

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

**Determinación de Metiltestosterona, en Fármacos
por Cromatografía en Fase de Vapor**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS

(Farmacia, Control de Medicamentos)

P R E S E N T A . L A Q . F . B .

OLIMPIA JIMENEZ LIGNAN



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.

ESTA INVESTIGACION SE REALIZO EN LA
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES DE
LA FACULTAD DE QUIMICA, EN EL DEPART
TAMENTO DE QUIMICA FARMACEUTICA Y
PRODUCTOS NATURALES Y EN EL DEPART
TAMENTO DE CROMATOGRAFIA.

Esta investigación se realizó bajo la dirección de la Dra. Carmen Rivera de Reyes, a quien expreso mi sincero reconocimiento.

Agradezco al Dr. Armando Manjarrez Moreno, las atenciones e indicaciones brindadas que me llevaron a una mejor realización de la presente investigación.

Al Q. Santiago Capella Vizcaíno, mi
agradecimiento por su apoyo y orien-
tación en el desarrollo de este traba-
jo.

A la Q. Carmen Labastida Rubio, por sus
valiosos consejos.

I N D I C E

| | | |
|----------|-----|---|
| CAPITULO | I | INTRODUCCION |
| CAPITULO | II | 1. SINTESIS DE LA METIL- TESTOSTERONA. 2. DESCRIPCION DE LOS ME <u>U</u> TODOS CONOCIDOS DE CON- TROL PARA LA METILTESTOS <u>U</u> TERONA. |
| CAPITULO | III | PARTE EXPERIMENTAL. |
| CAPITULO | IV | DISCUSION. |
| CAPITULO | V | CONCLUSIONES. |
| CAPITULO | VI | BIBLIOGRAFIA. |

CAPITULO I

INTRODUCCION

Una persistente necesidad de métodos microanalíticos para esteroides ha estimulado muchas aplicaciones recientes de la cromatografía en fase de vapor (CFV) en este campo.¹ Los investigadores inicialmente se ayudaron con técnicas improvisadas. En 1959 Eglinton et al.² informaron que la CFV podría ser empleada para el análisis de una gran variedad de sustancias de peso molecular elevado, incluyendo los esteroides.

A pesar de que el tiempo requerido para el análisis de esteroides era largo y las temperaturas elevadas, se demostró que los esteroides podían en realidad ser analizados por esta técnica. Poco tiempo después, Beerthis y Recourt³ establecieron que algunos esteroides podían ser analizados a elevadas temperaturas empleando aceite de silicón como fase estacionaria. Casi al mismo tiempo Sweeley y Horning⁴ describieron una experiencia similar con una fase líquida polar, isoftalato de etilen glicol, empleando

también altas temperaturas y obteniendo tiempos de retención dentro de un intervalo razonable. Una vez establecidas las posibilidades de análisis de esteroides por CVF, informes de Vanden-Heuvel et al.,⁵ Wotiz y Martin,⁶ Nicolaides⁷ y Chen y Lantz,⁸ llevaron a evidenciar la gran aplicabilidad que la técnica de CVF podía tener en esta nueva e importante área. Algunos de los avances más significativos serán mencionados a continuación ya que por razones obvias, no todo el trabajo reciente puede ser incluido.

Una gran variedad de fases líquidas ha sido explorada para trabajar en el campo de esteroides. En los primeros estudios mencionados, generalmente fueron usadas las fases disponibles tales como la grasa lubricante Apiezon o aceites de silicón. Los niveles de la fase líquida empleados en las columnas fueron variables y las temperaturas extremas. La técnica para la preparación de la "solución fase líquida" descrita en los principios por Horning et al.,⁹ y empleada para preparar las columnas, contenían una fina capa de fase líquida, proporcionando así el método general con el cual se podían preparar eficientemente las columnas para ser usadas a unas temperaturas más razonables (dentro de un intervalo de 200° - 230°C). Sin los límites impuestos por las altas concentraciones de la fase líquida, un gran número de nuevas fases líquidas

fueron sujeto de investigación. Desde 1960 Horning y sus colaboradores introdujeron el fluoro-silicón (QF-1),¹⁰ registraron análisis en succinato de neopentil-glicol y describieron el uso de mezclas de fases líquidas.¹¹ Lipsky y Landowne contribuyeron con una extensa comparación de las propiedades de una gran variedad de fases polares. El nitrilo-silicón (XE-60), fue introducido aproximadamente al mismo tiempo por VandenHeuvel et al.,¹² para 17-cetoesteroides; Ellin et al.,¹³ para una estimación del ácido triceto-colánico y Wells y Makita¹⁴ para un análisis de esteroides fecales. Clayton¹⁵⁻¹⁷ seleccionó el succinato de polietilen glicol para estudios de los éteres del metil esteroil y Bottcher y Meijer¹⁸ emplearon una fracción de asfalto como fase líquida para algunas separaciones esterooidales.

Mientras que la gran mayoría de los esteroides pueden ser separados sin convertirlos a derivados, es tal vez conveniente emplear los derivados por más de una de las siguientes razones: para disminuir la polaridad y de este modo minimizar las "colas" e impedir su adsorción parcial en la columna o en otras partes del instrumento; para enmascarar la aparición de reactivos estructurales térmicos y de esta manera prevenir el rompimiento térmico

de las sustancias en el inyector o en la columna; aumentar la volatilidad (por ejemplo en el caso de los ácidos biliares), o alterar el comportamiento en la retención para mejorar las separaciones de mezclas específicas.

La polaridad de los esteroides hidroxilados puede reducirse efectivamente por la preparación de o-metil éteres,¹⁷ acetatos,¹⁹ trifluoroacetatos^{20,21} o trimetil-silil-éteres.²² Landowne y Lipsky recientemente evaluaron los cloro-acetil derivados; la polaridad se reduce y estos derivados también son empleados en el uso de detectores de captura de electrones. Los ácidos biliares que contienen grupos carboxilo, así como grupos hidroxilo, pueden ser separados como ésteres metílicos²³⁻²⁶ pero es recomendable también, emplear derivados de los grupos OH por la baja polaridad de estas sustancias. VandenHeuvel et al.²¹ investigaron los ésteres del trifluoro-acetilo encontrando de esta forma tiempos cortos de retención y alto grado de resolución. Kuksis y Gordon²⁷ hicieron un excelente estudio de varios derivados de los ácidos biliares y sus separaciones en diferentes tipos de fases líquidas. Encontraron que los ésteres metil-o-acetilo son separados adecuadamente en SE-30 y que los ésteres metil-o-trifluoro-acetilo son separados de manera eficaz en QF-1, pero indican que los trifluoro-acetilos

rindieron resultados cuantitativos más correctos. Sjövall et al.^{28,29} también describen separaciones de trifluoro-acetatos y en adición in troducen el uso de trimetil-alil-éteres de los ésteres de bilis.²⁹ Makita y Wells³⁰ obtuvieron excelentes resoluciones en mezclas complejas de ácidos biliares como sus trimetil-silil-éteres. Es in teresante notar que el orden de elución en la columna polar es in- verso en el caso de los trimetil-silil-éteres de los ésteres de los ácidos biliares, comparados con el comportamiento de retención de los acetatos y los trifluoro-acetatos. Esto es, los trihidroxi com- puestos, tales como el ácido cólico y el ácido muricólico, son eluf in dos antes que varios hidroxí compuestos, como son los mono-hidroxi compuestos.

En cierto tipo de esteroides, notablemente en aquellos de la corteza suprarrenal, se presentan grupos estructurales con marca da labilidad térmica. VandenHeuvel y Horning³¹ notaron hace algún tiempo que, por ejemplo los 17 α -hidroxi-20-ceto-esteroides elimi- nan la cadena lateral, al ser inyectados para dar productos de degra da ción de 17 cetos. Este fenómeno puede ser prevenido mediante el uso de grupos dioxi-bis-metileno o empleando acetatos.³² Alterna- tivamente, Merits³³ removía la cadena lateral por ruptura al oxidar con periodato, convirtiendo los 17/ β -carboxi en metil ésteres y ana-

lizando éstos por CFV. La aldosterona es también inestable a temperaturas elevadas; en este caso Wotiz et al.³⁴ previene el rompimiento térmico convirtiendo el esteroide a diacetato, previo análisis. Klíman y Foster³⁵ describen, no obstante, que el producto recuperado no es el diacetato de aldosterona, sino más bien, el producto de degradación que tiene un grupo acetilo menos, Carr y Wotiz³⁶ cuantearon tetrahidroaldosterona en orina por CFV.

Hay muchos casos en los cuales las separaciones de mezclas específicas fueron mejoradas por el uso de derivados. Horning et al.³⁷ dieron varios ejemplos de resolución de 5 α -pregnanos en SE-30, como comparación de un excelente mejoramiento en la resolución de trifluoro-acetatos en la misma columna. Similarmente, el tiempo de retención del colestanol y del epicolestanol fue el mismo en SE-30; una resolución completa de esta mezcla fue conseguida al separarlos como trimetil-silil-éteres en SE-30.³⁷ Los estrógenos libres usualmente no dan una buena resolución, pero pueden ser resueltos completamente como trimetil-silil-éteres³⁷ o acetatos.³⁸

En literatura reciente se hacen numerosas referencias de las separaciones por CFV de ceto-esteroides,³⁹⁻⁴⁴ pregnanos⁴⁵⁻⁵¹

y estrógenos.^{52,53}

Se ha dado considerable énfasis a la posibilidad de correlacionar los tiempos de retención de los esteroides con su estructura con el objeto de poder desarrollar un medio de identificación sistemático de compuestos desconocidos. Cuidadosos métodos fueron desarrollados para este propósito y los resultados obtenidos hasta la fecha son alentadores, parece que es posible predecir, con gran exactitud, el número estructural con las características dadas del esteroide tomando en consideración los tiempos de retención bajo condiciones estandar. La mayor parte de este trabajo fue desarrollado a partir del concepto elaborado por Martin⁵⁴ y por Bate-Smith y Westall,⁵⁵ dado que el logaritmo del tiempo de retención relativo es una función aditiva que contribuye en los efectos producidos por las porciones de hidrocarburos en la molécula y por los efectos de varios sustituyentes (grupos funcionales) en la molécula. Clayton¹⁷ hizo uso de este concepto en forma de "factores de retención de grupo", para predecir los efectos de las dobles ligaduras, localizadas en diferentes posiciones, con el tiempo de retención relativo de los esteroides (como metil-ésteres) en columnas polares. VandenHeuvel y Horning,⁵⁶ hicieron extensivo un principio similar para definir el "número de carbono", definido an

teriormente por Woodford y VanGent⁵⁷ para ácidos grasos y empleado en el campo de los esteroides. El "número esteroidal" (SN), es calculado al graficar semilogarítmicamente el tiempo de retención relativo contra el número de átomos de carbono.⁵⁶ La forma de calcular el punto indicado en la gráfica para SN, es igual en fases selectivas y no selectivas, pero los valores obtenidos con fases no selectivas, como la fase SE-30, son más fáciles de interpretar.

Brooks y Hanaineh,⁵⁸ recientemente describieron tiempos de retención relativos y factores de retención de grupo de cerca de 90 esteroides. En general tienen una utilidad analítica los factores de retención, puesto que se establecen independientemente del peso molecular de la sustancia.

El principal objetivo de la presente investigación, es desarrollar una técnica por CFV con las debidas características de reproducibilidad, precisión y rapidez para la determinación de metiltestosterona en presentaciones comerciales de fármacos.

Del trabajo experimental desarrollado se propone un método de análisis de metiltestosterona en fármacos por CFV, en el que

su identificación es simple y su determinación cuantitativa bastante precisa. Además, mediante este método es posible detectar, aún en pequeñas concentraciones, la presencia de otras sustancias que se encontraron en la muestra analizada, los cuales pueden producir efectos indeseables en el fármaco.

El método aquí descrito se estudió para la presentación comercial en tabletas, pero con las modificaciones adecuadas en la extracción se puede utilizar para otras presentaciones farmacéuticas.

|

CAPITULO II

1. SINTESIS DE LA METILTESTOSTERONA

La 17α -metiltestosterona es el andrógeno más importante de actividad androgénica por vía oral, motivo por el cual se han desarrollado diversas síntesis, encontrándose entre éstas las siguientes:

a) Usualmente se obtiene a partir de la dehidro-epiandrosterona, que es tratada con bromuro de metilmagnesio y el diol resultante, 17α -metil-androst-5-eno- 3β , 17β -diol (II) p.f. 204°C , es oxidado por una reacción de Oppenauer a 17α -metiltestosterona (IV) p.f. 164°C .⁶⁴

b) Otra alternativa de síntesis partiendo del mismo material anterior⁷⁵ consiste en tratar la dihidro-epiandrosterona con yoduro de trimetilsulfonio dando una mezcla de compuestos: el 17β , 20-epoxi-21 norprogn-5-eno- 3β -ol, p.f. 166°C y un metil éter de p.f. $112-114^{\circ}\text{C}$; el tetra-hidropiranyl éter, (III) p.f. $166-168^{\circ}\text{C}$, se re-

SINTESIS

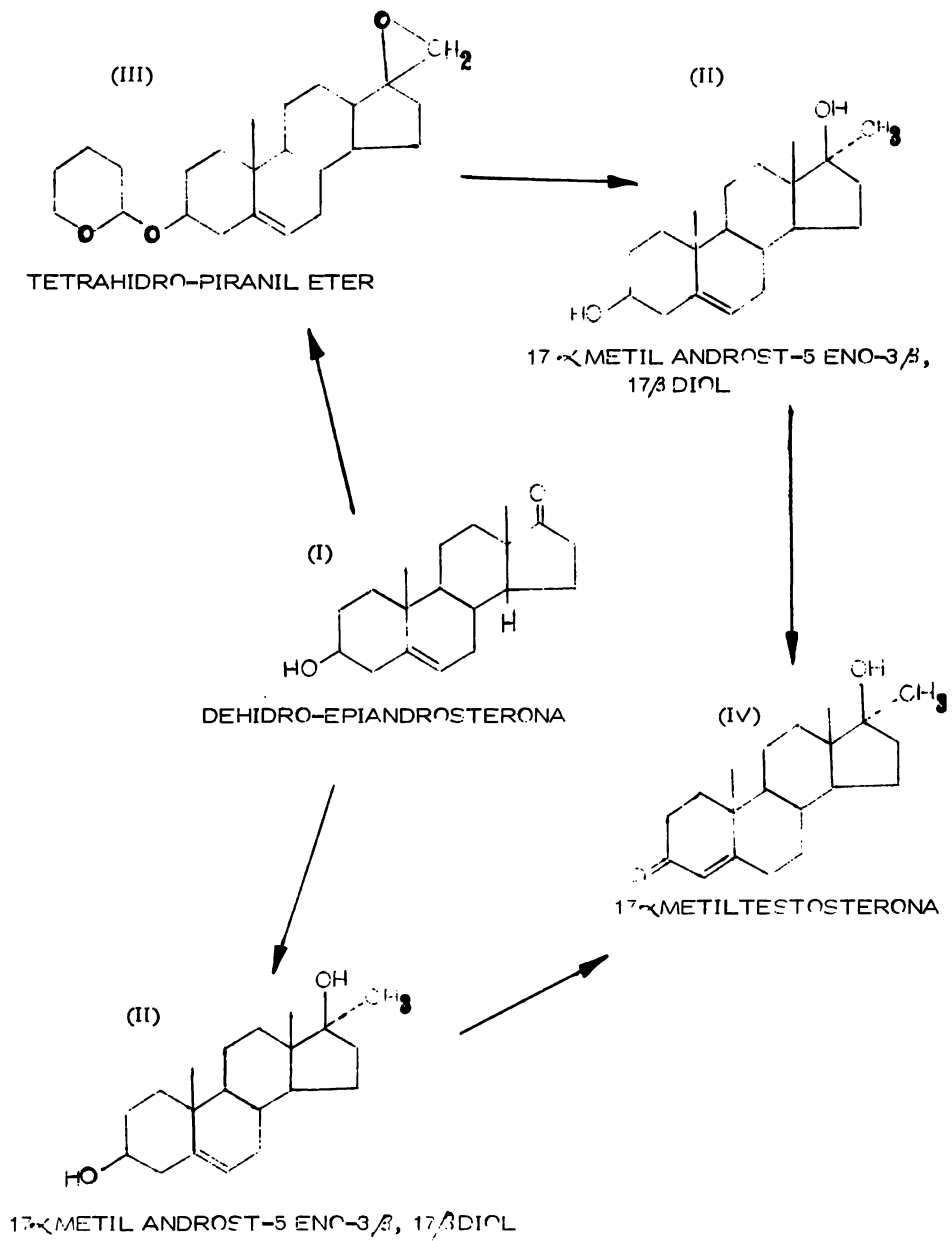


Diagrama I

SINTESIS

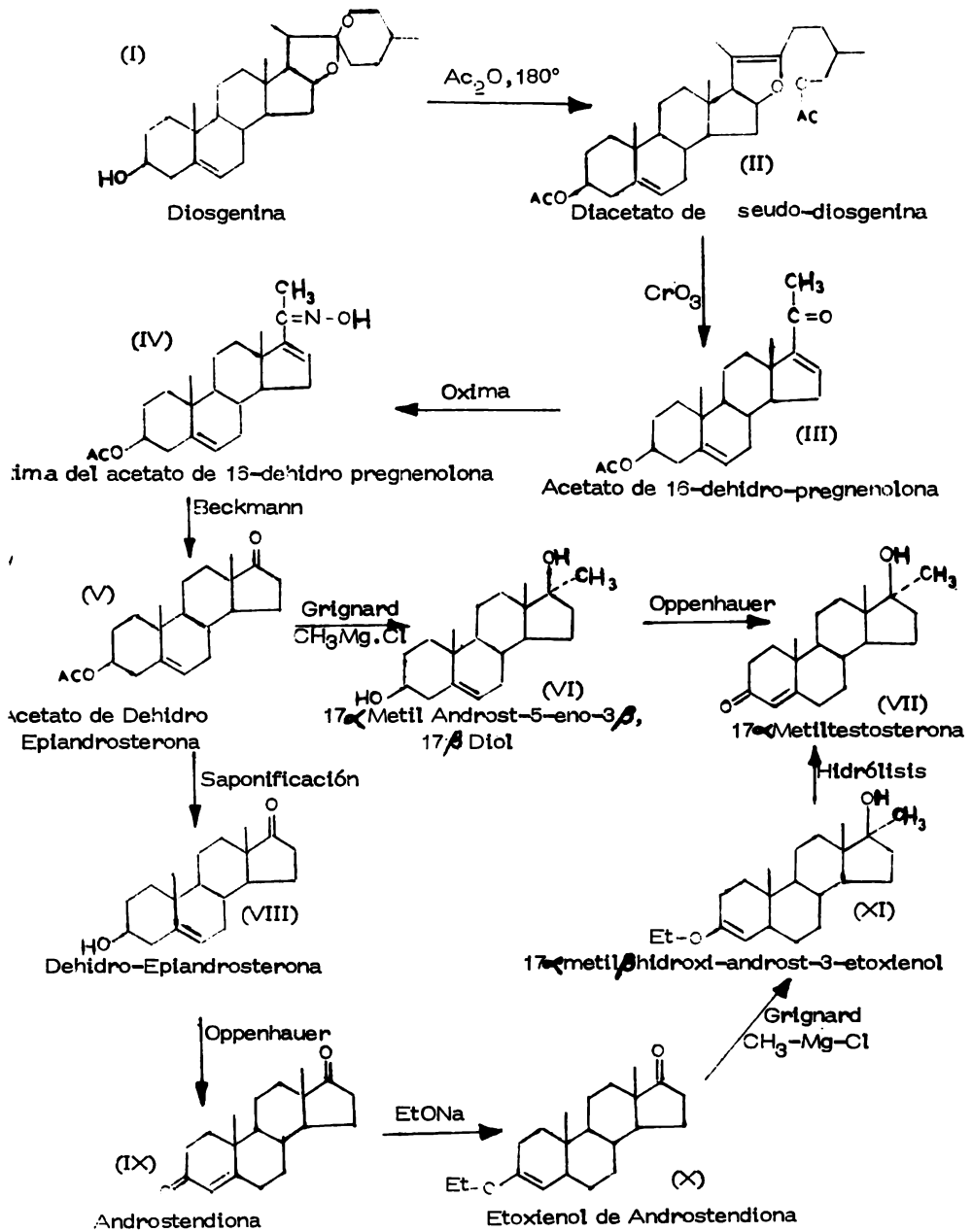


Diagrama II

duce con hidruro de litio y aluminio; la hidrólisis de este compuesto da origen a la 17α metil-androst-5-eno- 3β , 17β -diol (II) y se oxida a 17α metiltestosterona (IV).⁶⁵ (Diagrama I).

La diosgenina, fue aislada por primera vez por investigadores japoneses y fue caracterizada por Marker (1940). Tiene un doble enlace en 5-6 y el material se extrae en grandes cantidades de los rizomas de especies mexicanas de *Dioscorea* (cabeza de negro, barbasco) siendo materia prima muy utilizada en la producción de hormonas esteroídicas como se muestra en el diagrama II.

c) La primera síntesis comprende, a partir de la Diosgenina I, las sustancias indicadas con los números II, III, IV, V, VI y VII.

d) La segunda síntesis comprende, a partir del Acetato de dehidro-epiandrosterona V, las sustancias indicadas con los números VIII, IX, X, XI y VII.

Las dos primeras síntesis mencionadas, se pueden llevar a cabo en el laboratorio y las dos últimas se emplean a nivel comercial, de éstas la más empleada es la indicada en el inciso 'b'.

2. DESCRIPCION DE LOS METODOS CONOCIDOS DE CONTROL PARA METILTESTOSTERONA

Todos los métodos para este tipo de determinación están basados en la propiedad que presenta la metiltestosterona de absorber en el espectro de ultravioleta a una $\lambda_{\text{max.}}$ 240 m μ con una ϵ 16333 o en el infrarrojo mostrando un máximo de \sim 935 cm.⁻¹

a) Metiltestosterona en polvo.

Para la determinación de la metiltestosterona en polvo, se propone el método de espectroscopía en el ultravioleta, empleando como disolvente alcohol etílico y analizarlo bajo las siguientes condiciones:

$E_{1\text{cm.}}^{1\%}$ a un máximo de 241 m μ debe ser de 540.⁶⁶

$E_{1\text{cm.}}^{1\%}$ a un máximo de 240 m μ debe ser de 535.⁷³

$E_{1\text{cm.}}^{1\%}$ a un máximo de 241 m μ debe ser de 530 \pm 10^{69,70}

El empleo de esta técnica requiere por lo general alguna información previa acerca de los grupos funcionales de otros posibles compuestos presentes para que

el espectro de ultravioleta sea útil.

En el caso de los esteroides estos exámenes por lo general sólo investigan diferentes grupos funcionales, por lo que se puede considerar que el método es inespecífico, ya que la mayoría de los esteroides relacionados con la metiltestosterona darían respuestas similares. También debe tenerse presente que podrían permanecer pequeñísimas cantidades de productos relacionados con la síntesis, que no se podrían detectar.

- b) Existe otro método⁶⁷ en el cual se propone un análisis previo de las muestras mediante cromatografía en placa fina. Una vez que se tiene la certeza de la ausencia de compuestos interferentes se lleva a cabo una comparación entre una solución testigo de metiltestosterona y otra de la muestra bajo las siguientes condiciones:

$E_{1\%}^{1\text{cm}}$ a un máximo de 241 debe ser de 540.

Si n embargo, los esteroides seguirán presentándose

en forma inespecífica.

- c) Otro método⁷² propone la formación de derivados con una solución de dinitro-fenil-hidrazina bajo las siguientes condiciones:

$E_{1\text{ cm.}}^{1\%}$ a un máximo de 390 mu.

Si estos derivados se forman en el grupo funcional común, la identificación seguirá siendo difícil para las impurezas.

- d) Metiltestosterona en tabletas.

Para la determinación de metiltestosterona en tabletas, se propone el mismo método de espectroscopía en el ultravioleta, previa extracción del activo. Uno de los métodos propone efectuar la extracción con cloroformo y el otro método con éter.^{60,68} Evaporar a sequedad y disolver el residuo en alcohol etílico y analizarlo bajo las siguientes condiciones:

$E_{1\text{ cm.}}^{1\%}$ a un máximo de 241 mu debe ser de 540.

Al igual que en el caso anterior se presentará una inespecificidad en la identificación y valoración del producto, por las razones antes expuestas, además deberá suponerse que la extracción efectuada es lo suficientemente eficiente.

- e) Otro método para la determinación de metiltestosterona en tabletas⁶⁸ es el basado en la espectroscopía en el infrarrojo. En esta técnica se requiere una extracción previa con éter del activo y después de evaporar y disolver la muestra en disulfuro de carbono se compara la muestra con una solución testigo a una absorbancia de 935 cm^{-1} . El problema de la determinación cuantitativa de la radiación infrarroja no ha sido resuelto totalmente, Por lo tanto la mayoría de los instrumentos comerciales dan lecturas de porcentaje de transmisión, los cuales no son reproducibles de un instrumento a otro. Aún un mismo instrumento puede dar lecturas algo diferentes de un tiempo a otro.

Una de las ventajas que presenta la espectroscopía

18.

en el infrarrojo es el esclarecimiento de las estructuras de los componentes de la muestra, sin embargo, esta técnica sólo puede detectar componentes en concentraciones arriba del 2% aproximadamente. En el presente caso, si las estructuras son muy similares como lo son los esteroides, una mínima cantidad no puede ser detectada como impureza.

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

I. Extracción.

De acuerdo a la información recabada en la literatura se seleccionó la técnica descrita por Carol,⁷² en la cual se toma un número determinado de tabletas - por ejemplo 10 table-tas - y se pesan y pulverizan finamente. Una porción de este polvo, equivalente a 10 mg. de metiltestosterona, se transfiere cuantitativamente a un embudo de separación de 125 ml., que contiene 25 ml. de agua y 25 ml. de éter; la mezcla se agita durante un minuto, se dejan separar las capas y el extracto acuoso se transfiere a un segundo embudo de separación de 125 ml. que contiene 25 ml. de éter. La extracción se repite y el extracto acuoso se transfiere a un tercer embudo de separación de 125 ml. que contiene 25 ml. de éter, en donde se repite la extracción. La capa acuosa

se desecha. Los extractos integrados se lavan sucesivamente con 5 ml. de una solución saturada de bicarbonato de sodio y dos porciones de 5 ml. de agua destilada, desechando los extractos acuosos. La capa etérea se transfiere a un matraz de 150 ml. y se evapora a sequedad en baño de agua. Al residuo obtenido se le añaden 2 ml. de la solución del estándar interno, con el objeto de obtener una concentración de 5 mg/ml. de metiltestosterona y 5 mg/ml. del estándar interno.

II. Análisis por cromatografía en fase de vapor.

a) Líquidos de partición ensayados.

De acuerdo a la tensión de vapor de la metiltestosterona, su estructura química y su peso molecular se ensayaron las siguientes columnas.

Metilsilicón, OV-1 (Regis, Austin, Morton Grove, I11. U. S.A.). El empaque de esta columna se preparó usando como soporte, Chromosorb W, HP AW-DMCS, de 100 - 120 mallas. Se pesaron 0.08 g. de la fase líquida OV-1 y se di

solvieron en 60 ml. de cloroformo. A continuación se agregaron 3.92 g. del soporte mencionado con el fin de que el empaque presentara una concentración de líquido de partición de 2%. A continuación el recipiente empleado se adapta a un evaporador rotatorio, con el objeto de obtener un empaque homogéneo y seco.

La columna seleccionada consistió en un tubo de vidrio de 6 ft. x 1/4" que se lavó con ácido clorhídrico, agua destilada, acetona y por último se seca perfectamente. Se procede a llenar la columna ya limpia, mediante un embudo y vibración adecuada hasta que quede empacada firmemente; finalmente los extremos de la columna se cierran con lana de vidrio y se adapta al cromatógrafo.

Se acondiciona la columna calentando el horno del cromatógrafo a la temperatura a la que se efectúa el análisis y con el flujo del gas acarreador seleccionado (nitrógeno), por 12 - 24 horas para remover cualquier producto volátil. Es necesario este procedimiento para evitar cualquier contaminación en el detector y para estabilizar la línea base del registrador y obtener un buen cromatograma.

Al mismo tiempo intentaron separaciones de la muestra en columnas de OV-17 al 1%, 2% y 3%. Se siguió la técnica antes descrita para la preparación de estas columnas.

b) Condiciones de operación.

Todos los resultados descritos en el presente trabajo fueron determinados en el mismo tipo de columna. Las columnas OV-1, han sido empleadas para efectuar cerca de 1000 cromatogramas de muestras de esteroides. A intervalos de 1 - 2 meses, las partes terminales de la columna se pueden remplazar, por empaque de material nuevo. Este procedimiento restablece la sensibilidad y reduce "las cosas" causadas por la acumulación de productos de descomposición que se acumulan al final de la columna.

Para la columna OV-1 al 2% las mejores condiciones de operación encontradas fueron las siguientes: temperatura de la columna: 225°C; temperatura del inyector: 250°C; temperatura del detector: 250°C; flujo del gas acarreador (nitrógeno): 50 ml/min.

La columna OV-17 se ensayó bajo diferentes condiciones de

operación que fueron las siguientes: temperatura de la columna: 200°C; temperatura del inyector: 220°C; temperatura del detector: 220°C; flujo del gas acarreador (nitrógeno): 30 mL/min. Se variaron las condiciones de operación a: temperatura de la columna: 250°C; temperatura del inyector: 280°C; temperatura del detector: 280°C; flujo del gas acarreador (nitrógeno): 40 mL/min. Se observó que la respuesta obtenida no era nuevamente la adecuada, por lo que se suspendió el estudio en esta columna y se continuó en la columna OV-1.

c) Determinación del tiempo de Retención.

La medición para determinar el tiempo de retención se llevó a cabo en forma relativa. Los tiempos de los diversos componentes se hicieron coincidir con las distancias entre la inyección de la muestra y el máximo de la señal correspondiente.

Posteriormente estas distancias se relacionaron a la distancia correspondiente a la señal del estándar interno (progesterona).

d) Muestra Tipo de Metiltestosterona.

Se partió originalmente de dos muestras de metiltestosterona obtenidas comercialmente.

1) Muestra "a", purificada cuyo grado de pureza se indica en el marbete en un 98%.

2) Muestra "b", sin purificar. Su aspecto difería de la primera muestra por lo que se procedió a determinar sus constantes fíísicas con los siguientes resultados: punto de fusión: 146° - 148°C. El punto de fusión informado en las diferentes farmacopeas es de 163° - 168°C. Solubilidad: soluble en agua, alcohol etíílico, alcohol metíílico, éter; es escasamente soluble en aceites vegetales.

La muestra "b", se recristalizó en alcohol etíílico-agua tres veces consecutivas y se determinó en cada caso el punto de fusión con los siguiente resultados:

1a recristalización p.f. 149° - 153°C.

2a recristalización p.f. 150° - 155°C.

3a recristalización p.f. 163° - 167°C.

Una vez purificada la substancia se comparó cromatográficamente con los resultados obtenidos con la muestra "a". El resultado obtenido fue satisfactorio, ya que en el cromatograma se observó una respuesta similar y al compara la relación de las áreas obtenidas se pudo constatar que el grado de pureza obtenido era igual para ambas muestras (Columna OV-1 al 2%).

Las impurezas detectadas son posibles productos intermedios de la síntesis de la metiltestosterona.

III. Método Propuesto.

a) Materiales y técnica.

Solución testigo de metiltestosterona.

Solución de Progesterona (estándar interno).

Alcohol etílico. R. A.

Eter. R. A.

Bicarbonato de sodio. R. A.

Cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama.

Columna de vidrio de 6 ft. x 1/4" empacada con OV-1 al 2% (Regis, Austin, Morton Grove, I11, U. S. A.) sobre Chromosorb W, HP-AW-DMCS, de 100 - 120 mallas.

Jeringa de 10 ul.

Embudos de separación de 125 ml.

Matraces volumétricos de 25 ml. y 50 ml.

Pipetas volumétricas de 1 ml., 2 ml. y 5 ml.

Vasos de precipitados de 250 ml.

b) Soluciones.

Estándar interno, solución de progesterona. Se pesan 250 mg. de progesterona y se transfieren cuidadosamente a un matraz volumétrico de 50 ml.; se lleva a este volumen con alcohol etílico. La conceno

tración obtenida es de 5 mg/ml.

Solución testigo. Se pesan 125 mg. de metiltestosterona y se transfieren cuidadosamente a un matraz volumétrico de 25 ml.; se lleva a este volumen con la solución de progesterona. La concentración obtenida de ambas sustancias es de 5 mg/ml.

Solución de metiltestosterona. Se pesan 1000 mg. de metiltestosterona y se transfieren cuidadosamente a un matraz volumétrico de 10 ml.; se lleva a este volumen con alcohol etílico. La concentración obtenida es de 100 mg/ml. De esta solución se preparan diferentes diluciones para obtener las concentraciones que se muestran en la tabla I.

TABLA I

| | Volumen de Solución de Metiltestosterona ml. | Volumen Final con Solución de Progesterona ml. | Concentración Final de Metiltestosterona mg/ml. | Concentración Final de Progesterona mg/ml. |
|---|--|--|---|--|
| a | 1.0 | 10 | 10 | 5.0 |
| b | 0.5 | 10 | 5 | 5.0 |
| c | 0.3 | 10 | 3 | 5.0 |
| d | 0.2 | 10 | 2 | 5.0 |
| e | 0.1 | 10 | 1 | 5.0 |
| f | * 0. | 10 | 0.5 | 5.0 |
| g | * 0.1 | 10 | 0.1 | 5.0 |

* de solución "a".

c) Extracción.

Se toma un número determinado de tabletas – por ejemplo 10 tabletas – y se pesan y pulverizan finamente. Una porción de este polvo, equivalente a 10 mg. de metiltestosterona, se transfiere cuantitativamente a un embudo de separación de 125 ml., que contiene 25 ml. de agua y 25 ml. de éter; la mezcla se agita durante un minuto, se dejan separar las capas y el extracto acuoso se transfiere a un segundo embudo de separación de 125 ml. que contiene 25 ml. de éter. La extracción se repite y el extracto acuoso se transfiere a un tercer embudo de separación de 125 ml. que contiene 25 ml. de éter, en donde se repite la extracción. La capa acuosa se desecha. Los extractos integrados se lavan sucesivamente con 5 ml. de una solución saturada de bicarbonato de sodio y dos porciones de 5 ml. de agua destilada, desechando los extractos acuosos. La capa etérea se transfiere a un matraz de 150 ml. y se evapora a sequedad en baño de agua.

Al residuo obtenido se le añaden 2 ml. de la solución del estándar interno, con el objeto de obtener una concentración de 5 mg./ml. de metiltestosterona y 5 mg./ml. de estándar interno.⁷²

d) Análisis cromatográfico.

En el cromatógrafo de gases con la columna descrita y a las siguientes condiciones de operación: temperatura de la columna: 225°C; temperatura del inyector: 250°C; temperatura del detector: 250°C; flujo del gas acarreador (nitrógeno); 50 ml./min., se inyectan 2 ul. alternadamente, de la solución problema y la solución testigo, hasta obtener 3 cromatogramas de cada una de las soluciones.

e) Análisis cualitativo.

La identificación de las señales que aparecen en el cromatograma, se lleva a cabo mediante los tiem-

pos de retención relativos, los cuales aparecen anotados en la tabla II. Los compuestos androstendiona y metilandrostandiona se encuentran probablemente como impurezas.

TABLA II

| Tiempo de Retención Relativo a la Progesterona | |
|--|--------|
| Metilandrostandiona | 0.53 |
| Androstendiona | 0.61 |
| Metiltestosterona | 0.69 |
| Testosterona | 0.90 |
| Progesterona | 1.00 * |

* Estándar Interno

f) Análisis cuantitativo.

En los cromatogramas obtenidos se calculan las áreas de la metiltestosterona y la progesterona; con el promedio de estos valores se calcula el peso de la metiltestosterona por tableta, según la fórmula:

Peso de Metiltestosterona por tableta (mg.)=

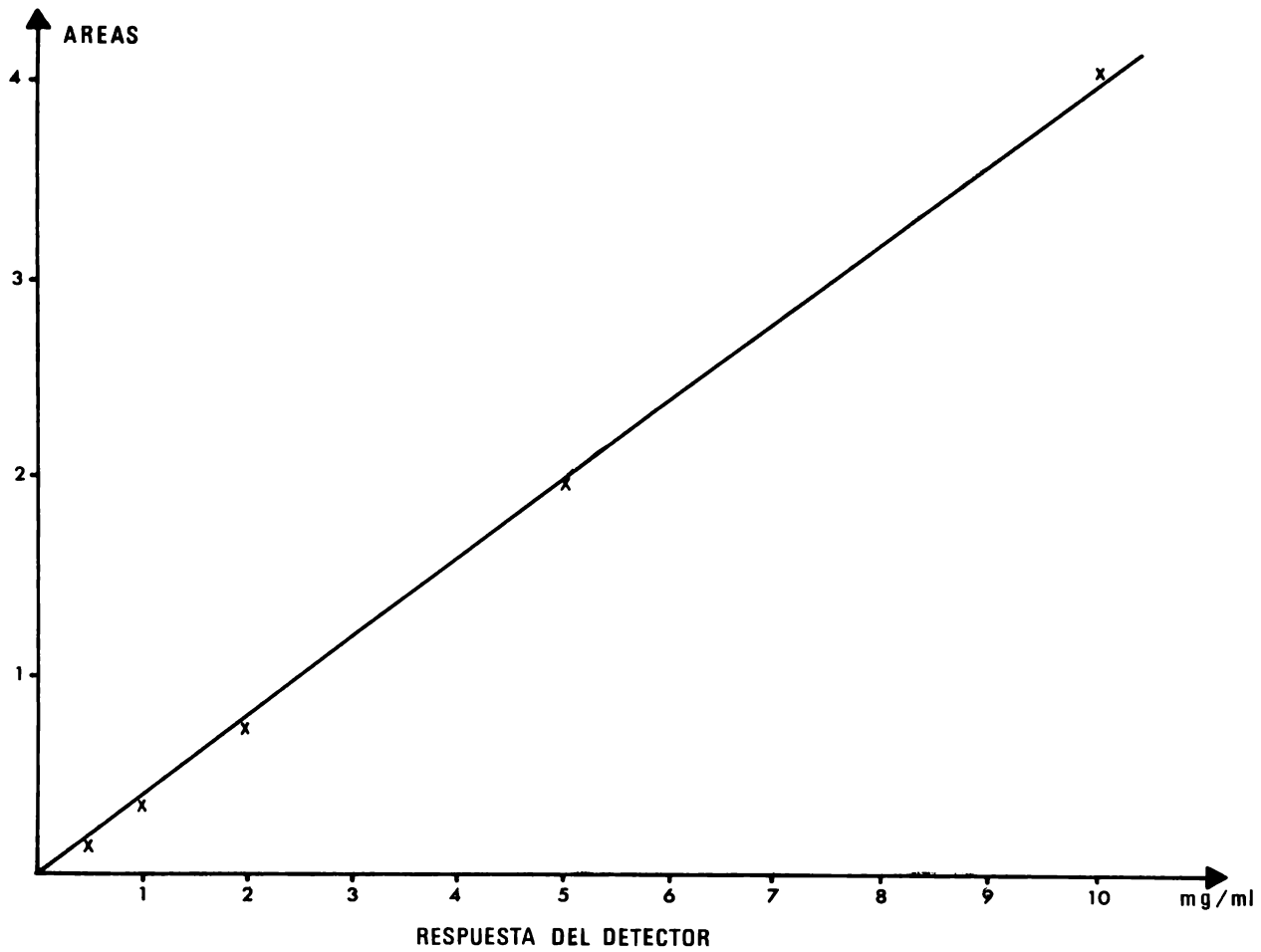
$$\frac{\text{Area m.t. prob.}}{\text{Area prog. prob.}} \times \frac{\text{Area prog. est.}}{\text{Area m.t. est.}} \times$$

$$\times \frac{(\text{Conc. m.t. est.})(V \text{ final prob.})}{\text{Número de tabletas}} \times$$

$$\times \frac{1}{0.933}$$

g) Curva de Calibración.

Empleando las soluciones que se indican en la tabla I, se obtiene la curva de calibración y se determina la linealidad de la respuesta del detector, obteniéndose la relación que aparece en la gráfica I.



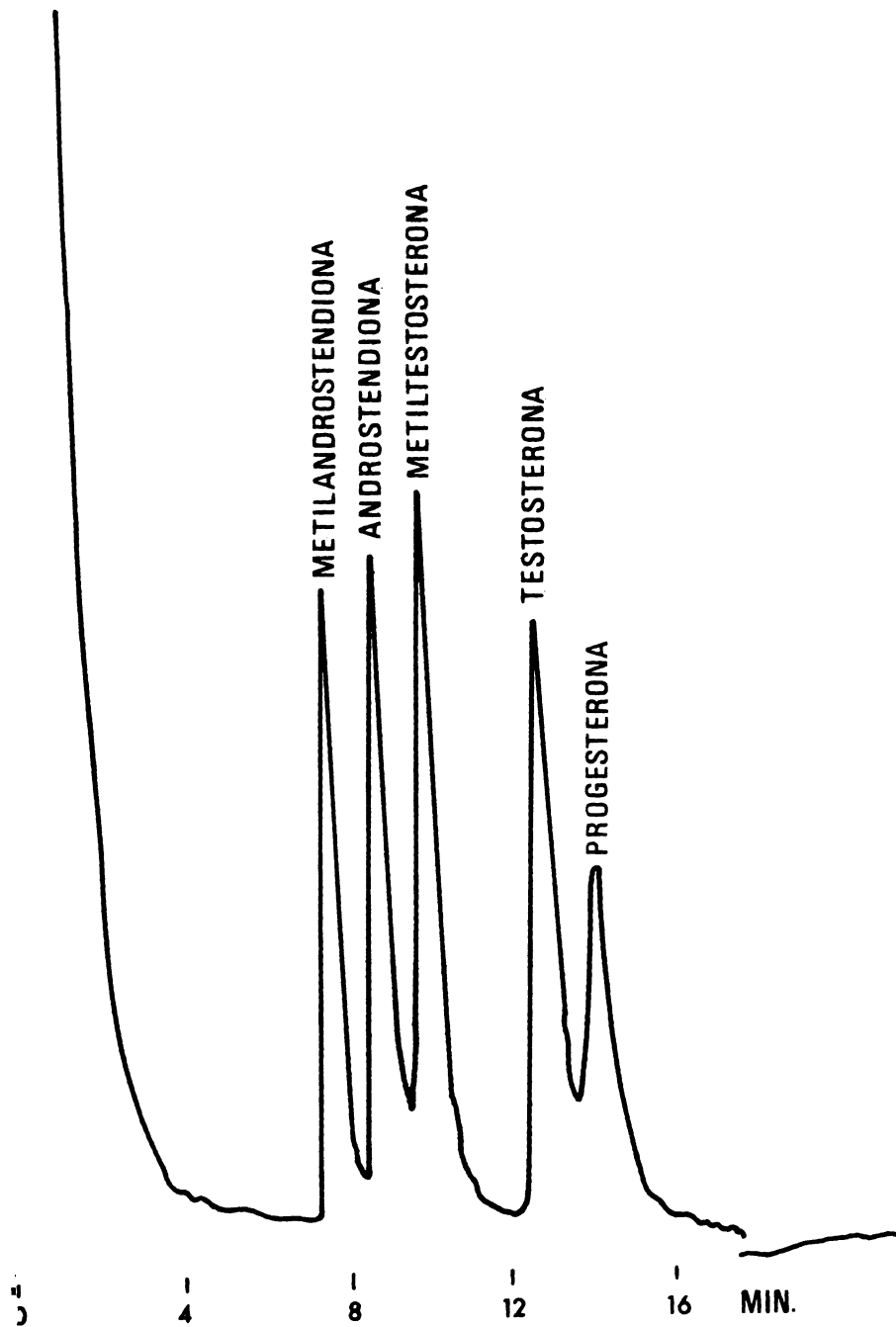
CAPITULO IV

DISCUSION

Para estudiar las características del método se realizaron las siguientes pruebas:

- a) Resolución. La separación de los compuestos estudiados, se puede observar en la figura I.
- b) Respuesta del Detector. La determinación cuantitativa, utilizando la fórmula ya indicada, solo es posible si la respuesta del detector es lineal en el intervalo de concentración con el que se trabaja. Para esto se estudió un intervalo de concentraciones entre 0.1 y 10 mg. / ml., obteniéndose la relación que aparece en la gráfica I, cuyo coeficiente de regresión lineal es de 0.996
- c) Reproducibilidad. Para determinar la reproducibilidad del método se emplearon 10 tabletas, las que se

FIGURA 1



pulverizaron finamente, se tomaron alícuotas que contenían 10 mg. y se analizaron según la técnica propuesta. Los resultados obtenidos se indican en forma agrupada en la Tabla III.

| | |
|--------------------------------|-------|
| Media aritmética (\bar{X}) | 9.980 |
| Desviación típica (s) | 0.432 |
| Varianza (S^2) | 0.186 |
| Intervalo de confianza 0.99 | 0.421 |

TABLA III

- d) Eficiencia. Para establecer la eficiencia del método se procedió de la siguiente manera: se tomó un lote de 10 tabletas, se pulverizaron finamente y se tomaron porciones de este polvo que contenían 10 mg. de metiltestosterona. A estas alícuotas se les añadieron respectivamente 0, 1, 3 y 5 mg. de metiltestosterona (98%). Las muestras se prepararon por duplicado y se analizaron según la técnica propuesta.

Con los resultados encontrados se calculó la eficiencia, obteniéndose en promedio un valor de 93.8%.

Por esta razón aparece el factor de corrección $1/0.938$, en la fórmula indicada.

e) Cantidad mínima detectable de las impurezas.

La posibilidad de indentificación y determinación cuantitativa de impurezas es una parte importante que se presenta en este método ya que, empleando el método de ultravioleta, de eficiencia probada, no es fácil el poder detectar con precisión otros productos esteroidales.⁶⁷ Por otra parte empleando la misma técnica de extracción, al efectuar el análisis de una muestra que contenía el producto activo y las impurezas en el infrarrojo, no fue posible determinar estas últimas como se muestra en los siguientes espectros:

Ia. Muestra con impurezas.

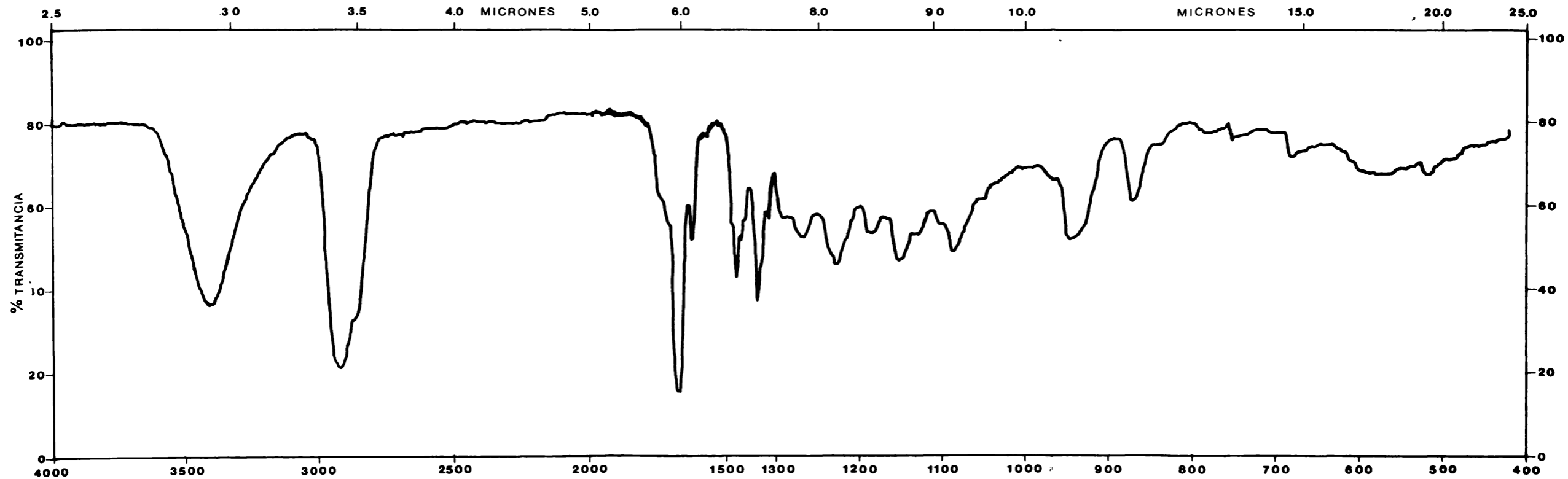
Ib. Metiltestosterona.

Ic. Metilandrosterona.

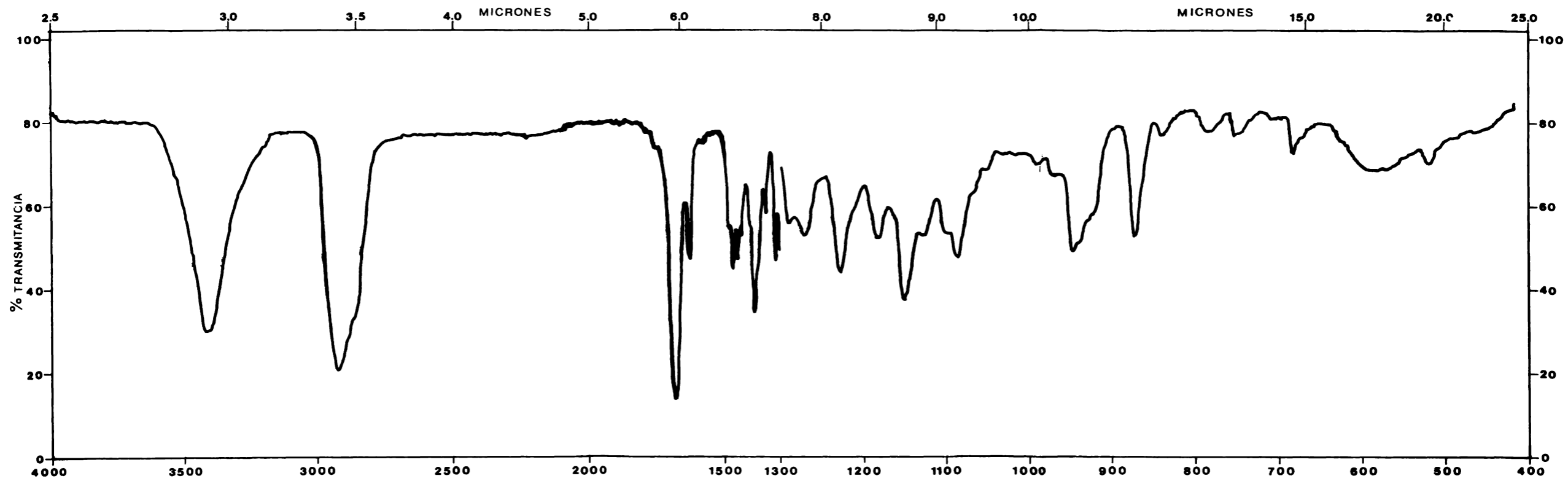
Id. Androsterona.

Es posible detectar androstendiona y metilandrosterona, que se pueden encontrar impurificando este producto, cuando se encuentran en cantidad mayores de $10^{-2}\%$ y $10^{-3}\%$ respectivamente, de la metiltestosterona. (Figura II). Para determinar estos valores se efectuaron diluciones con las sustancias puras, hasta que no se obtuvo respuesta adecuada en el cromatograma, por confundirse ésta con la señal del disolvente a una atenuación de 1×10^{-10} amp. / mV.

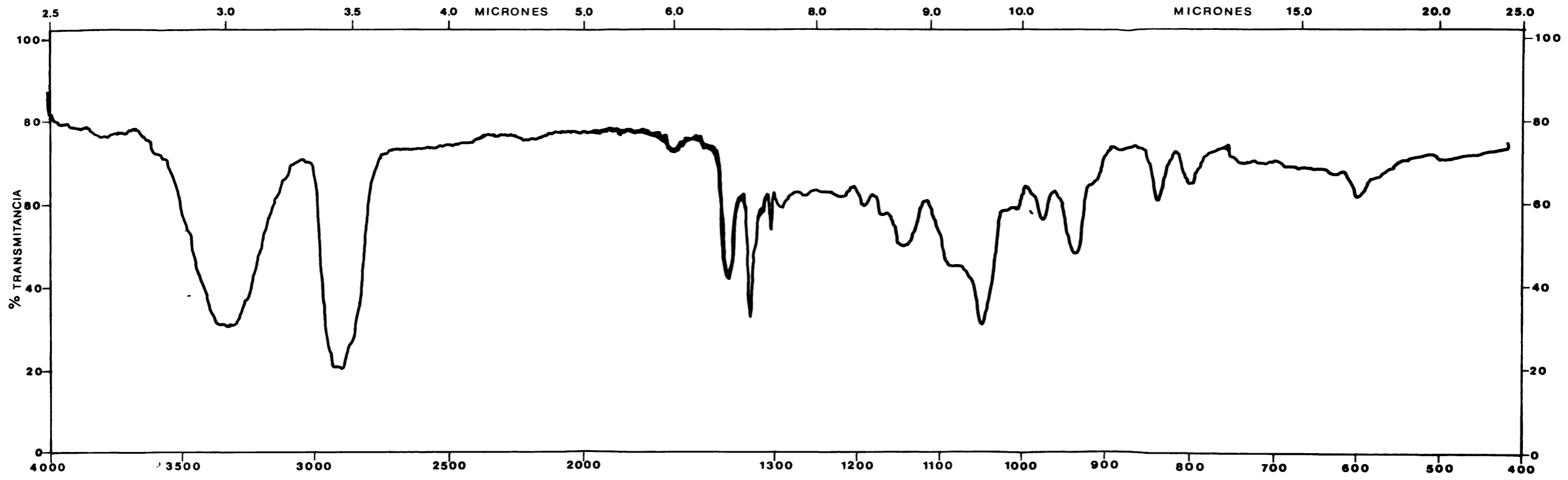
- f) Extracción. El método de extracción es el propuesto y aceptado para otras técnicas de análisis del fármaco en cuestión.⁷²



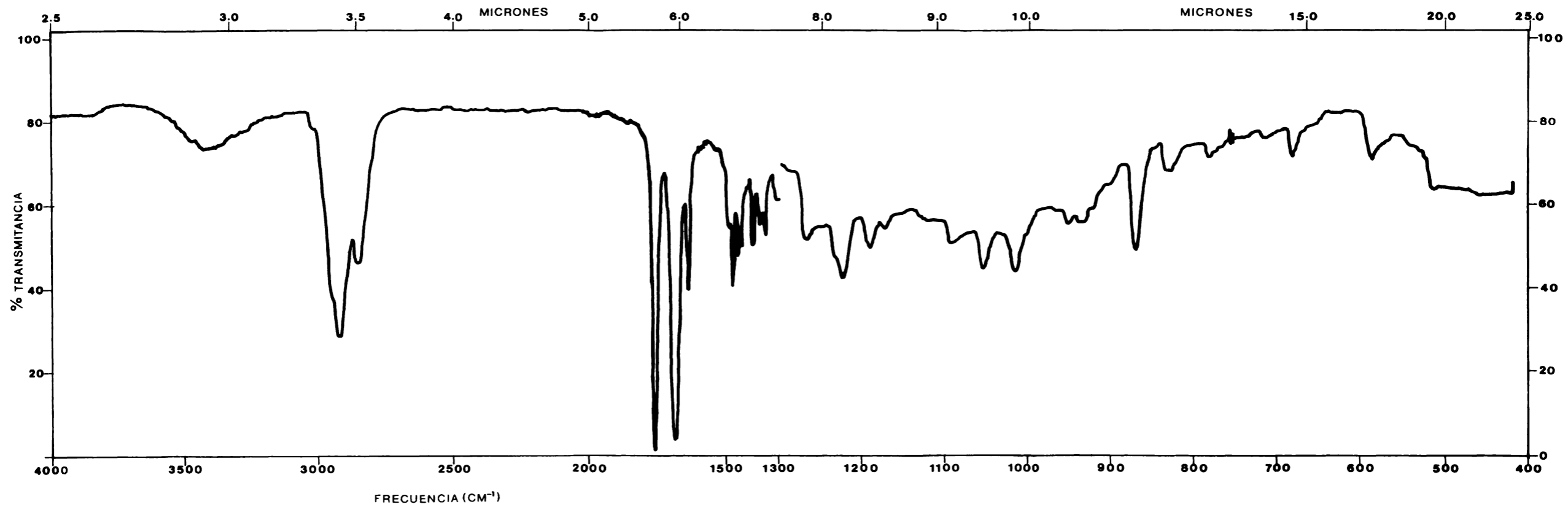
Ia. Muestra con impurezas



Ib. Methyltestosterona

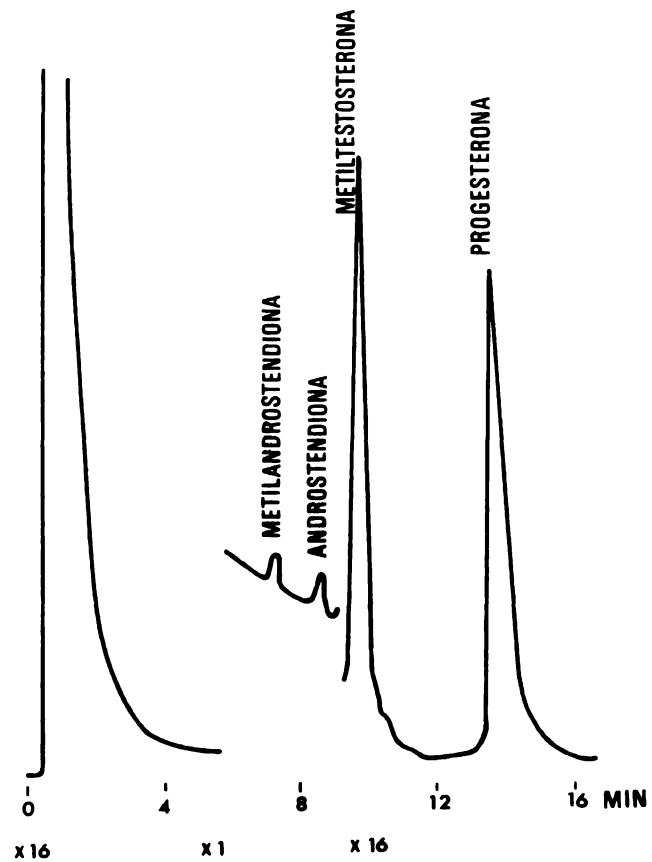


Ic. Metilandrostediona



Id. Androstendiona

FIGURA II



IMPUREZAS EN UNA MUESTRA DE M.T.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

Se propone un método de análisis de metiltestosterona en fármacos por C.F.V., con las siguientes características:

- 1) Columna de vidrio empacada con OV-1 al 2%. Se han empleado otros tipos de columnas en análisis de C.F.V. como son SE-30, XE-60,¹⁵ QF-1,¹⁶ para la elución de la metiltestosterona, pero no se informa de la separación de los otros compuestos aquí estudiados.
- 2) En la reproducibilidad de los datos, se observó un error relativo máximo de 4.4%, para un intervalo de confianza de 0.99
- 3) La eficiencia del método es de 93.8% y se supone que esta limitación se debe al método de extracción seguido.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

1. Horning, E. C., W. J. A. Vanden-Heuvel y B. G. Creech, Meth. Biochem. Anal., 11, 1963.
2. Eglinton, G., R. J. Hamilton, R. Hodges y R. A. Raphael, Chem. & Ind., 955, Londres, 1959.
3. Beerthuis, R. K., y J. H. Recourt, Nature, 186, 372, 1960.
4. Sweeley, C. C., y E. C. Horning, Nature, 187, 144, 1960.
5. VandenHeuvel, W. J. A., C. C. Sweeley y E. C. Horning, J. Am. Chem. Soc., 82, 3481, 1960.
6. Wotiz, H. H., y H. F. Martin, Abstr. Amer Chem. Soc. Meeting, Nueva York, Septiembre, 1960.
7. Nicolaidis, N., J. Chromatog., 4, 496, 1960.
8. Chen, C. y C. D. Lantz, Biochem. Biophys. Research Commun., 3, 182, 1960.
9. Horning, E. C., E. A. Moscatelli y C. C. Sweeley, Chem & Ind., 751, Londres, 1959.
10. VandenHeuvel, W. J. A., E. O. A. Haahti y E. C. Horning, J. Am. Chem. Soc., 83, 1513, 1960
11. Haahti, E. O. A., W. J. A. VandenHeuvel y E. C. Horning, Anal. Biochem., 2, 344, 1961.

12. VandenHeuvel, W. J. A., B. G. Creech y E. C. Horning, Anal. Biochem., 4, 191, 1962.
13. Ellin, R. I., A. I. Mendeloff y D. A. Turner, Anal. Biochem., 4, 198, 1962.
14. Wells, W. W., y M. Makita, Anal. Biochem., 4, 204, 1962.
15. Clayton, R. B., Nature, 190, 1071, 1961.
16. Clayton, R. B., Nature, 192, 524, 1961.
17. Clayton, R. B., Biochemistry, 1, 357, 1962
18. Böttcher, C. J. F., y J. W. A. Meijer, J. Chromatog., 6, 535, 1961.
19. Wotiz, H. H. y H. F. Martin, J. Biol. Chem., 236, 1312, 1961.
20. VandenHeuvel W. J. A., C. C. Sweeley y E. C. Horning, en "Symposium on Drugs Affecting Lipid Metabolism", ed. S. Garattini y R. Paoletti, Elsevier, p. 196, 1961.
21. VandenHeuvel, W. J. A., J. Sjövall y E. C. Horning, Biochim. Biophys. Acta, 48, 596, 1961.
22. Luukkainen, T., W. J. A. VandenHeuvel, E. O. A. Hahti y E. C. Horning, Biochim. Biophys. Acta, 52, 599, 1961.
23. VandenHeuvel, W. J. A., C. C. Sweeley y E. C. Horning, Biochem. Biophys. Research Commun., 3, 33, 1960.
24. Sjövall, J., C. R. Meloni y D. A. Turner, J. Lipid Research, 2, 317, 1961.
25. Blomstrand, R., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 107, 126, 1961.
26. Holmes, W. L. y E. Stack, Biochim. Biophys. Acta, 56, 163, 1962.
27. Kuksis, A. y B. A. Gordon, Can. J. Biochem. Physiol., 41, 1355, 1963.

28. Sjövall, J., Acta Chem. Scand., 16, 1761, 1962.
29. Sjövall, J., D. Sandberg, K. Sjövall y D. A. Turner, Federation Proceedings, 22, Part I, 198, 1963.
30. Makita, M. y W. W. Wells, Anal. Biochem., 5, 523, 1963.
31. VandenHeuvel, W. J. A., y E. C. Horning, Biochem. Biophys. Research Commun., 3, 356, 1960.
32. Kirschner, M. A. y H. M. Fales, Anal. Chem., 34, 1548, 1962.
33. Merits, I., J. Lipid Research, 3, 126, 1962.
34. Wotiz, H. H., I. Naukkarinen y H. E. Carr, Jr., Biochim. Biophys. Acta, 53, 449, 1961.
35. Kliman, B., y D. W. Foster, Anal. Biochem., 3, 403, 1962.
36. Carr, H. E. y H. H. Wotiz, Biochim Biophys. Acta, 71, 178, 1963.
37. Horning, E. C., W. J. A. VandenHeuvel y B. G. Creech, in "Methods of Biochemical Analysis", XI, ed. D. Glick, Interscience, Nueva York, 1963.
38. Wotiz, H. Y., y H. F. Martin, Anal. Biochem., 3, 97, 1962.
39. Hartman, I. S. y H. H. Wotiz, Steroids, 1, 33, 1963.
40. DePaoli, J. C. E. Nishizawa y K. B. Eik-Nes, J. Clin. Endocrinol. Met., 23, 81, 1963.
41. Kischner, M. A., y M. B. Lipsett, J. Clin. Endocrinol. Met., 23, 255, 1963.
42. Futterweit, W., N. L. McNiven, L. Marcus, C. Lantos, M. Drosdowsky y R. I. Dorfman, Steroids, 1, 628, 1963
43. Sparagana, M., E. H. Keutman y W. B. Mason, Anal. Chem., 35, 1231, 1963.

44. Supina, W. R., Anal. Chem., 35, 1304, 1963.
45. Cooper, J. A., J. P. Abbott, B. K. Rosengreen y W. R. Claggett, Am. J. Clin. Pathol., 38, 388, 1962.
46. Seegar Jones, G. E., D. Turner, I. J. Sarlos, A. C. Barnes y R. Cohen, Fertility and Sterility, 13, 544, 1962.
47. Turner, D., G. E. Seegar Jones, I. J. Sarlos, A. C. Barnes y R. Cohen, Anal. Biochem., 5, 99, 1963.
48. Wotiz, H. H., Biochim. Biophys. Acta, 69, 415, 1963.
49. Patti, A. A., P. Bonnano, A. Stein y T. Frawley, Am. J. Clin. Pathol., 39, 399, 1963.
50. Patti, A. A., P. Bonnano, T. F. Frawley y A. A. Stein, Acta Endocrinol., Suppl. 77, 1963.
51. Futterweit, W., N. L. McNiven y R. I. Dorfman, Biochim. Biophys. Acta, 71, 474, 1963.
52. Bender, S. R. y H. S. Kroman, Circulation, 26, 645, 1962.
53. Kroman, H. S., y S. R. Bender, J. Chromatog., 10, 111, 1963.
54. Martin, A. J. P., Biochem. Soc. Symposia, 3, 4, Cambridge 1949.
55. Bate-Smith, E. C. y R. C. Westall, Biochim. Biophys. Acta, 4, 427, 1950.
56. VandenHeuvel, W. J. A. y E. C. Horning, Biochim Biophys. Acta, 64, 416, 1962.
57. Woodford, F. P. y C. M. Van Gent, J. Lipid Research, 1, 188, 1960.
58. Brooks, C. J. W. y L. Hanaineh, Biochem. J., 87, 151, 1963.
59. Horning, E. C., W. J. A. VandenHeuvel y B. G. Creech, Meth. Biochem. Anal., 11, 1963.

60. Clayton, R. B., Nature, 192, 524, 1961.
61. Clayton, R. B., Nature, 192, 526, 1961.
62. Clayton, R. B., Anal. Biochem., 1, 357, 1962.
63. M. R. C. Steroid Reference Collection.
64. Ruzicka et al., Helv. Chim. Acta, 18, 1487, 1935.
65. Rodd's Chemistry of Carbon Compounds, ed. S. Coffey, Segunda edición, Amsterdam, Elsevier, vol. II, p. 268, 1960.
66. European Pharmacopoeia, Council of Europe, ed. Maisonneuve, S. A., 10a. ed., París, p. 301, 302, 1971.
67. The National Formulary, American Pharmaceutical Association, N. F. XIII, Washington, D. C., p. 455, 456, 1970.
68. Higuchi Takeru y Einar Brachmann-Hanssed, Pharmaceutical Analysis, ed. Interscience Publishers, Nueva York, p. 93, 94, 1961.
69. Farmacopea Ufficiale della Republica Italiana, ed. Istituto Poligrafico dello Stato, P. V., 8a. ed., Roma, vol. II, p. 708, 709, 1970.
70. Pharmacopée Francaise, Editée sous la direction de la Commission permanente de la Pharmacopée, Par l'ordre national de Pharmaciens, 8a. ed., París, p. 702, 703, 1965.
71. British Pharmacopoeia, General Medical Council, ed., The Pharmaceutical Press, Londres, p. 500, 501, 1022, 1023, 1963.
72. Carol, J. J., Assoc. Official Agric. Chem. J., 34, 572, 1951.
73. Brooks, J. W. y Hanaineh, L., Biochem. J., 87, 151. 1963.
74. Clarke, E. G. C., Isolation and Identification of Drugs, ed. Pharmaceutical P., Londres, p. 426, 1969.

50.

75. Drefahl, G., et al., Ber., 97, 3529, 1964.