y la Kanamicina que no reacciona producen picos pequeños, la Amikacina siendo el producto de interés da un pico bien definido y grande.

De acuerdo a los resultados obtenidos de rotación óptica y cromatografía en capa fina las fracciones de los 22 lotes analizados fueron clasificadas como se muestra en la Tabla No. 10 y 11.

Productos	Número de lote										
	58	59	60	62	63	64	65	66	67	68	69
Kanamicina	35-41	30-48	-----	-----	32-36	39-48	35-46	38-49	39-49	40-47	41-50
BBK29	41-52	48-58	48-59	41-59	36-51	46-58	43-55	49-58	49-58	47-55	50-57
Impureza intermedia	53-61	57-63	-----	62-65	53-56	60-63	57-60	59-64	60-64	56-64	62-69
Amikacina base	65-104	65-99	68-109	69-107	61-105	65-105	68-102	68-100	67-102	68-105	71-107
BBK6 y BBK11	102-114	100-111	-----	115-119	115-119	113-117	104-120	116-119	114-118	109-116	112-116

Tabla No. 10 Clasificación de las fracciones de la síntesis de Amikacina del lote AKC-99058-1 al AKC-99069-1 de acuerdo a su rotación óptica y TLC (Cromatografía en capa fina)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Productos	Número de lote											
	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	
Kanamicina	36-49	40-51	37-41	-----	39-48	38-48	36-46	41-51	40-46	37-46	40-48	
BBK29	49-56	51-57	42-62	37-54	49-56	46-56	46-55	51-59	46-57	46-54	50-57	
Impureza intermedia	57-66	60-65	-----	55-61	58-63	-----	57-63	-----	58-64	57-62	60-64	
Amikacina base	70-109	70-107	71-106	67-100	66-105	71-101	68-101	72-101	70-101	68-96	78-100	
BBK6 y BBK11	110-114	109-112	108-113	101-120	112-116	113-117	110-119	114-118	-----	112-116	114-116	

Tabla No. 11 Clasificación de las fracciones de la síntesis de Amikacina del lote AKC-99070-1 al AKC-99080-1 de acuerdo a su rotación óptica y TLC.

Los datos que muestra la Tabla No. 10 y No. 11 indican que las fracciones pueden identificarse por su rotación óptica, los 22 lotes de producción analizados tuvieron el mismo comportamiento; lo que permite conocer el orden de elución de los productos de la síntesis a través de la columna cromatográfica. Por lo tanto, los productos de la síntesis de Amikacina pueden ser detectadas después de pasar por la columna cromatográfica de intercambio iónico con sistema de gradientes por un polarímetro electrónico considerando lo siguiente:

La lectura en el polarímetro se realizó cada 30 minutos y siendo equivale a una fracción.

Las fracciones de la 1 a la 30 se consideran para la planta de tratamiento siempre y cuando no presenten una rotación óptica mayor de 1 grado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

De la fracción 31 a la 48 eluye la Kanamicina, su rotación óptica se encuentra entre 0.016° y 2.0° al gráficar estos valores el pico correspondiente a Kanamicina no llega a la línea base ya que normalmente se encuentra mezclado con el isómero BBK29 lo cual no representa un problema ya que lo que nos interesa es obtener en forma pura la Amikacina.

El isómero BBK29 eluye de la fracción 41 a la 62, y normalmente presenta una rotación óptica mínima de 1.082° y una máxima de 3.5° , este pico nace arriba de la línea base muy pegado al pico correspondiente a la Kanamicina por estar inicialmente mezclado con éste.

La impureza intermedia es de concentración variable pero generalmente se produce en muy pequeñas concentraciones. Eluye de la fracción 57 a la 69, y su rotación óptica se encuentra entre 0.17° y 0.9° .

A partir de la fracción 65 y hasta la 107 eluye el producto de interés "Amikacina" la cual presenta una rotación óptica mínima de 0.10° y una máxima de 8.65° , la gráfica de estos datos muestra un pico grande, bien definido que nace en la línea base y muere en la misma.

Se requiere de personal capacitado para el manejo del sistema columna-polarímetro-contenedor, que diferencie el cambio mínimo de rotación óptica de las fracciones además de estar pendiente de la gráfica que reporte la computadora instalada al polarímetro y que al observar cualquier variación de aviso a sus superiores.

De acuerdo a los resultados obtenidos los productos de la síntesis son almacenados en tres tanques. En uno se deposita toda la Amikacina obtenida que posteriormente sigue con su proceso de purificación, en el segundo tanque se recuperan los isómeros BBK6, BBK11 e impureza intermedia para posteriormente tratarlos y en el tercer tanque se almacena la Kanamicina e isómero BBK29 para su recuperación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los resultados obtenidos por cromatografía en capa fina y polarimetría, son semejantes, con ambas técnicas fue posible identificar en las mismas fracciones los productos de la síntesis. La técnica de cromatografía en capa fina como método de identificación no permite grandes cambios, sin embargo al realizar la identificación por polarimetría fue posible automatizar el sistema de purificación en su primera etapa, con esto se disminuye la manipulación manual de las fracciones, riesgos de pérdidas, contaminaciones cruzadas y tiempo de purificación.

Como siguiente paso a este estudio es la validación del proceso, sin embargo no fue posible realizarla debido a que la empresa dejo de producir Sulfato de Amikacina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPÍTULO IV:
"CONCLUSIONES"

4.1 CONCLUSIONES

1.- Existe relación entre la variable independiente (concentración) y la variable dependiente (rotación óptica), por lo tanto es posible determinar la concentración de Amikacina base en solución acuosa por polarimetría.

2.-Las fracciones de la síntesis de Amikacina después de ser separadas por la columna cromatográfica de intercambio iónico con sistema de gradientes, pueden ser evaluadas por polarimetría dentro del rango de pH de 8 a 11.

3.-La identificación de los productos de la síntesis por polarimetría solo es válida para soluciones de Amikacina que han sido separados por una columna cromatográfica.

5.- El empleo de la polarimetría durante la purificación de la Amikacina es un método alternativo conveniente a la cromatografía en capa fina ya que ofrece la las siguientes ventajas: disminuye la manipulación manual de las fracciones, riesgos de pérdidas, contaminaciones cruzadas, horas hombre, tiempo de purificación; además permitirá cumplir con un requisito mas en el proceso de certificación al poder automatizarse.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPÍTULO V:
"REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS "

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

15.-Noriega U. "Análisis Químico Farmacéutico de medicamentos". Vol. 2. México: Limusa S.A. de C.V., 1998: 817-861.

16.-Connors K A. "Curso de analisis Farmacéutico" 2ª Edicion. México: Reverté S.A., 1981:107-129.

17.-US 5,656,735 Process for the preparation of Amikacina precursos. Bioquímica Opos S. p. A., Milán, Italy. Aug. 12, 1997.

18.-US 5,621,085 Process for the preparation of Amikacin precursos. Bichimica Opos S. p A. Milán Italy Apr. 15, 1997.

19.-US 4,902,790 Process for preparing Amikacin. Chementecno S.r. L., Milán Jan. 15, 1991

20.-US4,424,343 Preparation of 1-N-[ω -Amino- α -hydroxyalkanoyl]-Kanamicina polysilylates and products. Bristol-Myers Company, New York N.Y. Jan 3, 1984

21.-US 4.902.790 Novel process for the synthesis of Amikacin. Pierrel Spa, Naples, Italy. Feb. 20, 1990.

22.-CA 1,131,628 Production of a selectively protected N-acylated derivative of an aminoglycosidic antibiotic. Zaidan Hojin Biseibutsu Kagaku, Kenkyu Kai, Tokyo, Japan. Sep. 14, 1982

23.-Pasteelnick, L. 1983. Analytical Methods Validation. Warner-Lambert C., ESA. USA.

24.-Paul, W. L. 1991. USP Perspectives on Analytical Methods Validation. Pharmaceutical Technology. p.p. 130-141.

25.-Wayne, D.W. 1995. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la Salud. Ed. UTEHA. México.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.-Kondo S.; Maeda K.; Nitta K.; Okami Y.; Takeuchi T.; Ueda M.; Umezawa H.; Utahara R. "BBK8" J. Antibiot. Vol. 10. Tokyo:1957:181-189.
- 2.-Fujisawa K.; Kawaguchi H.; Naito T.; Nakagawa S. "The chemistry and proof of structure, BBK8". J. Antibiot. Vol. 25. Tokyo: 1972: 695-708.
- 3.-Bristol Labs "Amikin ®". Physicians Desk. U.S.A 1982:721.
- 4.-The United States Pharmacopeia National Formulary. USP 24/NF 19. USA: United States Pharmacopeial convention, Inc. 1999:
- 5.-Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, 7ª Edición. Secretaría de salud. 2000:
- 6.-Hardman J G.; Gilman A.G.; Limbird L E.; Perry B. Las Bases Farmacológicas de la terapéutica. Vol II, 9ª Edición. México: Mc Graw-Hill, 1996:364-371.
- 7.-Kerridge K A. "Pharmacological and biochemical properties of amikacin". Drug Subst. Vol 1. Japan: 1977: 125-53.
- 8.-Meyer R.D. "Therapeutic of amikacin". Ann Intern. Med. Vol 95: 1981: 328-332.
- 9.-Proquifin S.A. de C.V. " Archivo maestro de producción de amikacina". México: 1990.
- 10.-Hadda PR.; Jackson P E. "Ion Chromatography. Principles and Applications". New Yorck: Elsevier, 1990:39-61.
- 11.-Marlin J P.; Syngé L M. "A new form of chromatography employing two liquid of phases" J. Biochem. Vol. 35. United States: 1990:1358-1368.
- 12.-Small H. "Ion Chromatography." Vol. 2. New Yorck: Pleenum press, 1989:36-47.
- 13.-Stahl E. "Thin-Layer Chromatography. Laboratory Handbook." 2ª Edición. New Yorck: Elsevier. 1979:23-50.
- 14.-Alworth W.L. "Stereochemistry and Its application in Biochemistry". New Yorck:Wiley-Interscience, 1972: 118-130.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

15.-Noriega U. "Análisis Químico Farmacéutico de medicamentos". Vol. 2. México: Limusa S.A. de C.V., 1998: 817-861.

16.-Connors K A. "Curso de analisis Farmacéutico" 2ª Edicion. México: Reverté S.A., 1981:107-129.

17.-US 5,656,735 Process for the preparation of Amikacina precusors. Bioquímica Opos S. p. A., Milán, Italy. Aug. 12, 1997.

18.-US 5,621,085 Process for the preparation of Amikacin precusors. Bichimica Opos S. p A. Milán Italy Apr. 15, 1997.

19.-US 4,902,790 Process for preparing Amikacin. Chementecno S.r. L., Milán Jan. 15, 1991

20.-US4,424,343 Preparation of 1-N-[ω -Amino- α -hydroxyalkanoyl]-Kanamicina polysilylates and products. Bristol-Myers Company, New York N.Y. Jan 3, 1984

21.-US 4,902,790 Novel process for the synthesis of Amikacin. Pierrel Spa, Naples, Italy. Feb. 20, 1990.

22.-CA 1,131,628 Production of a selectively protected N-acylated derivative of an aminoglycosidic antibiotic. Zaidan Hojin Biseibutsu Kagaku, Kenkyu Kai, Tokyo, Japan. Sep. 14, 1982

23.-Pasteelnick, L. 1983. Analytical Methods Validation. Warner-Lambert C., ESA. USA.

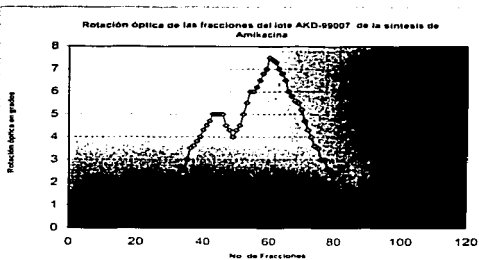
24.-Paul, W. L. 1991. USP Perspectives on Analytical Methods Validation. Pharmaceutical Technology. p.p. 130-141.

25.-Wayne, D.W. 1995. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la Salud. Ed. UTEHA. México.

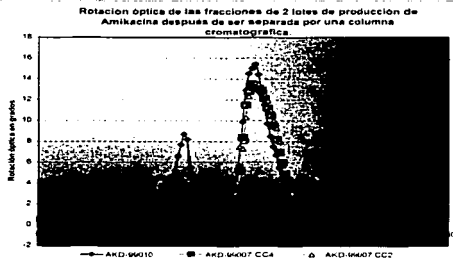
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO
"GRÁFICAS DE ROTACIÓN ÓPTICA "

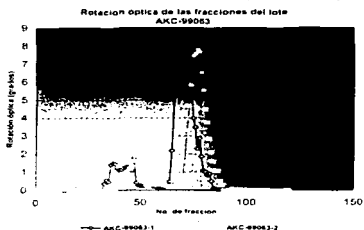


Gráfica No. 3. Rotación óptica del lote AKD-99007 escala photo.

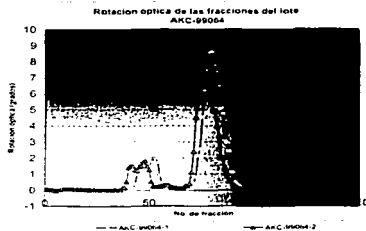


Gráfica No. 4. Rotación óptica de las fracciones de dos lotes de Amikacina a escala photo.

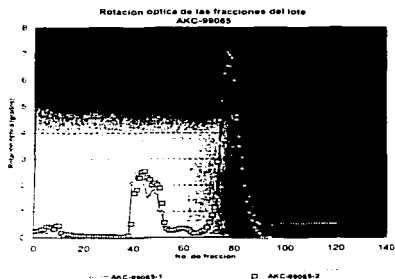
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



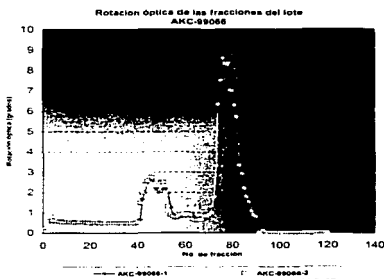
Gráfica No. 9 Rotacion optica vs. No. De fraccion del lote AKC-99063 separado por dos columnas cromatograficas.



Gráfica No. 10 Rotacion optica vs. No. De fraccion del lote AKC-99064 separado por dos columnas cromatograficas.



Gráfica No. 11 Rotacion optica vs. No. De fraccion del lote AKC-99065 separado por dos columnas cromatograficas.

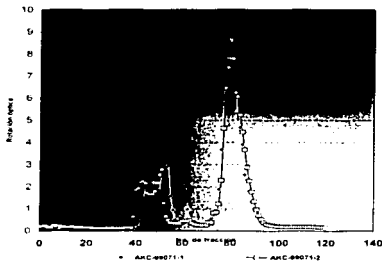


Gráfica No. 12 Rotacion optica vs. No. De fraccion del lote AKC-99066 separado por dos columnas cromatograficas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

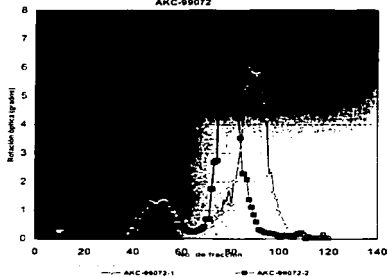
51

Rotación óptica de las fracciones del lote AKC-99071



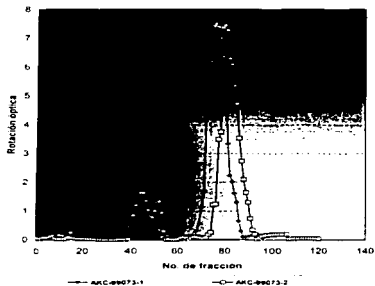
Gráfica No.17 Rotación óptica vs. No. de fracción del lote AKC-99071 separado por dos columnas cromatográficas

Rotación óptica de las fracciones del lote AKC-99072



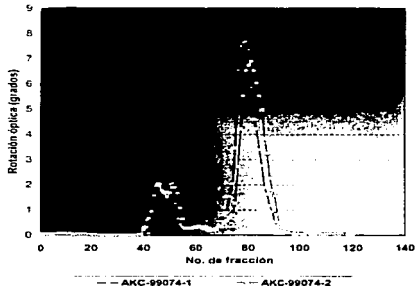
Gráfica No.18 Rotación óptica vs. No. de fracción del lote AKC-99072 separado por dos columnas cromatográficas

Rotación óptica de las fracciones del lote AKC-99073



Gráfica No.19 Rotación óptica vs. No. de fracción del lote AKC-99073 separado por dos columnas cromatográficas

Rotación óptica de las fracciones del lote AKC-99074

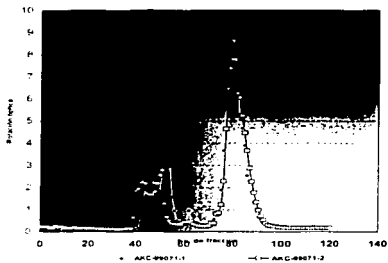


Gráfica No.20 Rotación óptica vs. No. de fracción del lote AKC-99074 separado por dos columnas cromatográficas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

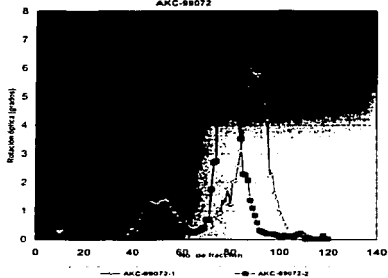
52

Rotación óptica de las fracciones del lote AKC-99071



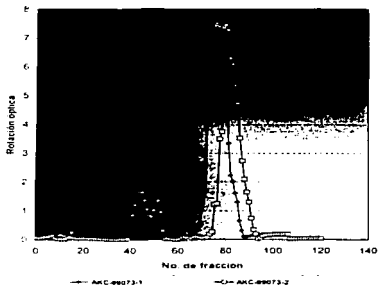
Gráfica No. 17. Rotación óptica vs. No. de fracción del lote AKC-99071 separada por dos columnas cromatográficas.

Rotación óptica de las fracciones del lote AKC-99072



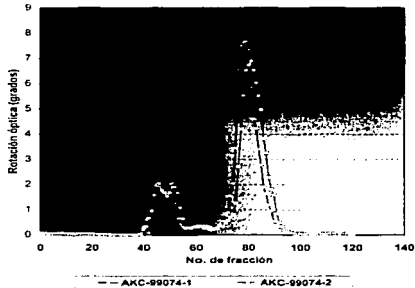
Gráfica No. 18. Rotación óptica vs. No. de fracción del lote AKC-99072 separada por dos columnas cromatográficas.

Rotación óptica de las fracciones del lote AKC-99073



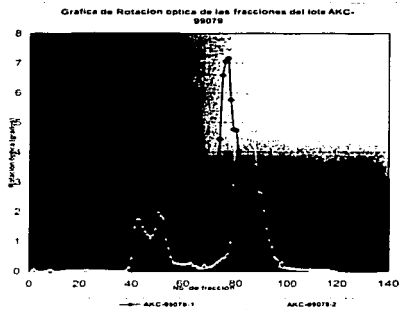
Gráfica No. 19. Rotación óptica vs. No. de fracción del lote AKC-99073 separada por dos columnas cromatográficas.

Rotación óptica de las fracciones del lote AKC-99074

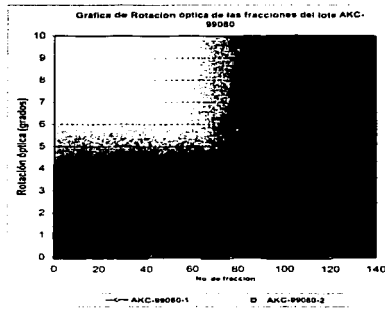


Gráfica No. 20. Rotación óptica vs. No. de fracción del lote AKC-99074 separada por dos columnas cromatográficas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Gráfica No.25. Rotación óptica vs No. de fracción del lote AKC-99079 separado por dos columnas cromatográficas.



Gráfica No.26. Rotación óptica vs No. de fracción del lote AKC-99080 separado por dos columnas cromatográficas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

54