



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
Laboratorio de Investigación Farmacéutica



Estudio de estabilidad en uso de tabletas de 6-mercaptopurina de 50mg de venta
en la zona metropolitana del valle de México.

Tesis

Presenta:

Salazar Herrera Marco Antonio

Director:

Dr. Vicente Jesús Hernández Abad

Asesor:

Dra. Elizabeth Guadalupe Sánchez González



Ciudad de México

2019



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.

AGRADECIMIENTO

PAPIME.

Este trabajo fue financiado por el proyecto PAPIME PE208718 “Mejora de la Enseñanza y el Aprendizaje de los procesos de Absorción, Distribución, Biotransformación y Excreción de Fármacos mediante el desarrollo e implementación de materiales Educativos Innovadores”, por lo que se agradece al apoyo de la UNAM, a través de la DGAPA.

AGRADECIMIENTO

PAPIIT

Este trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT IT201619 “Diseño de matrices multiparticuladas de liberación controlada preparadas mediante el proceso sol-gel, aplicables en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, por lo que se agradece al apoyo de la UNAM, a través de la DGAPA.

AGRADECIMIENTO

Congreso.

Este trabajo fue presentado en el “54° Congreso Mexicano de Química, 38° Congreso Nacional de Educación Química”, de la Sociedad Química de México, A.C., llevado a cabo del 30 de Septiembre al 3 de Octubre, 2019 en Puebla, Pue., México.

AGRADECIMIENTO

A mis padres y hermanos, por su apoyo y motivación que me brindaron durante esta etapa de mi vida. También les doy las gracias por ser un ejemplo de lucha constante y preparación continua, ya que sin su ejemplo y apoyo no hubiera logrado concluir este trabajo.

A mi familia que de alguna manera estuvieron presentes con su apoyo.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y a la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas y formar parte de esta gran institución, donde no solamente tuve una formación profesional, sino también una formación cultural, crítica y con un gran sentido social, lo cual me ha permitido ser una persona íntegra.

A todo el equipo del Laboratorio de Investigación Farmacéutica (LIF), en especial al Dr. Vicente J. Hernández Abad, a la Dra. Elizabeth G. Sánchez González, a la MASS. Cynthia Espinosa Contreras y al Q.F.B. José I. Vázquez Olvera, por su apoyo, conocimientos y enseñanzas transmitidos durante mi estancia en el LIF. También les agradezco el haberme dado la oportunidad de pertenecer a este gran equipo y por haber representado al LIF, en el congreso de ciencias Químicas en la ciudad de Puebla, México. Gracias.

A mis sinodales por las observaciones y el tiempo dedicado para la revisión de este trabajo. Gracias.

A mis amigos que siempre estuvieron presentes con su apoyo y comprensión, por las experiencias que vivimos como universitarios y por su amistad. Gracias.

Tabla de contenido

1. Introducción.....	9
2. Antecedentes.....	10
2.1 Descripción de la 6-mercaptopurina monohidratada.....	10
2.2 Propiedades de la 6-mercaptopurina monohidratada.....	10
2.2.1 Propiedades Químicas.....	10
2.2.2 Propiedades Físicas.....	11
2.2.3 Propiedades Fisicoquímicas y espectrales.....	11
2.3 Aplicaciones terapéuticas.....	12
2.3.1 Fases del tratamiento de la leucemia linfocítica aguda (LLA).....	12
2.3.2 Uso de la 6-mercaptopurina en la fase de mantenimiento de la LLA.....	13
2.3.3 Mecanismo de acción de la 6-mercaptopurina.....	13
2.3.4 Forma farmacéutica de la 6-mercaptopurina en venta en el Valle de México.....	14
2.4 Estabilidad de la 6-mercaptopurina.....	15
2.4.1 Definición.....	15
2.4.2 Tipos de estudios de estabilidad.....	15
2.4.3 Estabilidad en uso.....	16
2.4.4 Ejemplos de estudios de estabilidad en uso de medicamentos.....	17
2.4.5 Estudios de estabilidad en uso de la 6-mercaptopurina.....	19
2.4.5.2 Reacciones de degradación y principales productos de degradación....	22
2.4.6 Métodos indicativos de estabilidad.....	25
2.4.7 Técnicas analíticas utilizadas para elucidar e identificar a los productos de degradación de la 6-mercaptopurina.....	26
3.0 Planteamiento del problema.....	30
4. Hipótesis.....	31
5. Objetivo general.....	31
5.1 Objetivos particulares.....	31
6. Proceso experimental.....	32
6.1.1 Reactivos.....	33
6.1.2 Equipos.....	34
6.2 Metodología utilizada para el desarrollo del método indicativo de estabilidad.....	35

6.3 Metodología utilizada para la generación de los productos de degradación de la 6-mercaptopurina.	38
6.3.1 Preparación de las soluciones.	39
6.3.2 Modificaciones finales al método indicativo de estabilidad	43
6.4 Metodología para la validación del método indicativo de estabilidad.	43
6.4.1 Preparación de las soluciones.	44
6.4.2. Aptitudes del sistema y el método, evaluadas durante la validación	45
6.4.3 Validación del método.	46
6.5 Metodología para la evaluación de la estabilidad en uso de las tabletas de 6-mercaptopurina.	50
6.5.1 Metodología para la prueba de apariencia.	51
6.5.2 Metodología para la prueba de color.	51
6.5.3 Metodología para la prueba de variación de peso.	52
6.5.4 Metodología para la prueba de valoración.	52
6.5.5 Metodología para la prueba de identidad.	55
6.5.6 Metodología para la prueba de disolución.	55
7. Resultados y análisis de resultados.	58
7.1 Resultados de la revisión en artículos sobre métodos para cuantificar 6-mercaptopurina.	58
7.2 Resultados del método indicativo de estabilidad.	61
7.2.1 Descriptores cromatográficos.	63
7.3 Resultados de la validación.	63
7.4 Resultados de la degradación forzada.	65
7.5 Resultados del estudio de estabilidad en uso.	66
7.5.1 Resultados de Apariencia.	67
7.5.2 Resultados de la evaluación del color de las tabletas.	70
7.5.3 Resultados de la prueba de variación de peso.	71
7.5.4 Resultados de la valoración.	71
7.5.5 Resultados de la prueba de disolución.	72
7.5.6 Resultados de identidad.	73
8. Análisis de resultados	74
8.1 Análisis de resultados de la revisión de métodos para cuantificar 6-mercaptopurina.	74
8.2 Análisis de resultados del desarrollo del método indicativo de estabilidad para la 6-mercaptopurina.	75

8.3	Análisis de resultados de la validación.....	76
8.3.1	Validación del sistema.....	76
8.3.2	Validación del método.	80
8.4	Análisis de resultados de la degradación forzada de la 6-mercaptopurina.	84
8.4	Análisis de resultados de la estabilidad en uso.	90
8.5.1	Resumen de las pruebas realizadas durante el estudio de estabilidad en uso.	98
9.	Conclusiones.....	99
10.	Referencias bibliográficas.	100
Anexo A.	107
Imágenes de las cromatografías en capa fina.....		107
Anexo B.	109
Imágenes de los cristales precipitados.		109
Anexo C.	112
Termograma de los cristales obtenidos en la hidrolisis a pH 4.0, 6.0 y 8.0.		112
Anexo D.	114
Espectros IR de las muestras de degradación de la 6-mercaptopurina.		114
Anexo F.	121
Cromatogramas de las muestras de oxidación y fotooxidación en luz Ultravioleta.		121

1. Introducción.

La estabilidad en uso tiene como objetivo evaluar la capacidad del medicamento de permanecer inalterado durante el tiempo en que sea, después de la apertura y administración de la primera dosis.

En este trabajo se evaluó la estabilidad en uso de tabletas que contienen 6-mercaptopurina siguiendo las recomendaciones de la guía de la ICH Q1A (R2) Estudios de estabilidad para nuevos fármacos y productos, la guía de la EMA CPMP/QWP/2934/99, guía de estudios de estabilidad en uso de productos medicinales para humanos y la NOM-073-SSA1-2015 estabilidad de fármaco y medicamentos, así como de remedios herbolarios. Esto se llevó a cabo con muestras representativas de tabletas de 6-mercaptopurina de la marca "Purinethol" comercializados en la Zona Metropolitana del Valle de México por los laboratorios ASPEN S.A. de C.V.

Para evaluar la estabilidad en uso de las tabletas de 6-mercaptopurina se desarrolló un método indicativo de estabilidad utilizando la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) en fase reversa.

También se realizó la degradación forzada de la 6-mercaptopurina para generar los productos de degradación que pueden formarse durante el tiempo en que se lleve a cabo el estudio de las tabletas y de igual forma se evaluó la disolución siguiendo las recomendaciones de la monografía del medicamento, así como el MGA. 0291 de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 12ª edición.

2. Antecedentes.

2.1 Descripción de la 6-mercaptopurina monohidratada.

La 6-mercaptopurina es un análogo natural de la purina, hipoxantina y adenina. La mercaptopurina, además es uno de los principales agentes utilizados para tratar la leucemia linfoblástica aguda durante la etapa de mantenimiento. Existe como tratamiento para enfermedades autoinmunes que incluyen lupus erimatoso sistémico, artritis reumatoide aguda, síndrome nefrótico idiopático, colitis ulcerosa y síndrome intestinal, entre otras¹.

2.2 Propiedades de la 6-mercaptopurina monohidratada.

2.2.1 Propiedades Químicas.

Tiene un peso molecular equivalente a 170.2g/mol. Su estructura química está compuesta de dos anillos heterocíclicos, el primer anillo corresponde a un imidazol y el segundo anillo a una pirimidina y ligado a estos anillos una molécula de agua proveniente de la cristalización. El grupo funcional que tiene esta molécula es el grupo tiol (R-S-R), unido a un átomo de carbono ubicado en la posición 4 del anillo pirimidínico. La 6-mercaptopurina puede donar 2 hidrógenos lo cual lo vuelve un ácido débil, teniendo así dos constantes de disociación (pka), $pka_1=7.7$ proveniente del nitrógeno de la pirimidina y $pka_2= 11.14$ proveniente de uno de los nitrógenos del imidazol^{1,2}.

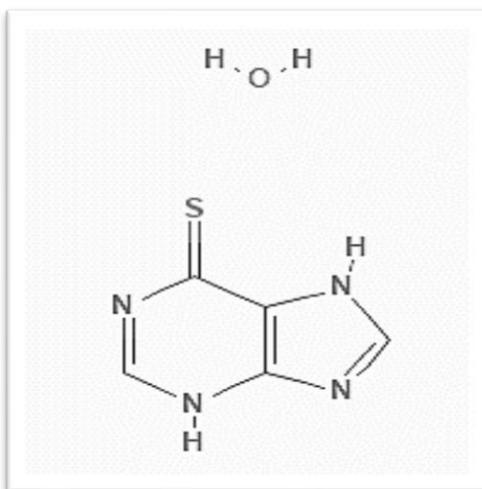


Imagen 1.0. Estructura molecular de la 6-mercaptopurina monohidratada.

2.2.2 Propiedades Físicas.

La 6-mercaptopurina físicamente es un cristal de color amarillo, inodoro con un punto de fusión entre 305°C y 313°C. Algunos autores reportan que la solubilidad de la 6-mercaptopurina es de 6848mg/L a una temperatura de 30°C¹.

2.2.3 Propiedades Fisicoquímicas y espectrales.

La 6-mercaptopurina tiene un coeficiente de reparto octanol-agua de 0.01, este dato nos indica que es 2 veces más soluble en agua que en octanol¹.

La 6-mercaptopurina absorbe en la región UV en un rango de 230nm a 335nm, teniendo un máximo de absorbancia a los 330nm y un coeficiente de absortividad molar ($\text{Log}E = 4.28$) en soluciones alcalinas^{1,3}.

2.3 Aplicaciones terapéuticas.

2.3.1 Fases del tratamiento de la leucemia linfocítica aguda (LLA).

Las asignaciones de tratamiento con base al riesgo es la principal estrategia terapéutica que se utiliza en niños con (LLA). Este enfoque permite que los niños que históricamente han obtenido muy buenos resultados con una terapia modesta eviten ser sometidos a terapias más intensivas y tóxicas, a la vez que les permite a los niños que han tenido menos probabilidades de supervivencia a largo plazo, el recibir terapias más intensivas que puedan aumentar sus probabilidades de curación⁴.

El tratamiento de los niños con LLA se divide en las siguientes etapas:

- Fase de Inducción: esta es la primera fase del tratamiento. La meta es destruir las células leucémicas de la sangre y la médula ósea. Esto pone la leucemia en estado de remisión. La fase de inducción para los pacientes con LLA incluye el uso de un glucocorticoide (prednisona o dexametasona), el rango de dosis de la prednisona es de 40-60 mg/m² y de la dexametasona de 6-10 mg/m⁴.
- Fase de consolidación/reinducción: se define como uno o más periodos de tratamiento intensificados administrados después de la inducción, cuyo objetivo es mantener la remisión leucémica continua y limitar un nuevo crecimiento de células malignas resistentes a los antineoplásico⁴.
- Fase de mantenimiento: es la última fase del tratamiento también llamada fase de continuación. La mayoría de los planes de tratamiento usan **6-mercaptopurina (6-MP)** diariamente y metotrexato semanalmente,

administrados en forma de tabletas, frecuentemente junto con vincristina, que es administrada en una vena (IV), y un esteroide (prednisona o dexametasona)⁴.

2.3.2 Uso de la 6-mercaptopurina en la fase de mantenimiento de la LLA.

Como se menciona en las guías clínicas para el tratamiento de la LLA, la 6-mercaptopurina es utilizada diariamente y el metotrexato semanalmente. La dosis bajo la cual se debe de administrar la 6-mercaptopurina es de 50-75mg/m²/día, el reajuste de las dosis de 6-mercaptopurina y metotrexato deberá realizarse conforme al conteo de los leucocitos (>1000 por mm⁴). Durante un tratamiento en fase de mantenimiento, el mismo frasco de 6-mercaptopurina, una vez abierto, puede ser utilizado por un mes o más, en función de la dosis ponderal y el conteo leucocitario.

2.3.3 Mecanismo de acción de la 6-mercaptopurina.

La 6-mercaptopurina pertenece a un grupo de fármacos a los que se les conocen como antimetabolitos puesto que, al tener estructuras químicas similares a los intermediarios del metabolismo y síntesis de ácidos nucleicos celulares generan alteraciones en el metabolismo celular, ejerciendo su efecto sobre la fase S⁵.

Su mecanismo de acción contempla la transformación de la 6-mercaptopurina de manera intracelular en su forma activa a través de la fosforilación de la hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa (HGPRT) y luego es metabolizada a la forma de trifosfato. El trifosfato es incorporado a los ácidos nucleicos e inhibe la síntesis de purinas actuando sobre la reacción catalizada por la 5-fosforribosil-1-pirofosfato-amidotransferasa, alterando el procesamiento y traducción del ARN_m⁶.

2.3.4 Forma farmacéutica de la 6-mercaptopurina en venta en el Valle de México.

La única forma farmacéutica con la que se comercializa la 6-mercaptopurina en México son las tabletas. En el país solo existe una marca comercial bajo el nombre de Purinethol. El Purinethol contiene un frasco con 25 tabletas y cada tableta contiene 50mg de 6-mercaptopurina monohidratada.



Imagen 1.1. Frasco de Purinethol, forma farmacéutica comercializada en México.

2.4 Estabilidad de la 6-mercaptopurina.

2.4.1 Definición.

La estabilidad se define como la capacidad de un fármaco, un medicamento o un remedio herbolario contenido en un sistema contenedor-cierre de determinado material, para mantener, durante el tiempo de almacenamiento y uso, las especificaciones de calidad establecidas⁷.

2.4.2 Tipos de estudios de estabilidad

La estabilidad en el ámbito industrial se estudia de dos maneras principalmente: la estabilidad acelerada y a largo plazo. La estabilidad acelerada tiene como objetivo incrementar la velocidad de degradación química, biológica o cambios físicos de un fármaco, medicamento o remedio herbolario, esto se logra sometiéndolos a condiciones extremas de temperatura, luz y humedad.

Por su parte la estabilidad a largo plazo se estudia para comprobar las condiciones de almacenaje y vida de anaquel de un fármaco, medicamento o remedio herbolario, a través de un programa de muestreo y la evaluación de sus requisitos físicos, químicos y biológicos.

Existen otros estudios de estabilidad como la estabilidad en uso, cuyo objetivo es conocer el tiempo de vida útil de un medicamento multidosis después de abierto el sistema contenedor cierre¹³, y la estabilidad forzada o degradación forzada, cuyo objetivo es conocer nuevas rutas y productos de degradación de un fármaco, así como conocer en qué condiciones de pH, temperatura, luz y humedad se presentan estos productos⁸.

2.4.3 Estabilidad en uso.

La estabilidad en uso se define como el periodo de vida útil de un medicamento después de la apertura del sistema contenedor cierre (empaquete), tiene la finalidad de evaluar los posibles cambios físicos, químicos y microbiológicos de una forma farmacéutica de uso multidosis. El estudio de estabilidad en uso no tiene establecidas las condiciones de almacenamiento, tiempos de muestreo y periodo de análisis. Esto es debido a que las condiciones de humedad, temperatura y luz son establecidas por el laboratorio o personal que realice el estudio. La guía de estudio de estabilidad en uso para medicamentos de uso humano de la EMA establece que las condiciones de almacenamiento deben contemplar el tiempo de uso del medicamento desde la administración de la primera dosis hasta la última y que las características a evaluar deben de contemplar las propiedades físicas, químicas, fisicoquímicas y microbiológicas del medicamento.

2.4.3.1. Diseño del estudio.

El diseño del estudio debe simular el uso del medicamento. Esto quiere decir que si hay pasos previos a la administración como: la reconstitución y dilución, deben ser equiparables con los intervalos aplicados en la práctica⁹.

Los parámetros para evaluar son tres: las características físicas, químicas y microbiológicas. Cada prueba para realizar deberá contemplar estas tres características, la guía para la evaluación de la estabilidad en uso de medicamentos para uso humano los parámetros a evaluar son los siguientes⁹.

- Características físicas: claridad, apariencia, integridad del sello, material particulado, tamaño de partícula, color.

- Características químicas (contenido): potencia o Valoración, preservación microbiana, preservación frente a la oxidación (actividad antioxidante), nivel de degradación del producto, pH.
- Características microbiológicas: conteo total de mesófilos viables y esterilidad.

De igual manera la guía establece que los métodos utilizados durante el estudio deben de describir y detectar de manera inequívoca los posibles cambios de las características del medicamento y cada análisis va enfocado a las propiedades susceptibles a cambios durante el tiempo de uso⁹.

2.4.4 Ejemplos de estudios de estabilidad en uso de medicamentos.

En la actualidad son pocos los estudios que se han reportado desde 1991, año en que la guía sobre estudios de estabilidad en uso para medicamentos de uso humano fue emitida. Pero ¿Por qué es importante evaluar la estabilidad en uso? La importancia radica en que en el mercado hay muchos medicamentos los cuales se desconoce su estabilidad una vez abierto el empaque. Un claro ejemplo son los ungüentos que contienen fármacos fotosensibles: detallando el ejemplo de estos tenemos al ungüento de diclofenaco. El diclofenaco es un antiinflamatorio no esteroideo utilizado en padecimientos como artritis reumatoide entre otros, este ungüento fue sometido a condiciones foto líticas por un grupo de investigadores del departamento de farmacia, salud y nutrición de la universidad de Calabria-Italia y encontraron que el 90% del contenido de diclofenaco se degradaba a los 3.90 días¹⁰. Ellos concluyen que se necesita reformular el ungüento adicionando agentes

que favorezcan la foto estabilidad, mencionando el uso de ciclodextrinas para poder encapsular al diclofenaco y así de esta manera proveer de una matriz la cual no sea fácilmente degradable a la exposición de la luz¹⁰.

Al igual que este artículo se han encontrado otros donde mencionan la estabilidad en los dosificadores comúnmente utilizados en terapias para el almacenamiento de formas sólidas como tabletas y cápsulas. En el año 2018 García y sus colaboradores realizaron una investigación sobre el re-empaqueamiento de medicamentos como: Atenolol, aspirina, Amlodipino y Clonazepam, en dosificadores de plástico, encontrando que la incidencia en el uso de los dosificadores ha ido en incremento. Ellos concluyen que es importante tener información disponible sobre el uso de los dosificadores y hacen hincapié sobre la importancia de evaluar la estabilidad en los dosificadores de cápsulas y tabletas en específico¹¹, puesto que son estas las formas farmacéuticas vinculadas al uso de los dosificadores.

En el año de 2017 un grupo multidisciplinario del departamento de farmacia de la College University de Londres, UK, Universidad de Barcelona, España y el Instituto de ciencias farmacéuticas de Londres, UK. realizaron un estudio sobre la estabilidad física de medicamentos re empacados en dosificadores. El grupo de investigadores evaluaron la disolución, contenido de agua, morfología, desintegración y las características de los polvos a través del tiempo utilizando el difractor de rayos X, de tabletas de atenolol, aspirina y lansoprazol.

Lo que este grupo multidisciplinario encontró es lo que muchos investigadores apoyan: “Hace falta más información y colaboración entre las empresas, hospitales,

médicos, farmacéuticos y la comunidad en general para asegurar que la estabilidad de las formas sólidas se ve afectada al ser reempacada en dosificadores”¹², esto concluyen los investigadores puesto que encontraron que la disolución *in vitro* de la aspirina, atenolol y lansoprazol se ve modificada cuando es colocada dentro de los dosificadores.

2.4.5 Estudios de estabilidad en uso de la 6-mercaptopurina.

En el caso de la 6-mercaptopurina se han realizado diversos estudios sobre su estabilidad. Como ya se ha descrito, la 6-mercaptopurina es un importante fármaco antineoplásico utilizado en la fase de mantenimiento de la leucemia linfocítica aguda. La forma farmacéutica en la cual se encuentra más ampliamente en el mercado es en tabletas, estas formas farmacéuticas no suelen ser muy agradables para los pacientes infantiles, lo cual genera que en ocasiones en los hospitales que las enfermeras, médicos o los mismos farmacéuticos trituren las tabletas y las adicionen en agua con saborizantes para hacerlas más atractivas para los pacientes infantiles. Esto genera duda sobre si la 6-mercaptopurina se ve inalterada en su concentración, si esto favorece o no mejor su biodisponibilidad. Wang RJ y compañía en su artículo “mejorando la disolución y biodisponibilidad de la 6-mercaptopurina por la vía de la co-cristalización explican que la 6-mercaptopurina monohidratada tiene baja biodisponibilidad, esto debido a que su solubilidad en agua es baja (aproximadamente 0.135mg/ml)¹³. La 6-mercaptopurina pertenece a la clase II de la clasificación biofarmacéutica, esto quiere decir que la 6-mercaptopurina es un fármaco con una alta permeabilidad, pero baja solubilidad. Por lo tanto, se desconoce si la preparación de estas suspensiones sea estable y

efectiva. En el tabla 1.1 se resumieron los diferentes estudios realizados a suspensiones y cápsulas de 6-mercaptopurina.

Tabla 1.0. Resumen de los estudios de estabilidad realizados a la 6-mercaptopurina.	
Tipo de matriz	Observaciones
Suspensión	La suspensión no mostró más del 1% de pérdida de concentración de la etiqueta cuando se almacenó durante 14 días a 25°C. Lo mismo se determinó en soluciones de mercaptopurina cloruro de sodio al 0,9% o dextrosa al 5% durante el mismo periodo de tiempo ¹⁴ .
Cápsulas	Se encontró que se produjo menos del 10% de la pérdida de mercaptopurina y no aparecieron productos de descomposición detectables durante 12 meses de almacenamiento ¹⁴ .
Suspensión	Los autores encontraron menos del 5% de pérdida en 14 días a temperatura ambiente ¹⁴ .
Suspensión	La degradación de este fármaco es menor al 10% a los 14 días de almacenamiento ¹⁴ .

La degradación en los estudios previos realizados reporta menos del 10%. Con esto se aseguraría que la 6-mercaptopurina es estable en suspensión y cápsulas, pero hasta la fecha no se ha reportado un estudio de estabilidad en uso realizado a tabletas de 6-mercaptopurina.

2.4.5.1 Condiciones de estabilidad de la 6-mercaptopurina.

La 6-mercaptopurina está compuesta por dos anillos hetero atómicos. Una pirimidina y un azol, en posición 4 de la pirimidina se encuentra una molécula de tiol (SH) análogo de los alcoholes ya que presenta reacciones de oxidación y reducción similares a estos.

La degradación de la 6-mercaptopurina se ha estudiado desde 1961, año en el que se publicó el primer artículo referente a la oxidación de esta, en este artículo se detalla cada compuesto obtenido a partir de la degradación de la 6-mercaptopurina y su método de síntesis¹⁵. En la mayor parte de las reacciones de síntesis que se mencionan en este artículo el grupo tiol o mercapto (SH), es el grupo que se oxida. Como se mencionó anteriormente los tioles son análogos químicos de los alcoholes, estos se pueden reducir u oxidar dependiendo de las condiciones de reacción, por lo tanto, al estar en presencia de un agente oxidante, el azufre del grupo tiol se oxida y da paso a la formación de dos productos: la purina-6-sulfonato y la purina-6-sulfinato. La formación de estos productos es dependiente de la concentración de agente oxidante, si hay una mayor presencia de O₂ en el medio se obtendrán los productos antes mencionados, pero si la concentración de O₂ es menor al 10% se obtiene a la hipoxantina¹⁵. Estos productos se obtienen en condiciones alcalinas y en medios acuosos o también en condiciones alcalinas bajo la presencia de luz ultravioleta. Por lo tanto, la 6-mercaptopurina debe ser manipulada con precaución evitando su preparación en medios alcalinos o en presencia de agentes oxidantes como I₂, KMnO₄ y H₂O₂.

2.4.5.2 Reacciones de degradación y principales productos de degradación.

2.4.5.2.1 Reacción de acoplamiento

Los tioles son análogos químicos de los alcoholes, esto permite que tengan las mismas reacciones que estos últimos. En condiciones alcalinas y bajo condiciones atmosféricas el tiol se oxida a una sulfona. Durante esta oxidación el azufre tiene un cambio en su número de oxidación de -2 a +4, perdiendo 6 electrones.

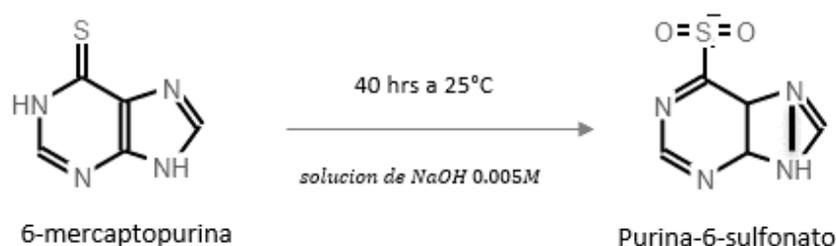


Imagen 1.2. Reacción de acoplamiento de la 6-mercaptopurina

2.4.5.2.2 Reacción de Fotólisis y fotooxidación.

La 6-mercaptopurina en condiciones de luz ultravioleta y en solución acuosa forma a la hipoxantina, bajo estas mismas condiciones, pero en presencia de H₂O₂ Hammen y colaboradores detallaron la fotooxidación de la 6-mercaptopurina.

Las condiciones bajo las cuales sometieron a la 6-mercaptopurina fueron luz ultravioleta, H₂O₂, donde la 6-mercaptopurina estaba en un medio acuoso.

Los autores del artículo detallan que la 6-mercaptopurina bajo condiciones de luz ultravioleta da paso a la formación de la hipoxantina a las 72 horas, pero en presencia de agentes oxidantes la 6-mercaptopurina se degrada no solo en hipoxantina, sino que también forma la purina-6-sulfonato y la purina-6-sulfinato¹⁶.

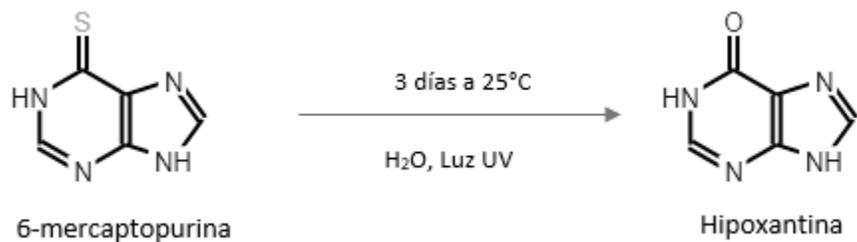


Imagen 1.3. Generación de la hipoxantina en condiciones de luz ultravioleta.

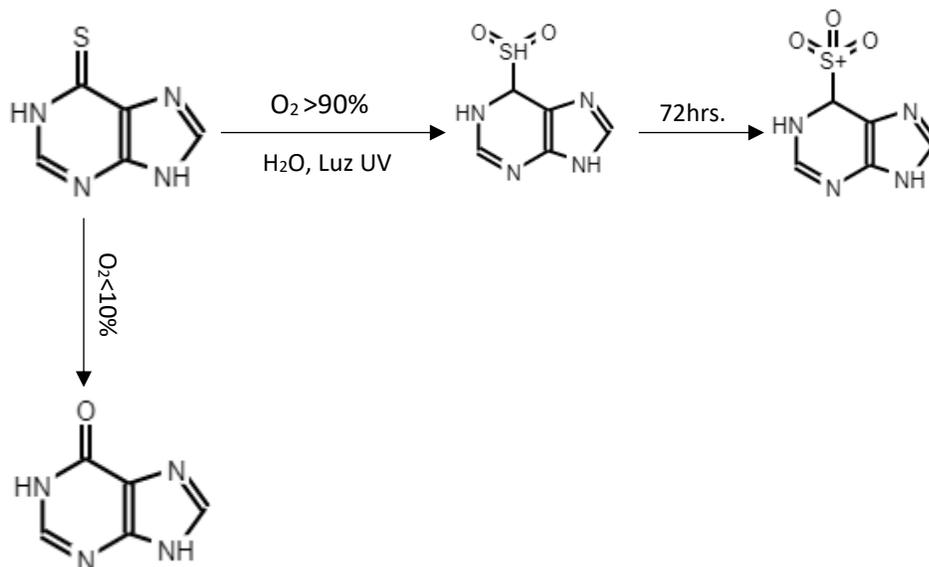


Imagen1.4. Generación de la purina-6-sulfonato, purina-6-sulfinato e hipoxantina en condiciones foto oxidantes.

Estas son las reacciones más importantes de degradación de la 6-mercaptopurina, su importancia radica en que se llevan en condiciones semejantes a las ambientales. Aún no se ha estudiado con certeza si la 6-mercaptopurina se degrada en condiciones ambientales, por lo tanto, es necesario realizar más estudios sobre la degradación bajo condiciones atmosféricas normales.

2.4.5.2.3 Propiedades físicas, químicas, fisicoquímicas y espectrales de la purina-6-sulfonato, purina-6-sulfinato e hipoxantina.

La 6-mercaptopurina, purina-6-sulfonato, purina-6-sulfinato e hipoxantina tienen una estructura química similar. En cuanto a propiedades físicas la purina-6-sulfonato y purina-6-sulfinato aún no han sido estudiadas con detalle, ya que estos compuestos son inestables y se encuentran disueltos, por ende, se necesita un método específico de extracción para poder caracterizarlos, para el caso de la hipoxantina tiene una estructura cristalina no definida y los cristales son de color amarillo limón claro en comparación con los cristales de 6-mercaptopurina que forman agujas y son de color amarillo limón cadmio.

En cuanto a solubilidad los 3 productos incluido la 6-mercaptopurina son solubles en soluciones alcalinas y ácidas. En el caso de la purina-6-sulfonato y la purina-6-sulfinato, son lábiles en condiciones alcalinas y pueden seguir reaccionando hasta formar a la hipoxantina^{15,16}. Los valores de pKa de la purina-6-sulfonato y purina-6-sulfinato son de: 8.55¹⁶ y 9.30¹⁶ respectivamente, mientras que el pKa de la hipoxantina es de 12.10¹⁶.

En cuanto a las propiedades espectrales la purina-6-sulfonato y purina-6-sulfinato presentan un comportamiento espectral similar, al ser evaluada su respuesta a diferente pH, los picos máximos de absorbancia se observaron entre 270 y 290nm¹⁶. En el caso de la hipoxantina el máximo de absorbancia se observó en un rango de 230 a 240nm¹⁶.

2.4.6 Métodos indicativos de estabilidad.

Un método analítico indicativo de estabilidad es aquel que puede detectar cambios en el tiempo de las propiedades químicas o biológicas del fármaco o medicamento; son específicos para el contenido del fármaco, productos de degradación y otros compuestos de interés.

Para el caso de 6-mercaptopurina son pocos los artículos que se han desarrollado acerca de métodos indicativos de estabilidad. En el tabla 1.2 se resumen los artículos de relevancia sobre métodos indicativos de estabilidad para la 6-mercaptopurina.

Tabla 1.1. Resumen sobre los métodos indicativos de estabilidad para la 6-mercaptopurina.

Método analítico indicativo de estabilidad.	Metodología	Resultados	Desventajas
Método para evaluar la foto estabilidad de la 6-mercaptopurina en una solución acuosa oxigenada ¹⁶ .	Se utilizó una solución stock de estándar de 6-mercaptopurina en una solución de KOH 0.05M. Condiciones Fase móvil: Se usaron diferentes fases móviles debido a que se analizaron diferentes muestras. Fase móvil 1: Consistió en una mezcla de metanol: SA de fosfatos pH 7.3 (20: 80 %v/v). Fase móvil 2: Cloroformo: metanol (76:24 %v/v). Columna: Se usó una columna C8. Todas las muestras se leyeron a una longitud de onda de 254nm.	Las soluciones fueron expuestas a la radiación UV, los productos que se formaron fueron las purina-6-sulfonato, la purina-6-sulfinato y la hipoxantina. El producto mayoritario fue el de la purina-6-sulfonato y el productor minoritario fue la Hipoxantina.	La utilización de la solución de KOH, acelera la oxidación de la 6-mercaptopurina. De igual manera no concluyen que fase móvil fue la que usaron, o bajo que parámetros se basaron para escoger esa fase móvil.

Método indicativo de estabilidad para azatioprina y mercaptopurina por cromatografía de líquidos en fase reversa ¹⁷ .	Condiciones: Se usó una solución de NaOH 0.1N para extraer la mercaptopurina de las tabletas de azatioprina. Fase móvil: la fase móvil consistió en una mezcla de metanol: agua (20: 80 %V/V) Columna: Se usó una columna C18 de (Shandon-Southern).	Se logró obtener un tiempo de retención de la azatioprina de 4.0 minutos y de 1.80 minutos para la mercaptopurina.	La utilización de la solución de NaOH, para extraer a la mercaptopurina, acelera la degradación de esta, debido a que la mercaptopurina es altamente oxidable en pH alcalino.
--	--	--	---

2.4.7 Técnicas analíticas utilizadas para elucidar e identificar a los productos de degradación de la 6-mercaptopurina.

2.4.7.1 Aspectos generales de la cromatografía.

La cromatografía es un proceso de separación que se lleva a cabo por una distribución de sustancias entre una fase móvil y una fase estacionara. Estas sustancias pasan por el sistema cromatográfico al ser distribuidas entre la fase móvil y la fase estacionaria. Como una consecuencia las sustancias son eluídas en una columna por orden inverso a su coeficiente de distribución con respecto a la fase estacionaria¹⁸.

El proceso cromatográfico involucra el reparto o distribución de una mezcla de analitos presentes en una muestra a separar entre dos fases inmiscibles entre sí. Una de estas fases es la estacionaria, la cual puede ser un sólido o un líquido adsorbido o enlazado covalentemente sobre un soporte poroso de gran área

superficial. La fase móvil es un fluido¹⁸, (gas, líquido o fluido supercrítico) que sirve como transporte de la mezcla.

2.4.7.1.1 Cromatografía de reparto.

Como se ha mencionado anteriormente la cromatografía de reparto consiste en la distribución de los analitos presentes en una muestra entre dos fases una fase móvil (líquida) y otra estacionaria (gel de sílice). La manera en la cual los analitos son descritos en la cromatografía de reparto va en función de su solubilidad y polaridad. Por ejemplo: si la molécula se encuentra solubilizada en su totalidad será menor su retención en la fase estacionaria lo cual se traduce en un tiempo de retención corto. Dicho de otra manera, la cromatografía de reparto es una forma de extracción entre dos líquidos, pero de manera más dinámica y compleja.

2.4.7.1.2 Cromatografía de reparto en fase reversa.

Los términos fase normal o fase reversa son empleados para describir la adsorción que puede darse entre los analitos y demás separaciones de fase enlazada¹⁸. En la cromatografía de fase reversa la fase móvil tiene una mayor polaridad que la fase estacionaria, ¿Qué quiere decir esto?, mientras en la fase normal el gel de sílice (fase estacionaria) tiene una mayor polaridad que la fase móvil (solventes con polaridad baja), por lo tanto, los solutos polares tendrán un tiempo de retención mayor que los de menor polaridad. En fase reversa se invierten los papeles los solutos que tienen una mayor polaridad tendrán un tiempo de retención corto a comparación de los solutos con polaridades menores.

2.4.7.2 Calorimetría diferencial de barrido.

La calorimetría diferencial de barrido, o DSC (en inglés), es una técnica para el análisis térmico que evalúa el efecto de la temperatura sobre la variación de la capacidad calorífica (Cp.) de un material. Se toma una muestra de una masa conocida y se la somete a calor o frío para luego analizar los cambios que se producen en su capacidad calorífica a medida que se modifica el flujo de calor. Esto permite detectar transiciones como puntos de fusión, transiciones vítreas, cambios de fase y curado¹⁹.

En cristales líquidos, metales, productos farmacéuticos y materiales orgánicos puros se pueden observar cambios de fase o polimórficos y estudiar el grado de pureza. Para el procesamiento o destilación de materiales, conocer su capacidad calorífica y los cambios en el contenido de calor (denominado entalpía) del material resulta útil para calcular la eficiencia de los procesos¹⁹.

2.4.7.3 Espectroscopía de infrarrojo (IR).

La espectroscopía de infrarrojos (espectroscopía IR) es un tipo de espectrometría de absorción que utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético¹⁹. La espectrometría infrarroja se basa en el hecho de que los enlaces químicos de las sustancias tienen frecuencias de vibración específicas, que corresponden a los niveles de energía de la molécula²⁰. Estas frecuencias dependen de la forma de la superficie de energía potencial de la molécula, la geometría molecular, las masas atómicas y posiblemente el acoplamiento vibracional²⁰.

Si la molécula recibe luz con la misma energía de esa vibración, entonces la luz será absorbida si se dan ciertas condiciones. Para que una vibración aparezca en

el espectro infrarrojo, la molécula debe someterse a un cambio en su momento dipolar durante la vibración¹⁹. Los enlaces pueden vibrar de seis maneras: estiramiento simétrico, estiramiento asimétrico, tijeras, rotación, giro y wag²⁰.

Con el fin de hacer medidas en una muestra, se transmite un rayo monocromo de luz infrarroja a través de la muestra, y se registra la cantidad de energía absorbida. Repitiendo esta operación en un rango de longitudes de onda de interés (por lo general, $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) se puede construir un gráfico²⁰.

3.0 Planteamiento del problema.

La estabilidad en uso de medicamentos multidosis tiene como propósito evaluar el tiempo de vida útil de un medicamento después de la apertura del envase.

La 6-mercaptopurina es un fármaco susceptible a degradación en condiciones atmosféricas normales y aunado a esto las tabletas pueden absorber la humedad presente en el medio, lo cual modifica las especificaciones físicas, químicas, de desintegración y disolución de las tabletas durante el tiempo que estas sean usadas, representando un problema para el usuario, debido a que es un medicamento de costo elevado y las tabletas son la única forma farmacéutica de comercialización en el territorio nacional.

Por lo tanto, surge la necesidad de estudiar y evaluar la estabilidad de las tabletas de 6-mercaptopurina durante el tiempo de uso que tiene un frasco de este medicamento (aproximadamente 30 días). La idea es conocer si las tabletas no se ven afectadas en sus propiedades para asegurar la conservación de la dosis y del desempeño de la forma farmacéutica.

4. Hipótesis.

Los parámetros evaluados para las tabletas de 6-mercaptopurina permanecerán dentro de especificación durante el estudio de estabilidad en uso.

5. Objetivo general.

- Evaluar la estabilidad en uso de tabletas de 6-mercaptopurina de 50mg, mediante estudios de valoración y disolución de estas.

5.1 Objetivos particulares.

- Desarrollar y validar un método indicativo de estabilidad por cromatografía de líquidos de alta resolución, siguiendo los lineamientos de la guía ICH: ICH Q2 (R1) Validación de métodos analíticos y las guías complementarias.
- Generar los productos de degradación que pudieran estar presentes durante el estudio, a partir de la degradación forzada de la 6-mercaptopurina, sometiéndola a condiciones de pH, luz, temperatura y agentes oxidantes.
- Demostrar que la disolución no se ve afectada en las tabletas de 6-mercaptopurina durante el tiempo de uso, mediante el desarrollo de la prueba de disolución.

6. Proceso experimental.

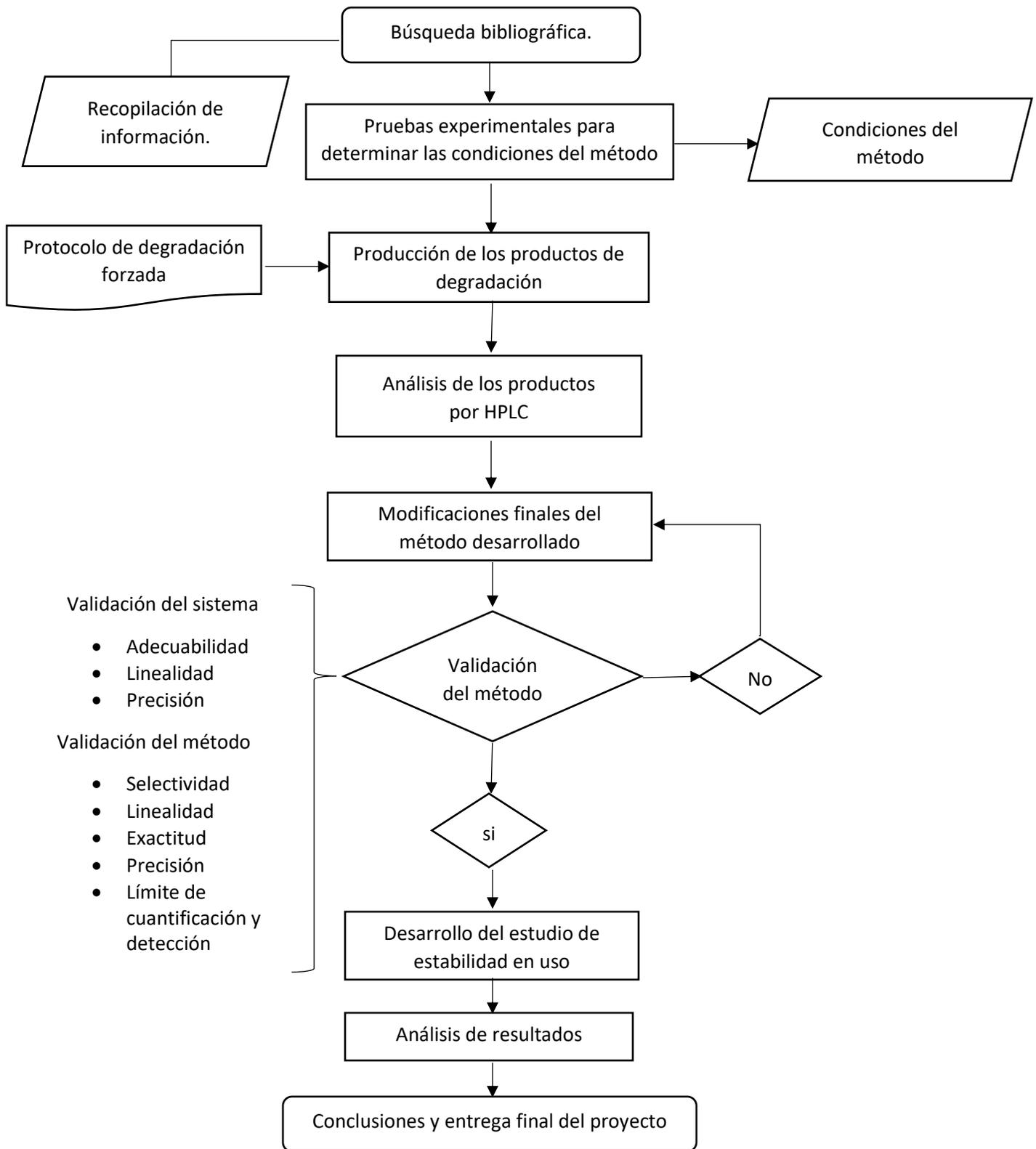


Imagen 1.5. Metodología utilizada durante el desarrollo experimental

6.1 Reactivos y equipos.

6.1.1 Reactivos.

Reactivo	Especificaciones	Marca
Metanol	HPLC	Tecsiquim.
Metanol	HPLC	Tecsiquim.
Acetonitrilo	HPLC	Tecsiquim.
Ácido 1-octilsulfonato de sodio	Grado analítico	Sigma aldrich.
Agua destilada	-	-
Agua desionizada	18.2mΩ	
Fosfato monobásico de potasio	Grado analítico	J.T. Baker.
Fosfato dibásico de potasio	Grado analítico	J.T. Baker.
6-mercaptopurina monohidratada	Estándar primario	Sigma aldrich.
Citarabina polvo para reconstituir	Medicamento	Cytosar laboratorios Pfizer.
6-mercaptopurina tabletas	Medicamento	Purinethol laboratories Aspen Pharmacare Holdings.
Estearato de magnesio	Materia prima	
celulosa	Materia prima	
Almidón	Materia prima	
Lactosa monohidratada	Materia prima	
Hidróxido de sodio	Grado analítico	
Ácido clorhídrico	Grado analítico	

Peróxido de hidrógeno	Grado reactivo	
Cloroformo	Grado analítico	J.T. Baker
Silica gel para columnas	Grado reactivo	
Acetato de etilo	Grado analítico	-

6.1.2 Equipos.

Tabla 1.3. Equipos utilizados durante el desarrollo del proyecto.		
Equipo	Marca	Modelo
Balanza analítica	Ohaus	PA224
Micro balanza	Mettler Toledo	1114470645
Bomba de vacío	Weg	25360EIXA56J
Potenciómetro	Hanna	HI2210
Refrigerador	DAEWOO	-
Cromatógrafo de líquidos	Hitachi	Primaide
Calorímetro	Perkin Elmer	DSC 7
Espectrofotómetro UV	Varían	Bio 50
Microscopio óptico	Iros cope	ES-24
Espectrómetro IR	Varían	-
Sonicador	Branson	3800
Disolutor	Henkel	VK 700
Lámpara de luz ultravioleta	Entela	UVGL25
Des ionizador	MilliQ	Synthesis
Estufa	Lab Oven	30-E

6.2 Metodología utilizada para el desarrollo del método indicativo de estabilidad.

Previo a la evaluación de la estabilidad en uso de las tabletas de 6-mercaptopurina, se realizó una búsqueda bibliográfica con la finalidad de encontrar métodos indicativos de estabilidad desarrollado por CLAR que cumplieran con la linealidad, exactitud y precisión. Como resultado de esta búsqueda se encontraron artículos con métodos de control de calidad los cuales se enfocaban a la valoración de la 6-mercaptopurina.

Se reprodujeron las metodologías y se encontró que el tiempo de retención era cercano al tiempo muerto de la columna y el factor de simetría estaba por encima del rango establecido para la simetría de un pico según la USP (0.8 a 1.2). Esto les restaría la capacidad de resolución a los picos cromatográficos lo cual representaba un problema, por lo que se descartó la idea de utilizar las condiciones establecidas en los artículos consultados y se tomó la idea de diseñar matrices de experimentos. Las matrices de experimentos contemplaron pH de la solución amortiguadora, proporción y modificador orgánico presentes en la fase móvil, velocidad de flujo, columna, preparación de las muestras (evaluando el efecto del tipo de filtro) y estándar interno debido a que el método establecido para evaluar la señal respuesta de la 6-mercaptopurina fue el de estándar interno.

Previamente a la experimentación con las matrices se realizó un barrido en el espectro ultravioleta. Se preparó una solución estándar de 6-mercaptopurina pesando con exactitud 1.0mg de polvo de tableta de 6-mercaptopurina, posteriormente se depositaron en un matraz volumétrico de 25ml y se llevó al aforo

con metanol hasta $\frac{3}{4}$ partes del aforo y se sonicó durante 10 minutos, al finalizar esto se retiró el matraz y se llevó al aforo con metanol grado HPLC. Se realizó un barrido en un intervalo de longitudes de onda de 400 a 200nm, dando como resultado dos picos máximos de absorbancia. El primero a los 325nm y el segundo a los 310nm, con estos datos se inició la primera serie de experimentos con la cual se buscó el pH y la concentración de la solución amortiguadora (SAF) y el par ácido base que permitiría llegar a este pH. Se probaron dos pH, el de 6.5 y 7.5 utilizando el par ácido-base del fosfato monobásico de potasio (ácido) y el fosfato dibásico de potasio (la sal).

Posterior a determinar el pH de la solución amortiguadora se determinó la concentración a la cual sería preparada. Las concentraciones que se evaluaron fueron 0.001, 0.005, 0.01 y 0.05M. Al finalizar estas pruebas se diseñó la segunda matriz la cual tuvo la finalidad de determinar el modificador orgánico y la proporción de este en la fase móvil. Anterior a esto se observó que el metanol era el modificador orgánico más utilizado en los artículos consultados.

Los modificadores orgánicos que se utilizaron fueron el metanol y el acetonitrilo ambos disolventes fueron de grado HPLC. Primeramente, se utilizó al metanol y se realizó una corrida con una proporción en la fase móvil de 50:50% v/v de metanol y la solución amortiguadora de fosfatos pH 7.5, al concluir con esta prueba se probaron inicialmente las proporciones de 70-30, 80-20 y 90-10 de metanol y solución amortiguadora. En todas las proporciones la 6-mercaptapurina tenía un tiempo de retención cercano al tiempo muerto de la columna. La columna era una C-18 de la marca Phenomenex, con un tamaño de partícula de 5.0 μm , con

dimensiones de 4.6x150 mm a una velocidad de flujo de 1.0ml/min y la detección se llevó cabo a 325 nm. El cromatógrafo empleado fue de la marca Hitachi modelo Primaide. Al observar que la 6-mercaptapurina no se estaba reteniendo se decidió modificar la columna con la finalidad de generar condiciones más polares para que se pudiera retener por más tiempo la 6-mercaptapurina. La columna que se utilizó fue una C-8, de 5.0 μm de tamaño de partícula, con las mismas dimensiones que la columna C-18 previamente utilizada.

Se realizaron las mismas pruebas y se observó que la 6-mercaptapurina con la proporción de 70-30 de metanol-SAF 0.05M pH 7.5, tenía un tiempo de retención de 1.56 minutos cercano al tiempo muerto de la columna el cual es de 1.40 minutos, por lo tanto, se modificó la proporción de la fase móvil a 40-60% v/v de metanol y solución amortiguadora y se observó una mayor retención por parte de la 6-mercaptapurina. Se rediseñó la matriz de experimentos y se probaron 3 proporciones más 30-70, 20-80 y 10-90 % v/v de metanol-SAF 0.05M pH 7.5. Para disminuir el factor de coe de los picos cromatográficos se tomó la decisión de adicionar un agente par iónico como el ácido 1-octilsulfonato de sodio a una concentración de $1 \times 10^{-5}\text{M}$. Al termino de esto se llevaron a cabo las mismas pruebas con el acetonitrilo y tomó la decisión de que el método se desarrollaría con la técnica del estándar interno debido a que en este método permite saber qué es lo que le pasa al analito por medio de las reacciones que pueda presentar el estándar.

Se realizó el diseño de una última matriz para encontrar una molécula que tuviera un coeficiente de reparto octanol/agua ($\log P$), pKa, solubilidad cercanos y con un

coeficiente de absorptividad molar igual o cercano al de la 6-mercaptopurina. Para eso se realizó una revisión bibliográfica acerca de las propiedades físicas en específico la solubilidad, pKa, coeficiente de reparto octanol-agua (log P) y coeficiente de absorptividad molar en soluciones acuosas de 23 moléculas y se realizaron pruebas con las 23 moléculas, utilizando una columna Phenomenex C8 con un tamaño de partícula de 5.0mcm y dimensiones de 4.6x150 mm, con una fase móvil compuesta por metanol-solución amortiguadora de fosfatos 0.05M pH 7.5 (10-90% v/v) a una longitud de onda de 325nm.

6.3 Metodología utilizada para la generación de los productos de degradación de la 6-mercaptopurina.

Para la generación de los productos de degradación se utilizaron las recomendaciones de la guía de la ICH Q1A (R2) estudios de estabilidad para nuevos fármacos y productos²¹, Q1B estudios de foto estabilidad para nuevos fármacos y productos²² y de un artículo de estudios de degradación forzada²³.

Se tomó como base el cuadro de degradación publicado en el artículo antes mencionado. Se verificaron que las lámparas de luz blanca y luz ultravioleta cumplieran con las características recomendadas por la guía Q1B de la ICH.

Las condiciones que se establecieron para generar los productos de degradación fueron: Hidrólisis ácida y básica, hidrólisis a pH de 2.0, 4.0, 6.0 y 8.0, oxidación utilizando como agente oxidante al H₂O₂ al 3.0% de concentración y fotólisis en luz blanca y ultravioleta. Adicionalmente se llevó a cabo una prueba de fotooxidación utilizando la metodología publicada en el artículo fotooxidación de la 6-mercaptopurina en soluciones acuosas²⁴.

6.3.1 Preparación de las soluciones.

- **Preparación de la solución patrón de 6-mercaptopurina.**

Se prepararon 200ml de una solución patrón de 6-mercaptopurina con una concentración de 1.0mg/ml. Se pesó 200mg de estándar de 6-mercaptopurina y se colocaron en un matraz volumétrico de 200ml, posteriormente se adicionó metanol grado HPLC hasta $\frac{3}{4}$ partes del aforo y se sometió a sonicación por 10 minutos. Al finalizar la sonicación se retiró el matraz del sonicador y se llevó al aforo con metanol.

- **Preparación de la solución de hidróxido de sodio 0.1M.**

Se pesaron con exactitud 4.0g de perlas de NaOH y fueron vertidas en un vaso de precipitados de 1000ml, previamente se adicionaron 500ml de agua desionizada y se colocó el vaso en una parrilla con agitación. Se colocó dentro del vaso una barra de agitación magnética de media pulgada y se agitó la solución. Finalmente se adicionaron los 500ml restantes de agua desionizada y se mantuvo en agitación hasta que las perlas se disolvieran.

- **Preparación de la solución de HCl 0.1M.**

En un vaso de precipitados de 250ml se adicionaron 50ml de agua desionizada y se vertieron cuidadosamente 0.8280ml de ácido clorhídrico al 100%. Se colocó dentro del vaso una barra magnética de media pulgada, seguido de esto el vaso se colocó sobre una parrilla de agitación. La solución se agitó durante 1 minuto.

- **Preparación de la solución amortiguadora de fosfatos 0.05M pH 2.0.**

Para la preparación de la SA de fosfato se utilizó el par ácido-base, ácido fosfórico - fosfato monobásico de potasio. Se pesaron con exactitud 0.9398g de fosfato monobásico de potasio y se colocaron en un vaso de precipitados de 500ml con 250ml de agua. Posteriormente se adicionaron 0.3704ml de ácido fosfórico. Se agitó esta solución durante 10 minutos y se ajustó el pH con una solución 0.01M de NaOH. Finalmente se trasvasó en un recipiente de plástico limpio.

- **Preparación de la solución amortiguadora de fosfatos 0.05M pH 4.0.**

Se colocaron 250ml de agua desionizada en un vaso de precipitados de 500ml. Posteriormente se pesaron con exactitud 2.1492g de fosfato monobásico de potasio y fueron depositados en un vaso de precipitados de 500ml. Se colocó una barra de agitación de media pulgada dentro del vaso de precipitados. El vaso de precipitados se colocó en una parrilla de agitación y la solución se agitó hasta que no se observaran cristales de fosfato en el fondo del vaso. Posteriormente se adicionaron 10 ml de ácido fosfórico y se continuó con la agitación durante un minuto. Finalmente se verificó el pH y se ajustó adicionando gota a gota una solución 0.01M de NaOH.

- **Preparación de la solución amortiguadora de fosfatos 0.05M pH 6.0.**

En un vaso de precipitados de 500ml se adicionaron 250ml de agua desionizada y se pesaron con exactitud 1.6017g de fosfato monobásico de potasio y 0.1264g de fosfato dibásico de potasio y fueron vertidos dentro del vaso de precipitados de 500ml. Posteriormente se colocó dentro del vaso de precipitados un agitador

magnético de media pulgada, seguido de esto se colocó el vaso en una parrilla de agitación y se agitó hasta la disolución de los cristales. Finalmente se verificó el pH y se ajustó adicionando gota a gota una solución 0.01M de NaOH.

- **Preparación de la solución amortiguadora de fosfatos 0.05M pH 8.0.**

En un vaso de precipitados de 500ml se adicionaron 250ml de agua desionizada. Se pesaron con exactitud 0.2373g de fosfato monobásico de potasio y 1.8733 g de fosfato dibásico de potasio y se adicionaron dentro del vaso de precipitados junto con una barra magnética. Seguido de esto se colocó el vaso en una parrilla de agitación y se agitó la solución hasta la disolución de las sales. Finalmente se verificó el pH y se ajustó adicionando gota a gota con una solución 0.01M de NaOH.

- **Preparación de la solución de peróxido de hidrógeno al 3.3%.**

Se utilizó una solución comercial de peróxido de hidrógeno, debido a que contiene una concentración de 3.3g de H₂O₂ por cada 100ml. Por tal motivo solo se mantuvo en almacenamiento, sellada herméticamente hasta su utilización.

- **Desarrollo de la degradación forzada de la 6-mercaptopurina.**

En el desarrollo de la degradación forzada cada prueba se realizó por triplicado, adicionando 5.0ml de una solución patrón de 6-mercaptopurina más 5.0ml de cada solución reactivo para cada condición de degradación dentro de tubos de ensaye de 18x150mm, estableciendo una proporción 1:1. Las muestras de hidrólisis ácida, básica y a pH de 2,4,6 y 8.0 se colocaron dentro de un bote de poliestireno de alta densidad con tapa del mismo material, el cual previamente se había acondicionado

en una estufa a $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ con una solución saturada de KOH para obtener una humedad relativa del $75\pm 5\%$ HR. La cámara fue monitoreada por 72 horas.

Para seguir el avance de las reacciones en cada condición, se empleó la técnica de cromatografía en capa fina utilizando como eluyente una fase móvil 50:50% v/v de metanol-cloroformo y la silica gel utilizada se preparó con una mezcla de cloroformo y acetato de etilo 50:50% v/v, formando una suspensión y aplicándola por sumersión a porta objetos de vidrio. El análisis se llevó acabo cada 48 horas durante 5 días, al cabo de los 5 días se retiraron de cada condición y las reacciones se detuvieron neutralizándolas con soluciones de NaOH y HCl 0.01M, para las muestras de Hidrólisis a pH de 2, 4 y 6.0 se neutralizaron con la solución 0.01 de NaOH y las muestras de pH 8.0 con la solución 0.01M de HCl, todas se llevaron a un pH de 7.0. En el caso de las muestras de oxidación se les adicionaron 5.0ml de agua desionizada para diluirlas. Ya detenidas las reacciones las muestras se colocaron en tubos de 18x180mm con tapa de baquelita y se colocaron en refrigeración a 5.0°C . Las muestras de hidrolisis a pH 2, 4, 6, y 8 presentaron precipitación de cristales de color amarillo cadmio limón, estos cristales se analizaron por calorimetría diferencial de barrido y por espectroscopia infrarroja.

Las muestras que no presentaron precipitación de cristales fueron analizadas por espectroscopia infrarroja.

6.3.2 Modificaciones finales al método indicativo de estabilidad.

Las muestras de degradación se procesaron y fueron corridas utilizando las condiciones previamente establecidas, pero los picos cromatográficos del estándar interno y los productos de degradación se sobreponían. Se modificaron la velocidad de flujo, la columna y la longitud de onda. Las condiciones finales del método fueron: una columna Thermo C8 de tamaño de partícula de 5.0 μm con dimensiones de 4.6x250 mm, una fase móvil compuesta por metanol grado HPLC y una solución amortiguadora de fosfatos 0.05M pH 7.5 con una proporción 10:90% v/v, con una velocidad de flujo de 0.8ml/min y con una longitud de onda de detección a 295nm.

6.4 Metodología para la validación del método indicativo de estabilidad.

Una vez concluidos los ajustes finales a las condiciones del método desarrollado, se procedió a realizar la validación siguiendo las recomendaciones de la guía de la ICH Q2 (R1) Validación de métodos analíticos²⁵.

Las aptitudes del método evaluadas fueron las siguientes:

Validación del sistema.

- Adecuabilidad del sistema
- Linealidad del sistema
- Precisión del sistema

Validación del método

- Especificidad/selectividad
- Exactitud del método
- Linealidad del método
- Intervalo

- Precisión del método
 1. Repetibilidad
 2. Precisión intermedia
- Límite de detección
- Límite de cuantificación

6.4.1 Preparación de las soluciones.

- **Fase móvil.**

La fase móvil para el método indicativo de estabilidad de la 6-mercaptopurina consistió en 1000 ml de una mezcla metanol- solución amortiguadora de fosfatos 0.05M pH 7.5 con una composición 10:90 %v/v, la cual fue filtrada a través de un filtro de nylon de 0.45mcm de diámetro y se desgasificó por 30 minutos.

- **Preparación de la solución amortiguadora 0.05M de Potasio dihidrógeno fosfato – Di potasio hidrógeno fosfato pH 7.5.**

Se pesaron con exactitud 2.3065g de Potasio di hidrógeno fosfato (ácido) y 5.7566g de Di potasio hidrógeno fosfato (sal) y se transfirieron a un vaso de precipitado de 1000ml, previamente se adicionaron 1000ml de agua desionizada dentro del vaso de precipitados. Seguido de esto se verificó el pH de la solución con un potenciómetro previamente calibrado y se ajustó el pH adicionando gota a gota una solución 0.01M de NaOH.

- **Preparación de la solución patrón de estándar de 6-Mercaptopurina.**

Se pesaron con exactitud 2.50mg de estándar de 6-mercaptopurina y se transfirieron dentro de un matraz volumétrico de 25ml. Se adicionó metanol grado HPLC hasta $\frac{3}{4}$ partes antes del aforo y se sonicó durante 10 minutos. Seguido de

esto se llevó esta solución al aforo con metanol y se agitó para homogeneizar la solución. Esta solución tenía una concentración de 100mcg/ml.

- **Preparación de la solución patrón de citarabina.**

Se tomaron con una jeringa de insulina 200 μ l del medicamento Cytosar solución inyectable de Pfizer, la cual contiene 500mg/10ml de citarabina y se colocaron dentro de un matraz volumétrico de 25ml. Posteriormente se adicionó agua desionizada hasta $\frac{3}{4}$ del aforo del matraz y se sonicó por 10 minutos. Finalmente se llevó al aforo con agua desionizada, la concentración final de esta solución fue de 400mcg/ml.

6.4.2. Aptitudes del sistema y el método, evaluadas durante la validación.

- **Adecuabilidad del sistema.**

La Adecuabilidad del sistema se evaluó mediante la inyección por sextuplicado de una muestra preparada al 100% de la concentración de la curva estándar. Con las respuestas analíticas se calculó el coeficiente de variación (C.V.) y como criterio de aceptación se tomó que el coeficiente de variación no fuera mayor al 2.0%

- **Linealidad del sistema.**

Los puntos para evaluar la linealidad del sistema fueron 1.0, 3.0, 5.0, 7.0 y 9.0 μ g/ml. Para ello se tomaron de la solución patrón de 6-mercaptopurina los siguientes volúmenes por triplicado: 100, 300, 500, 700 y 900 μ l. Posteriormente se vertieron a matraces volumétricos de 10 ml, seguido de esta operación se adicionaron 500 μ l de la solución patrón de citarabina y se llenó el matraz hasta el aforo con la fase

móvil del método previamente descrita. Las muestras se colocaron en viales los cuales fueron previamente lavados y purgados con la fase móvil.

Se calcularon las respuestas analíticas y por medio del método de mínimos cuadrados, se determinaron el coeficiente de correlación (r^2), la pendiente (m) y ordenada al origen (b) de la curva que se obtuvo.

- **Precisión del sistema.**

La precisión del sistema se realizó preparando por sextuplicado muestras equivalentes al 100% de la curva estándar propuesta. De la solución patrón de 6-mercaptopurina se tomaron por sextuplicado 500 μ l y fueron vertidos a matraces volumétricos de 10 ml, posteriormente se adicionaron 500 μ l de la solución patrón de citarabina y se llevó al aforo con la fase móvil. Al final las muestras fueron agitadas para homogeneizarlas y se colocaron en viales previamente lavados y purgados con fase móvil. Con las respuestas analíticas se determinó el coeficiente de variación el cual no debía de ser mayor al 2.0%.

6.4.3 Validación del método.

- **Especificidad/selectividad.**

La prueba de especificidad se realizó con las muestras de oxidación y fotooxidación cargadas con 6-mercaptopurina y los excipientes. Las muestras se prepararon por triplicado utilizando los siguientes excipientes:

- Estearato de magnesio
- Celulosa microcristalina
- Almidón

- Lactosa

La preparación de las muestras ocurrió de la misma manera que en las muestras de Adecuabilidad, precisión y linealidad del sistema. Se realizó el cálculo de las respuestas analíticas y con esos datos se realizó una comparación de medias utilizando el estadígrafo t de student.

- **Exactitud del método.**

Para realizar la exactitud del método se evaluaron por triplicado los niveles bajo, intermedio y alto de la curva estándar. Esto se realizó tomando los puntos de 1.0, 5.0 y 9.0 $\mu\text{g/ml}$ y se trasvasaron a matraces volumétricos de 10 ml a los cuales se les adicionaron 500 μl de la solución estándar de citarabina. Las muestras se llevaron al aforo con fase móvil y se agitaron antes de pasarlas a los viales. Seguido de esto se calcularon las respuestas analíticas, concentración de las muestras, el porcentaje de recobro por nivel y el promedio del porcentaje de recobro. El criterio de aceptación es que el porcentaje de recobro por nivel no sea diferente del 100%, para ello se realizó un análisis de varianza de los porcentajes de recobro de cada nivel.

- **Precisión del método (repetibilidad).**

Para evaluar la precisión del método se evaluaron dos aptitudes del método. La repetibilidad y la precisión intermedia. Para evaluar la repetibilidad se prepararon muestras por triplicado con los siguientes puntos de la curva estándar: 1.0, 5.0, y 9.0 $\mu\text{g/ml}$. Posteriormente fueron transferidas a matraces volumétricos de 10ml respectivamente y se les añadieron 500 μl de la solución estándar de citarabina y

se llevó al aforo con la fase móvil, al final se agitaron las muestras y se colocaron en viales con el mismo tratamiento con el que se ha venido trabajando.

Se calcularon las respuestas analíticas de cada nivel y se calculó el coeficiente de variación de las respuestas analíticas. De igual forma que en Adecuabilidad y precisión del sistema el coeficiente de variación debe ser menor al 2.0%.

- **Precisión del método (precisión intermedia).**

La precisión intermedia se realizó mediante la evaluación del efecto que presentan los analistas, los días y la interacción de ambos. El modelo matemático que se siguió fue el siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + A_i + D_j + AD_{ij} + e_{k(ij)}$$

Para evaluar la precisión intermedia fue necesario utilizar dos analistas. Cada analista preparó por triplicado muestras correspondientes al 100% de la curva estándar utilizando dos días, en total cada analista preparó 6 muestras las cuales fueron preparadas aleatoriamente utilizando un calendario de trabajo para de esta manera evaluar el error relativo a los analistas y los días. Posteriormente se les pidió que prepararan muestras el mismo día para evaluar el error relativo a la interferencia día-analista. Se calcularon las respuestas analíticas y se realizó una tabla de análisis de varianza con los datos de los analistas, los días de trabajo y la interferencia de estos. Como criterio de aceptación alfa (α) debe ser mayor a 0.05 y el valor de F de Fisher calculada debe ser menor a F de tablas.

- **Linealidad del método.**

La evaluación de la linealidad del método se realizó por pesada independientes. Se pesaron por triplicado 2.500 µg de estándar de 6-mercaptopurina y se transvasaron a matraces volumétricos de 25 ml y se llevaron al aforo con metanol grado HPLC. Posteriormente se realizó el mismo tratamiento que en las demás pruebas. Los puntos que se evaluaron fueron los mismos que se determinaron en la linealidad del sistema. Se calcularon las respuestas analíticas y utilizando el método de mínimos cuadrados se calculó la pendiente, ordenada al origen y coeficiente de determinación. Posteriormente se evaluó cada parámetro estableciendo una hipótesis donde la pendiente era diferente de cero y la ordenada al origen igual a 0. Se calculó el valor de t de student para refutar estas afirmaciones.

- **Límite de detección y cuantificación.**

Para calcular el límite de detección se establecieron 10 puntos que contemplaron los 5 puntos de la curva estándar adicionándole 5 puntos localizados debajo del nivel inferior de la curva estándar. Cada punto se realizó por triplicado y se prepararon de la misma forma que en las aptitudes evaluadas anteriormente mencionadas. De igual forma se calcularon las respuestas analíticas y se utilizó el método de mínimos cuadrados para obtener la pendiente, ordenada al origen y coeficiente de determinación. También se calculó la desviación estándar correspondiente a la regresión (S_m y S_b). Con estos datos y las fórmulas: $LC = \frac{10S_b}{b}$ y $LD = \frac{3.3S_b}{b}$, sirvieron para calcular el LD y LC.

6.5 Metodología para la evaluación de la estabilidad en uso de las tabletas de 6-mercaptopurina.

El desarrollo del estudio de estabilidad en uso contemplo las recomendaciones dadas por la guía de la EMA: EMA/CPMP/QWP/2934/99 guía de estudios de estabilidad en uso para medicinas de uso humano y de la Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios.

Inicialmente se establecieron las condiciones de estudio. La frecuencia de muestreo y la duración del estudio se establecieron tomando en cuenta el tiempo que permanece un frasco abierto durante el tratamiento. La evaluación del estudio consistió en dejar abierto el frasco durante 60 segundos cada 24 horas por 25 días²⁵.

Los días de muestreo se establecieron en 7 días de muestreo durante el lapso ya mencionado. Los análisis que se realizaron en las tabletas contemplaron las características físicas y químicas de las tabletas, los análisis y pruebas fueron las siguientes:

- Apariencia
- Color
- Valoración
- Disolución
- Identidad
- Variación de pesó

6.5.1 Metodología para la prueba de apariencia.

Para la prueba de apariencia primeramente se evaluó la integridad del recipiente, por lo que, se tomó el frasco y se verificó que el empaque secundario (caja) no tuviera daños aparentes. Se abrió el frasco presionando la tapa hacia abajo y girándolo en sentido contrario a las manecillas del reloj para quitar el seguro contra niños. Se revisó que el sello de hermeticidad estuviera integro. Se tomaron 5 tabletas y se analizaron con la ayuda de una lupa y un estereoscopio. Se observó que las tabletas no tuvieran la presencia de partículas de otra coloración, el color de las tabletas y la integridad de la superficie. Posteriormente estas tabletas serían utilizadas para las pruebas restantes.

Todos los días de muestreo a partir de este que se consideró como tiempo 0, se realizó la misma metodología. Se tomaban 5 tabletas del frasco y se colocaban en un vidrio de reloj limpio, seco y sanitizado con una solución de etanol al 70%. primeramente, fueron observadas con la lupa para describir el color y la presencia de partículas de diferente pigmentación y posteriormente eran analizadas usando el estereoscopio para describir la integridad de la superficie de las tabletas y observar detalladamente si existía la presencia de partículas extrañas.

6.5.2 Metodología para la prueba de color.

Dentro de la prueba de apariencia se evaluó el color de las tabletas. Se describió la coloración y se observó bajo el estereoscopio la existencia de partículas de diferente pigmentación.

6.5.3 Metodología para la prueba de variación de peso.

Se tomaron las 5 tabletas previamente usadas en las pruebas de coloración y apariencia y se pesaron una por una en una balanza analítica. Posteriormente se pesaron en conjunto para sacar el peso promedio de cada tableta. La finalidad de realizar esta prueba era observar el aumento o disminución del peso de las tabletas.

6.5.4 Metodología para la prueba de valoración.

La prueba de valoración se realizó utilizando el método indicativo de estabilidad previamente diseñado. Se tomaron las 5 tabletas ya pesadas y se trituraron con cuidado hasta obtener un polvo fino. Seguido de esto se pesó por triplicado lo equivalente al peso promedio de las 5 tabletas y se colocaron en matraces volumétricos de 50ml, posteriormente se aforó hasta $\frac{3}{4}$ partes del aforo con metanol grado HPLC y se colocaron dentro del sonicador con pesas para evitar que se derramaran. Los matraces se sometieron a sonicación durante 10 minutos, al cabo de este tiempo fueron retirados del sonicador, se secaron y se llevaron al aforo con metanol.

- **Tratamiento de las muestras.**

Cada muestra se filtró con la ayuda de un swinnex el cual contenía un filtro de nylon de 0.45 μm de tamaño de poro. Posteriormente se adaptaron jeringas de 20 ml a las cuales se les adicionaban 20 ml de muestra y con la ayuda de los émbolos se ejercía presión para que la muestra pasara a través del swinnex y las partículas no solubilizadas por el metanol se retuvieran en el filtro. Las muestras filtradas eran recogidas en matraces Erlenmeyer de 50 ml previamente etiquetados. Las muestras filtradas eran agitadas con cuidado de no derramarse para homogenizarlas seguido

de esto con la ayuda de una micropipeta de 10 a 100 μl , se tomaban 50 μl y se depositaban en matraces volumétricos de 10 ml, posteriormente se adicionaban 500 μl de la solución patrón de citarabina (estándar interno) y se llevaban al aforo con la fase móvil.

Al final las muestras eran colocadas en viales en la charola de muestreo del cromatógrafo de líquidos. Las muestras fueron analizadas en conjunto con muestras de control de calidad (estándar de 6-mercaptopurina) que contenían teóricamente el mismo contenido que las tabletas.

- **Preparación y acondicionamiento del sistema.**

El equipo que se utilizó fue calificado previamente. El equipo fue un cromatógrafo de la marca HITACHI modelo Primaide, con una bomba mezcladora modelo 1110, un sistema de inyección automático modelo 1210, una lámpara de luz policromática UV modelo 1410 y un módulo de suministro de solventes y fase móvil modelo Primaide.

Primeramente, el sistema era encendido de manera secuencial iniciando en el módulo de suministro seguido de la lámpara, el sistema de inyección, la bomba y por último la computadora con la cual se controla el equipo. La columna que se utilizó fue una C8 de la marca Thermo con un tamaño de partícula de 5.0 μm , con medidas de 4.6x250mm.

La columna era conectada siguiendo la dirección marcada por el fabricante, posteriormente se realizaba un lavado a la columna con una mezcla 50:50% v/v metanol-agua desionizada a una velocidad de 1ml por minuto por 15 minutos. Al

finalizar el tiempo el flujo era detenido para cambiar la línea y comenzar a acondicionar la columna con la fase móvil previamente descrita. El acondicionamiento de la columna se realizaba con un tiempo estimado de 45 minutos, se monitoreaba 15 minutos la presión generada en las tuberías del sistema de inyección para posteriormente monitorear 30 minutos la línea base. Una vez que la columna estaba equilibrada se iniciaban las inyecciones de las muestras.

- **Cálculos para la concentración de 6-mercaptopurina.**

Se construyó una curva estándar de 1.0, 3.0, 5.0, 7.0 y 9.0 µg/ml y posteriormente se calculó la respuesta analítica de cada punto de la curva estándar. Con los datos obtenidos se realizó la regresión lineal de la respuesta analítica contra la concentración. Finalmente se obtuvieron los parámetros de regresión lineal para determinar la concentración de cada muestra.

Para calcular la respuesta analítica se utilizó la siguiente fórmula:

$$RA_m = \frac{ABC_{6MP}}{ABC_{citarabina}}$$

Fórmula para calcular la concentración de cada muestra.

$$C_o = \frac{(RA_m)(b)}{m}$$

Dónde:

m= pendiente obtenida de la curva estándar

b=ordenada al origen obtenida de la curva estándar

RA_m = respuesta analítica de la muestra.

Finalmente, la concentración se multiplica por el factor de dilución equivalente a 10000.

6.5.5 Metodología para la prueba de identidad.

Para la prueba de identidad se prepararon muestras del estándar de 6-mercaptapurina, se realizó el mismo tratamiento que en la validación del método y se corrieron antes que las muestras. Se reportaron el factor de capacidad del estándar y de las muestras.

El criterio de aceptación fue que la diferencia entre el factor de retención de la muestra control y las muestras no era significativa

6.5.6 Metodología para la prueba de disolución.

La prueba de disolución se realizó en el tiempo inicial de muestreo, a mitad del tiempo de muestreo y al final. Para ello se siguió como base el método de disolución especificado en la monografía de las tabletas de 6-mercaptapurina de la FEUM 11^a edición²⁶. Se modificó el número de vasos y se utilizaron 3 en lugar de 6 vasos.

- **Preparación del medio de disolución.**

El medio de disolución utilizado consistió en una solución de HCl 0.1N, especificada en la monografía del medicamento. Se midieron con exactitud 5000 ml de agua desionizada y se colocaron en un recipiente de plástico con capacidad de 5000 ml, posteriormente se adicionaron con precaución 42 ml de ácido clorhídrico al 100%. Esta solución se sometió a agitación durante 10 minutos y se desgasificó por 30 minutos. La concentración teórica de esta solución fue de 0.1N.

- **Preparación del sistema.**

Previamente a la adición del medio los vasos del disolutor fueron lavados y purgados con agua desionizada y medio de disolución. Posteriormente se adicionó agua dentro del baño del disolutor hasta que cubriera la salida que estaba conectada al recirculador y posteriormente se encendió para que comenzara a calentar el baño a 37°C.

Con la ayuda de una probeta de 1000 ml se midieron 900 ml del medio de disolución y se depositaron dentro de los vasos del disolutor evitando la formación de burbujas. Posteriormente los vasos fueron colocados y ajustados con la ayuda de los soportes dentro del baño del disolutor. Finalmente se colocaron las tapas de los vasos y se estuvo monitoreando la temperatura del medio hasta que la temperatura del medio de disolución llegara a un equilibrio térmico con el baño del disolutor.

- **Tratamiento de las muestras.**

La prueba de disolución daba inicio cuando la temperatura del medio alcanzaba el equilibrio térmico con el baño del disolutor. Se colocó una tableta previamente pesada por vaso y se tomaba el tiempo con la ayuda de un cronómetro. Para evitar el traslape de cada muestreo, se dejaba correr un minuto.

La prueba de disolución se detenía al cabo de los 60 minutos especificados en la monografía del medicamento. Posteriormente con la ayuda de una sonda y una jeringa se retiraban de cada vaso 10 ml, los cuales eran filtrados a través de un filtro de nylon de 0.45 μm de tamaño de poro con la ayuda de los swinnex. Posteriormente se tomaban 50 μl de cada muestra y se depositaban en matraces

volumétricos de 10ml, los cuales contenían 500 µl de la solución patrón de citarabina. Finalmente se llevaba al aforo con la fase móvil, se homogenizaban las muestras y se colocaban en viales de vidrio con tapa para ser llevados a la charola de muestreo del cromatógrafo.

Las muestras fueron corridas con la fase móvil utilizada en la valoración a la misma longitud de onda que la utilizada en la valoración.

- **Cálculos del porciento disuelto.**

Para el cálculo del porcentaje disuelto se utilizó la fórmula reportada en la monografía del medicamento de la FEUM 12^a edición.

$$Q = \frac{100CD \left(\frac{A_m}{A_{ref}} \right)}{m} \left(\frac{170.19}{152.18} \right)$$

Dónde:

Q= porciento disuelto

C=cantidad por mililitro de mercaptopurina en la preparación del estándar

D=factor de dilución

m=cantidad de mercaptopurina indicada en el marbete

A_m= área bajo la curva del pico cromatográfico de la muestra

A_{ref}= área bajo la curva del pico cromatográfico del estándar

170.19= masa molecular de la mercaptopurina monohidratada

152.16= masa molecular de la mercaptopurina anhidra

7. Resultados y análisis de resultados.

7.1 Resultados de la revisión en artículos sobre métodos para cuantificar 6-mercaptopurina.

Como se había mencionado en la metodología para el desarrollo del método indicativo de estabilidad, lo primero que se realizó fue una revisión bibliográfica utilizando metabuscadores: Zapmeta, Metacrawler, About.com, Google académico, Yippi, webcrawler, Wippo y Ixquick. Se recopilaron todos los métodos para cuantificar 6-mercaptopurina utilizando la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa. Todas las metodologías encontradas se recopilaron en el tabla 1.4.

Tabla 1.4. Resumen de los métodos para cuantificar 6-mercaptopurina

Nombre del artículo	Matriz de análisis	Condiciones del método
Nuevo método para estimar 6-mercaptopurina en plasma y tejidos de rata ²⁷ .	Biológica.	Fase móvil: Acetonitrilo-SAF pH 6.5, 0.01M (20:80%v/v). Columna: Termosilw C18, (250x4.3mm, 5.0mcm). Velocidad de flujo: 1ml/min. Longitud de onda:325nm Estándar interno: Metronidazol
Método RP-HPLC, para la estimación de 6-MP, en plasma humano enriquecido y formulaciones farmacéuticas ²⁸ .	Biológica y farmacéutica.	Fase móvil: Metanol-Agua desionizada (90:10%v/v). Columna: C18 (250x4.3mm, 5.0mcm). Velocidad de flujo: 1ml/min. Longitud de onda:325nm Estándar interno: N/A
Optimización y validación de un método RP-HPLC, para la estimación de 6-MP en formulaciones farmacéuticas y a granel ²⁹ .	Biológica y farmacéutica.	Fase móvil: Acetonitrilo-SAA pH 6.8 0.05M (10:90%v/v). Columna: Phenomenex C18, (250x4.3mm, 5.0mcm). Velocidad de flujo: 1ml/min Longitud de onda: 324nm. Estándar interno: N/A
Determinación de 6-MP y sus metabolitos en plasma o suero mediante HPLC ³⁰ .	Biológica.	Fase móvil: Acetonitrilo-Agua desionizada, ácido acético. Columna: C18 (250*4.3mm, 5.0mcm). Velocidad de flujo: 1ml/min. Longitud de onda: 295 a 330nm. Estándar interno: 6-tioguanina.
Determinación por HPLC, de los metabolitos de 6-MP adecuados para la evaluación del riesgo clínico y su toxicidad ³¹ .	Biológica.	Fase móvil: Metanol-SAF pH 2.6, 0.025M Columna: Thermo C18 (150x4.6mm, 5.0mcm). Velocidad de flujo: 1ml/min. Longitud de onda: 290 a 330nm Estándar interno: N/A.

Nombre del artículo	Tipo de matriz	Condiciones del método
Ensayo de 6-MP y sus metabolitos en plasma ³² .	Biológica.	Fase móvil: Metanol-SAF pH 3.0, 0.003M(60;40% v/v). Columna: C18 (250x4.3mm, 5.0mcm). Velocidad de flujo: 1ml/min. Longitud de onda: 330nm Estándar interno: N/A.
Ensayo para cuantificar 6-MP y sus metabolitos en plasma por HPLC con un arreglo de diodos ³³ .	Biológica	Fase móvil 1: Metanol-SAF pH 3.0, 0.003M(98;2.0% v/v). Fase móvil 2: Metano-SAF pH 3.0, 0.003M (60:40% v/v). Columna: LC18 (250x4.3mm, 5.0mcm). Velocidad de flujo: 1ml/min. Longitud de onda: 330nm Estándar interno: N/A.

7.2 Resultados del método indicativo de estabilidad.

Como resultados obtenidos de las matrices de experimentos realizadas para obtener las condiciones idóneas para el método indicativo de estabilidad. Se realizó un tabla donde se resumen las condiciones encontradas incluyendo al estándar interno, ver imagen 1.5

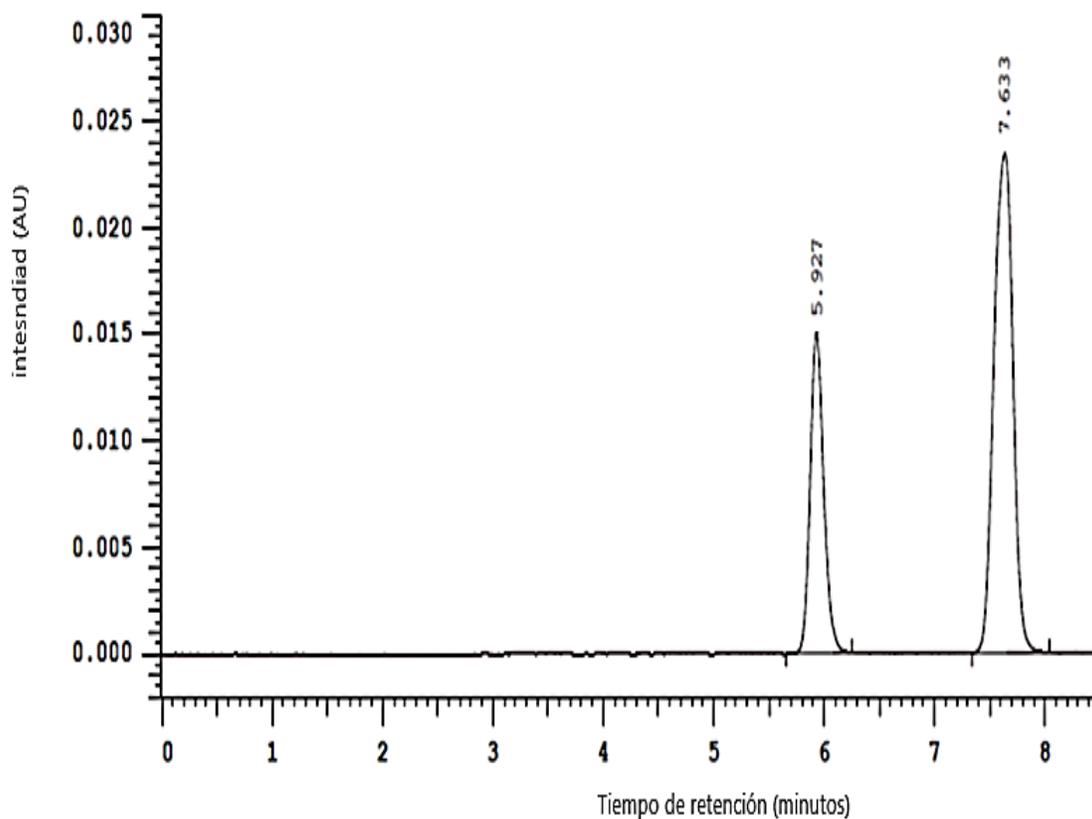


Imagen 1.6. Cromatograma de la citarabina (5.927minutos) y la 6-mercaptopurina (7.633minutos)

Tabla 1.5. Resultado de las condiciones del método.

Condiciones	Resultados
Velocidad de flujo	0.8ml/min
Fase móvil	Metanol-Solución amortiguadora de fosfatos 0.05M pH 7.5 con una proporción de 10:90 %v/v.
Columna	Thermo C8, 4.3x250mm, tamaño de partícula 5.0µm.
Estándar interno	Citarabina
Longitud de onda	295nm

7.2.1 Descriptores cromatográficos.

En el siguiente tabla se muestran los resultados de los descriptores cromatográficos evaluados durante el desarrollo del método.

Molécula	Tiempo de retención	Factor de capacidad (K')	Factor de simetría	Número de platos teórico	Respuesta	Alfa
Citarabina	5.927	1.31	1.20	11370	-	-
6-mercaptopurina	7.633	1.97	0.97	10106	6.949	1.57

7.3 Resultados de la validación.

Una vez determinadas las condiciones se procedió a realizar la validación del método. En el tabla 1.7 se muestra el resumen de las aptitudes del método evaluadas, los resultados obtenidos y los criterios de aceptación para cada aptitud evaluada.

Tabla 1.7. Resumen de los resultados de la validación del método.

Aptitud del método	Criterio de aceptación	Resultado
Adecuabilidad del sistema	C.V. de las respuestas analíticas <2.0%	CV = 0.6075
Precisión del sistema	C.V. de las respuestas analíticas <2.0%	CV = 1.5605
Linealidad del sistema	$\beta \neq 0, \alpha = 0$ y $r^2 > 0.98$	B=0.4436, $\alpha=0.006986$, $r^2=0.9987$ $T_\beta=43009179.2$ $T_\alpha=-0.0069686$ Valor crítico de t=1.7109
Selectividad del método	$H_0: m_1 - m_2 = 0$ $H_1: m_1 - m_2 \neq 0$	$H_0: 2.5359 - 2.5062$ $= 0.02861$ $T_{calc}=1.0971109$ Valor crítico para t=2.131846
Linealidad del método	$\beta \neq 0, \alpha = 0$ y $r^2 > 0.98$	B=0.4687, $\alpha=-0.12047$, $r^2=$ 0.9940 $t_\beta=14.086911$ $t_\alpha=-1.7406377$ valor crítico de t=1.7709
Exactitud del método	$H_0: \mu = 100$ $H_1: \mu \neq 100$	Valor promedio de los recobros= 99.9769 $T_{cal}=0.0502648$ Valor crítico para t= 1.7458
Presión <ul style="list-style-type: none"> Repetibilidad Precisión intermedia 	<ul style="list-style-type: none"> Para Repetibilidad el CV del % de recobro < 2.0% Para precisión intermedia: $H_0: A_1D_1 = A_2D_2 = A_1D_2 = A_2D_1$ $H_i: A_1D_1 \neq A_2D_2 \neq A_1D_2 \neq A_2D_1$ Valor de $F_{calc} > F$ Probabilidad < 0.05 	Repetibilidad CV del % de recobro =1.6483 Precisión entre días Valor de F:1.813845 Valor crítico de F:7.7086474 Probabilidad:0.249294 Precisión entre analistas Valor de F:0.0669737 Valor crítico de F:4.9646 Probabilidad:0.80104
Límite de detección	No aplica	LD=0.1774µg/ml
Límite de cuantificación	No aplica	LC=0.5371µg/ml.

7.4 Resultados de la degradación forzada.

Condición degradante.	Tiempos de muestreo		
	0	2	4
Hidrólisis básica	-	+	+
Hidrólisis ácida	-	-	-
Hidrólisis a pH 2	-	+	+
Hidrólisis a pH 4	-	+	+
Hidrólisis a pH 6	-	+	+
Hidrólisis a pH 8	-	+	+
Oxidación	-	+	+

- No hubo presencia de huellas cromatográficas. El RF del tiempo 0 al tiempo x de análisis no se modificó.

+ Se presentaron otras huellas cromatográficas diferente a la del estándar y al tiempo 0.

Las muestras una vez concluido el estudio de degradación acelerada fueron transvasadas en tubos de ensaye con tapón de baquelita de 18x150mm y se colocaron dentro de un refrigerador a 5°C.

A las 24 horas después las muestras de hidrólisis a pH 2.0, 4.0, 6.0 y 4.0 presentaron precipitación de cristales color amarillo cadmio limón diferentes al color amarillo cadmio medio del estándar de la 6-mercaptopurina.

Los cristales fueron analizados por calorimetría diferencial de barrido (consultar anexo C). Como se muestra más adelante en este documento en el tabla 2.6 donde se resumen los puntos de fusión y entalpías de fusión de cada muestra. Posteriormente las muestras fueron analizadas por espectroscopía de infrarrojo, en este análisis se incluyeron todas las muestras sometidas a degradación por hidrólisis oxidación y fotólisis (consultar anexo D).

7.5 Resultados del estudio de estabilidad en uso.

Los tiempos de análisis y como se realizó el muestreo se muestran la tabla siguiente.

Tabla 1.9. Tiempos de muestreo del estudio de estabilidad en uso						
Pruebas	Tiempo					
	0	1	2	3	4	5
Apariencia	x	x	X	X	X	X
Color	x	x	X	X	X	X
valoración	x	x	X	X	X	X
Disolución	-	x	-	X	-	X
Identidad	x	x	X	X	X	X
Variación de peso	x	x	X	X	X	x

Cada día que se realizó la prueba se marcó con una x, los días los cuales no se llevó a cabo alguna de las pruebas se marcó con un-.

El estudio de estabilidad en uso dio inicio el día 14 de mayo del 2019 a las 13:30 horas. El frasco fue abierto durante 60 segundos y se tomaron 5 tabletas las cuales fueron analizadas con el apoyo de una lupa y un estereoscopio.



Imágenes 1.7 y 1.8. Evaluación de la apariencia durante el tiempo 0

7.5.1 Resultados de Apariencia.

- **Tiempo 0**

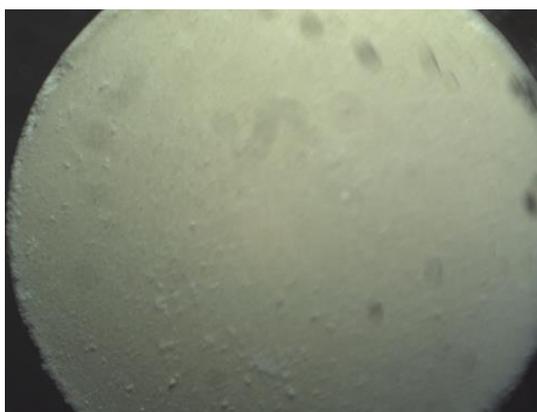


Imágenes 1.9 y 2.0. Tablet de 6-mercaptopurina observadas con el objetivo de 10X.

Durante el tiempo 0, las tabletas se observaron bajo estereoscopio utilizando un lente de 4x y 10x. Se obtuvieron mejores resultados con el objetivo de 10x, debido

a que se pudo observar la superficie de la tableta y la presencia de cristales de color amarillo.

- **Primer tiempo de muestreo.**



Imágenes 2.1 y 2.2. Tabletas del primer día de muestreo observadas con el objetivo 10x.

En el primer tiempo de muestreo, las tabletas seguían presentando el mismo color característico sin la presencia de partículas de otro color o extrañas.

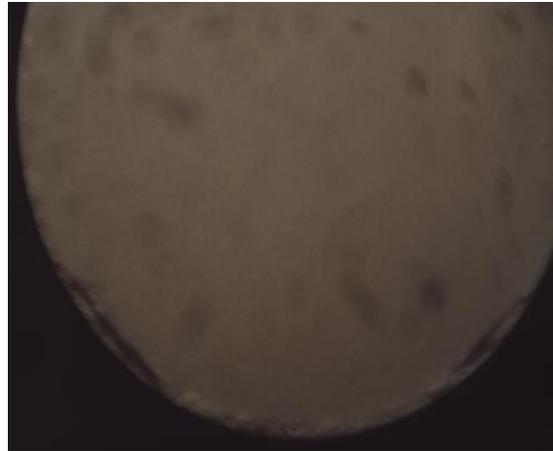
- **Segundo tiempo de muestreo.**



Imágenes 2.3 y 2.4. Tabletas analizadas durante el segundo día de análisis.

Durante el análisis de la apariencia en el segundo día de muestreo se logro observar la presencia de una particula extraña. La particula extraña tenia forma de hilo de color negro.

- **Tercer día de muestreo.**

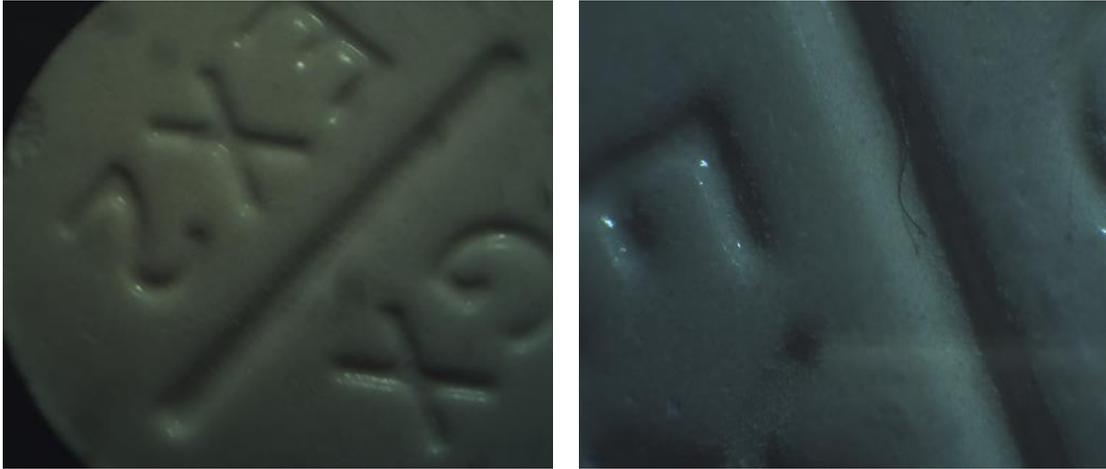


Imagenes 2.5 y 2.6. Tabletas analizadas durante el tercer día de muestreo.

Al observar las tabletas durante el tercer día de análisis, se pudo observar la presencia de una particula extraña en forma de bastón. Similar a un pedazo de hilo de color negro incrustado en la tableta.

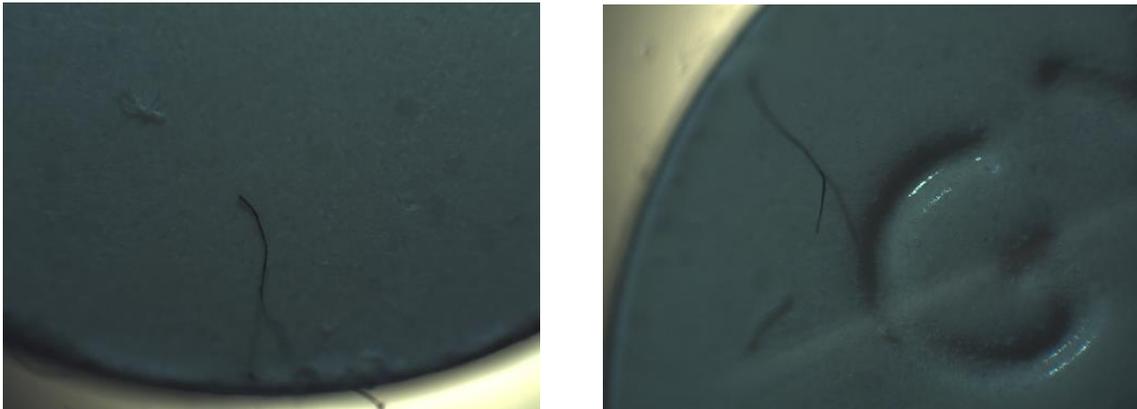
Los dos días restantes las tabletas comenzaron a mostrar la presencia de trasas de hilo.

- **Cuarto día de muestreo.**



Imágenes 2.7 y 2.8. Tabletas con la presencia de partículas extrañas

- **Quinto día de muestreo.**



Imágenes 2.9 y 3.0. Presencia de partículas extrañas en la superficie de las tabletas.

7.5.2 Resultados de la evaluación del color de las tabletas.

Las tabletas durante los 28 días que duró el estudio no mostraron modificaciones en el color, pero algunas presentaron partículas extrañas a partir del tercer día de muestreo. Las partículas tenían forma de bastón similares a trozos de tela.

7.5.3 Resultados de la prueba de variación de peso.

En la prueba de variación de peso los resultados fueron lo siguientes, se reportaron los pesos de 5 tabletas durante cada día de muestreo. Se generó una tabla donde se anotaron los pesos.

Tabla 2.0. Resultados de la prueba de variación de peso.								
Tiempo	Peso de las tabletas					Promedio	Desviación	Coeficiente de variación
0	122.80	122.9	122.8	123.5	124.3	123.6	0.65038	0.5276
1	122.2	125.7	120.1	120.4	125.2	122.72	2.6243	2.1384
2	126.9	125.3	123.8	122.7	125.3	124.8	1.6062	1.2870
3	123.5	120.3	121.9	122.9	124.1	122.54	1.4926	1.2181
4	125.1	120.9	12.5	121.2	121.4	122.42	1.8157	1.4832
5	122.0	122.4	124.7	122.7	121.6	122.68	1.2029	0.9805

7.5.4 Resultados de la valoración.

La valoración se realizó por triplicado, se pesaron 5 tabletas y de estos pesos se obtuvo el peso promedio. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 2.1. Resultados de la valoración

Tiempo	Concentración recuperada (mg).			Porcentaje de recobro
	1	2	3	
0	46.9568	42.4620	44.6067	91.5881
1	52.0568	46.9512	89.6906	95.9020
2	42.2269	38.8613	37.6665	79.1699
3	49.8248	50.7025	48.8668	99.5925
4	43.2720	38.5997	42.1553	90.8669
5	47.5433	44.42156	43.8299	90.6598

7.5.5 Resultados de la prueba de disolución.

Tabla 2.2. Resultados de la prueba de disolución

Tiempo	Porcentaje disuelto			Promedio del porcentaje disuelto
	M-1	M-2	M-3	
0	104.09526	108.3730	103.8721	105.4468
1	98.0393	95.9022	105.7433	99.8949
2	89.2062	98.9855	103.9506	97.3808

7.5.6 Resultados de identidad.

Tabla 2.3. Resultados de la prueba de identidad				
Tiempo	Factor de capacidad			
	Muestra control	M-1	M-2	M-3
0	1.91	1.91	1.91	1.91
1	1.90	1.91	1.90	1.91
2	1.88	1.88	1.88	1.88
3	1.72	1.74	1.73	1.73
4	1.87	1.87	1.87	1.87
5	1.87	1.88	1.88	1.88

8. Análisis de resultados

8.1 Análisis de resultados de la revisión de métodos para cuantificar 6-mercaptopurina.

Para el desarrollo de este método se realizó una revisión en artículo sobre metodologías para cuantificar 6-mercaptopurina. Se seleccionaron los métodos que pudieran ser reproducibles, este fue el primer criterio para seleccionar el método, ya que la mayoría de los métodos omitían datos como el tratamiento de las muestras. El segundo criterio de selección fue que utilizaran estándares internos como técnica analítica. Solamente 2 métodos cumplieron con este criterio y se reprodujeron las técnicas descritas, obteniendo como resultado tiempos de retención cercanos a el tiempo muerto, factores de simetría fuera de los criterios de aceptación y factores de capacidad menores a 1.0.

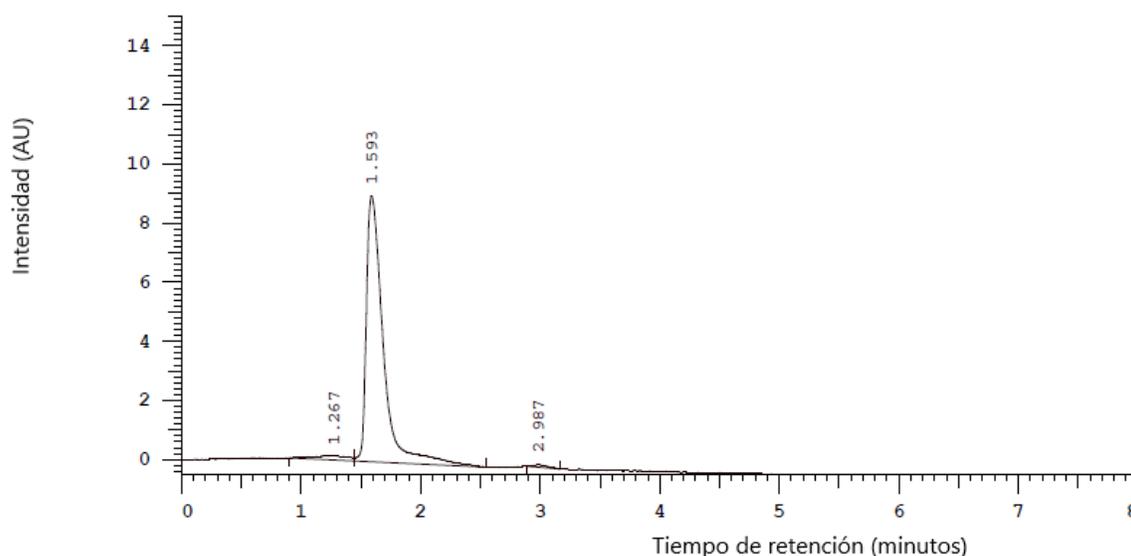


Imagen 3.1. Cromatograma 6-MP condiciones: Fase móvil de metanol-SAF pH 6.5 0.05M (60:40% v/v), longitud de onda de 325nm con una velocidad de flujo de 1ml/min, columna Phenomenex C18 (250*4.3mm, 5.0mcm).

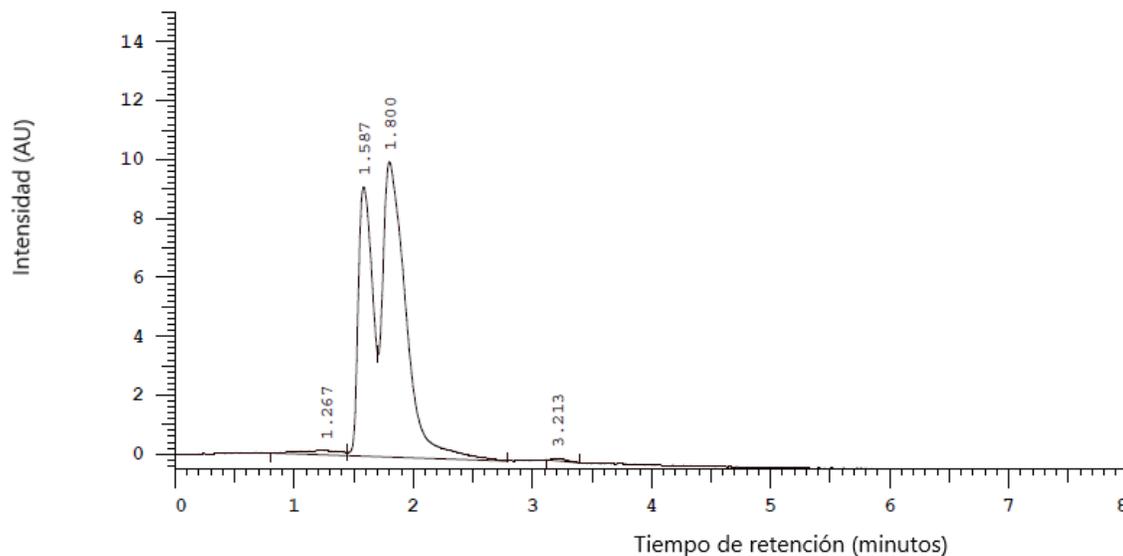


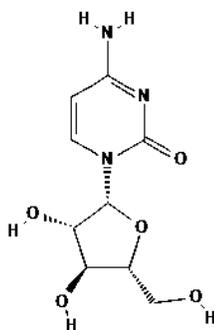
Imagen 3.2. Cromatograma 6-MP, condiciones: Fase móvil acetonitrilo-SAF pH 6.5, 0.01M (80:20% v/v), longitud de onda 325nm con una velocidad de flujo de 1ml/min, columna Phenomenex C18 con las mismas dimensiones del cromatograma anterior.

8.2 Análisis de resultados del desarrollo del método indicativo de estabilidad para la 6-mercaptopurina

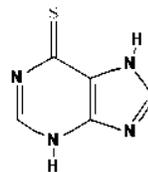
Tabla 2.4. Descriptores cromatográficos.

Molécula	Tiempo de retención	Factor de capacidad (K')	Factor de simetría	Número de platos teórico	Respuesta	Alfa
Citarabina	5.927	1.31	1.20	11370	-	-
6-mercaptopurina	7.633	1.97	0.97	10106	6.949	1.57

La tabla 2.4 muestra los resultados de los descriptores cromatográficos obtenidos después de los ajustes pertinentes. Como estándar interno se utilizó a la citarabina dado que tiene una estructura similar a la de mercaptopurina.



A.



B.

imagen 3.3. Estructura A, molécula de citarabina y molécula B, estructura de la 6-mercaptopurina.

Además de que la citarabina absorbe la longitud de onda de 295nm, los descriptores cromatográficos como el factor de capacidad de ambas moléculas esta entre 1.0 y 2.0, lo cual implica que ambas moléculas se retuvieron en la columna y no se traslaparon con el tiempo muerto. También ambas moléculas presentan una simetría entre los límites permitidos que van de 0.8 a 1.20.

Con respecto a la columna ambas moléculas obtuvieron un número de platos teóricos por arriba de 5000, la respuesta obtenida por la mercaptopurina estuvo por arriba de 0 al igual que la separación de los picos. Lo cual permitió calcular el área bajo la curva de los picos sin la incertidumbre de que estos se sobrepusieran.

8.3 Análisis de resultados de la validación.

8.3.1 Validación del sistema.

La validación del método indicativo de estabilidad consistió en evaluar las condiciones operativas del sistema y las condiciones en operación del método. Dentro de los parámetros evaluados en la validación del sistema, se evaluaron: adcaubilidad, precisión y linealidad del sistema dando los siguiente resultados.

Para la adecuabilidad del sistema la guía de validación de la ICH Q2(R1), establece que el coeficiente de variación para la determinación de la adecuabilidad y la precisión del sistema no debe ser mayor al 2.0%. El coeficiente de variación obtenido para la adecuabilidad y la precisión del sistema fue de 0.6075 y de 1.5605 respectivamente, como lo marca la guía para estas dos aptitudes del sistema ni uno de los dos coeficientes de variación fue mayor al 2.0%, por lo tanto el sistema presentó adecuabilidad y precisión.

En el caso de la linealidad se calcularon la pendiente, ordenada al origen y coeficiente de determinación. La pendiente fue de 0.4436, la ordenada al origen fue de -0.006986 y el coeficiente de determinación fue de 0.9987, con estos resultados se realizaron los ensayos de hipótesis para la pendiente y la ordenada al origen.

Las hipótesis utilizadas fueron las siguientes:

- Para la pendiente:

$$H_o = \beta = 0$$

$$H_i = \beta \neq 0$$

- Para la ordenada al origen:

$$H_o = \alpha = 0$$

$$H_i = \alpha \neq 0$$

- Coeficiente de determinación:

$$r^2 \geq 0.98$$

Para analizar cada uno de los parámetros de linealidad se utilizó el estadígrafo t de student, se cálculo la t de student para cada parámetro y se obtuvo el valor crítico de t.

Tabla 2.5. Resultados de los parámetros de linealidad.		
Parámetros de la linealidad	Resultados de t de student calculada	Valor crítico de t de student
Pendiente (β)	43009179.2	1.7109
Ordenada al origen (α)	0.0069686	1.7109

En el caso de el coeficiente de determinación se calcularon y graficaron los residuales.

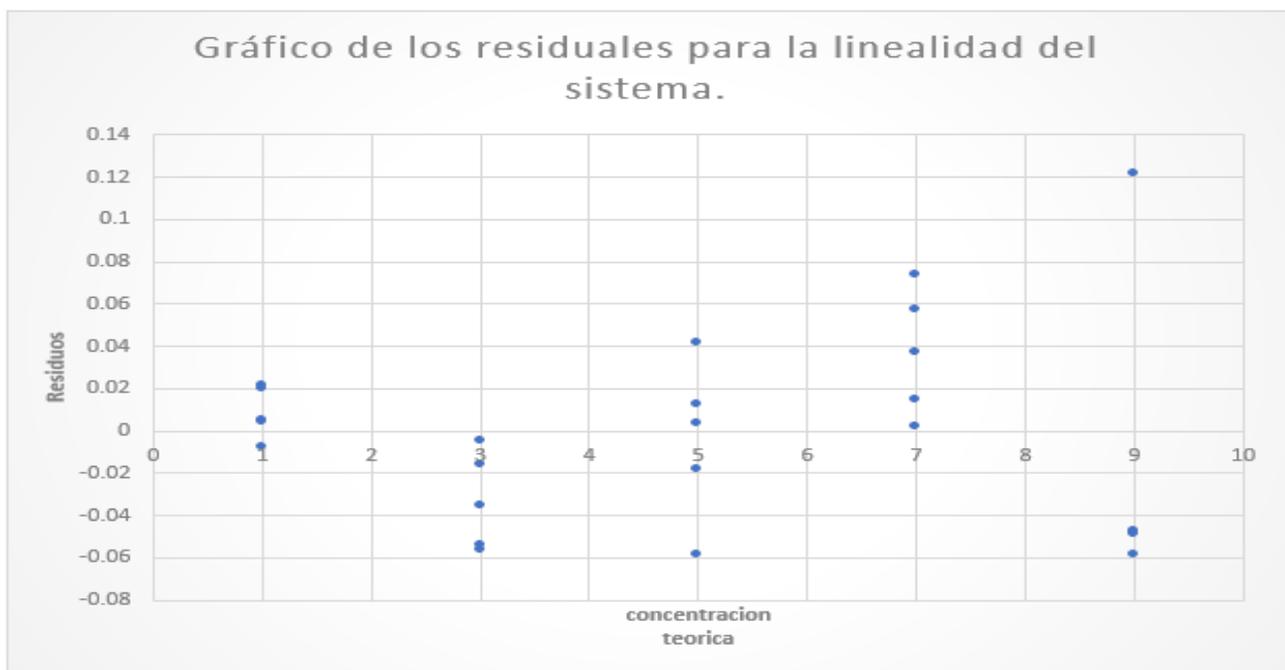


Imagen 3.4. Gráfico de residuales de la linealidad del sistema

Tabla 2.6. Valores residuales de la linealidad del sistema.		
Observación	Pronóstico Respuestas analíticas	Residuos
1	0.44259056	0.01951675
2	0.44259056	-0.00803163
3	0.44259056	0.00430894
4	0.44259056	0.00451349
5	0.44259056	0.02095936
6	1.32777168	-0.03585807
7	1.32777168	-0.05384992
8	1.32777168	-0.01630791
9	1.32777168	-0.005014
10	1.32777168	-0.05632023
11	2.21295279	0.0418545
12	2.21295279	0.00360855
13	2.21295279	-0.05894109
14	2.21295279	-0.01843875
15	2.21295279	0.01266496
16	3.09813391	0.05755242
17	3.09813391	0.03716988
18	3.09813391	0.00207184
19	3.09813391	0.01470348
20	3.09813391	0.07343895
21	3.98331503	0.12178026
22	3.98331503	-0.04832413
23	3.98331503	-0.04921153
24	3.98331503	-0.04771494
25	3.98331503	-0.0584756

Con el cálculo y el gráfico de los residuales, no se deben de observar patrones. Ya que con el modelo lineal la pendiente es capaz de predecir la mayoría de las dispersiones de los mismos con respecto al valor promedio. Los resultados obtenidos de la evaluación de los parámetros de la linealidad del sistema dan la certeza de que el sistema no interferirá con la dispersión de los datos y la respuesta de las muestras.

8.3.2 Validación del método.

a. Linealidad del método.

De igual manera que la linealidad del sistema se evaluaron los parámetros de linealidad, pendiente, ordenada al origen y coeficiente de determinación.

Parámetros de la linealidad	Resultados obtenidos de la linealidad	Resultados de t de student calculada	Valor crítico de t de student
Pendiente (β)	0.4687	14.086911	1.7709
Ordenada al origen (α)	-0.12047	1.7407	1.7709

Observación	Pronóstico RA	Residuos
1	0.450467879	-0.021567879
2	0.450467879	-0.043567879
3	0.450467879	-0.035467879
4	1.351403636	-0.108803636
5	1.351403636	-0.094203636
6	1.351403636	-0.023703636
7	2.252339394	-0.061839394
8	2.252339394	-0.135839394
9	2.252339394	-0.139739394
10	3.153275152	-0.116075152
11	3.153275152	-0.157975152
12	3.153275152	0.060024848
13	4.054210909	0.279689091
14	4.054210909	0.149789091
15	4.054210909	0.011189091

El coeficiente de determinación obtenido en la linealidad del método fue de 0.9940. Al igual que en la linealidad del sistema se calcularon y graficaron los residuales, esperando obtener datos dispersos.

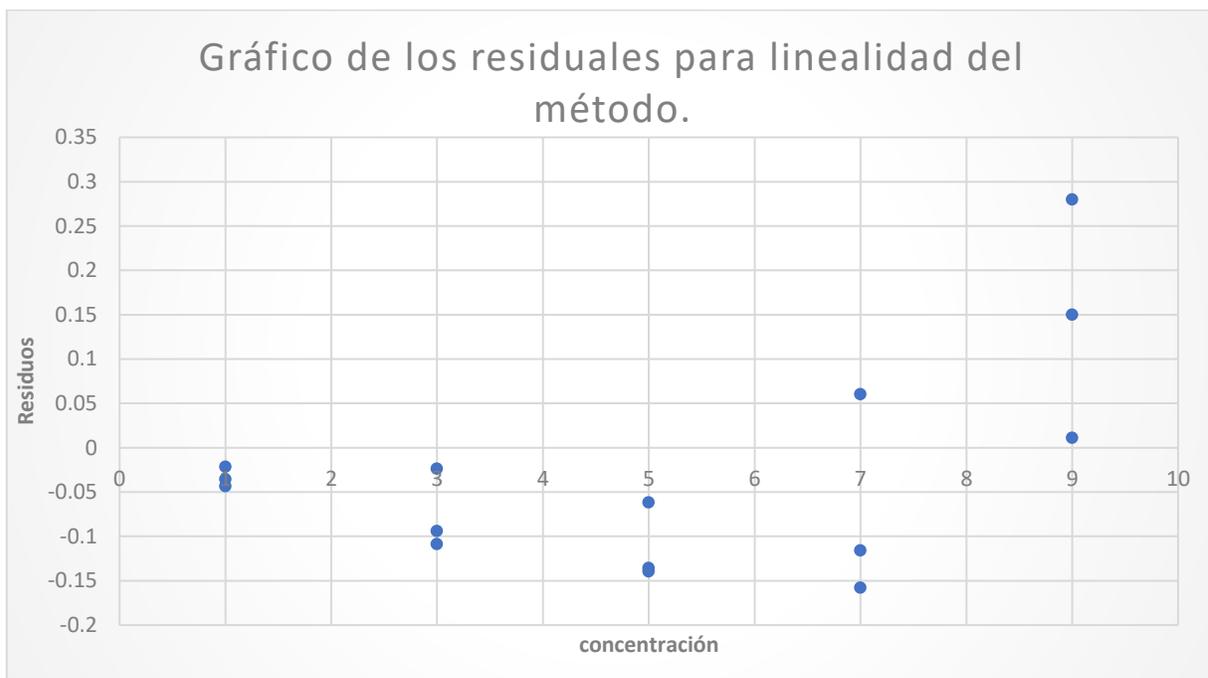


Imagen 3.5. Gráfico de residuales de la linealidad del método

b. Selectividad.

El método mostró selectividad y esto se puede corroborar con el valor de alfa el cual fue de 1.57. Lo cual se traduce en que la 6-mercaptopurina se retuvo en la columna un minuto y medio más que la citarabina evitando así que los picos se juntaran, con respecto a los productos de degradación de la 6-mercaptopurina se observaron picos con respuestas muy bajas, por lo tanto, se reanalizaron las muestras a 275, 250 y 235nm (consultar anexo F).

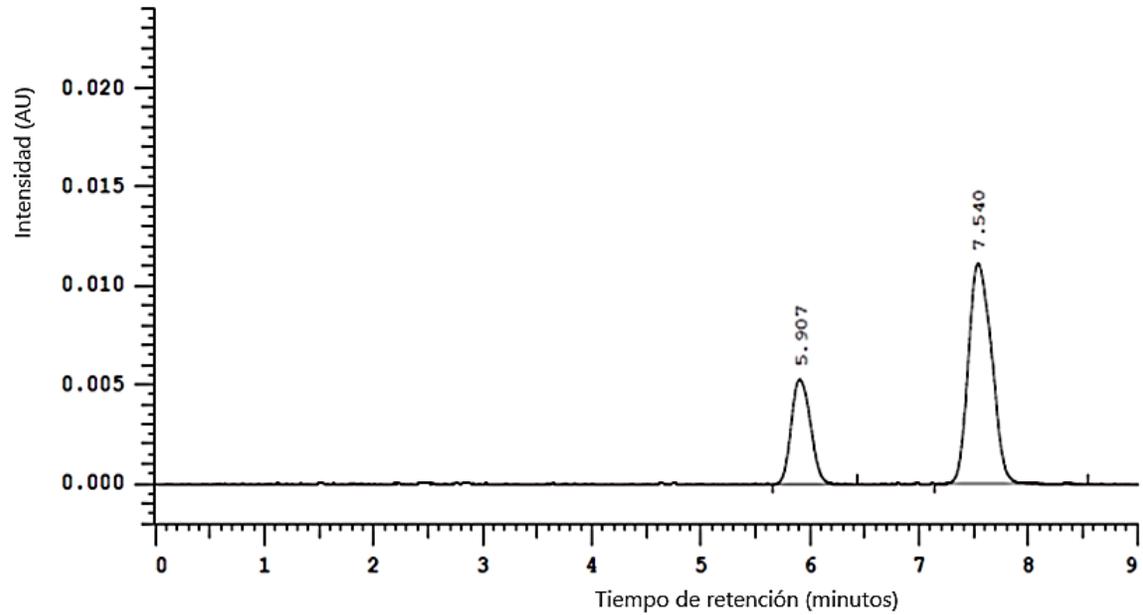


Imagen 3.6. Cromatograma de la 6-mercaptopurina en presencia de los excipientes de la formulación.

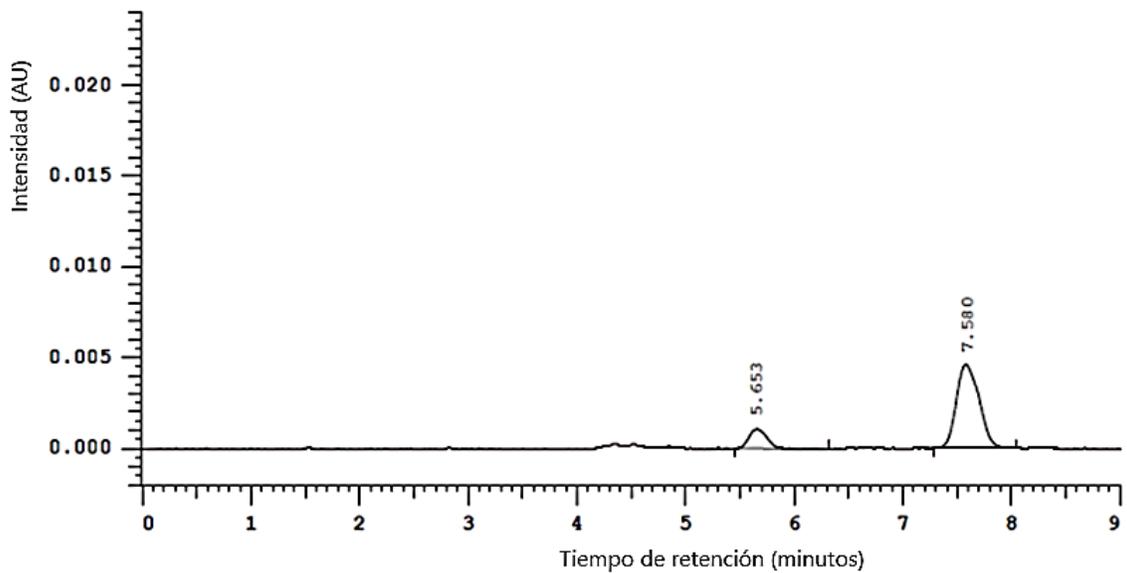


Imagen 3.7. Cromatograma de la 6-mercaptopurina (7.580) y productos de degradación (5.653).

c. Exactitud.

El porcentaje de recobro de los niveles bajo, intermedio y alto de la curva estándar propuesta para el desarrollo de este método, dieron como resultado 99.9769 para el valor promedio del porcentaje de recobro y una t de student de 0.0502648, el

valor crítico de t de student para este análisis fue de 1.7458, por lo tanto, el porcentaje de recobro obtenido para este método es aceptable.

d. Precisión intermedia.

En la precisión intermedia se evaluaron los parámetros de repetibilidad y precisión. Para el parámetro de repetibilidad el coeficiente de variación de los porcentajes de recobro por nivel fueron menores al 2.0%. El valor promedio del coeficiente de variación de todos los niveles fue de 1.6483, lo cual está dentro de los parámetros establecidos para el coeficiente de variación.

En el caso de la precisión se evaluó la precisión entre días y analistas utilizando una tabla de análisis de varianza para determinar los valores de p y F. El valor de F obtenido para la precisión entre días fue de 1.813845, el valor crítico de F fue de 7.7086474 y el valor de P fue de 0.249294

Para el caso de la precisión entre analistas el valor obtenido de F fue de 0.06697 para un valor crítico de 4.9646 y un valor de P de 0.80104. El método presenta precisión entre días y entre analistas.

e. Limite de detección y cuantificación.

El límite de detección obtenido para este método fue de 177.4ng/ml y el límite de cuantificación fue de 537.1 ng/ml, es decir que el método es capaz de detectar y seguir la degradación de la 6-mercaptopurina desde la formación del 1×10^{-6} mg de la formación de estos (menor al 1% del contenido de una tableta). Esto se traduce a que el método es muy sensible, exacto, lineal y preciso.

8.4 Análisis de resultados de la degradación forzada de la 6-mercaptopurina.

Las muestras de 6-mercaptopurina se sometieron a hidrólisis ácida y básica, hidrólisis a pH desde 2.0 hasta 8.0, oxidación, fotólisis. Las recciones se fueron siguiendo mediante la cromatografía en capa fina (consultar en anexo A).

Las muestras de hidrólisis a pH 2.0, 4.0, 6.0 y 8.0 presentaron un precipitado de color amarillo cadmio limón.

Tabla 2.9. Resultados de los termo gramas de la hidrólisis de la 6-mercaptopurina				
Condición de degradación	Descripción	Número de termas	Temperatura de fusión °C	□H J/g
Muestra control (estándar de 6-MP)	La muestra de estándar de 6-mercaptopurina	4	1. 175.0 2. 258.0 3. 267.34 4. 347.69	1. 166.5024 2. 24.5136 3. 16.9656 4. 94.3223
Hidrólisis pH 4.0	Muestra de los cristales precipitados a este pH	2	1. 160.34 2. 174.00 3. 268.00	1. 75.8898 2. 17.0784 3. 148.9904
Hidrólisis pH 6.0	Muestra de cristales precipitados	3	1. 170.0 2. 266.34 3. 337.0	1. 263.3104 2. 135.5934 3. -1528.83
Hidrólisis pH 8.0	Muestra de cristales precipitados	4	1. 164.67 2. 258.66 3. 267.0 4. 340.67	1. 285.667 2. 40.5237 3. 37.5460 4. -1777.63

En un principio se pensó que este precipitado correspondía a una recristalización de la 6-mercaptopurina, pero se realizaron análisis por calorimetría diferencial de barrido, para corroborar lo antes mencionado como se muestra en la tabla 1.6, la muestra control de la 6-mercaptopurina mostró 4 isotermas, 3 de estas isotermas pueden corresponder al proceso de pérdida de la forma I y cambio a la forma II de la 6-mercaptopurina^{34,35}. Esto se menciona en algunos artículos donde toman a la 6-mercaptopurina monohidratada como la primera forma cristalina de este compuesto. La pérdida de la molécula de agua se da entre los 120 y los 160°C según reportan algunos artículos pero el punto de fusión puede llegar a desplazarse hasta los 170°C. En el caso de la muestra control el punto de fusión es de 175°C pero por la entalpía que es alta en comparación con las tres isotermas restantes podría tratarse de la pérdida de moléculas de agua³⁵.

La segunda isoterma ocurre a 258°C y la tercera a los 267°C puede deberse al proceso de fusión recristalización de la forma III de la 6-mercaptopurina, esta forma es amórfica, los puntos cercanos de la muestra control pueden ser el proceso de fusión recristalización o transición vítrea de esta forma amórfica³⁵.

La última isoterma se encuentra a los 347°C, la literatura reporta que el punto de fusión se encuentra a los 313°C pero en la monografía del estándar de 6-mercaptopurina establece un rango que va de los 320 a los 350°C. Lo cual dice que a los 347 fue el punto de fusión para la muestra control³⁵.

Con respecto a las muestras de hidrólisis, se obtuvieron cristales precipitados en cada pH a excepción de las muestras de hidrólisis ácida y básica. Las muestras de

hidrólisis a diferentes pH mostraron un patrón de cristalización creciente, esto quiere decir que el pH entre más básico la presencia de cristales precipitados era mayor. Los cristales obtenidos se analizaron por calorimetría diferencial de barrido y se obtuvieron termas similares, pero con la aparición de un nuevo terma a los 160°C. Como se había mencionado antes este punto de fusión puede deberse a la pérdida de agua, pero también corresponde a el punto de fusión de un producto de degradación, la Hipoxantina (punto de fusión entre 150 y 160°C)³⁶. La hipoxantina es un polvo cristalino de color amarillo canario, este color descrito es el que presentaron los cristales precipitados pero se necesitarían realizarse más pruebas para concluir que estos cristales son de hipoxantina y no de una recristalización de la 6-mercaptopurina. De igual forma tampoco se puede descartar la presencia de trazas de Hipoxantina y xantinas en los cristales precipitados, debido a que la hipoxantina puede generarse por hidrólisis básica de la 6-mercaptopurina.

Las isotermas de 170 a 175°C corresponderían al proceso de arreglo cristalino pasando de la forma I a la II. También los cristales obtenidos presentaron termas entre 258°C y 266°C correspondientes al proceso de transición vítrea entre la forma II y III de la 6-mercaptopurina pero también estos puntos de fusión pueden corresponder a la xantina debido a que el punto de fusión de la xantina esta ente 250 y 300°C^{36,37}.

Por lo tanto se puede inferir que los cristales precipitados fueron de nuevos compuestos los cuales corresponderian a las xantinas, hipoxantina y otros productos de degradación.

Tabla 3.0. Resultados de los espectros infrarrojos de las muestras de degradación.

Muestra de degradación	Longitud de onda (cm ⁻¹)	Anexo
Muestra control de 6-mercaptopurina	<ol style="list-style-type: none"> 1. 3373.543 2. 3289.520 3. 2944.395 4. 2913.651 5. 2355.813 6. 1562.154 7. 1546.345 8. 1512.019 9. 1478.258 10. 1021.974 (Estiramiento del enlace C=S, huella dactilar de la 6-MP) 	Consultar en el anexo D
Hidrólisis pH 4.0	<ol style="list-style-type: none"> 1. 3943.399 2. 3902.049 3. 3829.084 4. 3839.127 5. 3734.961 6. 3674.919 7. 3606.657 8. 3542.863 9. 3500.689 10. 3418.714 11. 3121.883 12. 3042.683 13. 2953.867 14. 1644.170 (Estiramiento del enlace C=O) 15. 794.587 	Consultar en el anexo D
Hidrólisis pH 6.0	<ol style="list-style-type: none"> 1. 3838.844 2. 3830.267 3. 3692.503 4. 3391.100 5. 3122.321 6. 3003.151 7. 2365.670 8. 1639.504 (Estiramiento del enlace C=O) 9. 1014.559 (Estiramiento del enlace C=S) 	Cosultar en el anexo D

Hidrólisis pH 8.0	<ol style="list-style-type: none"> 1. 3388.134 2. 3360.472 3. 2955.564 4. 2925.581 5. 2643.673 6. 1710.181 7. 1679.102 (Estiramiento del enlace C=O) 8. 1567.799 9. 1538.155 10. 1504.940 	Consultar en el anexo D
Hidrólisis básica	<ol style="list-style-type: none"> 1. 3195.596 2. 3653.659 3. 3673.708 4. 3568.175 5. 3540.651 6. 3445.290 7. 3401.571 8. 3185.529 9. 2951.657 10. 1643.711 (estiramiento del enlace C=O) 11. 1013.997 (Estiramiento del enlace C=S) 12. 773.927 	Consultar en el anexo D
Oxidación	<ol style="list-style-type: none"> 1. 3733.834 2. 3410.57 3. 3378.353 4. 2949.775 5. 2924.064 6. 2912.040 7. 1866.580 8. 1710.618 9. 1635.696 (Estiramiento del enlace C=O) 10. 1650.718 11. 1574.750 12. 1518.855 13. 1478.507 14. 1114.061 (Estiramiento del enlace C=S) 15. 1014.111 	Consultar en el anexo D

	16.942.611	
Fotooxidación	1. 3941.666 2. 3882.925 3. 3912.684 4. 3734.847 5. 3625.431 6. 3614.928 7. 3551.172 8. 3464.842 9. 3406.353 10. 3157.936 11. 3135.686 12. 1642.652 (Estiramiento del enlace C=O) 13. 1014.497 (Estiramiento del enlace C=S) 14. 704.973	Consultar en el anexo D

En las muestras de hidrólisis se observó una disminución en la intensidad en la banda características de la 6-mercaptopurina, este estiramiento se da a los 1021.20 el cual corresponde a el enlace C=S³⁸, el cual tiene una intensidad cercana a 35% de transmitancia en contraste las muestras de hidrólisis la cual tiene una intensidad cercana a los 75% de transmitancia. Además de que la banda correspondiente a el grupo NH⁺ localizada entre 3400 y 3300^{40,41}, tiene un aumento en la transmitancia cercano al 60% en comparación con el estándar en cual se encuentra entre 70-75%.

Esto indicaría que en las muestras de hidrólisis la 6-mercaptopurina recristalizó debido a la disminución de la energía cinética, debido a que las muestras inicialmente se prepararon en metanol, se adicionaron las soluciones amortiguadoras correspondientes y se colocaron durante 5 días a una temperatura de 40°C. Al finalizar este tiempo se almacenaron en refrigeración a 5°C y es aquí donde precipitaron los cristales pero al estar a diferentes pH se generaron en menor

cantidad productos de degradación y esto se puede corroborar ya que las muestras de oxidación, hidrólisis básica y fotooxidación, no presentaron cristales precipitados.

Esto lleva al mecanismo de oxidación de la 6-mercaptapurina la cual inicia con la formación de un puente disulfuro entre dos moléculas de 6-mercaptapurina que frente a agentes oxidantes en condiciones básicas se hidroliza y forma la purin-6-sulfonato o regresa a formar a la 6-mercaptapurina, el enlace pi del C=S pasa a formar un enlace sencillo y es aquí donde el átomo de carbono forma un enlace con moléculas de OH⁻. Como en la formación de los cetales⁴². El grupo sulfonato se seguirá oxidando hasta formar un sulfinato, un excelente grupo saliente el cual busca recuperar los electrones perdidos durante la oxidación, formando un nuevo compuesto, este mecanismo se puede presentar en las muestras de hidrólisis, donde se pueden observar huellas de estos grupos funcionales en las bandas de 1400 a 1300cm⁻¹, las cuales corresponden a los sulfoxidos.

En el caso de las muestras de oxidación la reacción es más agresiva y pasa de formar la dipurinil-6-disulfuro a formar la purina-6-sulfonato más una molécula de 6-mercaptapurina que seguirá formando el puente disulfuro contra molécula de 6-mercaptapurina.

8.4 Análisis de resultados de la estabilidad en uso.

- **Apariencia y color.**

La apariencia de las tabletas se modificó con el tiempo, las tabletas al ser observadas bajo el estereoscopio mostraron superficies irregulares, algunas incluso mostraron trazas de hilo, esto se observó a partir del tercer día de muestreo. Como

se menciona en la guía de estudios de estabilidad en uso, el tiempo de exposición debe considerarse desde que se abre el contenedor hasta que se deja de utilizar el contenedor, considerando el tiempo de exposición del contenido. El tiempo utilizado en este estudio fue de 60 segundos y esto se estandarizó revisando la metodología realizada en el artículo “modelaje de estudios de estabilidad para tabletas y polvos”³⁶, donde establecen que el tiempo de exposición de los contenedores debe de ser de 60 a 90 segundos y después se cerraba el contenedor. En este estudio se realizó la misma metodología y se establecieron 60 segundos como tiempo de exposición de las tabletas de 6-mercaptopurina.

Durante la evaluación de la apariencia llamó la atención el descubrimiento de trazas incrustadas por la presión de los punzones durante la operación de tableteado.

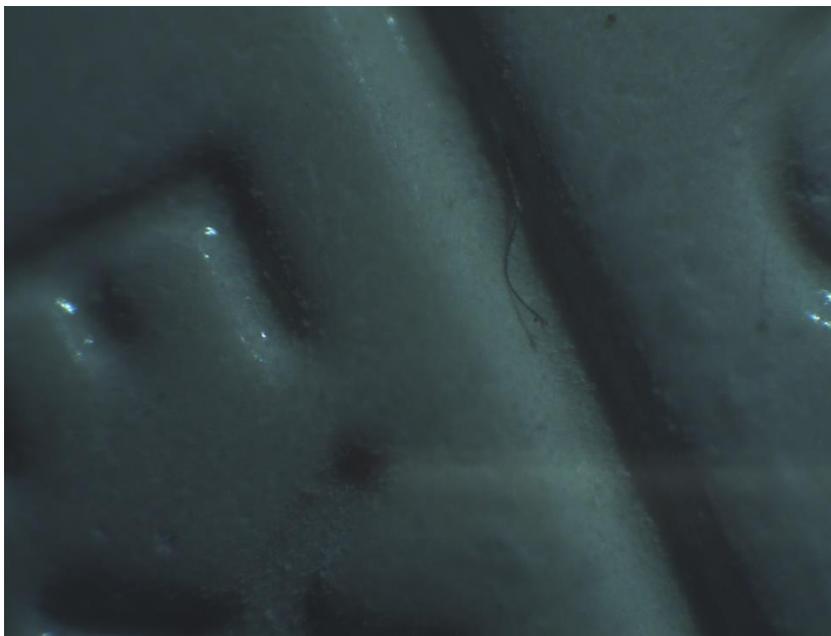


Imagen 3.8. Tableta de 6-mercaptopurina con una traza de fibra acuñada.

La imagen fue tomada durante el quinto día de análisis y se observa un pedazo de hilo. Otra consideración importante es que las tabletas al ser trituradas se quedaba gran parte del polvo triturado apelmazado en el pistilo. Esto se pudo deber a la adsorción de humedad en la superficie de las tabletas.

- **Color.**

El color no se modificó durante el estudio, desde el tiempo 0 se observó un color amarillo claro en las tabletas, este color permaneció durante todo el estudio.

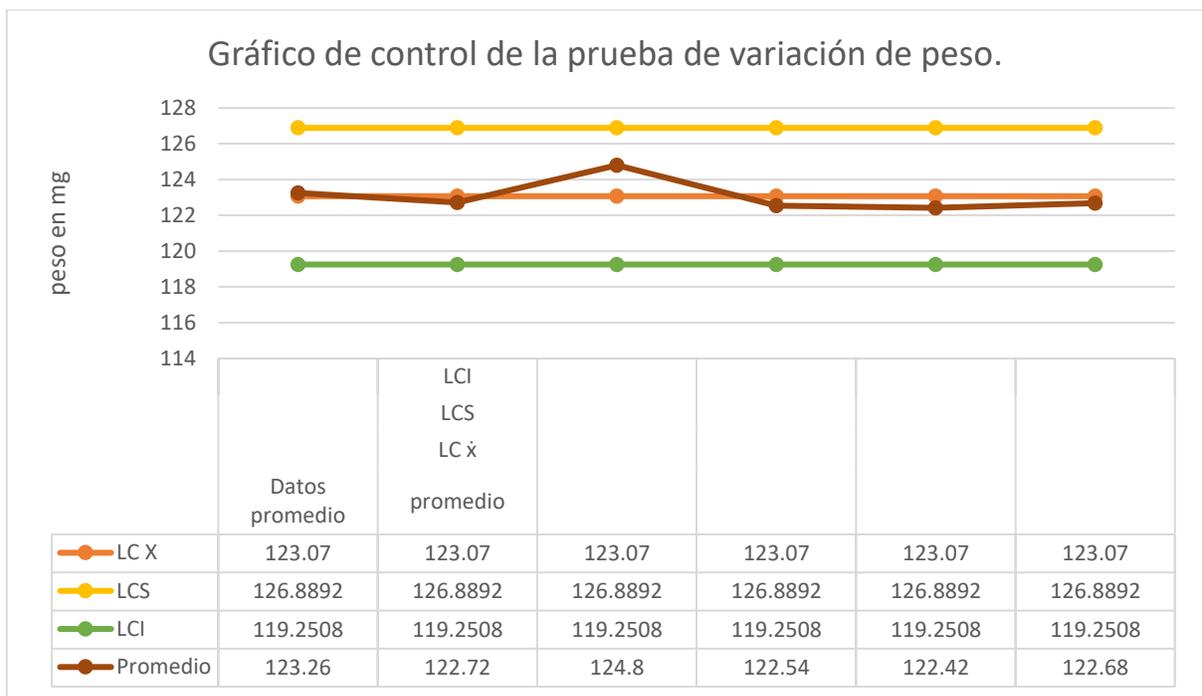
- **Variación de peso.**

El peso de las tabletas no se vió modificado conforme se realizaba el estudio. Para monitorear la variación de peso se realizaron los cálculos de coeficiente de variación.

Tabla 3.1. Resultados de la prueba de variación de peso.			
Tiempo de análisis (días).	Peso promedio de las tabletas	Desviación estándar del peso	Coficiente de variación
0	123.26	0.6504	0.5277
1	122.72	2.6443	2.1384
2	124.8	1.6062	1.2870
3	122.54	1.4927	1.2180
4	122.42	1.8158	1.4833
5	122.68	1.2030	0.9806

Como se muestra en la tabla el coeficiente de variación del primer tiempo fue de 2.1384, el valor esta por encima del valor permitido, esto se debió a que la distribución de los pesos de las tabletas estaba en un rango de 120mg a 125mg en comparación con los demas días donde las tabletas oscilaban entre 123mg y 125mg. Se descarta que el aumento del peso durante el análisis del primer tiempo de muestreo sea debido a la absorción de agua proveniente del medio ambiente debido a que no se observó el apelmazamiento de las tabletas cuando ya estaban trituradas.

Incluso el peso promedio no mostro variaciones considerables. Esto se constato con la construcción de un gráfico de control.



En el gráfico se aprecia que el peso de las tabletas esta dentro de los límites establecidos, por lo tanto no hay variaciones significativas.

- **Valoración.**

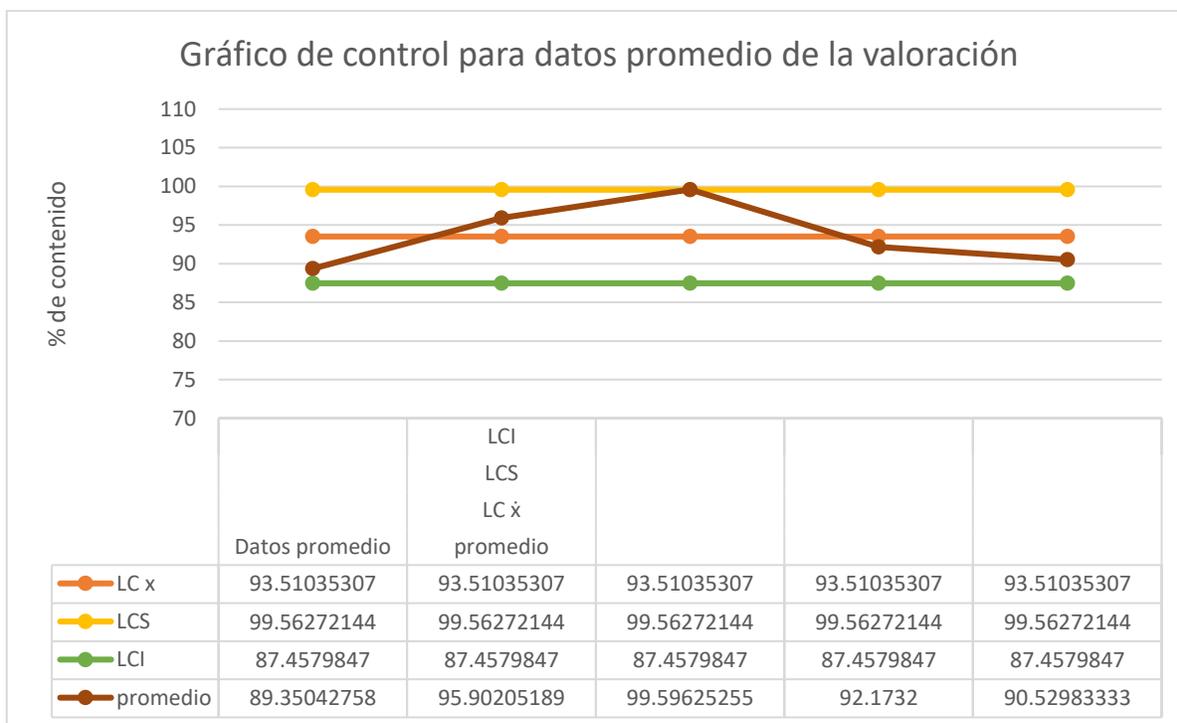
Como se muestra en la tabla 1.9, no se observa una tendencia decreciente en la concentración, se denota una tendencia creciente hasta el cuarto día de muestreo, donde se observa un decremento en el contenido, manteniéndose así hasta el último tiempo de muestreo.

Esta disminución en la concentración pudo deberse a la pesada y preparación de las muestras o a la variabilidad de contenido en las tabletas.

El valor de aceptación según la monografía de la FEUM 11ª edición la valoración debe de estar entre 93 y el 110% de contenido.

Tabla 3.2. Resultados de la valoración				
Tiempo de análisis (días).	Concentración recuperada (mg).			Porcentaje de recobro
	1	2	3	
Muestra control	49.8248	50.7025	48.8668	98.9294
0	46.9568	42.4620	44.6067	91.5881
1	52.0568	46.9512	89.6906	95.9020
2	49.8248	50.7025	48.8668	99.5925
3	43.2720	38.5997	42.1553	90.8669
4	47.5433	44.42156	43.8299	90.6598

Para determinar si las muestras estaban fuera de especificación, se construyó un gráfico de control para la validación.



Como se muestra en la tabla 3.0; las muestras del cuarto y quinto día están fuera de especificación. Podría considerarse que las muestras del cuarto y quinto día se degradaron pero el área bajo la curva de la 6-mercaptopurina no se vio modificada y no se observó la presencia de productos de degradación los cuales tienen tiempos de retención entre 4 y 7 minutos. Si existiese la presencia de productos de degradación el pico de la mercaptopurina se partiría y disminuiría.

- **Disolución.**

Los resultados obtenidos en la prueba de disolución cumplen con lo especificado, de la monografía de la FEUM 12^a edición, establece que para la prueba de disolución el valor de Q debe ser mayor al 80%.

Tabla 3.3. Resultados de la prueba de disolución				
Tiempo de análisis (días).	Porcentaje disuelto			Promedio del porcentaje disuelto
	M-1	M-2	M-3	
0	104.09526	108.3730	103.8721	105.4468
1	98.0393	95.9022	105.7433	99.8949
2	89.2062	98.9855	103.9506	97.3808

En la tabla 3.3 se muestra que los valores obtenidos durante el estudio cumplían con el criterio especificado en la monografía de la 6-mercaptopurina.

- **Identidad.**

Para la prueba de identidad, se reportaron por tiempo de análisis los coeficientes de capacidad de las muestras control con respecto a las muestras de tableta. El criterio de aceptación es que el valor del factor de capacidad no debía de modificarse en más de 0.05 unidades o en su caso que el coeficiente de variación fuera menor a 2.0%.

Tabla 3.4. Resultados de la prueba de identidad

Tiempo	Factor de capacidad				Promedio	desviación	C.V.
	muestra control	M-1	M-2	M-3			
0	1.91	1.91	1.91	1.91	1.91	0	0
1	1.90	1.91	1.90	1.91	1.91	0	0
2	1.88	1.88	1.88	1.88	1.88	0	0
3	1.72	1.74	1.73	1.73	1.73	8.16×10^{-3}	0.4720
4	1.87	1.87	1.87	1.87	1.87	0	0
5	1.87	1.88	1.88	1.88	1.8775	5×10^{-3}	0.2663

Como se muestra en los coeficientes de variación obtenidos no rebasan el valor de 2.0%, por lo tanto los picos cromatográficos de las muestras de tableta con respecto a la muestra control son la misma molécula.

8.5.1 Resumen de las pruebas realizadas durante el estudio de estabilidad en uso.

Tabla 3.5. Resumen de la pruebas realizadas en el estudio de estabilidad en uso.

Prueba	Especificación	Resultados	Dictamen
Apariencia	Tableta de color amarillo cadmio limón. Con las iniciales GX/EX2 acuñadas. Sin la presencia de partículas extrañas	Tabletas de color amarillo cadmio limón. Con las iniciales GX/EX2. Con la presencia de partículas extrañas similares a trazas de fibra.	No aceptado
Color	Tabletas de color amarillo cadmio limón	Tabletas de color amarillo limón	Aceptado
Valoración	Contiene no menos del 93.0% y no mas del 110%	Durante el estudio el promedio de la valoración fue de 93.5106% de contenido	Aceptado
Disolución	Q=80% a los 60 minutos	Q>80% a los 60 minutos	Aceptado
Variación de pesó	C.V. <2.0%	C.V.=1.2725%	Aceptado
Identidad	C.V por día de análisis debe ser <2.0%	CV _{t0} =0 CV _{t1} =0 CV _{t2} =0 CV _{t3} =0.4720 CV _{t4} =0 CV _{t5} =0.2663	Aceptado

9. Conclusiones.

Se logró demostrar que las tabletas de 6-mercaptopurina permanecen inalteradas durante el tiempo de uso debido a que no se modificaron los parámetros evaluados. Se observó que en la superficie de las tabletas había trazas de fibras acunadas, lo cual lleva a deducir que estas fibras son residuos de cepillos o fibras utilizadas durante la operación de limpieza de los equipos implicados en la fabricación de las tabletas.

También se logró desarrollar y validar un método indicativo de estabilidad el cual fue puesto a prueba analizando las muestras de hidrólisis básica, hidrólisis a pH de 2, 4, 6 ,8, oxidación y fotooxidación, muestras las cuales mostrarán diferentes huellas en la cromatografía en capa fina. Constatando que la 6-mercaptopurina se degrada en estas condiciones.

Por último se demostró que la disolución no se modifica durante el tiempo de uso de las tabletas. Este parametro es importantes debido a que si los resultados de la prueba de disolución esta fuera de especificación durante el tiempo de uso, no se garantizaría que las tabletas de 6-mercaptopurina sean seguras y eficaces.

10. Referencias bibliográficas.

1. Centro Nacional de Información Biotecnológica. Base de datos compuesta de PubChem (internet) US: resumen del compuesto CID 2724350, 6-mercaptopurina monohidratada: Librería Nacional de Medicina US, Washington D.C., 2004, [consultado el 26-de junio del 2018], disponible en <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2724350>
2. Connors KA, Amidon GL, Stella VJ, Chemical stability of pharmaceuticals, A handbook for pharmacists, 2nd edition, John Wiley and Sons Inc, Canada, 1986.
3. Weast, R.C. (ed.). Handbook of Chemistry and Physics. 60th ed. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., p. C-469. 1979.
4. Vizcaíno M, et al. Guía de atención integral para la detección oportuna, diagnóstico, tratamiento y seguimiento de leucemia linfocítica aguda en niños, niñas y adolescentes. Rev Colomb Cancerol. 2015.
5. Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, Leza JC, Moro MA, Portoles A. Velázquez, Farmacología básica y clínica. Editorial medica panamericana. Hegel, Chapultepec, CDMX, México. 18^{ed}. 2008. 996-998.
6. Formulario Nacional de Medicamentos, 6-mercaptopurina. [en línea]. 2010. [fecha de acceso 20 de junio del 2019]. Disponible en: <http://fnmedicamentos.sld.cu/index.php?P=FullRecord&ID=70>
7. Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015 (internet), Diario Oficial de la federación, publicada el 06 de junio del 2016, (Consultada el 25 de junio del 2018), disponible en: <http://www.cofepris.gob.mx/MJ/Documents/Normas/nom073.pdf>.

8. Iram F, Iram H, Iqbal A, Husain A, Forced Degradation Studies, Journal Analytical and Pharmaceutical Research, Department of Pharmaceutical Chemistry, Jamia Hamdard (Hamdard University), India, December 14th, 2016.
9. Committee for Proprietary Medicinal Products, Note for Guidance on in use stability testing of human medicinal products, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 2001.
10. Loele, G., et al., The difficulties for a photolabile drug in topical formulations: The case of diclofenac. Int J Pharmaceutics (2014).
11. Estela R. García, Stefanie Thalhauser, Héctor R. Loscertales, Pilar Modamio, Cecilia F. Lastra & Eduardo L. Mariño (2018): Current evidence in the stability of medicines in dose administration aids: implications for patient safety, Expert Opinion on Drug Delivery.
12. Bahijja RA, Garcia A, Galcera C, Barker AS and Orlu M. Investigating, the physical stability of repackaged medicine store into commercially available multicompartiment compliance aids (MCAs), Journal of Pharmaceutical Health Services Research (2017).
13. Wang, JR, et al. Improving the dissolution and bioavailability of 6-mercaptopurina via co-crystallization Bioorg. Med. Chem. Lett. (2015).
14. Trissel LA, Ashworth LD, Ashworth J, Trissel's Stability of Compounded Formulations, 4th ed., APhA Publications, EU, 2009.
15. Doerr IL, Wempen I, Clark DA, Fox JJ. Thiation of nucleosides, III, Oxidation of 6-mercaptopurine. The journal of organic chemistry, Vol 26 (9), 1961, 3401-3409.

16. Hemmens VJ, Moore DE, Photo-oxidation of 6-mercaptopurine in aqueous solution, J Chem Soc, 2006, 15, 209-11.
17. Fell FA, Neil JM, Stability indicating assay for azathioprine and 6-mercaptopurine by reversed phase high performance liquid chromatography, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1979, 691-704.
18. Hernández Abad VJ, Sánchez González EG, Vázquez Lira JC, Mora Guevara JLA, Mendoza Mara MT. Introducción a las técnicas cromatográficas instrumentales más utilizadas en el análisis farmacéutico. Impresiones Torres S.A. de C.V. Jesús Araujo N° externo. 4, N° interno. 7, Consejo Agrarista Mexicano, Ciudad de México. 2008.
19. Guía lab Perkin Elmer. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) [en línea], 2019. (citado el día 02 de junio del 2019), disponible en: <https://www.guialab.com.ar/notas-tecnicas/calorimetría-diferencial-de-barrido-dsc/>
20. Espectrometria.com, Espectrometría de infrarrojo (en línea), 2019. (citado el día 02 de junio del 2019), disponible en: https://www.espectrometria.com/espectrometra_infrarroja
21. International Council for Harmonization. Stability Testing of New Drug Substances and products (internet); US, Published in federal register, June 2018. (consultado el día 26 de junio del 2018) Disponible en: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf.
22. International Council for Harmonisation, Stability Testing: Photostability of new drug substance and products; US, Published in federal register, December 1996, (consulted in June 26 of 2018) Despoiled in:

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B_Guideline.pdf.

23. Iram F, Iram H, Iqbal A, Husain A, Forced Degradation Studies, Journal Analytical and Pharmaceutical Research, Department of Pharmaceutical Chemistry, Jamia Hamdard (Hamdard University), India, December 14th, 2016.
24. ICH Expert Working Group. Validation of analytical methods text and methodology Q2(R1) (internet). Conference on Harmonisation of Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. 2005 (citado el 30 de mayo del 2019), disponible : https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf
25. Kenneth C. Waterman, Lili Chen, Philip Waterman, Bruce C. MacDonald, Andrew P. Monahan & Garry Scrivens, Modeling of in-use stability for tablets and powders in bottles, Drug Development and Industrial Pharmacy (internet), 2016, (consulted in June 25 of 2018), despoil in: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/03639045.2016.1153648>
26. Secretaria de Salud, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 11^a ED. Comisión permanente de la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, México DF. 2014.
27. Umrethia ML, Ghosh PK, MajithiA RJ, Murthy RSR, New RP-HPLC method for the estimation of 6-mercaptopurine in rat plasma and various tissue homogenates, Journal of liquid Chromatography and Related Technologies, 2006, Vol 29-1, pp. 55-67

28. Somasekhar V. Optimization and validation of an RP-HPLC method for the estimation of 6-mercaptopurine in bulk and pharmaceutical formulations. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 50, n. 4, oct./dec., 2014.
29. Hawwa HF, Millership JS, Collier PS, McElroy JC. Development and validation of an HPLC methods for the rapid and simultaneous determination of 6-mercaptopurine and four of its metabolites in plasma, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009, Vol. 49, pp: 401-409.
30. Sahnoun Z, Serre-Debeauvais F, Lang GF, Gavend, Determination of 6-mercaptopurine and its metabolites in plasma or serum by high performance liquid chromatography, 1990, Vol. 4, N° 4, pp: 144-147.
31. Su Y, Yi Hon Y, Chu Y, Matthijs, EC, Poll V, Relling MV, Assay of 6-mercaptopurine and its metabolites in patient plasma by high-performance liquid chromatography with diode-array detection, 1999, Vol. 732, N° 2, pp: 459-468.
32. Nakamachi H., Wada Y., Aoki I., Kodama Y., Kuroda K., Effect of minor component on thermal transformation of crystalline 6-mercaptopurine. Chem. Pharm. Bull., Vol 29, N°10, 1981.
33. Ling Ding T, Benet LZ, Determination of 6-mercaptopurine and azathioprine in plasma by high-performance liquid chromatography, Journal of Chromatography, 1979, Vol. 163, pp: 281-288.
34. Bariyanga J., Luyt AS., Synthesis Fourier Transform infrared, nuclear magnetic resonance and thermal analysis of sodium and platinum complexes of 6-mercaptopurine., Journal of molecular structure, 2000, 49-54.

35. Nakamachi H, Wada Y, Aoki I, Kodama Y, Kuroda K. Effect minor component on thermal transformation of crystalline 6-mercaptopurine. Chem Pharm Bull. Vol 29. 1981. 2956-2965.
36. Hipoxantina (Internet). Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. 2019 (citado el 21 de agosto del 2019). Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135398638#section=Physical-Description>
37. Xantina (internet). Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. 2019 (citado el 21 de agosto del 2019). Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1188#section=Computed-Properties>
38. Pretsch E, Bühlmann P, Badertscher M, IR spectroscopy compounds, Structure Determination of organic compounds tables of spectral data, 4th Edition. 2009. 269-335.
39. Excelled GM, Summary of product characteristics of mercaptopurine, Feucht-Germany, 2015. N°559, 2001, 49-54.
40. Spectral Database for organic compounds (ethernet): SDBS N° 4199, espectro infrarrojo del 6-purinetiol (consultado el 6 de agosto del 2019), disponible en: https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi
41. Spectral Database for organic compounds (internet): SDBS N° 1080, espectro infrarrojo la hipoxantina (consultado el 6 de agosto del 2019), disponible en: https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi

42. Spectral Database for organic compounds (ethernet): SDBS N° 1081, espectro infrarrojo de la Xantina (consultado el 6 de agosto del 2019), disponible en: https://sdfs.db.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi

Anexo A.

Imágenes de las cromatografías en capa fina.

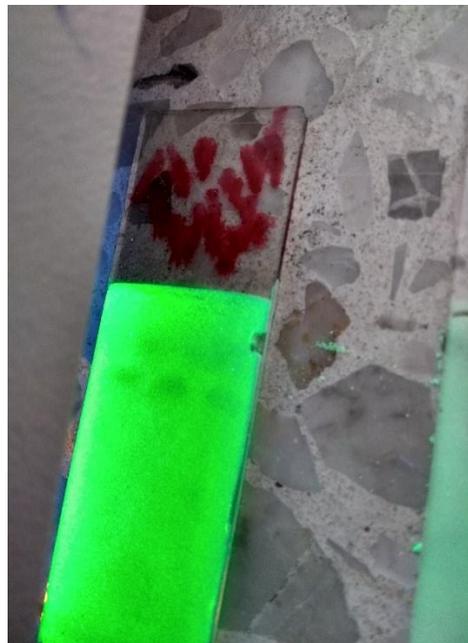
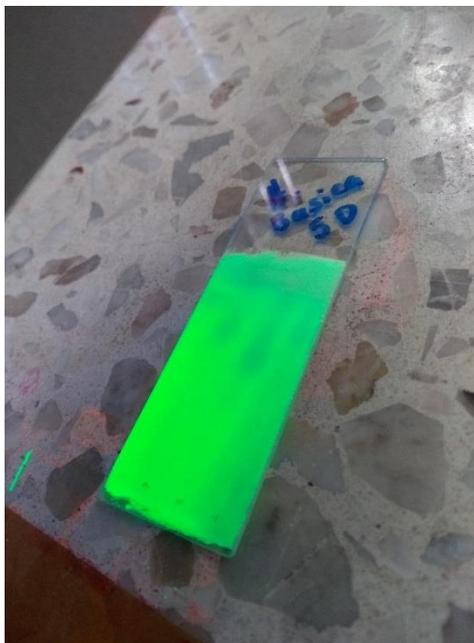


Imagen 3.9 y 4.0. Cromatoplas de las muestras de hidrólisis básica y oxidación.

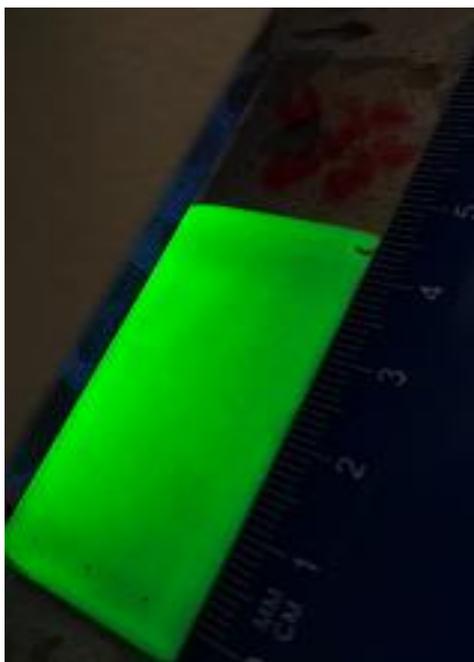


Imagen 4.1 y 4.2. Cromatoplas de las muestras de hidrólisis ácida e hidrólisis a pH 2.0.

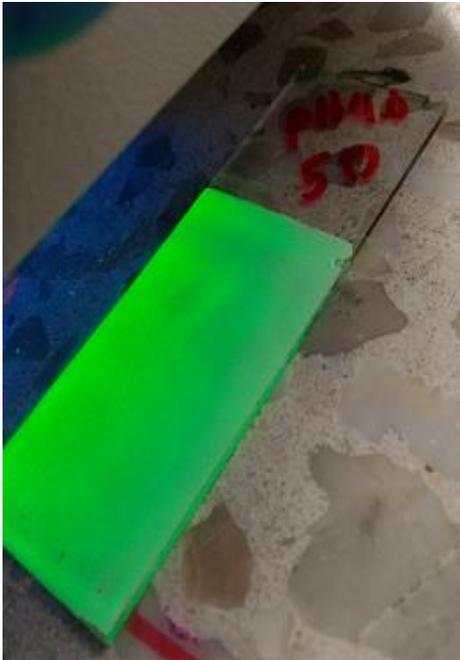


Imagen 4.3 y 4.4. Cromatoplasmas de las muestras de hidrólisis a pH 4.0 y 6.0.



Imagen 4.5 y 4.6. Cromatoplasmas hidrólisis a pH 8.0 y fotoxidación luz UV.

Anexo B.

Imágenes de los cristales precipitados.

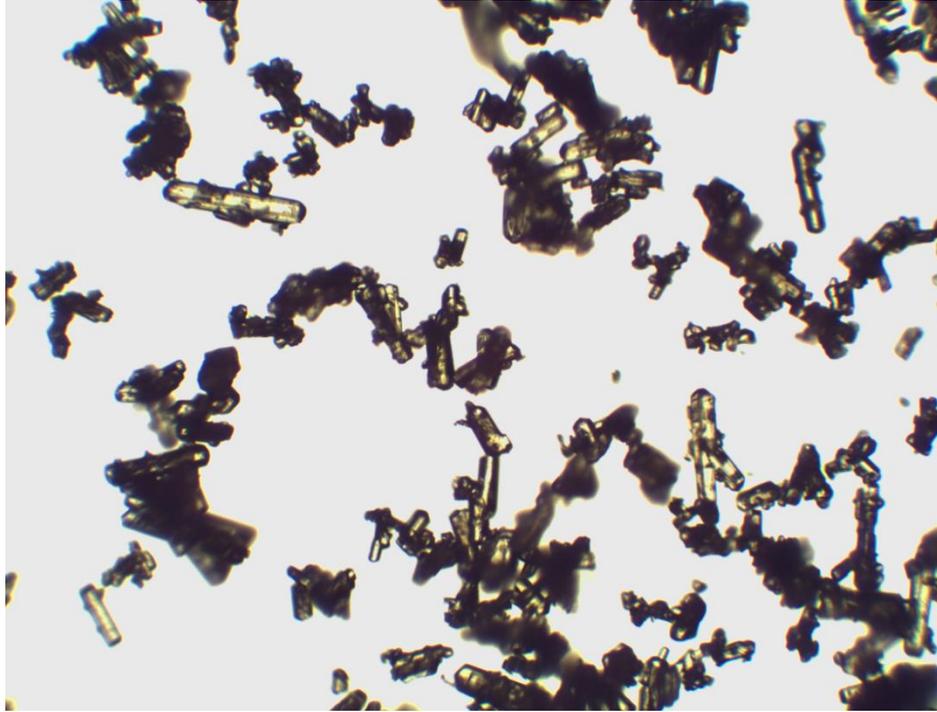


Imagen 4.7. Cristales de estándar de 6-mercaptopurina (muestra control).

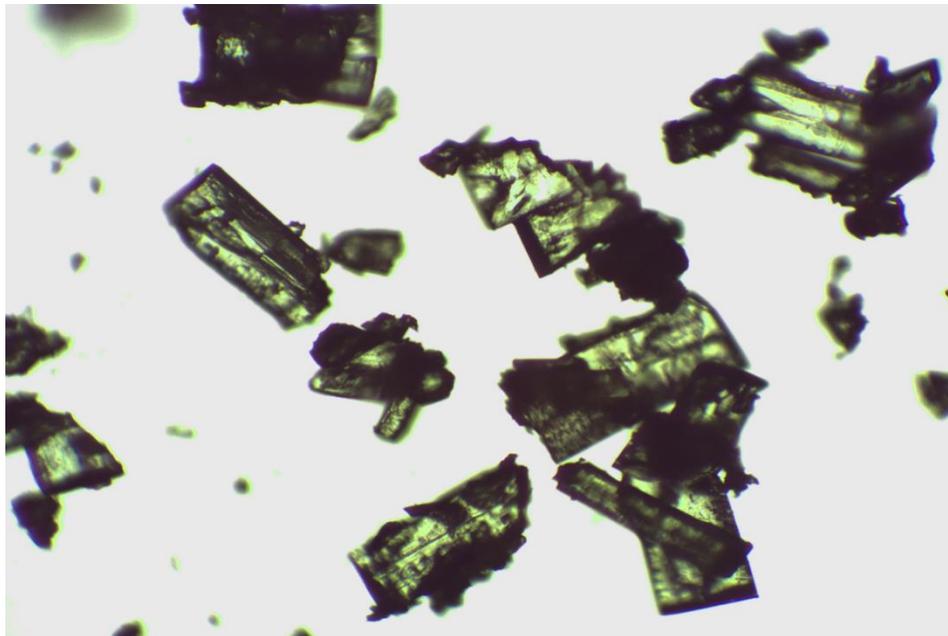


Imagen 4. 8.. Cristales obtenidos en la hidrólisis a pH 2.0.

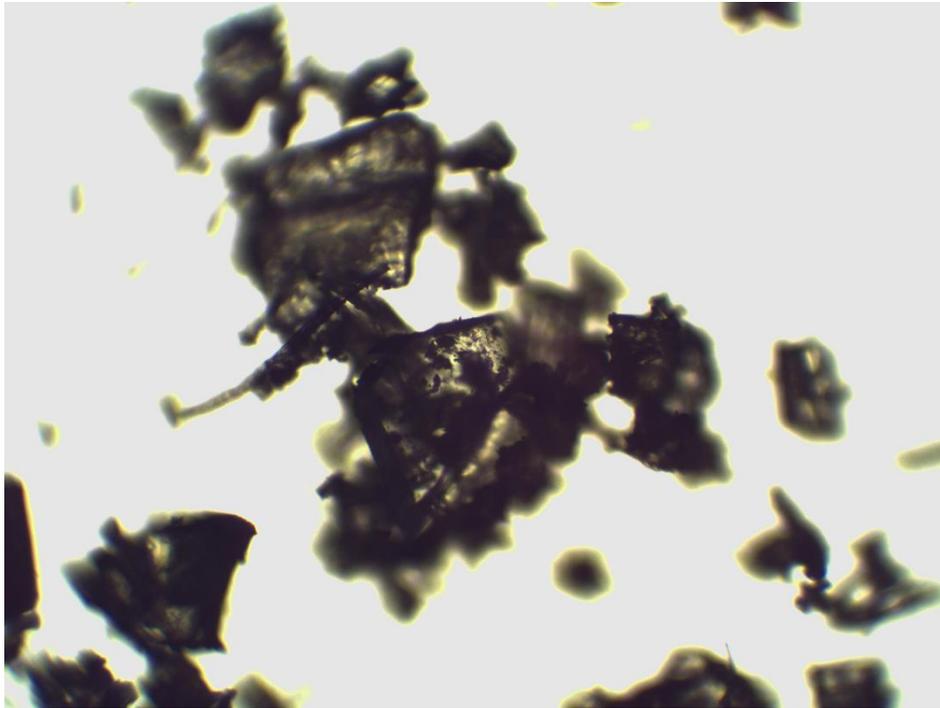


Imagen 4.9. Cristales obtenidos en la hidrólisis a pH 4.0.

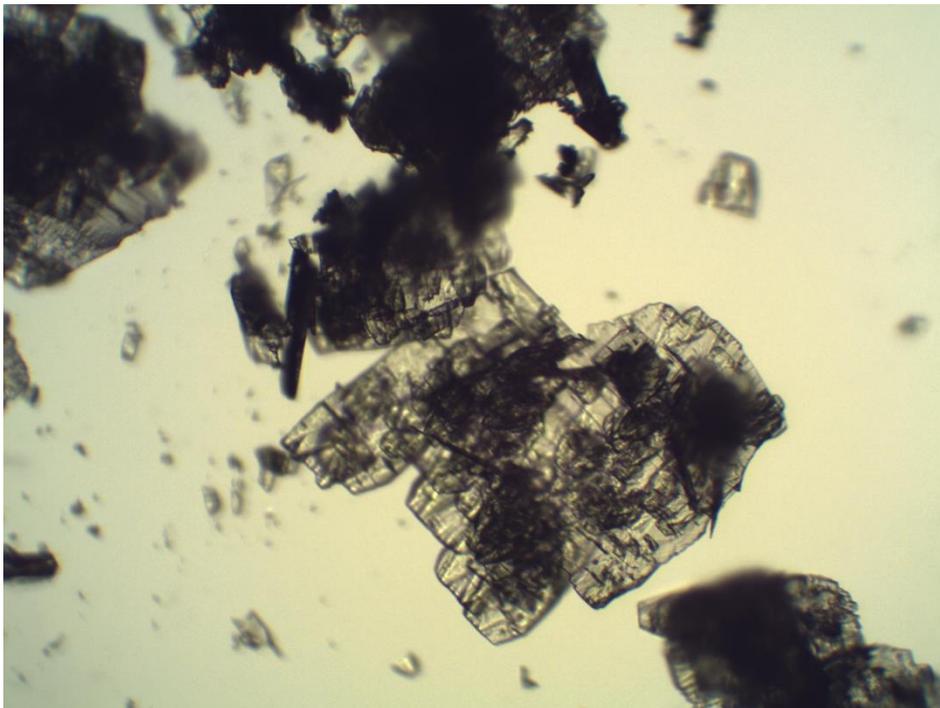


Imagen 5.0. Cristales obtenidos en la hidrólisis a pH 6.0.

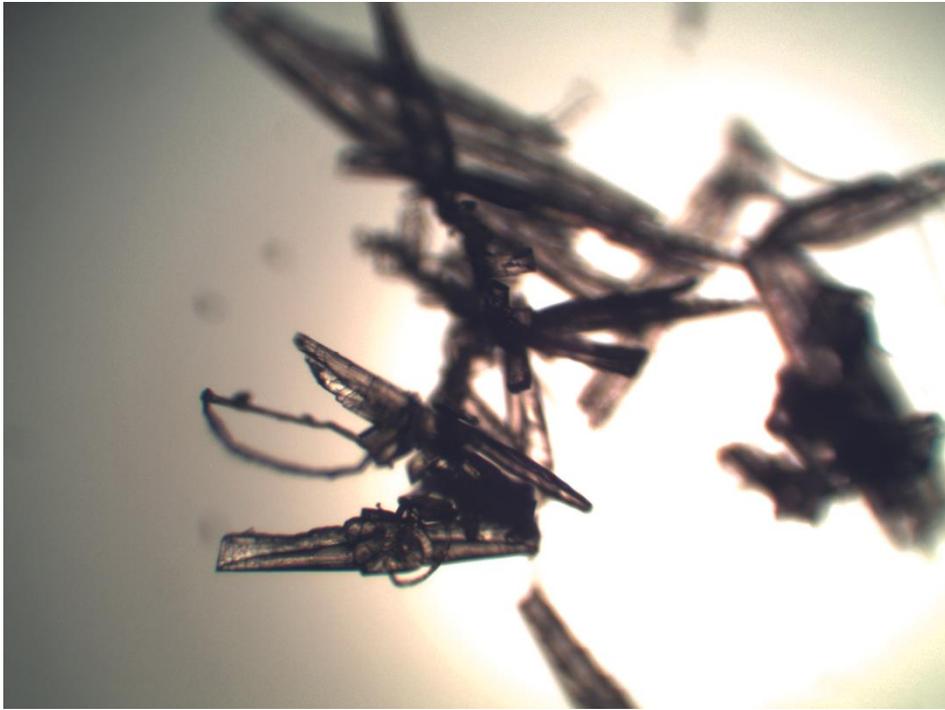


Imagen 5.1. Cristales obtenidos en la hidrólisis a pH 8.0.

Anexo C.

Termograma de los cristales obtenidos en la hidrolisis a pH 4.0, 6.0 y 8.0.

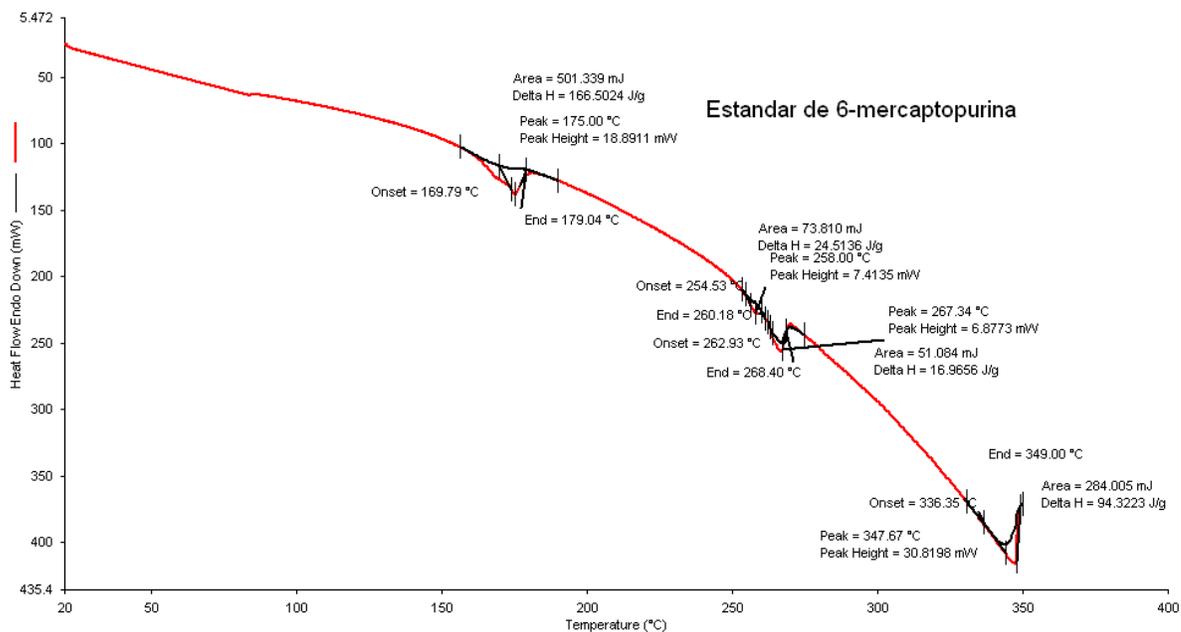


Imagen 5.2. Termograma de la muestra control analizado.

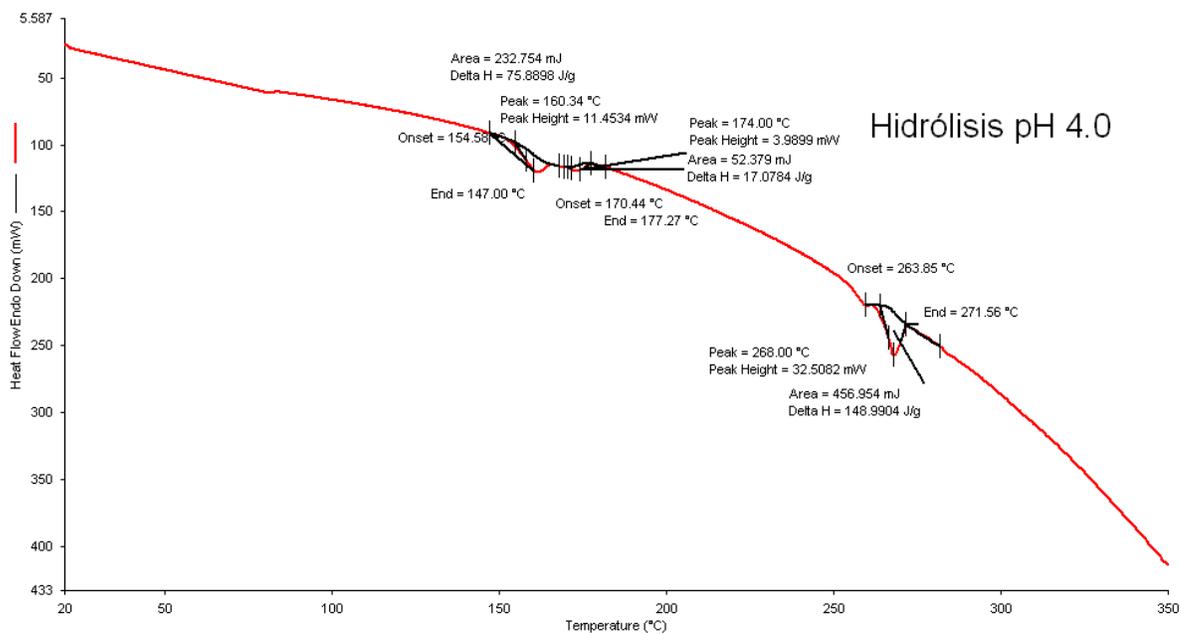


Imagen 5.3. Termograma de las muestra de los cristales obtenidos a pH 4.0 analizado.

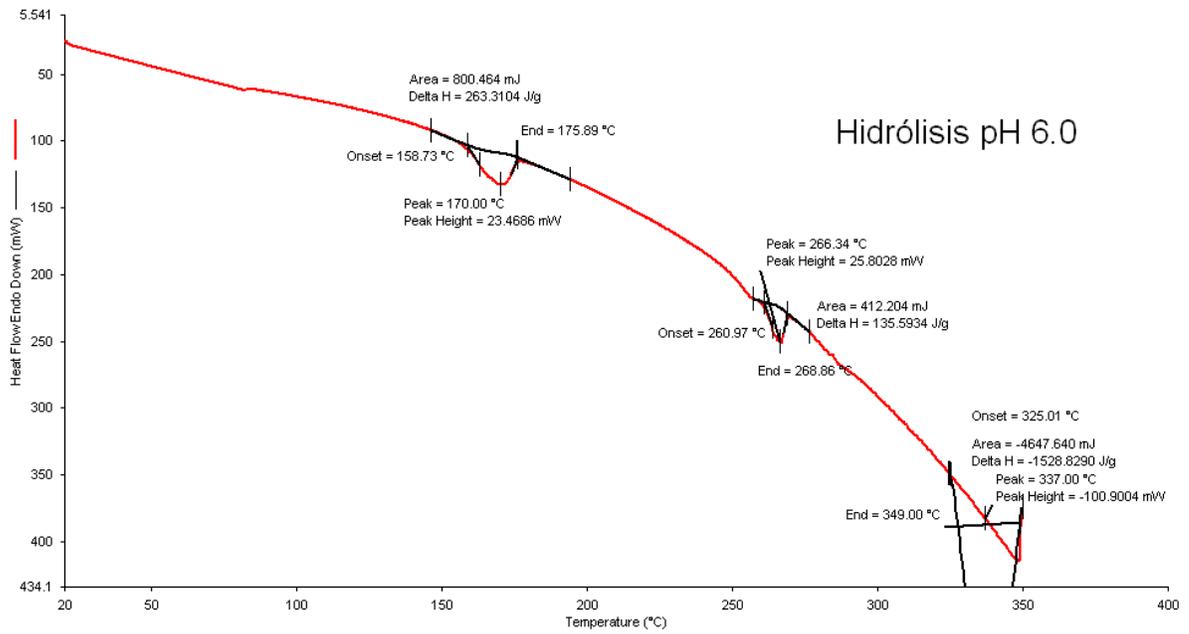


Imagen 5.4. Termograma de la muestra de los cristales obtenidos a pH 6.0 analizado.

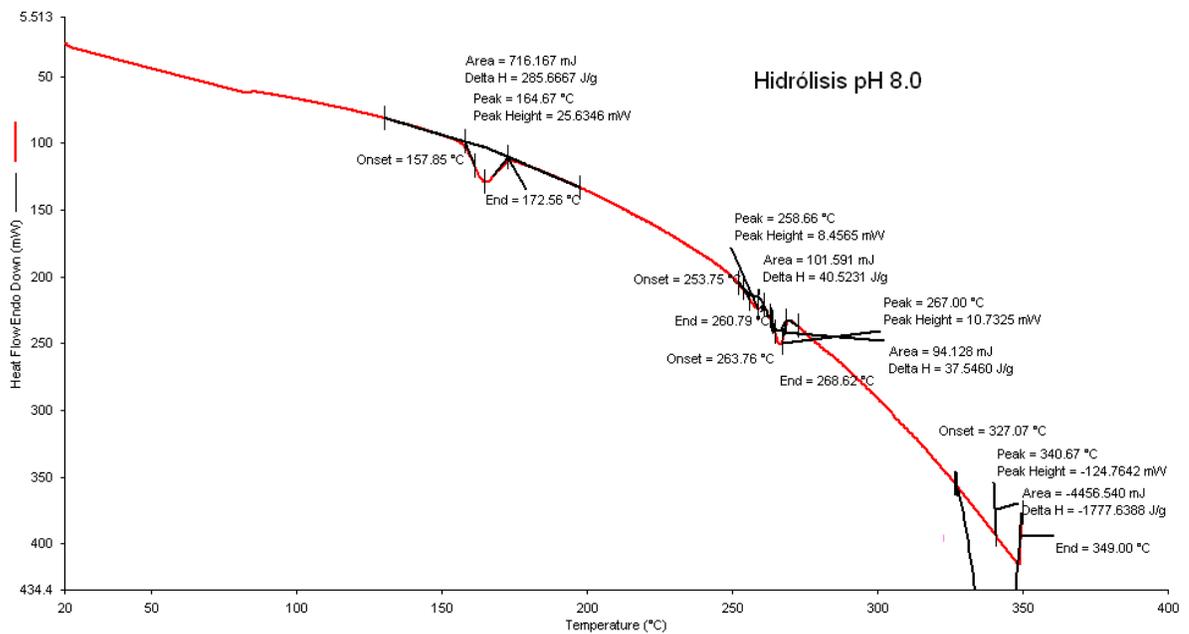


Imagen 5.5. Termograma de la muestra de los cristales obtenidos a pH 8.0 analizado

Anexo D.

Espectros IR de las muestras de degradación de la 6-mercaptopurina.

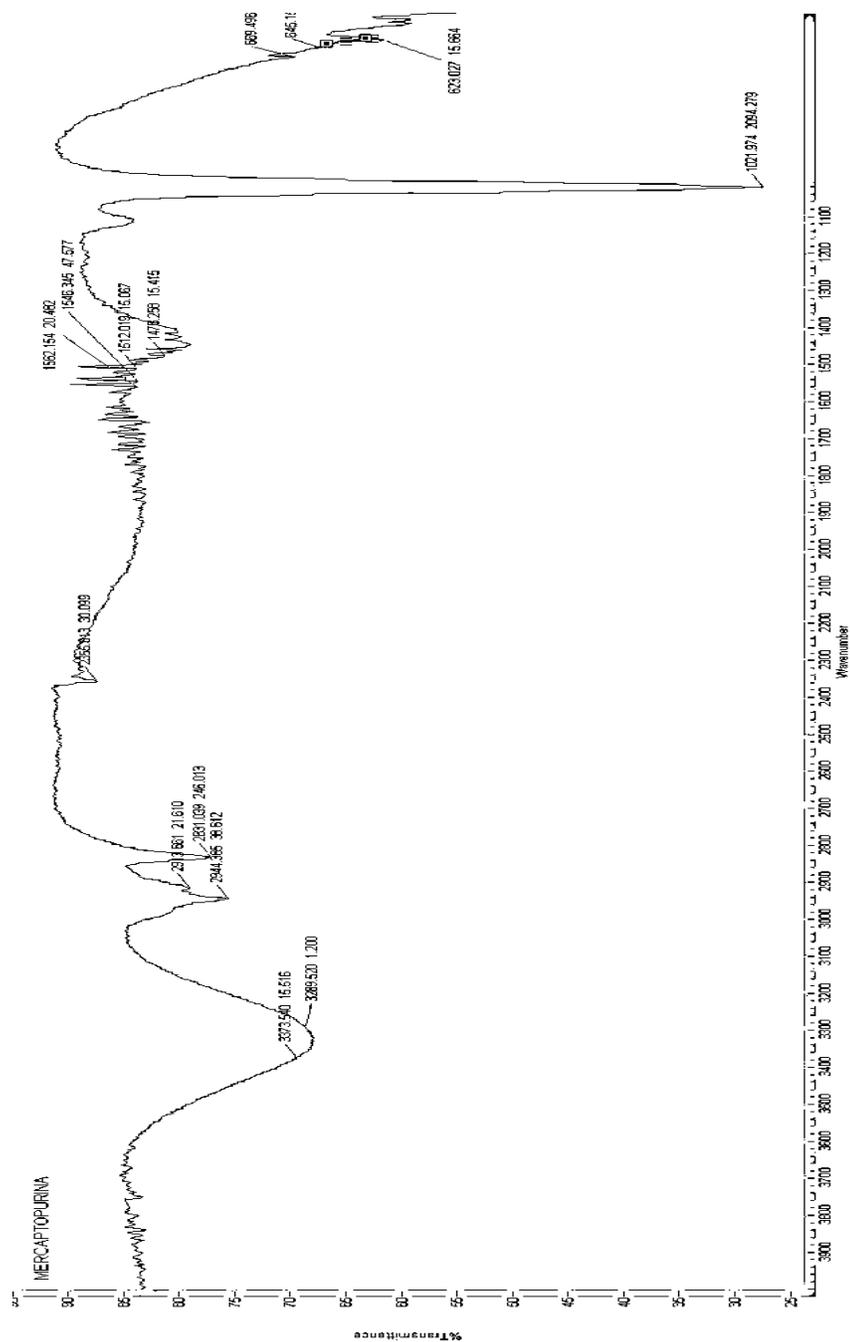


Imagen 5.6. Espectro infrarrojo de la muestra control (estándar de 6-mercaptapurina).

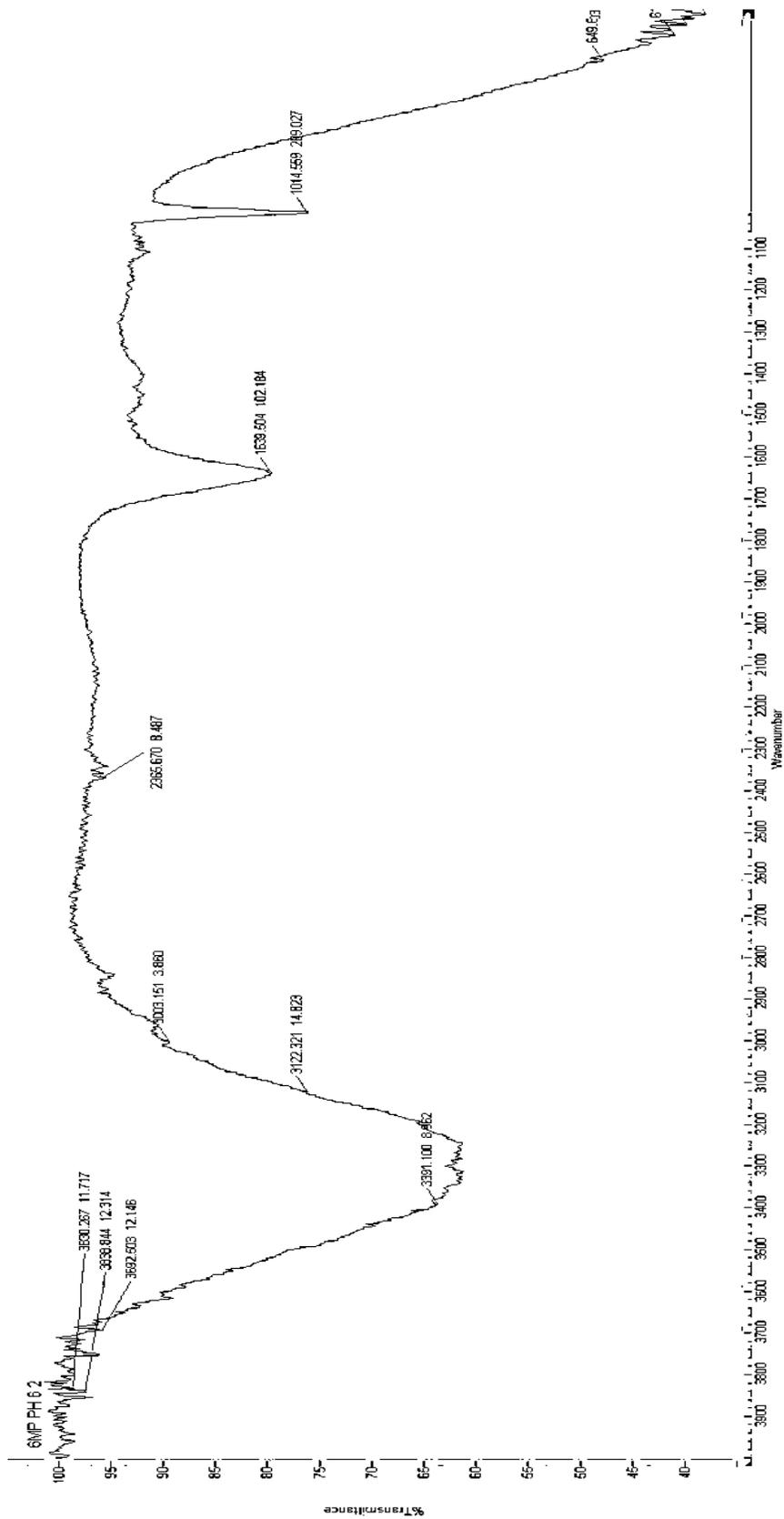


Imagen 5.8. Espectro infrarrojo de la muestra de la hidrólisis a pH 6.0.

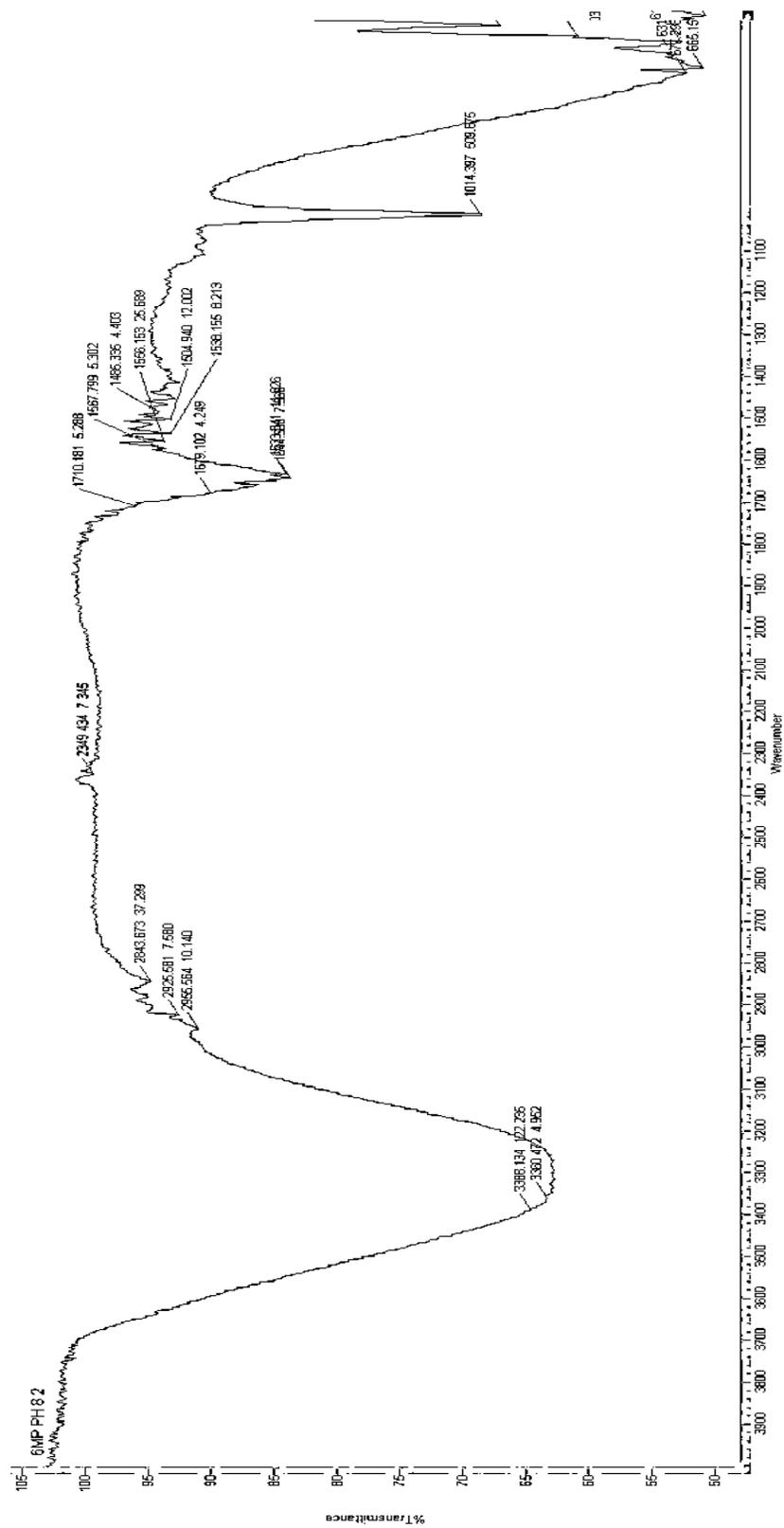


Imagen 5.9. Espectro infrarrojo de la muestra de la hidrólisis a pH 8.0

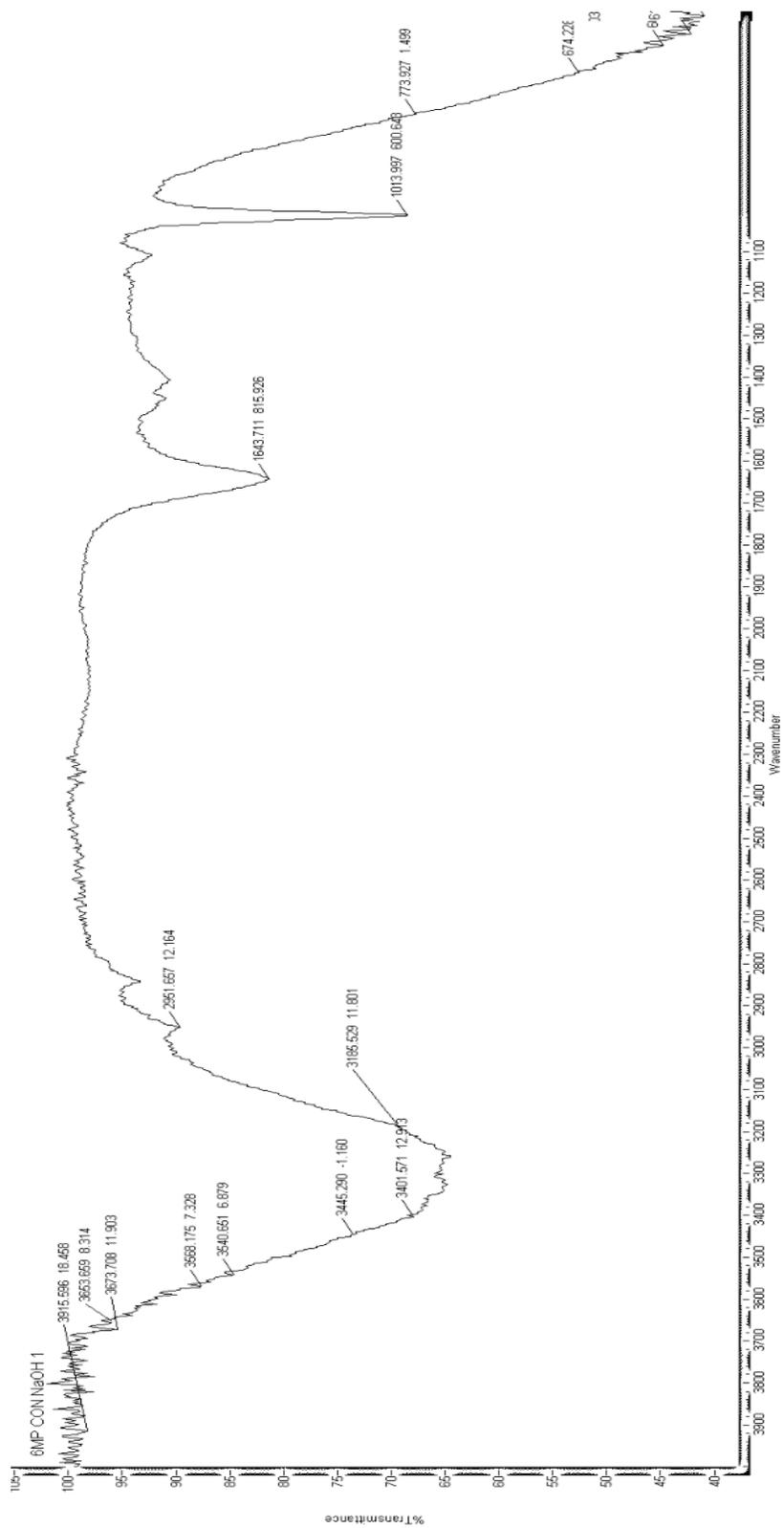


Imagen 6.0. Espectro infrarrojo de la muestra de hidrólisis básica

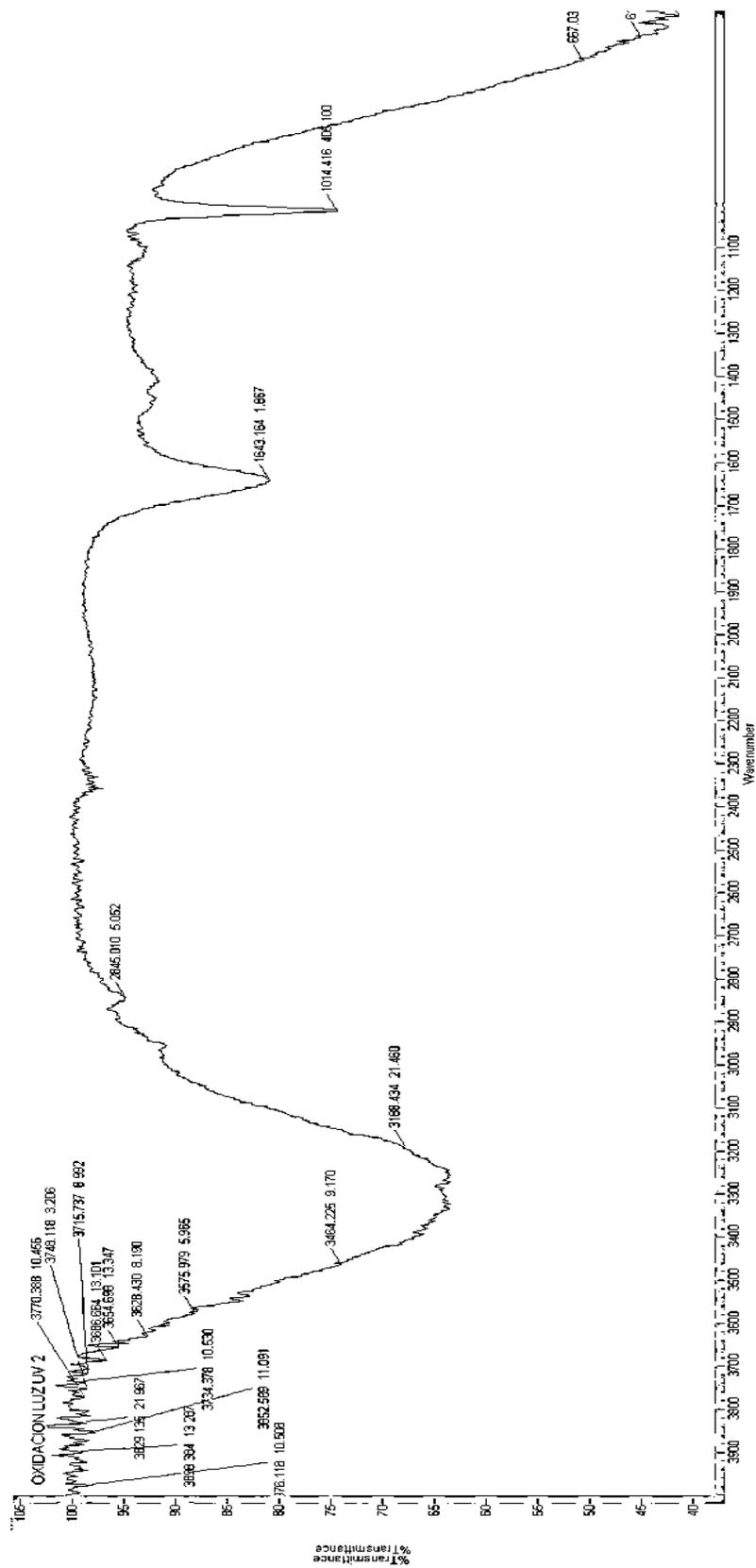


Imagen 6.2. Espectro infrarrojo de la muestra de la fotooxidación con luz ultravioleta.

Anexo F.

Cromatogramas de las muestras de oxidación y fotooxidación en luz

Ultravioleta.

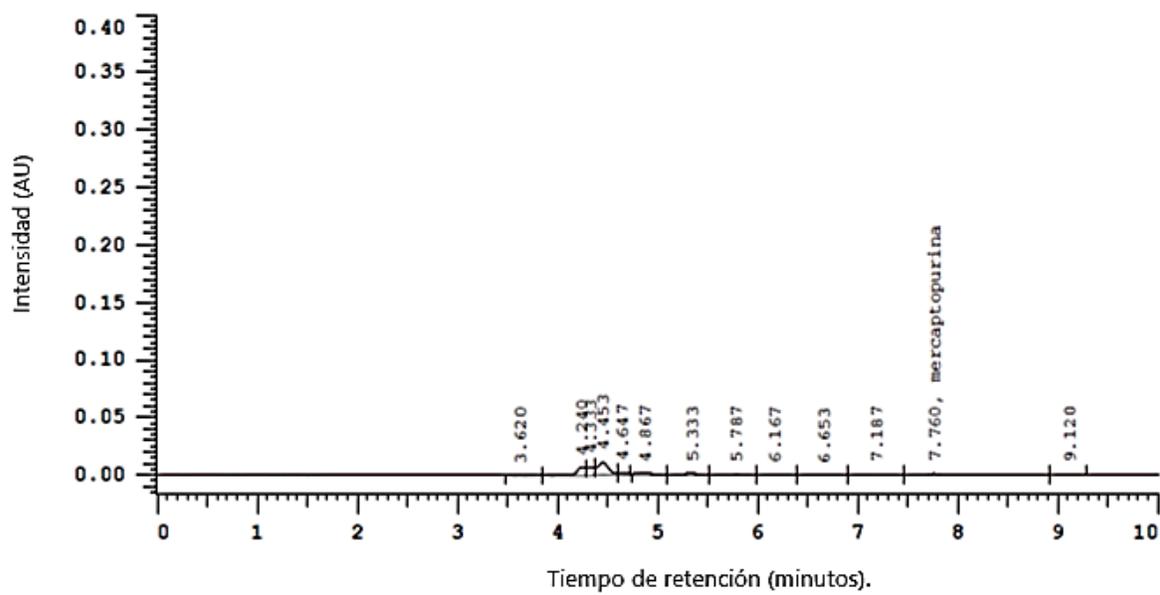


Imagen 6.3. Cromatograma de la muestra de la condición de oxidación a 295nm.

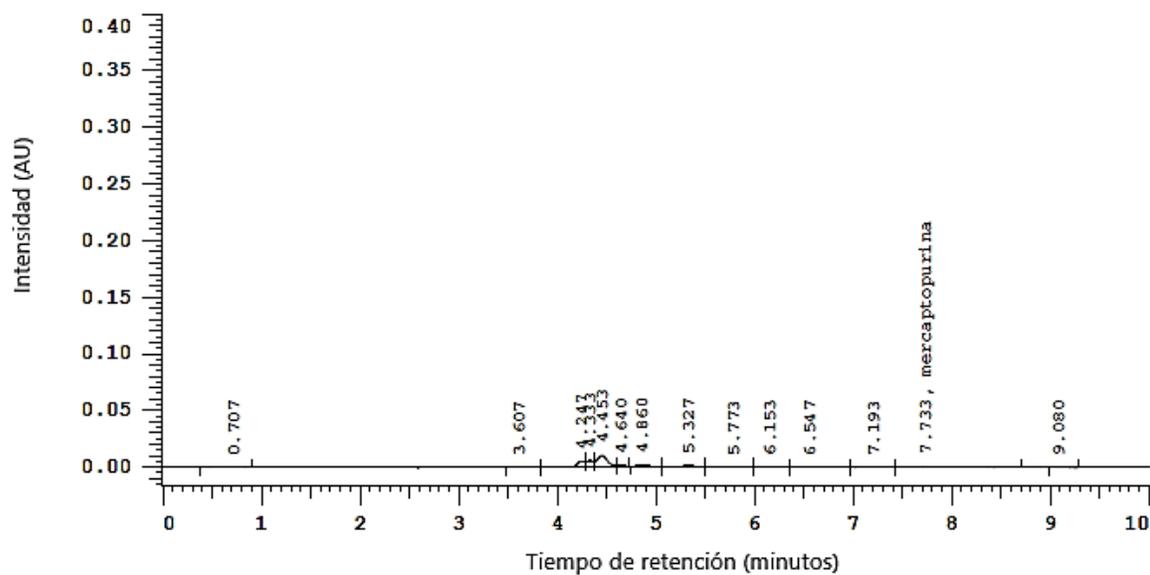


Imagen 6.4. Cromatograma de la muestra de la condición de fotooxidación a 295nm.

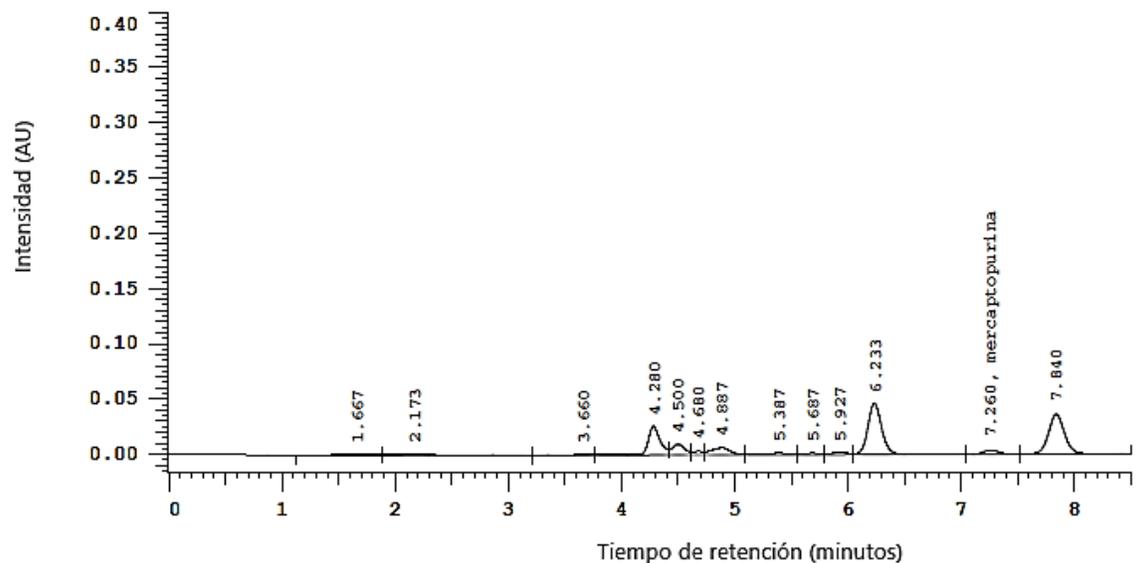


Imagen 6.5. Cromatograma de la muestra de la condición de fotooxidación a 275nm.

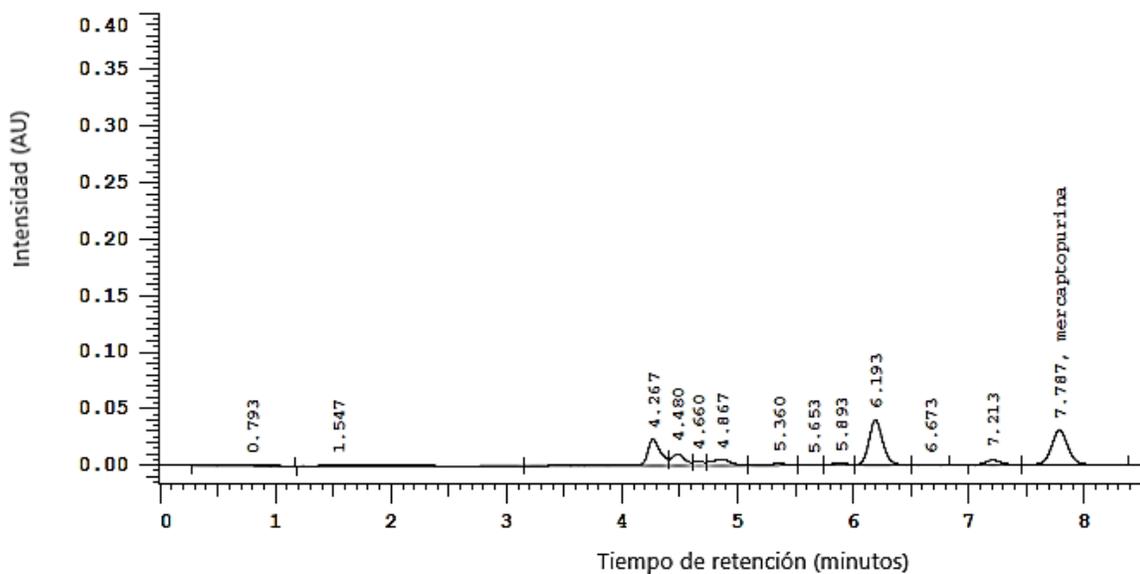


Imagen 6.6. Cromatograma de la muestra de la condición de oxidación a 275nm.

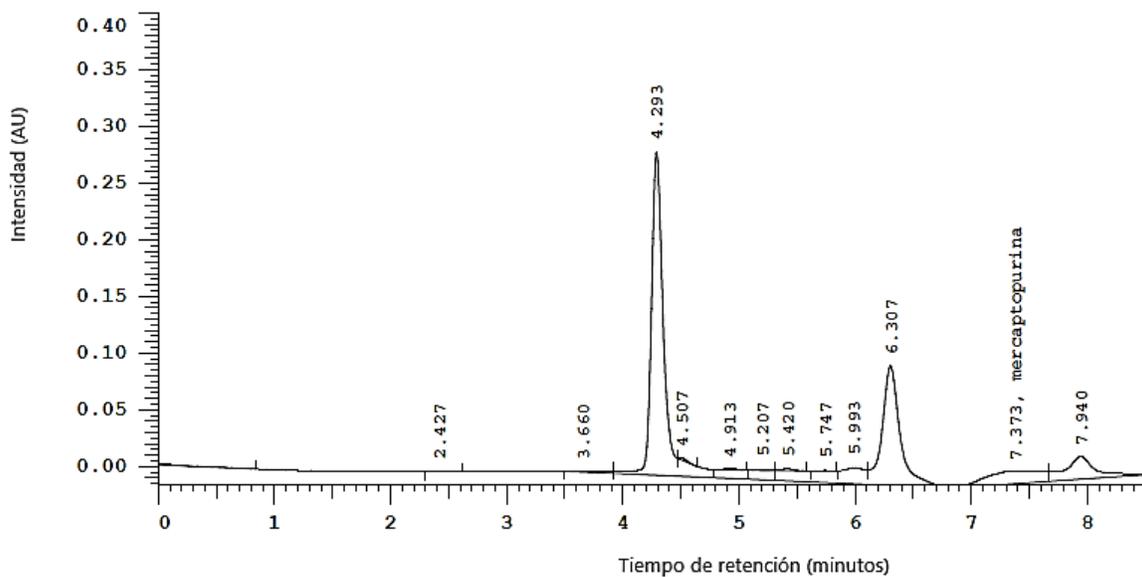


Imagen 6.7. Cromatograma de la muestra de la condición de Fotooxidación a 230nm.

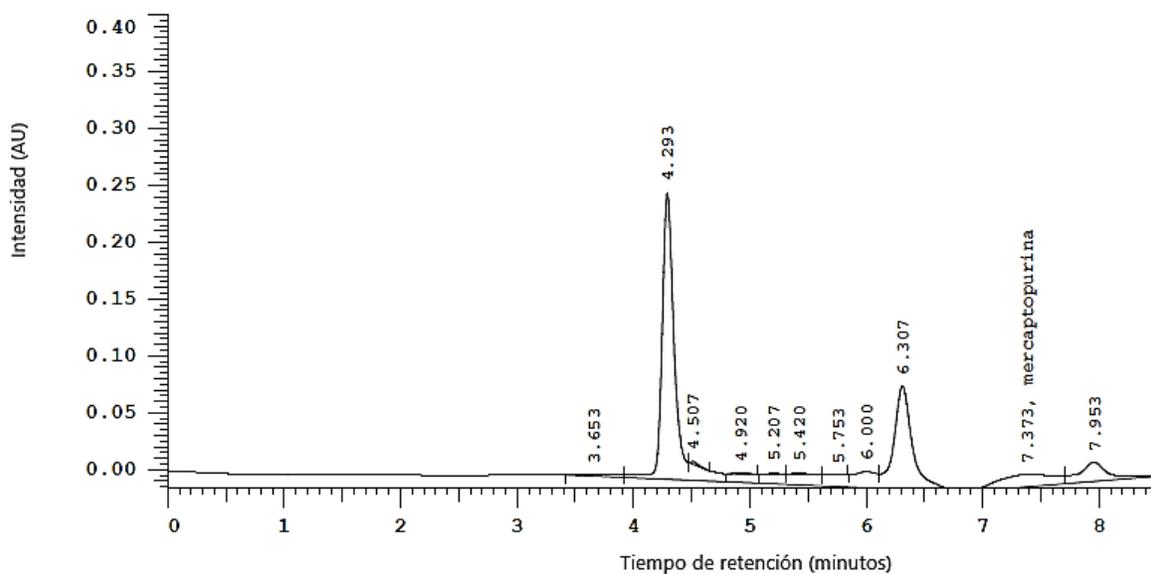


Imagen 6.8. Cromatograma de la muestra de la condición de oxidación a 230nm.

