

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DE CEFALOTINA SODICA
INTENTO PARA ESTABLECER UNA SUBSTANCIA
DE REFERENCIA SECUNDARIA

279

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A

NORMA ALICIA PEREZ FLORES



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.

CLAS. Tesis
ADQ. 1975
FECHA 1975
PROC. M7 264



QUÍMICA

JURADO ORIGINALMENTE ASIGNADO SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE: DR. JF. RAMON ULACIA ESTEVE.
VOCAL: PROF. ETELVINA MEDRANO DE JAIMES.
SECRETARIO: PROF. MARIO MIRANDA CASTRO.
1er. SUPLENTE: PROF. ALFREDO GARZON SERRA.
2º . SUPLENTE: PROF. HECTOR JARA FARJEAT.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIOS ELI LILLY Y CIA. DE MEXICO, S. A. DE C. V.

SUSTENTANTE: NORMA ALICIA PERES FLORES.
ASESOR DEL TEMA: ETELVINA MEDRANO DE JAIMES.

CON TODO CARIÑO

A MIS PADRES Y HERMANOS.

HOMERO PEREZ SALINAS.
ALICIA FLORES DE PEREZ.
LAURA PEREZ FLORES.
HOMERO PEREZ FLORES.

A MI ABUELITA.

MA. DE JESUS BARBA.

A MI ESPOSO.

PABLO ARTURO CRUZ YAÑEZ.

HAGO PATENTE MI AGRADECIMIENTO
A LOS LABORATORIOS ELI LILLY Y
CIA. DE MEXICO, S. A. DE C. V. POR
LAS FACILIDADES QUE ME BRINDARON
PARA REALIZAR EL PRESENTE TRABA-
JO.

INDICE.

INTRODUCCION	1
I GENERALIDADES.	7
II ESPECIFICACIONES FUNDAMENTALES DE LA CEFALOTINA SODICA.	21
III PARTE EXPERIMENTAL.	27
IV CONCLUSIONES.	68
BIBLIOGRAFIA.	

INTRODUCCION

Hace mucho tiempo que en los ensayos oficiales se piden sustancias de referencia. En los últimos 20 años, se han introducido cientos de estas sustancias que se emplean para pruebas químicas, así como para valoraciones tanto químicas como biológicas.

Existen varias organizaciones que se han dedicado, desde hace muchos años, a la elaboración y distribución de patrones de referencia reconocidos mundialmente, entre las que tenemos:

El Comité de Sustancias de Referencia USP, el Code of Federal Regulations, el National Formulary, la Farmacopea Británica y la Organización Mundial de la Salud.

Las primeras sustancias de referencia USP, fueron establecidas para los ensayos biológicos contenidos en la USP X, que apareció en 1926. En la USP XIV (1950), ya aparecían 40 sustancias de referencia, muchas de las cuales estaban indicadas para pruebas y valoraciones químicas. Desde entonces el número se ha ido incrementando continuamente, y ya la USP XVIII marca 240 patrones de referencia.

El desarrollo en el National Formulary (NF) ha sido semejante. En el NF IX (1950), el número de patrones de referencia fue de 5, aumentó a 42 en el NF IX (1960); a 91 en el NF XII y a 238 en el NF XIII.

En el Code of Federal Regulations se mencionan 50 patrones de referencia para antibióticos de la Food and Drug Administration (FDA). A pesar de que algunos de ellos son idénticos a los patrones de referencia USP y NF, con ellos se llega a una cantidad de cerca de 500 sustancias de referencia en los E.U.A.

En la British Pharmacopoeia se mencionaron por primera vez, sustancias de referencia para pruebas químicas, en la edición de 1963. Los llamados especímenes auténticos, se introdujeron para las identificaciones con infrarrojo y posteriormente para los ensayos fotométricos de formas farmacéuticas. Los primeros especímenes se establecieron en 1964 y son distribuidos por la British Pharmacopoeia Commission. Actualmente hay más de 260 especímenes.

Las sustancias químicas de referencia británicas, forman otra

clase de patrones de referencia que se mencionan en la British Pharmacopoeia. Estos patrones químicos de referencia son materiales altamente purificados, con cada uno de los cuales se provee un protocolo completo de análisis.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha sido, desde hace mucho tiempo, uno de los principales proveedores de sustancias de referencia. Actualmente han sido establecidos más de 270 patrones biológicos de referencia internacionales y más de 40 patrones químicos de referencia internacionales.

Por el desarrollo que han tenido las sustancias de referencia y la importancia que han adquirido en los análisis farmacéuticos, nos podemos dar cuenta que hay una tendencia evidente hacia un aumento en el número de estas sustancias. Además, con la introducción de técnicas de valoración automatizadas, puede predecirse que se van a necesitar patrones de referencia para la mayoría de los fármacos. Es por esto que existe una necesidad obvia de aumentar la cooperación internacional en este campo. En los últimos años se han desarrollado programas de colaboración entre las Comisiones Farmacopéicas nacionales,

las Instituciones que se dedican al establecimiento de sustancias de referencia y la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Hace algunos años, que en varios países, se han venido desarrollando programas para establecer sustancias de referencia nacionales. Así tenemos el caso de India, Japón, Hungría, etc., en cuyas Farmacopeas se mencionan ya varios patrones de referencia nacionales.

En México también se ha desarrollado un programa para la elaboración de sustancias de referencia nacionales, el cual está a cargo del Comité Mexicano de Sustancias Farmacéuticas de Referencia. (COSUFAR). Aunque todavía no existe ningún patrón de referencia nacional en el mercado, varias sustancias están siendo sometidas a análisis exhaustivos para la comprobación de su identidad, estabilidad, pureza y actividad biológica, de modo que en un futuro cercano se tendrán ya en nuestro país estas sustancias de referencia.

Son varias las causas que originaron el desarrollo de este programa de elaboración de sustancias de referencia nacionales, entre las principales tenemos el hecho de que el costo de adquisición de las sustancias de referencia USP, NF, FDA, etc.,

es muy elevado, tanto por la naturaleza misma de estas sustancias, como por los gastos que se realizan para su importación; otra de las causas es el largo tiempo que tardan estos patrones de referencia en ser entregados y ahora también ha surgido el problema de que algunas de las organizaciones mencionadas, que elaboran sustancias de referencia, ya no quieren o no pueden surtir algunos de ellos. Es por esto, que el logro de patrones de referencia nacionales se ha convertido en algo indispensable y urgente.

En muchos laboratorios se obtienen patrones secundarios de trabajo, para uso particular de los mismos. Esta sustancia de referencia de trabajo se obtiene a partir de materias primas que al analizarse en el laboratorio, se ve que tengan una calidad superior a la común. Así por ejemplo, de un lote de materia prima, originalmente destinado a la producción de una forma farmacéutica definida, se separa una cantidad determinada, con el fin de obtener una sustancia de referencia de trabajo.

Para que una sustancia sea aceptada como referencia secundaria, es necesario que sus constantes físicas y químicas, así

como su actividad biológica se comprueben. La comprobación de éstas se hace comparando siempre con una sustancia de referencia internacional, ya sea USP, NF, Británico, etc.

El Objetivo de este estudio es determinar si el lote 23252W de Cefalotina sódica puede emplearse como una sustancia de referencia secundaria en el laboratorio que auspició este estudio. El tamaño del lote es de 30 g. de cefalotina sódica.

La comprobación de las constantes físicas, químicas y la potencia de este antibiótico, se harán comparando con el patrón de referencia USP. Las especificaciones obtenidas servirán de norma para establecer la sustancia de referencia secundaria de Cefalotina Sódica.

I GENERALIDADES

La Cefalotina sódica es un antibiótico semisintético de amplio espectro, del grupo de las cefalosporinas.

Las cefalosporinas constituyen una clase de antibióticos lactámicos, derivados de la cefalosporina C, que es un producto metabólico del *Cephalosporium acremonium*. Este microorganismo produce varias clases de antibióticos llamados: cefalosporina C, cefalosporina N y cefalosporina P. Estos antibióticos fueron identificados en el medio de cultivo, 10 años después del aislamiento del *C. acremonium* realizado por Brotzu en 1948 y de la demostración subsecuente de su actividad contra bacterias gram positivas y gram negativas.

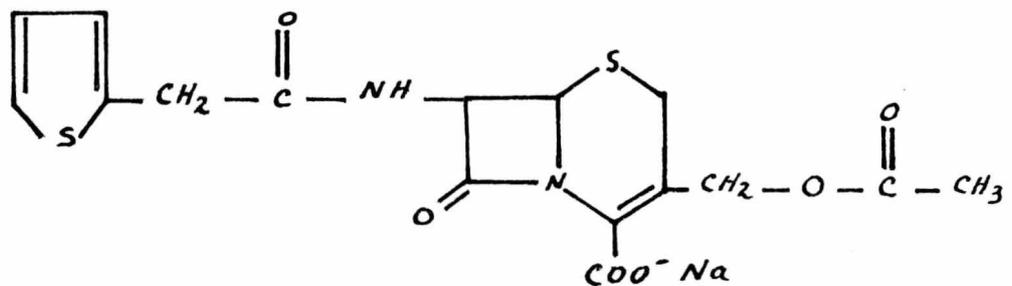
La investigación de todos los antibióticos producidos por el *Cephalosporium* sp. empezó con un examen de la fracción obtenida mediante la extracción con solventes orgánicos del caldo de fermentación ligeramente acidulado. Se encontró que esta fracción tenía 5 antibióticos esteroidales llamados, cefalosporinas P₁₋₅. La cefalosporina P poseía actividad contra organismos gram positivos, pero no tenía actividad contra

los gram negativos y por lo tanto no podía ser el único antibiótico observado por Brotzu con el extracto crudo. Los investigadores reexaminaron el caldo de cultivo y encontraron un antibiótico no extraíble con actividad gram negativa. Esta sustancia, denominada originalmente como cefalosporina N, es la responsable de la actividad gram negativa descrita por Brotzu. Posteriormente se demostró que la cefalosporina N era idéntica a la sinnematina B y se le rebautizó con el nombre de penicilina N.

Durante la purificación de una muestra de penicilina N degradada con ácido, Newton y Abraham (1955) aislaron una sustancia que se movía más lentamente en una columna de intercambio aniónico y que tenía un fuerte máximo de absorción ultravioleta a 260 nm. La sustancia, llamada cefalosporina C, se demostró que era un nuevo antibiótico β -lactámico relacionado con la penicilina N. La cefalosporina C se asemeja a la penicilina N, en que contiene un grupo acilo derivado del ácido D- α -amino adípico y difiere en que presenta la cadena lateral condensada con un anillo β -lactama dihidrotiazina, ácido 7-amino cefalosporánico (7-ACA), en vez de un anillo β -lactama tiazolidina, ácido 6-amino peni-

cilánico (6-APA). En un principio no se le dió importancia a este antibiótico, ya que su espectro de acción es semejante al de la penicilina N, pero menos intenso. Ahora se le da interés porque es posible eliminar por hidrólisis la cadena α -amino adipílica, para producir el ácido 7-amino cefalosporánico, del cual pueden obtenerse cefalosporinas semisintéticas con actividades antibacteriales mayores.

De los muchos ácidos cefalosporánicos, el primero de importancia médica fue la cefalotina (Chauvette et. al. 1962)



Biosíntesis.

La Cefalotina se prepara mediante la reacción del cloruro de tiofeno-2-acetilo con el ácido 7-amino cefalosporánico ¹⁰. El núcleo cefalosporánico se obtiene de la cefalosporina C, la cual es producida por un hongo identificado como *Cephalosporium acremonium* N° 49137 (Instituto Micológico Imperial, Inglaterra), o por cepas de él.

A pesar de que la cefalosporina C se puede fragmentar en ácido α -amino adípico, cisteína y valina, aún no ha sido establecido el mecanismo real mediante el cual el *Cephalosporium* sp. incorpora los 3 aminoácidos para dar la cefalosporina C.

Arnstein y Morris ¹¹ aislaron la (α -amino adipil) cisteinil valina del micelio del *Penicillium chrysogenum* y sugirieron que el tripéptido es un precursor en la biosíntesis de todas las penicilinas. Se ha encontrado este mismo tripéptido en el líquido intracelular del *Cephalosporium* sp. ¹².

El último paso postulado en la biosíntesis de la penicilina es una reacción de transferencia de un acilo, o la producción del ácido 6-amino penicilánico, si es que no se adiciona el precursor.

El *Cephalosporium* sp. aparentemente no produce amidasas de cadenas laterales o acil transferasas, y no se ha reportado la existencia del 7-ACA en la fermentación. Así pues, para obtener antibióticos clínicamente útiles, es necesaria la manipulación química de la cefalosporina C.

La síntesis de muchos 7-acil derivados fue posible una vez lograda una reacción práctica de rompimiento de la cefalosporina C¹³, que producía grandes cantidades del 7-ACA.

De estos derivados, la cefalotina sódica fue la primera que se lanzó al mercado (Patente: Eli Lilly y Cía., por E. H. Flynn, Belg. 618, 663, Dic. 7, 1962; U.S. Appl., Junio 8, 1961; Chem. Abstracts 59, 5176, 1963).

Síntesis Química.

Después de que se reportaron los detalles estructurales de la cefalosporina C, muchos químicos intentaron su síntesis. Se dirigieron los esfuerzos hacia la fusión de un anillo β -lactámico con un anillo dihidrotiazina¹⁴; a la conversión de un núcleo de penicilina en un núcleo de cefalosporina¹⁵, y a la construcción del anillo β -lactámico a partir de la L (+) cisteína como mono-

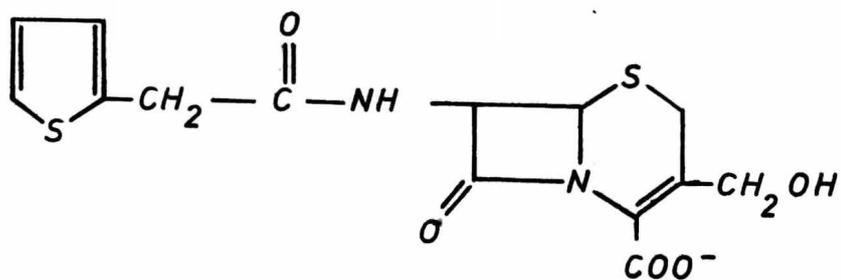
ciclo inicial, para sintetizar el núcleo de cefalosporina ¹⁶ .
Este último esfuerzo logró la síntesis total estereoespecífica de la cefalosporina C y de la cefalotina.

Estabilidad y Degradación.

La cefalotina sódica en estado sólido y seco, almacenada en envases de vidrio perfectamente cerrados y protegidos de la humedad, es estable por 3 años a 25° C. ⁵

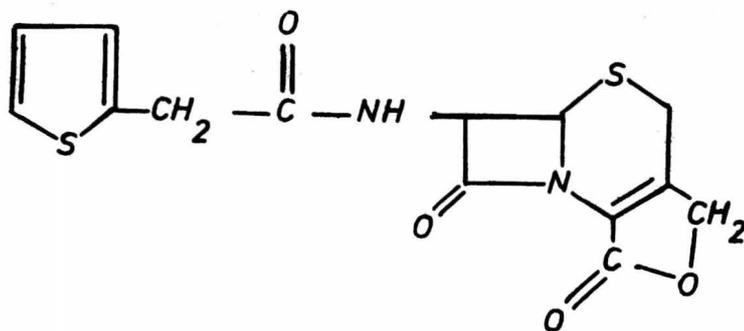
Las soluciones acuosas mantenidas a 25° C, por 24 horas, pierden aproximadamente el 8% de su actividad y la velocidad de pérdida de actividad fue casi la misma en buffers con valores de pH entre 3 y 7. ⁵

La cefalotina en solución acuosa sólo se hidroliza lentamente para producir deacetylcefalotina y bajo condiciones ligeramente ácidas, el compuesto deacetylado y la cefalotina se convierten en cefalotin lactona:



DEACETILCEFALOTINA

CEFALOTIN LACTONA.



Las soluciones alcalinas con un pH arriba de 8, pierden rápidamente su actividad biológica cuando permanecen a temperatura ambiente ⁵.

La β -lactama es más estable a los ácidos fuertes que a las bases fuertes, pero en condiciones vigorosas el núcleo entero se rompe formando el tienil acetamido acetaldehído, que es biológicamente inactivo ¹⁷.

Se ha reportado que el núcleo de cefalosporina es lábil a la luz ultravioleta (260 nm.) ¹⁸. La descomposición de una solución acuosa de cefalosporina C, medida por la pérdida de su actividad biológica, fue del 90% en un lapso de media hora.

La actividad de la cefalotina en suero humano se mantuvo completamente, por un período de 14 días a -20° C. A una temperatura de 5° C, ocurrió una inactivación del 12% en 2 días, y del 50% en 14 días. A temperatura ambiente la inactivación fue rápida y sólo se detectó un 15% de la actividad original después de 2 días.

Wick ¹⁹ reportó que la cefalotina y su metabolito deacetilado permanecieron estables en suero humano incubado a 37° C por

2.5 hrs.

Lee et al., ²⁰, reportaron haber encontrado muy poca cantidad, si es que ninguna, de deacetylcefalotina en suero y sangre entera heparinizada, después de incubarlas con cefalotina durante 1 hora a 37° C. Esto sugirió que ni el suero, ni la sangre entera, contenían una cantidad significativa de esterasas capaces de hidrolizar la cefalotina.

La degradación química de la cefalosporina C y de sus análogos no produjo equivalentes estructurales de los productos de degradación de la penicilina ²¹. Las cefalosporinas no dieron los análogos esperados de los peniciloatos, ni de los penicilinos, así como tampoco formaron penicilamina. Las reacciones con alcoholes, tanto en presencia como en ausencia de sales metálicas, no rompieron el anillo lactámico; mientras que la reacción con alcóxidos producía la expulsión del grupo acetato ²².

El rompimiento del anillo β -lactámico de la cefalotina, con β -lactamasas, se encontró que iba acompañado de la expulsión del grupo acetato y de cambios importantes en el espectro de

absorción ultravioleta ²³. La reacción producía compuestos lábiles con un máximo de absorción a 230 nm, el cual desaparecía en varias horas. Las estructuras tentativas de los compuestos formados en la degradación hidrolítica con β -lactamasas o con amoníaco, han sido reportadas y sostenidas por varios estudios hechos de los espectros de resonancia magnética de protones ²⁵.

Las acil-estearasas pueden atacar la cefalotina en la función acetilo unida al metilo en C-3, produciendo deacetylcefalotina. A pesar de ser bastante estable bajo condiciones fisiológicas ¹⁹, el compuesto deacetylado fue inestable cuando se le abrió el anillo β -lactama ²³. Sin embargo, el comportamiento de la cefalotin lactona fue excepcional; la presencia de la lactona de 5 miembros causó que la reacción con β -lactamasas prosiguiera como con las penicilinas y se produjo un producto de reacción estable ²⁶.

Las amidasas fueron capaces de eliminar las cadenas laterales relativamente no polares de los cefalosporinatos ²⁷⁻²⁸. Sin embargo la amida amino adípica, que existe naturalmente en la cefalosporina C, fue resistente a las amidasas.

Productos metabólicos - Farmacocinética.

La cefalotina fue transformada parcialmente a deacetilcefalotina después de ser administrada parenteralmente a animales de experimentación y al hombre²⁰. En el perro, la excreción inicial contenía iguales cantidades de cefalotina y de su metabolito deacetilado; una excreción posterior mostró una preponderancia del metabolito sobre el compuesto original.

La cefalotina persistió durante un período más largo de tiempo, cuando se administró por vía intramuscular que cuando se dió por vía intravenosa.

En el hombre, se midió la cantidad total excretada en la orina, después de la administración intramuscular de 1 g. de cefalotina. La recuperación de la cefalotina y de su metabolito deacetilado promedió 460 y 240 mg, respectivamente; una relación de 2:1 en favor de la cefalotina.

La deacetilcefalotina es biológicamente activa. Estudios *in vitro*¹⁹ demostraron que el metabolito tiene un espectro antimicrobiano semejante al de la cefalotina, pero se requieren de 2 a 16 veces más metabolito, para la inhibición de cultivos representativos de

organismos de prueba. A pesar de que no se tienen datos de la efectividad terapéutica de la deacetilcefalotina en el hombre, se han estudiado infecciones experimentales en ratones ¹⁹, y se observó que el efecto curativo del metabolito era menor que el de la cefalotina; este descubrimiento estaba de acuerdo con los resultados obtenidos de la evaluación in vitro.

La excreción urinaria fue la ruta principal de eliminación para la cefalotina, tanto en el hombre, como en el perro ²⁰⁻²⁹. De un 60 a un 90% de la dosis apareció en la orina durante las 6 hrs. siguientes a la administración. Estudios renales en perro indicaron que la actividad antibiótica era secretada a través de los túbulos renales y que esta secreción tubular podría ser completamente bloqueada por el Probenecid.

El suero alcanzó niveles máximos en la media hora siguiente a la administración ²⁰⁻²⁹. La vida media microbiológica en el suero de perro, fue de 42.3 ± 2.5 min. para la cefalotina ²⁰, comparada con 25.9 ∓ 0.8 min. para la deacetilcefalotina ¹⁹. La corta vida media en el suero fue atribuible a la rápida excreción urinaria ²⁹.

Lee y colaboradores²⁰⁻³⁰ reportaron la distribución de la cefalotina en sangre y tejidos, y su paso a los fluidos orgánicos. Puesto que el volumen relativo de distribución era mayor de 1 (1.413 ± 0.244 ml/g), los autores sugirieron que la cefalotina se distribuía más allá del espacio extracelular y que se concentraba en los tejidos.

Actividad farmacológica y Usos.

Su espectro antibacteriano in vitro incluye gérmenes grampositivos y gramnegativos, cocos y bacilos. Es resistente a la penicilinas.

Su uso debe restringirse a las infecciones serias, especialmente cuando estaría indicada la ampicilina o la bencilpenicilina, y los gérmenes son resistentes; pero no puede usarse cuando el paciente es alérgico a la penicilina, ya que puede haber alergenidad cruzada entre la cefalotina y las penicilinas.

Posiblemente la cefalotina actúa interfiriendo con la síntesis de la pared celular bacteriana en forma semejante a como lo hace la penicilina.

Las mínimas concentraciones inhibitoras para los cocos son de 0.05 mcg a 1 mcg/ml; es la más activa de las cefalosporinas contra los estafilococos, y hasta la fecha no se han encontrado estafilococos resistentes. Los *Streptococcus faecalis* y otros enterococos y bacterias gramnegativas susceptibles requieren de 10 a 30 mcg/ml.

Estas diferencias hacen ver claramente la necesidad de determinar la sensibilidad bacteriana antes de instituir el tratamiento y determinar la dosis.

La cefalotina se puede usar en el tratamiento de infecciones del conducto urinario, ya que es la vía principal de eliminación de esta substancia. Este antibiótico, causa menor daño al riñón que la cefaloridina, es por esto que se prefiere para el tratamiento de pacientes con fallas renales o los que están siendo dializados.

II ESPECIFICACIONES FUNDAMENTALES DE LA CEFALOTINA SODICA.

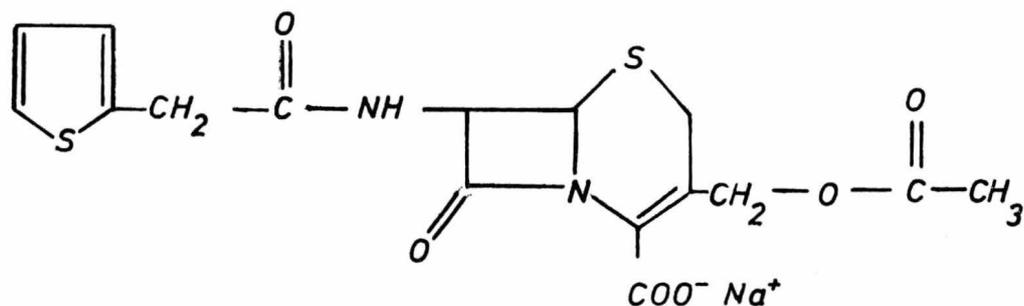
Como ya se ha mencionado anteriormente, para que una sustancia sea aceptada, generalmente, como patrón de referencia, es necesario que sus constantes físicas y químicas, así como su actividad biológica y estabilidad se comprueben cuidadosamente, con aparatos e instrumentos de precisión comprobada y en forma tal que los resultados obtenidos proporcionen una base estadística adecuada para juzgar la nobleza y confiabilidad de tal sustancia. Para determinar esta nobleza y confiabilidad, las sustancias son sometidas a técnicas analíticas usuales como, absorción ultravioleta e infrarroja, rotación específica, cromatografía, pruebas de pureza, y determinaciones que muestren que la sustancia se comporta adecuadamente al utilizarse en las pruebas para las que está destinada.

Las pruebas que se realizan a una sustancia para poder establecer un patrón de referencia, no son necesariamente, todas las especificadas en su monografía, ya que muchas de estas pruebas solo son de utilidad para cuando la sustancia va destinada a la elaboración de un medicamento. Generalmente, las pruebas fundamentales que

se le hacen a la sustancia, son aquéllas necesarias para determinar la identidad, pureza, actividad biológica, y estabilidad de la misma.

A continuación se especifican las pruebas fundamentales que deben hacerse a la Cefalotina sódica para poder establecer una sustancia de referencia.

Cefalotina sódica.- Sal sódica del acetato del ácido 3(hidroximetil) 8-oxo-7-2-(2-tienil) -acetamido -5-tía-1-azabicyclo 4.2.0 oct-2-eno-2-carboxílico, también conocido como la sal sódica del ácido 7-(tiofeno-2-acetamido) cefalosporánico.



* $C_{16}H_{15}N_2NaO_6S_2$

* PM = 418.43

Descripción.- Es un polvo cristalino blanco o ligeramente amarillento, esencialmente inodoro.

Solubilidad.- Es muy soluble en agua, formamida, dimetil sulfóxido, y en etilen y propilen glicol, es ligeramente soluble en alcoholes de bajo peso molecular, e insoluble en solventes orgánicos no polares.

Espectro infrarrojo.- El espectro infrarrojo de la cefalotina sódica presenta las siguientes bandas de absorción características:

- a) N - H : 3300 cm^{-1}
- b) carbonilo de la β -lactama: 1760 cm^{-1}
- c) carbonilo del éster: 1735 cm^{-1}
- d) carbonilo de la amida: 2^{ia} : 1660 y 1535 cm^{-1}
- e) carbonilo del carboxilo: 1630 cm^{-1}
- f) C - O del $(\text{CH}_3 - \underset{\text{O}}{\underset{||}{\text{C}}} - \text{O})$: 1250 cm^{-1}

La región del carbonilo que existe entre 1500 y 1800 cm^{-1} , es la región más característica en el espectro infrarrojo de la cefalotina sódica. En esta región se pueden detectar cambios como: rompimiento del éster, formación de lactona y apertura de la β -lactama⁵.

Espectro ultravioleta.- El espectro ultravioleta de una solución acuosa de cefalotina sódica (25 mcg/ml), determinado de 220 a 310 nm , presentó un máximo a 237 nm y otro a 265 nm .

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} (237 \text{ nm en agua}) = 336$$

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} (265 \text{ nm en agua}) = 204$$

$$A_{(265)} / A_{(237)} =$$

Cromatografía en capa fina.- Se deben realizar pruebas cromatográficas para detectar cualquier producto de degradación o impureza que pudiera existir en el lote de cefalotina sódica en estudio.

Pérdida al secado.- La cefalotina sódica, secada a 60° C a presión reducida (no mayor de 5 mm de Hg) durante 3 hrs, no debe de perder más del 1.5% de su peso.

Metales pesados.- La cefalotina sódica no debe contener más de 30 ppm.

Rotación óptica.- La rotación específica de una solución acuosa de cefalotina sódica al 5% (w/v), es de:

$$[\alpha]^{25^\circ} = +129^\circ \pm 5^\circ \text{ (en base seca)}.$$

Ensayo.- La potencia de la cefalotina sódica es de 945 mcg/mg.

Los métodos que se emplean generalmente para valorar este antibiótico son:

a) Método microbiológico de cilindro-placa.

Yodométrico.

b) Método químico:

Colorimétrico.

Estabilidad.— Es muy importante conocer la estabilidad de la sustancia que se quiere usar como un patrón de referencia, ya que ella va a servir de base para la aceptación o el rechazo de otros lotes de cefalotina sódica y por lo tanto se debe estar seguro de cuál será la potencia antibiótica de la futura sustancia de referencia en el momento de usarla, para que de este modo se tenga un punto de comparación correcto que lleve a la obtención de resultados analíticos reales.

Se realizan pruebas para determinar la estabilidad de la sustancia sólida, así como en solución, a temperatura ambiente y a temperatura de refrigeración.

Los siguientes datos de la estabilidad de la cefalotina sódica han sido tomados de la bibliografía:

1.- La cefalotina sódica en estado sólido, mantenida en recipientes perfectamente cerrados y protegidos de la humedad, es estable de 2 a 3 años a 25° C. 4-5.

- 2.- A temperatura de 25° C, las soluciones acuosas de cefalotina sódica pierden aproximadamente el 8% de su actividad en 24 hrs. La pérdida de actividad fue sensiblemente la misma en buffers de pH = 3.0 a pH = 7.0. ⁵
- 3.- Las soluciones de cefalotina sódica preparadas a partir de una substancia de referencia, pueden permanecer hasta 5 días sin pérdida significativa de su potencia, cuando se preparan en soluciones amortiguadoras de pH apropiado y se conservan a temperatura de 4° C. ⁴

III PARTE EXPERIMENTAL.

El lote 23252W de cefalotina sódica se sometió a todas las pruebas básicas que deben hacerse a esta substancia.

En todas las pruebas se corrió al mismo tiempo la substancia de referencia USP, ya que es indispensable, para poder establecer un patrón secundario de referencia, comparar siempre la materia prima en estudio con un patrón primario, en este caso el patrón USP.

A continuación se describen los métodos de prueba empleados en la determinación de las especificaciones fundamentales de la cefalotina sódica, y los resultados obtenidos.

Descripción.- Revisión de las características organolépticas, aspecto, color y olor, de la cefalotina sódica, comparando la substancia de referencia USP con el lote 23252W de cefalotina sódica.

Resultados.- Substancia de referencia USP: polvo cristalino blanco, inodoro.

Lote 23252W : polvo cristalino ligeramente amarillento, inodoro.

Solubilidad.- Se determinó la solubilidad del lote 23252W de cefalotina sódica y de la sustancia de referencia USP en los siguientes solventes: agua, formamida, etilenglicol, propilenglicol, etanol, cloroformo y éter.

Resultados.-

Solvente.	Subs. de Ref. USP.	Lote 23252W.
Agua.	Muy soluble.	Muy soluble.
Formamida.	Muy soluble.	Muy soluble.
Etilenglicol.	Muy soluble.	Muy soluble.
Propilenglicol.	Muy soluble.	Muy soluble.
Etanol.	Poco soluble.	Poco soluble.
Cloroformo.	Insoluble.	Insoluble.
Eter.	Insoluble.	Insoluble.

Espectro Infrarrojo.- Se prepararon pastillas de bromuro de potasio, con la sustancia de referencia y el lote 23252W (previamente secados a 60° C por 3 hrs.), pesando aproximadamente 3 mg. de cada una en 300 mg. de KBr y se procedió a determinar el espectro infrarrojo de cada una de las sustancias.

Se tomaron 3 espectros de cada una de las sustancias en 3 días consecutivos.

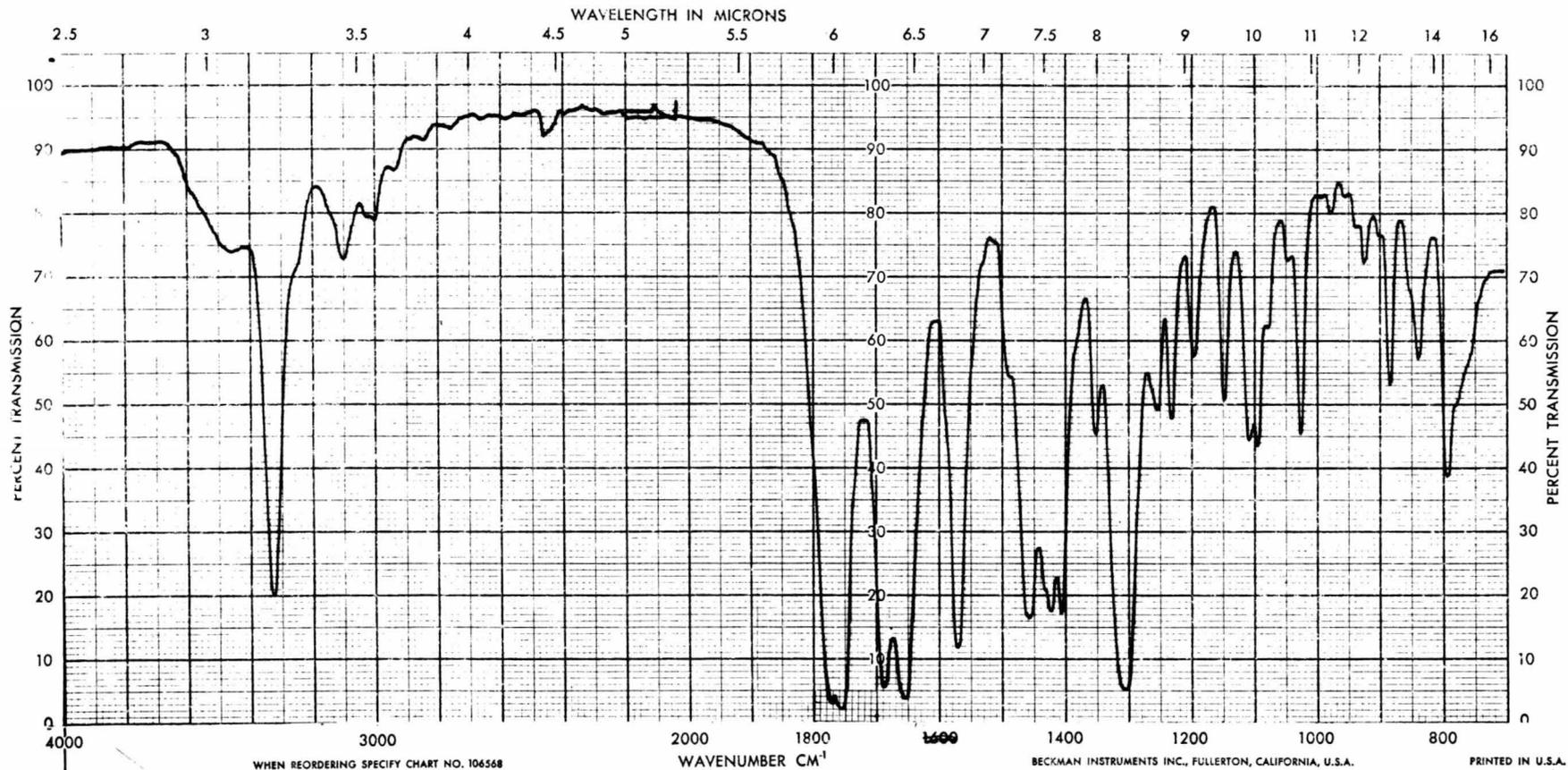
Resultados.-

El espectro infrarrojo del lote 23252W fue idéntico al de la sustancia de referencia USP.

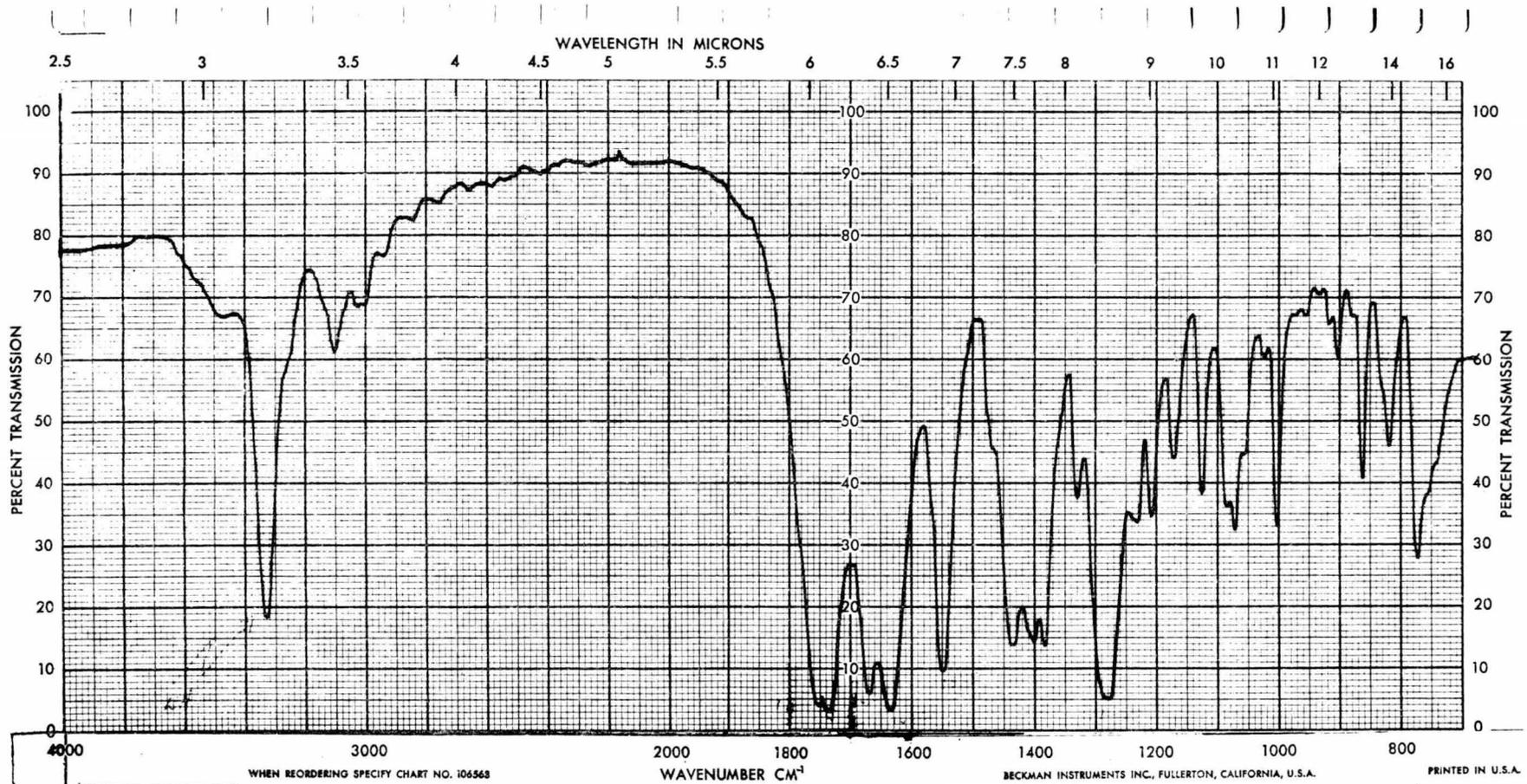
De los tres espectros obtenidos de cada sustancia se escogió el más preciso, de acuerdo a los datos teóricos.

Espectro infrarrojo de la sustancia de referencia USP y del lote 23252W.

ESPECTRO IR. DE CEFALOTINA SODICA
PATRON DE REFERENCIA USP



ESPECTRO IR. DE CEFALOTINA SODICA
LOTE 23252 W



Espectro ultravioleta.- Se prepararon soluciones acuosas que contenían 25 mcg/ml (0.0025%) de cefalotina sódica, tanto de la substancia de referencia USP, como del problema.

Una vez preparadas las soluciones se corrieron los espectrogramas desde 200 hasta 340 nm.

Se determinaron tres espectros de cada una de las substancias en 3 días consecutivos. Se prepararon soluciones frescas cada día.

Se calcularon, $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (237 nm), $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (265 nm) y la relación $A_{(265)} / A_{(237)}$, tanto para la substancia de referencia USP como para el problema.

El valor de $E_{1\text{cm}}^{1\%}$, se obtuvo con la siguiente fórmula:

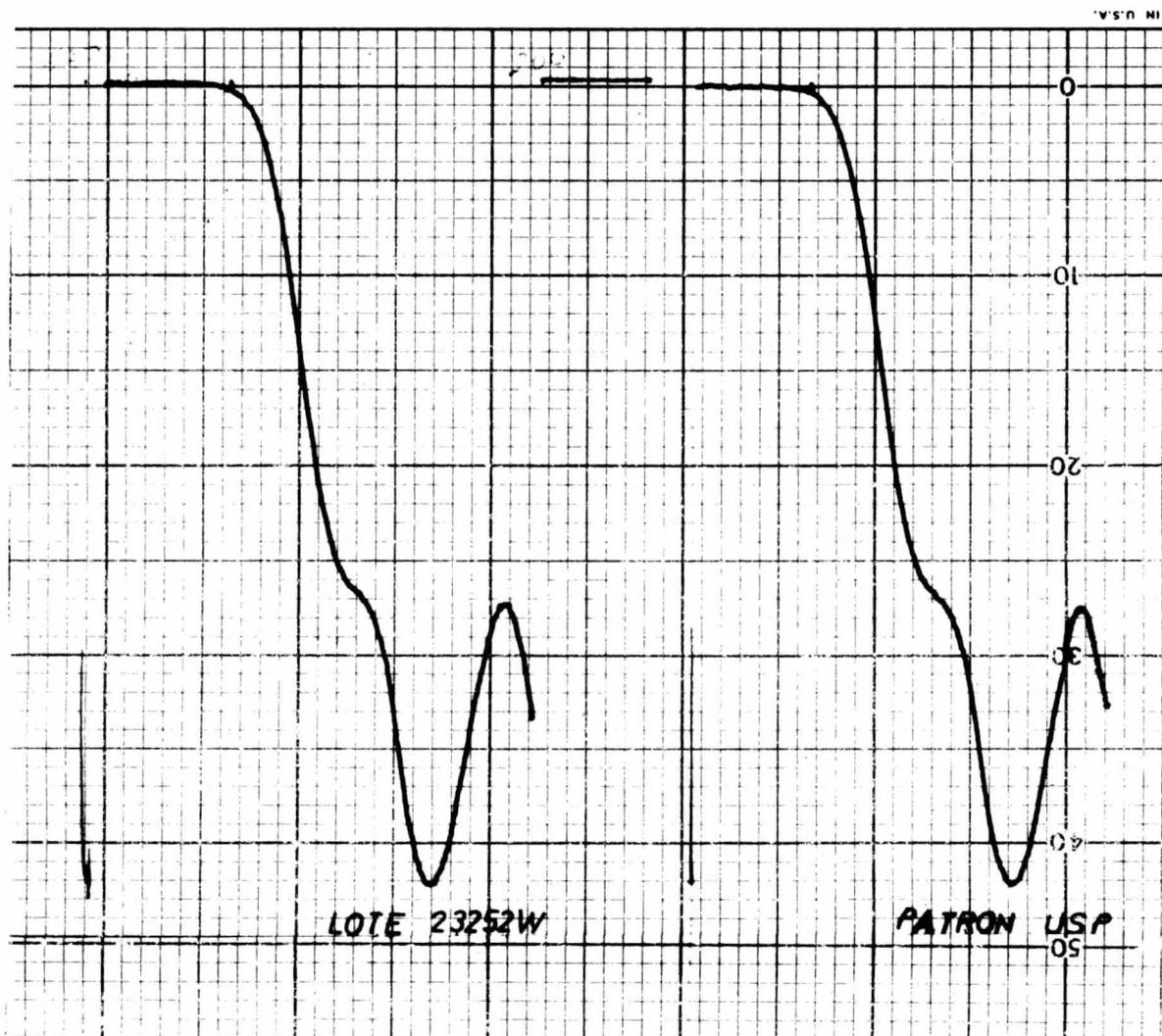
$$E_{1\text{cm}}^{1\%} = A \times \frac{25}{w} \times \frac{100}{5} \times \frac{1000}{100}$$

A - Absorbancia.

w - mg de la substancia.

Resultados.- El espectro ultravioleta del lote 23252W, fue idéntico al de la substancia de referencia USP. Ambos presentaron dos máximos de absorción, uno a 265 nm y otro a 237 nm.

Espectros ultravioleta de la substancia de referencia USP
y del lote 23252W.-



Lecturas de las absorbancias (A) de las soluciones patrón y problema, a 265 y 237 nm:

nm	Subs. de Ref USP			Lote 23252W		
	Pesada	A	\bar{A}	Pesada	A	\bar{A}
265	12.45 mg	0.508	0.510	12.45 mg	0.058	0.510
	12.47	0.511		12.48	0.510	
	12.51	0.511		12.50	0.512	
237	12.45	0.836	0.839	12.45	0.837	0.839
	12.47	0.839		12.48	0.841	
	12.51	0.843		12.50	0.841	

1%

Valores de E 1 cm de las soluciones patrón y problema, a 265 y 237 nm:

nm	Subs. de Ref. USP		Lote 23252W	
	E 1%	$\bar{E}1\%$	E 1%	$\bar{E}1\%$
265	204.1	204.5	204.1	204.5
	205.0		204.4	
	204.4		205.5	
237	336.0	336.5	336.5	336.7
	336.5		337.0	
	337.0		336.7	

Valores de la relación A_{265}/A_{237} , de las soluciones patrón y problema:

Subs. de Ref. USP		Lote 23252W	
A_{265}/A_{237}	A_{265}/A_{237} Promedio	A_{265}/A_{237}	A_{265}/A_{237} Promedio
0.607	0.606	0.606	0.606
0.609		0.606	
0.604		0.608	

ROTACION OPTICA.

A la substancia de referencia USP, no se le determinó la rotación específica, se tomó el dato reportado en el protocolo enviado con él.

Se determinó la rotación específica de una solución acuosa al 5%, del lote 23252W de cefalotina sódica.

Preparación de la Solución.- Se pesaron 500 mg de la substancia, previamente secada a 60°C por 3 hrs, y se llevaron a 10 ml. con agua destilada. Se pasó la solución a una celda de 1 dm. y se leyó la rotación óptica de la solución en el polarímetro, tomando varias lecturas.

Resultados.-

$$\bar{a} = 6.353$$

$$l = 1 \text{ dm}$$

$$c = 4.929 \text{ g/100 ml.}$$

$$[\alpha]^{25^\circ} = \frac{100 \times a}{l \times c}$$

$$[\alpha]^{25^\circ} = \frac{100 \times 6.353}{1 \times 4.929} = 128.9^\circ$$

$[\alpha]^{25^\circ}$ Subs. de Ref. USP	$[\alpha]^{25^\circ}$ Lote 23252W
129.2°	128.9°

PERDIDA AL SECADO.

Se determinó la pérdida al secado de la substancia de referencia USP y del lote 23252W. Se pusieron a secar aproximadamente 100 mg de cada una de las substancias en una estufa de vacío a 60° C y a una presión de 5 mm de Hg, durante 3 hrs.

Resultados.-

Pérdida al Secado	
Subs. de Ref. USP	Lote 23252W
0.11%	0.24%

METALES PESADOS.

Esta prueba sólo se le hizo a la substancia problema.

Para la substancia de referencia USP se tomó el dato reportado en su protocolo.

Reactivos.-

Amoníaco T.S. (Amoníaco al 10%).- Se diluyeron 400 ml de amoníaco al 29% con suficiente agua purificada para hacer 1000 ml.

Solución "madre" de nitrato de plomo.- Se disolvieron 159.8 mg de nitrato de plomo en 100 ml de agua destilada a la que se le había

Añadido 1 ml de ácido nítrico al 70% y se diluyó a 1000 ml.

Solución patrón de plomo.- Se tomaron 10 ml de la solución "madre" y se colocaron en un matrás volumétrico de 100 ml y se diluyó con agua. Cada ml de esta solución contenía 10 mcg. de plomo.

Preparación de la solución patrón.- Se prepararon varias soluciones patrón, con 10, 20 y 30 ppm de plomo, para poder comparar cuantitativamente la cantidad de plomo que contenía el lote 23252W.

En un tubo de Nessler se colocó un volumen de la solución patrón de plomo que contenía el equivalente de plomo deseado y se diluyó a 25 ml. Se ajustó el pH de la solución entre 3 y 4 con ácido acético al 6% y/o amoníaco al 10%, usando papel pH de rango corto; se diluyó a 40 ml con agua y se agitó bien. Esta fue la solución A.

Preparación de la muestra.- Se pesó 1 g de sustancia y se colocó en una cápsula de porcelana. Se agregó suficiente ácido sulfúrico para mojar la muestra y se incineró cuidadosamente hasta que la muestra estuvo bien quemada. Se adicionaron 2 ml

de ácido nítrico al 70% y 5 gotas de ácido sulfúrico al 96% y se calentó cuidadosamente hasta que se produjeron humos blancos, entonces se incineró en una mufla a 500–600°C hasta que se hubo quemado todo el carbono. Se enfrió y se agregaron 4 ml de ácido clorhídrico 1 en 2, se cubrió la cápsula y se digirió durante 15 min. en un baño de vapor. Después se humedeció el residuo con una gota de ácido clorhídrico al 37%, se agregaron 10 ml de agua destilada caliente y se digirió por 2 min, se agregó amoníaco al 10%, gota a gota hasta que la solución estuvo apenas alcalina al papel litmus, se diluyó a 25 ml y se ajustó el pH entre 3 y 4 con ácido acético al 6%. Se filtró y se lavó, la cápsula y el filtro con 10 ml de agua, se diluyó el filtrado y los lavados a 40 ml. Se pasó esta solución a un tubo de Nessler. Esta fué la solución B.

Comparación de color.- A los tubos que contenían las soluciones A y la B, se les agregaron 10 ml de agua sulfhídrica, se mezcló y dejó reposar durante 5 min, se vieron hacia abajo los tubos contra un fondo blanco. Así se vió con cuál de las soluciones patrón se podía comparar el color de la solución problema, teniendo pues de este modo la ppm de plomo que contenía el lote

23252W de cefalotina sódica.

Resultados.-

Metales	Pesados
Subs.de Ref. USP	Lote 23252W
10 ppm.	20ppm.

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

Para esta prueba se elaboraron 4 cromatoplasacas en sílica gel, una por día y todas a diferente hora para obtener de esta manera datos más reales.

Se preparó la cámara colocando un volumen adecuado del sistema de solventes acetona-ácido acético 20:1 y dejando saturar durante 2 hrs.

Se activaron las placas de sílica gel en la estufa y después se procedió a marcar el lugar de aplicación de la substancia USP y de la substancia problema, y se marcó el lugar a donde se quería que llegara el frente del solvente. En cada placa se depositaron 3 cargas de la solución de referencia y 3 de la solución problema, intercalando una y una; la carga fue de 2 mcl de una solución acuosa de 0.5 mcg/ml

4

(12.5 mg en 25 ml) tanto del patrón de referencia como del lote 23252W, y la aplicación de esta carga se hizo mediante un capilar graduado. Una vez depositadas las soluciones y ya que habían secado las manchas, se colocó la cromatoplaque en la cámara ya saturada y se dejó correr el solvente hasta que llegó a la posición marcada, entonces se sacó la cromatoplaque de la cámara y se dejó evaporar el solvente. Ya seca la cromatoplaque se aplicó el revelador, que fue una solución al 3% de vainillina en una mezcla de ácido fosfórico - metanol 1:1, y se dejó secar, después de lo cual se metió la cromatoplaque a una estufa a 105°C. Ya visibles las manchas se determinó el Rf de cada una de ellas. Las cromatoplaques también se pudieron revelar usando una lámpara de luz ultravioleta de onda corta, sólo que en este caso hubo que marcar el centro de las manchas que solo permanecían visibles bajo la luz ultravioleta, para después poder calcular el Rf.

Resultados.-

En todas las cromatoplaques sólo apareció la mancha correspondiente a la cefalotina sódica, tanto para la substancia de referencia USP, como para la substancia en estudio.

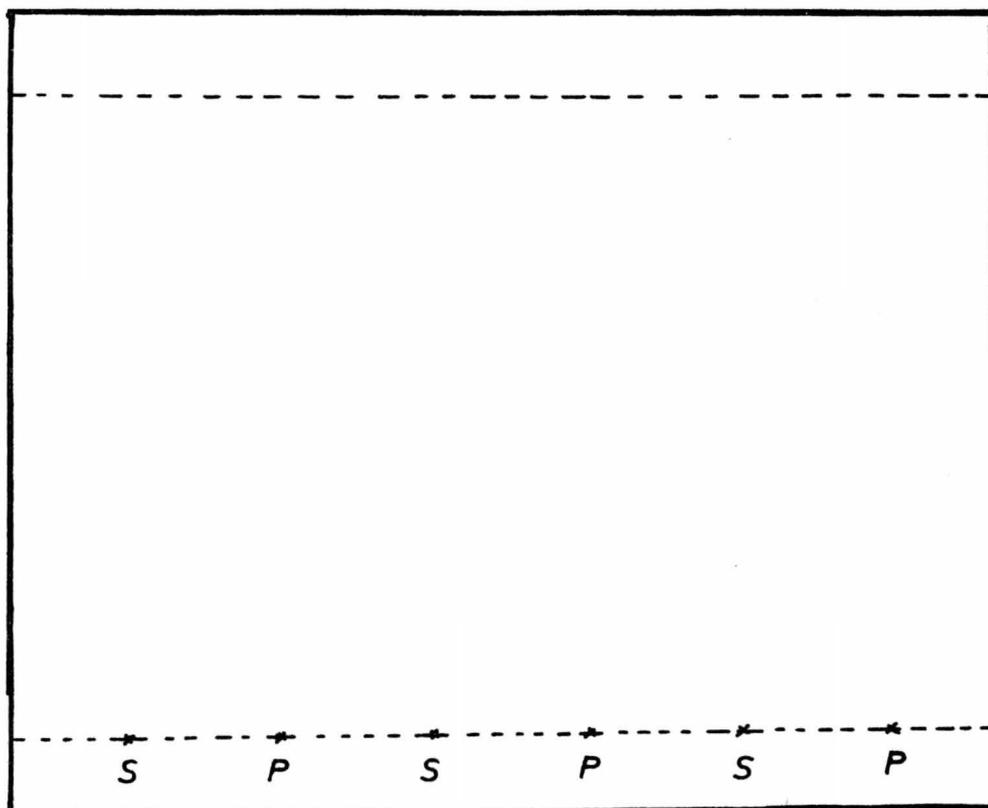
En cada placa se tomó el Rf promedio de las 3 muestras del patrón USP y de las 3 muestras del lote 23252W.

		Subs. de Ref. USP		Lote 23252W	
Cromatoplaca	Rf.	$\bar{Rf.}$	Rf.	$\bar{Rf.}$	
I	0.60	0.617	0.60	0.620	
II	0.62		0.62		
III	0.60		0.61		
IV	0.65		0.65		

ESQUEMA DE UNA DE LAS CROMATOPLACAS.

S - substancia de referencia.

P - lote 23252W.



METODOS DE VALORACION

ENSAYO MICROBIOLOGICO.

La potencia de la cefalotina sódica se determina en forma rutinaria por el método de difusión en agar (cilindroplaca), usando *Staphylococcus aureus* o *Bacillus subtilis*.

La actividad biológica de la cefalotina sódica reside en el anillo lactama de la molécula.

Las pruebas se realizaron por triplicado en 25 días consecutivos. De los resultados de cada día se tomaron los promedios para después efectuar el análisis estadístico.

Preparación de la solución patrón.- Se pesó una cantidad adecuada de la substancia de referencia USP (previamente secada a 60° C durante 3 hrs.) para obtener una solución que contuviera 100 mcg/ml. Se llevó al volumen apropiado con buffer de fosfatos pH=6 estéril.

Preparación de la curva patrón.- A partir de la solución patrón se prepararon soluciones que contenían 4.0, 2.0, 1.0 y 0.5 mcg/ml, las diluciones se hicieron con la solución amortiguadora estéril de fosfatos pH=6.

Preparación de la muestra.- En base a la potencia estimada del material a probar, se pesó una cantidad adecuada para obtener una solución que contuviera 2.0 mcg/ml. Todas las soluciones se hicieron con buffer pH=6 estéril. La sustancia en estudio también se secó antes de ser usada.

Cultivo "madre" de *Staphylococcus aureus*.- Se utilizó la cepa 6538P. Se hicieron resiembras diariamente, para mantener el cultivo fresco, se sembró sobre medio de agar N° I, en tubo inclinado y se incubaron a 37° C de 16 a 18 hrs.

Preparación del inóculo.- El cultivo desarrollado en un tubo se recogió con 3 ml de agua estéril y de aquí se tomó 1 ml para hacer una suspensión 1:10 en agua estéril.

Preparación del medio inoculado.- El día del ensayo se inocularon cada 100 ml de medio de agar N° I, previamente fundido y enfriado a 48°C, con 2 ml de la suspensión 1:10 del inóculo.

Procedimiento.- Se prepararon 10 cajas de Petri para la curva patrón y 5 cajas para cada muestra a ensayar, de la forma siguiente: Se pusieron 20 ml del medio de agar N° 2 en cada caja

y se dejaron enfriar. Después de que esta capa base hubo solidificado, se agregaron 5 ml del medio inoculado a cada caja, se taparon las cajas y se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente.

Se colocaron 4 penicilindros simétricamente en cada una de las cajas. En las cajas de la curva patrón, se llenó un cilindro de cada caja, con cada uno de los niveles de la curva patrón.

En las cajas del problema, se llenaron 2 cilindros opuestos de cada caja con la solución de referencia (2.0 mcg/ml), y se llenaron los cilindros restantes de las 5 cajas de muestra, con la dilución final de la substancia problema. Se cubrieron las cajas, se marcaron para identificarlas y se colocaron a incubar a 37°C por 16 - 18 hrs. Se midieron las zonas de inhibición con un aparato Fisher-Lilly.

Cálculo de la potencia.- Se sacó el diámetro promedio para cada uno de los niveles de la curva patrón. Estos valores promedio se substituyeron en las fórmulas siguientes para obtener la recta que mejor representa la curva de dosis - respuesta para el ensayo:

$$a) \text{ Punto bajo} = \frac{7(a) + 4(b) + c - 2(d)}{10}$$

$$d) \text{ Punto alto} = \frac{7(d) + 4(c) + b - 2(a)}{10}$$

Donde el punto bajo (a) fue el valor calculado de la respuesta (enmm) de la concentración más baja (0.5 mcg) y el punto alto (d) fue el valor calculado de la respuesta de la concentración alta (4.0 mcg). Donde a, b, c y d fueron los valores promedio de las respuestas observadas para cada concentración, yendo de la menor a la mayor.

Se graficaron estos dos puntos en papel semilogarítmico, en donde las abscisas representaban los niveles de dosis del patrón de referencia y se traza una línea recta.

Se calculó el diámetro promedio de la zona de inhibición para la solución problema y para el patrón de referencia de 2.0 mcg, de las cajas problema.

Se corrigió el valor promedio de la zona de inhibición de la solución problema, sumándole o restándole la diferencia entre el valor promedio de la zona de inhibición del patrón de referencia

en las cajas problema y el valor teórico de este patrón de 2.0 mcg, obtenido de la gráfica.

La potencia de la solución problema se obtuvo extrapolando en la gráfica, la dosis que correspondía al diámetro promedio corregido de la muestra. El valor obtenido se multiplicó por el factor de dilución y se dividió entre la cantidad de muestra pesada.

Preparación de los medios de agar I y II y del buffer pH=6

Medio N° I de agar.-

Peptona	6 g
Digerido pancreático de caseína	4 g
Extracto de levadura	3 g
Extracto de carne	1.5 g
Dextrosa	1 g
Agar	15 g
Agua destilada cbp	1000 ml

Se disolvió calentando, se ajustó el pH a 6.7 y el volumen a 1 litro, se dejó hervir unos minutos y esterilizó por 30 min a 15

1b de presión.

Medio N° II de agar.-

Peptona	6 g
Extracto de levadura.	3 g
Extracto de carne	1.5 g
Agar	15 g
Agua destilada cbp	1000 ml

Se disolvió calentando, se ajustó el pH a 6.7 y el volumen a 1 litro, se dejó hervir unos minutos y se esterilizó por 30 min. a 15 lb de presión.

Buffer de fosfatos pH = 6

Fosfato de potasio dibásico	2 g
Fosfato de potasio monobásico	8 g
Agua destilada y estéril cbp	1000 ml

Resultados del ensayo microbiológico del lote 23252W de
cefalotina sódica.-

\times	$\bar{\times}$	$(\times - \bar{\times})^2$
919.8	27.2	739.84
943.2	3.8	14.44
945.8	1.2	1.44
941.1	5.9	34.81
944.5	2.5	6.25
943.6	3.4	11.56
948.1	1.1	1.21
950.0	3.0	9.00
944.28	4.2	17.64
045.6	1.4	1.96
947.8	0.8	0.64
945.5	1.5	2.25
959.3	12.3	151.29
933.4	13.6	184.96
952.1	5.1	26.01
922.0	25.0	625.00
981.2	34.2	1,169.64
942.3	4.7	22.09
950.0	3.0	9.00
963.3	16.3	265.69
930.0	17.0	289.00
953.4	6.4	40.96
948.1	1.1	1.21
977.0	30.0	900.00
943.9	3.1	9.61
<hr/>		<hr/>
$\bar{\times} = 947.0$		4,535.50

$$\sigma = \sqrt{\frac{(\sum (X - \bar{X})^2)}{N - 1}} \quad \sigma = \sqrt{\frac{4535.5}{24}} = \sqrt{188.9} = 13.7 \quad \sigma = 13.7$$

$$\text{C.V.} = \frac{\sigma}{M} \times 100 \quad \text{C.V.} = \frac{13.7}{947.0} \times 100 = 1.4466 \quad \text{C.V.} = 1.4466$$

$$e = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} \quad e = \frac{13.7}{\sqrt{25}} = \frac{13.7}{5} = 2.74 \quad e = 2.74$$

Límites de Confianza:

$$\text{L.C.} = M \pm e t$$

$$P=1\% \quad 947.0 \pm 2.74 (2.80) = 947 \pm 7.67 \quad \text{L.C.} (939.3 - 954.6)$$

$$t = 2.80$$

$$P=5\% \quad 947.0 \pm 2.74 (2.06) = 947.0 \pm 5.64 \quad \text{L.C.} (941.3 - 952.6)$$

$$t = 2.06$$

$$P=10\% \quad 947.0 \pm 2.74 (1.71) = 947.0 \pm 4.68 \quad \text{L.C.} (942.3 - 951.6)$$

$$t = 1.71$$

ENSAYO YODOMETRICO.-

El ensayo yodométrico se usa como un método alternativo para determinar la potencia de la cefalotina.

En este método se está determinando la cantidad de cefalotina presente, por medio de la β -lactama de la molécula, que es la parte biológicamente activa.

La técnica yodométrica es segura, reproducible y se compara favorablemente con el ensayo microbiológico de cilindro placa, siempre y cuando se tenga la certeza de que la substancia en estudio, no presente contaminantes que consuman yodo.

Parte Experimental.-

Las pruebas se realizaron por duplicado en 25 días consecutivos. De los resultados de cada día se tomó el promedio para después efectuar el análisis estadístico.

Reactivos.-

Buffer de fosfato de potasio (1%) pH=6.- Se disolvieron 2 g de fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) y 8 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) en 750 ml de agua purificada. Se diluyó a 1000 ml con agua purificada y se mezcló bien.

Hidróxido de sodio 1 N.- Se disolvieron 45 g de hidróxido de sodio en 950 ml de agua purificada. Se adicionó una solución saturada, recientemente preparada de hidróxido de bario hasta que no se formó más precipitado. Se mezcló perfectamente y se dejó reposar toda la noche en un recipiente cerrado. Se filtró la solución y se mezcló bien, se valoró como sigue: Se secaron alrededor de 5 g de biftalato de potasio molido, a $105^\circ C$ por 3 hrs y se pesaron exactamente. Se disolvieron en 75 ml de agua libre de CO_2 , se agregaron dos gotas de fenoftaleína TS y se tituló con la solución de hidróxido de sodio hasta que se produjo un color rosa permanente. Se calculó la normalidad en base a que cada 204.23 mg de biftalato de potasio equivalen a 1 ml de hidróxido de sodio 1N. Se ajustó la normalidad a como se requería y se revaloró.

Acido Clorhídrico 1.2N.- Se diluyeron 114 ml de ácido clorhídrico al 37% en agua purificada para hacer 1000 ml y se mezcló bien. Se valoró como sigue:

Se pesaron 1.5 g de patrón **primario** de carbonato de sodio anhidro, previamente secado a 270° C por 1 hr. Se disolvieron en 100 ml de agua y se agregaron 2 gotas de rojo de metilo TS. Se tituló con el ácido lentamente, con agitación constante, hasta que la solución tuvo un color ligeramente rosa.

Se calentó la solución a ebullición y se continuó la titulación hasta que el color rosa no se vió afectado por la ebullición.

Se calculó la normalidad en base a que cada 63.594 mg de carbonato de sodio anhidro equivalen a 1 ml de HCl 1.2N. Se ajustó la normalidad y se revaloró.

Almidón TS.- Se trituró 1 g de almidón de papa con 10 ml de agua fría y se vació lentamente, con agitación constante, en 200 ml de agua hirviendo. Se hirvió la mezcla hasta obtener un fluído ligero y translúcido. Se dejó reposar y se usó solamente el líquido claro sobrenadante.

Yodo 0.1N .- Se disolvieron alrededor de 14 g de yodo en una solución de 36 g de yoduro de potasio en 100 ml de agua, se

agregaron 3 gotas de HCl (37%), se diluyó a 1000 ml con agua y se mezcló bien. Se valoró así:

Se pesaron exactamente alrededor de 150 mg de trióxido de arsénico y se disolvieron en 20 ml de NaOH 1N, se calentó cuando fue necesario.

Se diluyó con 40 ml de agua, se agregaron 2 gotas de anaranjado de metilo TS y se agregó HCl al 10% hasta que el color amarillo pasó a rosa.

Entonces se agregaron 2 g de bicarbonato de sodio, se diluyó con 50 ml de agua y se agregaron 3 ml de almidón TS. Se tituló lentamente con la solución de yodo hasta que se obtuvo un color azul permanente. Se calculó la normalidad en base a que cada 4.946 mg de trióxido de arsénico equivalen a 1 ml de yodo 0.1N.

Para hacer yodo 0.01N, se diluyeron 100 ml del yodo 0.1N a 1000 ml con agua y se mezcló bien.

Tiosulfato 0.1N.- Se disolvieron 26 g de tiosulfato de sodio pentahidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y 200 mg de carbonato de sodio anhidro en 1000 ml de agua recientemente hervida y enfriada. Se mezcló bien y se valoró por titulación con el yodo 0.1N.

Tiosulfato de sodio 0.01N.- Se diluyeron 110 ml de tiosulfato 0.1N a 1000 ml con agua purificada y se mezcló bien. Se guardó

en recipientes cerrados y se valoró por triplicado de la forma siguiente:

Se colocaron exactamente 5 ml de dicromato de potasio 0.02N en un matraz de yodo de 125 ml. Se agregó 1 ml de ácido sulfúrico al 10% y 5 ml de una solución de yoduro de potasio al 10%, en este orden. Se tapó el matraz, se agitó suavemente para mezclar, se selló con agua y se tituló con el tiosulfato 0.01N, agregando 1 ml de almidón TS cerca del punto final. Se promediaron los valores obtenidos. Se corrió un blanco con 5 ml de agua, 1 ml de ácido sulfúrico (10%) y 5 ml de yoduro de potasio (10%), agregados en este orden y se hicieron las correcciones necesarias.

Procedimiento.-

Preparación de la sustancia de referencia.- Se preparó una solución que contenía aproximadamente 2000 mcg/ml. La concentración debía de estar entre 1600 y 2400.

Se pesaron exactamente alrededor de 50 mg del patrón de referencia USP, previamente secado a 60° C por 3 hrs y se llevó a 25 ml con buffer de fosfatos pH=6. Esta fue la solución (S)

Preparación de la muestra.- Se preparó una solución de 2000 mcg/ml aproximadamente. Se pesaron alrededor de 20 mg de la materia prima, previamente secada, y se llevaron a 10 ml con buffer de fosfatos pH=6. Esta fue la solución (P)

Ya preparadas las soluciones se trataron igual la solución de referencia y la solución problema.

Se tomaron, una alícuota de 2 ml que se colocó en un matraz de yodo de 125 ml y otra alícuota de 2 ml que se colocó en un matraz erlenmeyer de 125 ml que fue el blanco. A la alícuota en el matraz de yodo se le agregaron 2 ml de NaOH 1N, se agitó suavemente y se tapó el matraz dejando reposar a temperatura ambiente durante 15 min.

Al final de este tiempo se agregaron 2 ml de HCl 1.2N, agitando, e inmediatamente se agregaron 10 ml de yodo 0.01N; se tapó el matraz, se agitó y se selló con agua, dejándolo otros 15 min. Cumplido este tiempo se lavó el tapón y las paredes del matraz cuidadosamente con agua. El exceso de yodo se

tituló con tiosulfato de sodio 0.01N agregando 1 ml de almidón TS cerca del punto final.

A la alícuota en el matraz erlenmeyer se le agregaron 10 ml de yodo 0.01N e inmediatamente se titularon con el tiosulfato de sodio 0.01N, agregando 1 ml de almidón TS cerca del punto final. Este gasto fue el blanco.

P_1 = Solución problema.

P_2 = Blanco de la solución problema.

S_1 = Solución de referencia.

S_2 = Blanco de la solución de referencia.

	P_1	P_2	S_1	S_2
Solución P	2 ml	2 ml	-	-
Solución S	-	-	2 ml	2 ml
NaOH: 1N	2 ml		2 ml	
Dejar en reposo 15 min. P_1 y S_1				
HCL: 1.2 N	2 ml		2 ml	
YODO: 0.01N	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Dejar en reposo 15 min. P_1 y S_1				
Titular con tiosulfato 0.01N				

La potencia de la solución problema se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{mcg/mg de cefalotina sódica} = \frac{V_{P2} - V_{P1}}{V_{S2} - V_{S1}} \times \frac{\text{mg S}}{V_S} \times \frac{\text{Potencia S}}{1} \times \frac{2}{1} \times \frac{10}{\text{mgP}} \times \frac{1}{2}$$

donde:

V_{P1} = volumen de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.01N consumido por la solución problema

V_{P2} = Volumen de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.01N, consumido por el blanco del problema.

V_{S1} = Volumen de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.01N consumido por la solución de referencia.

V_{S2} = Volumen de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.01N consumido por el blanco de la solución de referencia.

mg_S = mg pesados de la sustancia de referencia.

V_S = Volumen al que se llevó la sustancia de referencia.

mg P = mg pesados de la sustancia problema.

Resultados del ensayo yodométrico del lote 23252W de
cefalotina sódica.-

x	$x - \bar{x}$	$(x - \bar{x})^2$
944.8	0.2	0.04
944.3	0.3	0.09
944.4	0.2	0.04
945.7	1.1	1.21
946.2	1.6	2.56
935.8	8.8	77.44
945.7	1.1	1.21
952.1	7.5	56.25
945.1	0.5	0.25
939.3	5.3	28.09
946.0	1.4	1.96
958.1	13.5	182.25
950.1	5.5	30.25
944.4	0.2	0.04
931.7	12.9	166.41
940.5	4.1	16.81
945.7	1.1	1.21
954.0	9.4	88.36
937.2	7.4	54.76
944.9	0.3	0.09
943.3	1.3	1.69
945.0	0.4	0.16
946.1	1.5	2.25
945.3	0.7	0.49
941.2	3.4	611.56
<hr/>		<hr/>
$\bar{x} = 944.6$		725.47

$$\sigma = \sqrt{\frac{(\sum (X - \bar{X})^2)}{N - 1}} = \sqrt{\frac{725.47}{24}} = \sqrt{30.22} = 5.5 \quad \sigma = 5.5$$

$$\text{C.V.} = \frac{\sigma}{M} \times 100 \quad \text{C.V.} = \frac{5.5}{944.6} \times 100 = 0.5825 \quad \text{C.V.} = 0.5825$$

$$e = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} \quad e = \frac{5.5}{\sqrt{25}} = \frac{5.5}{5} = 1.1 \quad e = 1.1$$

Límites de Confianza:

$$\text{L.C.} = M \pm e t$$

$$\begin{array}{l} P = 1\% \\ t = 2.80 \end{array} \quad 944.6 \pm 1.1 (2.80) = 944.6 \pm 3.08 \quad \text{L.C.} (941.5 \text{ — } 947.6)$$

$$\begin{array}{l} P = 5\% \\ t = 2.06 \end{array} \quad 944.6 \pm 1.1 (2.06) = 944.6 \pm 2.26 \quad \text{L.C.} (942.3 \text{ — } 946.8)$$

$$\begin{array}{l} P = 10\% \\ t = 1.71 \end{array} \quad 944.6 \pm 1.1 (1.71) = 944.6 \pm 1.88 \quad \text{L.C.} (942.7 \text{ — } 946.4)$$

ENSAYO COLORIMETRICO .-

La cefalotina sódica se puede analizar mediante el complejo colorido que se forma con la adición de un reactivo férrico, al correspondiente ácido hidroxámico producido mediante el tratamiento con hidroxilamina.

En este método se mide el contenido total de β -lactama, ya que ésta es la que reacciona con la hidroxilamina, para dar el ácido hidroxámico.

En este método también se está valorando el grupo responsable de la actividad farmacológica de la sustancia.

Parte experimental.-

Las pruebas se realizaron por duplicado durante 25 días.

De los resultados de cada día se tomó el promedio para después efectuar el análisis estadístico.

Reactivos.-

Solución de clorhidrato de hidroxilamina.- Se disolvieron 350 g

de clorhidrato de hidroxilamina en suficiente agua destilada para hacer 1 litro.

Solución buffer.- Se disolvieron 173 g de hidróxido de sodio y 20.6 g de acetato de sodio en suficiente agua destilada para hacer 1 litro.

Hidroxilamina neutralizada.- Se mezcló un volumen de la solución de clorhidrato de hidroxilamina con un volumen de buffer. Se determinó el pH y se ajustó cuando fue necesario a 7.0 ± 0.1 , agregando una cantidad adicional de uno de los componentes. A un volumen de esta solución neutralizada se agregaron 8 volúmenes de agua destilada y 2 volúmenes de etanol del 95%. Esta solución sólo se podía usar en el mismo día de su preparación.

Sulfato férrico amoniacal.- Se disolvieron 272 g de sulfato férrico amoniacal en una mezcla de 26 ml de ácido sulfúrico concentrado y suficiente agua destilada para hacer 1 litro. Este reactivo podía ser usado durante una semana si se mantenía en un frasco ámbar a la temperatura ambiente.

Preparación de la solución patrón.- Se disolvió una cantidad exactamente pesada de la sustancia de referencia USP, en suficiente buffer de fosfato de potasio al 1%, pH=6, para hacer una solución que contenía 2.5 mg de cefalotina sódica por mililitro.

Preparación de la solución problema.- Se disolvió una cantidad exactamente pesada de la sustancia en estudio en suficiente buffer de fosfato de potasio al 1%, pH=6, para hacer una solución que contenía 2.5 mg de cefalotina sódica por mililitro.

Procedimiento.- Se usó un volumen de 1 a 2 ml de la solución patrón y de la solución problema, se adicionó un volumen igual de agua y se mezcló.

Se agregaron los siguientes reactivos en las proporciones volumétricas especificadas con respecto a las soluciones patrón y problema: Se agregaron 1.25 volúmenes del reactivo de hidroxilamina neutralizada y se dejó que reaccionara por 5 min, se agregaron 1.25 volúmenes de reactivo de sulfato férrico amoniacal, se mezcló y después de 3 min se determinó la absorbancia de la solución resultante a una longitud de onda de 480 nm, usan-

do un espectrofotómetro adecuado y un blanco de reactivos preparado del modo siguiente: Se trató un volumen de agua de la misma manera que las soluciones patrón y problema. El tiempo transcurrido después de la adición del reactivo de sulfato férrico amoniacal y la lectura de la absorbancia debía ser precisamente el mismo (dentro de un lapso de 10 seg) para cada solución.

La potencia de la solución se calculó de la manera siguiente:

$$\text{Microgramos por mg de muestra} = \frac{(A_1) (\text{Potencia (en mcg/ml de la sol patrón)})}{(A_2) (\text{mg de muestra por ml de sol. prob.})}$$

(A_1) = Absorbancia de la solución problema.

(A_2) = Absorbancia de la solución patrón.

Resultados del ensayo colorimétrico con hidroxilamina del

lote 23252W de cefalotina sódica.-

x	$x - \bar{x}$	$(x - \bar{x})^2$
946.5	0.5	0.25
945.9	0.1	0.01
942.8	3.2	10.24
944.1	1.9	3.61
949.3	3.3	10.89
956.2	10.2	104.04
952.7	6.7	44.89
944.8	1.2	1.44
950.9	4.9	24.01
959.0	13.0	169.00
943.3	2.7	7.29
931.2	14.8	219.04
944.3	1.7	2.89
946.1	0.1	0.01
935.2	10.8	116.64
950.2	4.2	17.64
947.4	1.4	1.96
948.7	2.7	7.29
945.2	0.8	0.64
944.7	1.3	1.69
940.0	6.0	36.00
943.7	2.3	5.29
944.9	1.1	1.21
948.3	2.3	5.29
945.0	1.0	1.00
<hr/>	<hr/>	<hr/>
$\bar{x} = 946.0$		792.26

$$\sigma = \sqrt{\frac{(\sum X - \bar{X})^2}{N-1}} = \sqrt{\frac{792.26}{24}} = \sqrt{33.0} = 5.8 \quad \sigma = 5.8$$

$$C.V. = \frac{\sigma}{M} \times 100 \quad C.V. = \frac{5.8}{946.0} \times 100 = 0.613 \quad C.V. = 0.613$$

$$e = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} \quad e = \frac{5.8}{\sqrt{25}} = \frac{5.8}{5} = 1.16 \quad e = 1.16$$

Límites de Confianza:

$$L.C. = M \pm e t$$

$$P = 1\% \quad 946.0 \pm 1.16 (2.80) = 946.0 \pm 3.24 \quad L.C. (942.7 \text{ --- } 949.2)$$

$$t = 2.80$$

$$P = 5\% \quad 946.0 \pm 1.16 (2.06) = 946.0 \pm 2.38 \quad L.C. (943.6 \text{ --- } 948.3)$$

$$t = 2.06$$

$$P = 10\% \quad 946.0 \pm 1.16 (1.71) = 946.0 \pm 1.98 \quad L.C. (944.0 \text{ --- } 947.9)$$

$$t = 1.71$$

PRUEBAS DE ESTABILIDAD.-

Sólo se verificaron pruebas de estabilidad en solución del lote 23252W de cefalotina sódica.

Estas pruebas se realizaron con el objeto de determinar, por cuánto tiempo se podría emplear, sin que presentara pérdida significativa de su potencia, una solución patrón del lote 23252W de cefalotina sódica, si se aceptara éste como sustancia de referencia secundaria, para hacer las futuras valoraciones de otros lotes.

Parte experimental.-

Para ver la estabilidad del lote 23252W de cefalotina sódica en solución, se determinó la pérdida de potencia en varias soluciones preparadas a partir de él. El método analítico que se empleó para medir esta pérdida de potencia fue el ensayo microbiológico de cilindro placa.

Las soluciones de cefalotina sódica se hicieron en buffer de fosfatos pH=6 y se determinó la estabilidad de ellas a temperatura ambiente y a temperatura de refrigeración.

Se prepararon 10 soluciones con una concentración de 2 mcg por ml y se les determinó la potencia; después 5 de ellas se almacenaron en el refrigerador y las otras 5 se dejaron a temperatura ambiente. A todas las soluciones se les determinó la potencia diariamente durante los 4 días siguientes a su preparación y se promediaron los resultados de las soluciones sometidas a las mismas condiciones.

Resultados.-

Los resultados reportados son los promedios de las potencias de las soluciones sometidas a las mismas condiciones.

Tiempo	Potencia	
	Temp. ambiente.	Temp. refrigeración
Recién preparada	946.1	947.2
2° día	850.9	940.1
3 er día.	740.5	931.7
4° día	600.3	910.5
5° día	508.1	890.7

IV CONCLUSIONES .

I - Resultados de las pruebas a las que se sometió el lote 23252W de cefalotina sódica.

Pruebas .	Resultados .
Descripción:	Las características organolépticas del lote 23252W fueron similares a las de la sustancia de referencia USP .
Solubilidad:	Similar la del lote 23252W, a la de la sustancia de referencia USP .
Espectro IR (En pastilla de KBr)	El espectro del lote 23252W fue consistente con la estructura de la cefalotina sódica, e idéntico al de la sustancia de referencia USP .
Espectro UV:	El del lote 23252W fue idéntico al de la sustancia de referencia USP .
$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (265 nm)	Lote 23252W: 204.5 Subs . Ref . USP: 204.5
$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (237 nm)	Lote 23252W: 336.7 Subs . Ref . USP: 336.5

A_{265} / A_{237}	Lote 23252W: 0.606
	Subs. Ref. USP: 0.606
Rotación específica: (5% en agua)	Lote 23252W: +128.9°
	Subs. Ref. USP: +129.2°
Pérdida al secado (3 hrs. 60°C, vacío)	Lote 23252W: 0.24%
	Subs. Ref. USP: 0.11%
Metales pesados:	Lote 23252W: 20 ppm
	Subs. Ref. USP: 10 ppm
Cromatografía en capa fina.	En ambas sustancias solo aparece una mancha, R_f Lote 23252W: 0.620
	R_f Subs. Ref. USP: 0.617
Ensayo microbiológico: (cilindro - placa)	Potencia = 947.0 mcg/mg
Ensayo yodométrico:	Potencia = 944.6 mcg/mg
Ensayo colorimétrico:	Potencia = 946.0 mcg/mg
Estabilidad:	A temperatura ambiente, las solucio- nes acuosas del lote 23252W de cefalo- tina sódica, se descomponen rápidamente.
	A temperatura de refrigeración, las soluciones acuosas del lote 23252W de

cefalotina sódica, se descomponen más lentamente, conservan su potencia casi inalterada durante dos días.

2 - Considerando los resultados recomiendo usar el lote - 23252W de cefalotina sódica como sustancia de referencia secundaria, con potencia de:

Microbiológica	-	947.0 mcg/mg
Yodométrica	-	944.6 mcg/mg
Colorimétrica	-	946.0 mcg/mg

3 - Las soluciones acuosas del lote 23252W, usadas ya como soluciones de referencia, es conveniente que se preparen el mismo día en que van a utilizarse, para evitar posibles errores.

4 - El lote 23252W de cefalotina sódica, se deberá almacenar en viales de vidrio ámbar, herméticamente cerrados y en cantidades de 250 mg. Los viales del patrón secundario deberán mantenerse en refrigeración dentro de un desecador.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Analytical Microbiology.
Frederick Kavanagh. Vol. II
Academic Press, New York 1972.
- 2.- Analytical Profiles of Drug Substance.
Vol. II - Klaus Florey.
Academic Press, New York 1972 Pag. 320-341.
- 3.- A textbook of Pharmaceutical Analysis.
Kenneth A. Connors.
John Wiley & Sons, Inc. New York, London, Sidney 1967.
Pag. 79-82, 450-452.
- 4.- British Pharmacopoeia
1973
Pag. 90-91.
- 5.- British Pharmaceutical Codex.
1973
Pag. 86-87.
- 6.- Farmacia Química
Consuelo Hidalgo.
Ed. Alhambra, S. A. Pag. 506-509.
- 7.- Federal Register.
March 7, 1972 F.R. 4906
148 W. 1, 141.507
- 8.- Pharmaceutical Reference Standards.
O. Wallen.
Who Cronicle. Vol. 26, N° 9 pag. 389-393.
- 9.- United States Pharmacopea
N° XVIII
- 10.- R. R. Chauvette, E. H. Flynn
J. Am. Chem. Soc. 84, 3401 (1962)
- 11.- H.R.V. Arnstein and Morris,
Biochem J. 76, 357 (1960)
- 12.- E.P. Abraham and g.g.f. Newton
Advances in Chemotherapy Vol. 2
Academic Press, New York (1965)

- 13.- R.B. Morin, B.G. Jackson
J. Am. Chem. Soc. 84, 3400 (1962)
- 14.- R. Heymes, G. Amiard
Compt. Read Acad. - Sc. Paris Série C.
263, 170 (1966)
- 15.- R.B. Morin, B.G. Jackson
J. Am. Chem. Soc. 85, 1897 (1963)
J. Am. Chem. Soc. 91, 1401 (1969)
- 16.- R.B. Woodward, K. Heusler,
J. Am. Chem. Soc. 88, 852 (1966)
- 17.- H.R. Sullivan and R. E. McMakon
Biochem. J. 102, 976 (1967)
- 18.- A. L. Demain, Nature 210, 426 (1966)
- 19.- W.E. Wick
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1965, 870 (1966)
- 20.- C.C. Lee, E. B. Herr
Clin. Med. 70, 1123 (1963)
- 21.- E.P. Abraham
Am. J. Med. 39, 692 (1965)
- 22.- S.H. Eggers, T. R. Emerson
Proc. Chem. Soc. (London), p. 248 (1963)
- 23.- L. D. Sabath, M. Jago
Biochem J. 96, 739 (1965)
- 24.- J.M.T. Hamilton-Miller, G.G.F. Newton
Biochem J. 116, 371 (1970)
- 25.- J.M.T. Hamilton-Miller E. Richards
Biochem J. 116, 385 (1970)
- 26.- G.G.F. Newton, E. P. Abraham
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1967, 449 (1968)
- 27.- M. Cole.
Nature 203, 519 (1964)
- 28.- W. Kaufmann and L. Bauer
Nature 203, 520 (1964)

- 29.- R. S. Griffith and H. R. Black
J. Am. Med. Assoc. 189, 823 (1964)
- 30.- C.C. Lee and R. C. Anderson
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1962, 695 (1963)
- 31.- Herbert Arkin & Raymond R. Colton
Tables for Statisticians
Pag. 121 .