

Caracterización fisicoquímica de algunas ampicilinas del mercado nacional

Luz Stella Ospina de Nigrinis¹
María Teresa Reguero¹
Francisco J. Alvarez P¹
Luis Enrique Aya R.¹

RESUMEN

Se realizó la caracterización fisicoquímica de ampicilina, materia prima como aporte a la elaboración de la monografía general de este fármaco sintetizado en el país.

Se efectuó la evaluación de cinco muestras de ampicilina y se determinaron los parámetros espectroscópicos del fármaco. Además se determinaron los contaminantes de esta materia prima teniendo en cuenta el método de obtención utilizado en Colombia.

Las muestras de ampicilina analizadas concuerdan con la mayoría de los requerimientos expresados en las Farmacopeas oficiales en Colombia, pero la rotación óptica específica, para la muestra 2 y el tamaño de partícula que determina la clasificación de las muestras 2, 3 y 4 no cumplen con los requerimientos.

SUMMARY

As a contribution to the general monography of ampiciline, physicochemical characterization of five ampicilline samples (row material), synthesized in this country, was made.

Evaluation of the samples, as well as, spectroscopic parameters were determined. In addition, determination of the contaminants present, according to the synthetic method used in Colombia, was made.

Ampicilline samples analyzed, are in agreement with most of the requeriments expressed in the official Pharmacopoeias

in Colombia, but specific optical rotation for sample 2 and particle size, that classifies samples 2, 3 and 4 as dust, disagrees with these requeriments.

INTRODUCCION

Las propiedades fisicoquímicas de los fármacos y los posibles contaminantes presentes derivados del método de obtención, influyen de manera notable en la tecnología de elaboración del sistema de entrega del fármaco que lo contiene, y por ende también en su biodisponibilidad.

Un desconocimiento de estas propiedades fisicoquímicas trae como consecuencia fallas en la tecnología de fabricación y por consiguiente toda una serie de problemas posteriores en el medicamento.

En razón a los problemas de estabilidad presentados por los medicamentos en donde su principio activo es ampicilina de fabricación nacional, el presente trabajo se propone contribuir al control de calidad del fármaco y a la elaboración de su monografía general por intermedio de una caracterización fisicoquímica del mismo, evitando así problemas e inconvenientes en la elaboración de esta serie de medicamentos.

En la caracterización fisicoquímica de una materia prima es indispensable la realización de toda una serie de ensayos que permitan establecer las características del fármaco y someterlas a evaluación con los parámetros establecidos en las Farmacopeas Oficiales en el país.

Para lograr lo anterior debe hacerse un análisis previo de las diferentes metodologías informadas en la literatura con el fin de seleccionar las más adecuadas al objetivo del presente estudio, teniendo principalmente en cuenta parámetros tales como sensibilidad del método, sencillez en su realización, accesibilidad de reactivos, empleo de equipos no muy sofisticados, poco costosos, de ejecución rápida y que impliquen gastos mínimos de patrones y muestras.

Las consideraciones anteriores son de gran importancia para el caso de la ampicilina dado el uso popular tan extendido

¹ Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. A. A. 14490. Santafé de Bogotá, D. C.

en nuestro medio de este fármaco, en el tratamiento terapéutico de las infecciones, ocasionadas por bacterias Gram (-) y algunas Gram (+).

En este trabajo se realizó un estudio fisicoquímico comparativo de 4 clases de ampicilina del mercado nacional con un patrón de referencia y se propone la monografía general de este fármaco de acuerdo a la ruta de obtención utilizada en el país.

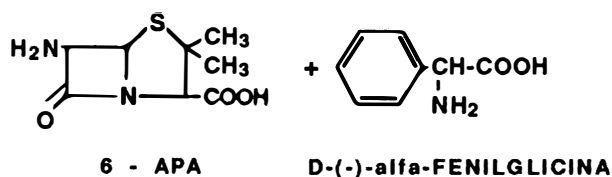
La ampicilina se obtiene biotecnológicamente a través de procesos de fermentación con microorganismos, se utilizan varias especies de *Pseudomonas Kluvera Psitrophila*, *Rhodopseudomonas spheroides* o *Micrococcus ureae*. (1, 2, 3, 4).

Se emplean como precursores el ácido 6-APA y la alfa-fenilglicina, (5) vía acilación enzimática del 6-APA. (6,7). Ver Figura 1.

Químicamente es sintetizada por condensación de 6-APA con la alfa-fenilglicina protegida; se usan gran variedad de grupos para proteger la amina primaria reactiva (8). Ver Figura 2. La ampicilina es regenerada por la remoción de los grupos protectores.

También puede ser obtenida por tratamiento de 6-APA con bromuro de alfa-bromofenilacetilo (9), vía azidopenicilina e hidrogenación catalítica. (10 a 16). Ver Figura 3.

Existen informaciones en la literatura en los cuales la ampicilina se prepara por tratamiento del alfabromobencilpenicilina con hexametilentetramina (17,18). Ver Figura 4.



Incubación de microorganismos
Vía Acilación Enzimática del 6-APA

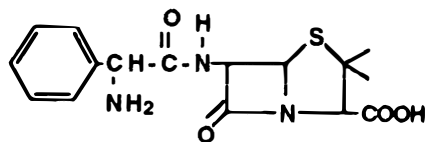


FIGURA 1

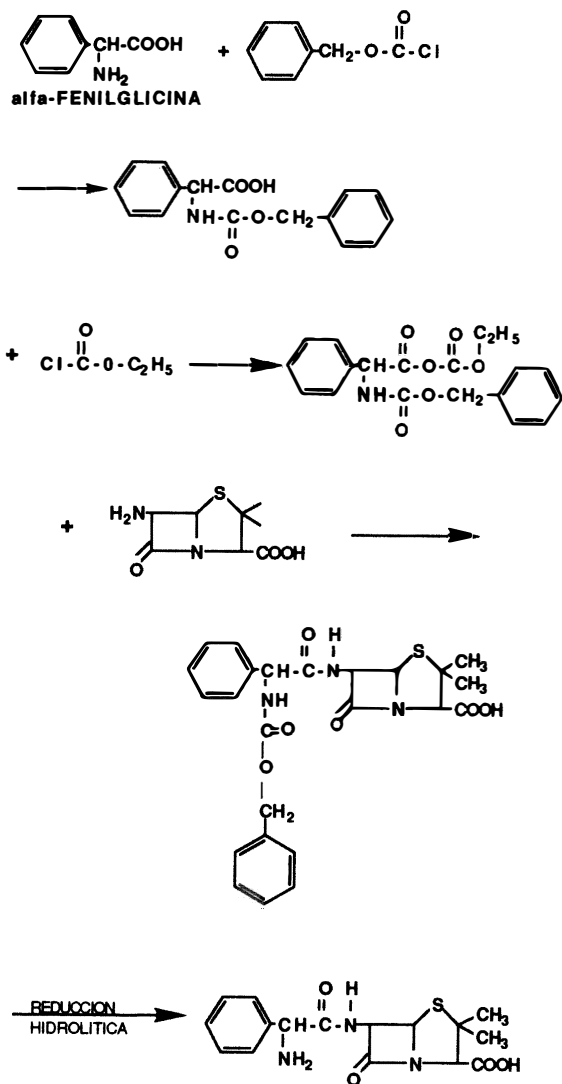


FIGURA 2

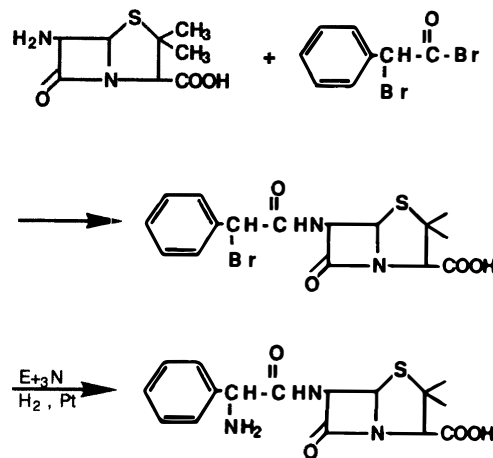


FIGURA 3

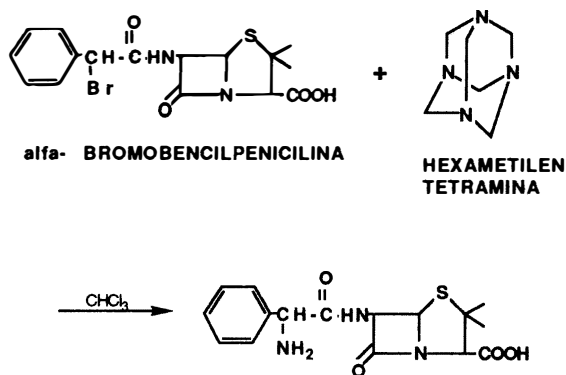
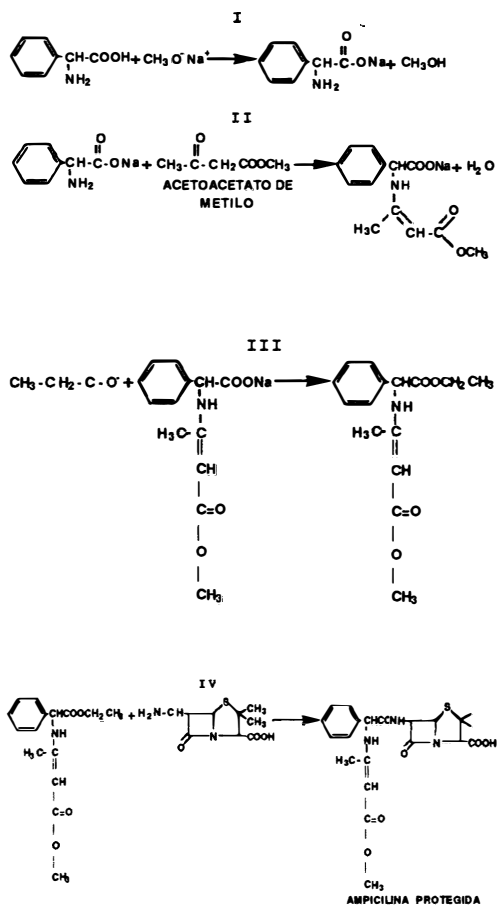
**FIGURA 4**

FIGURA 5

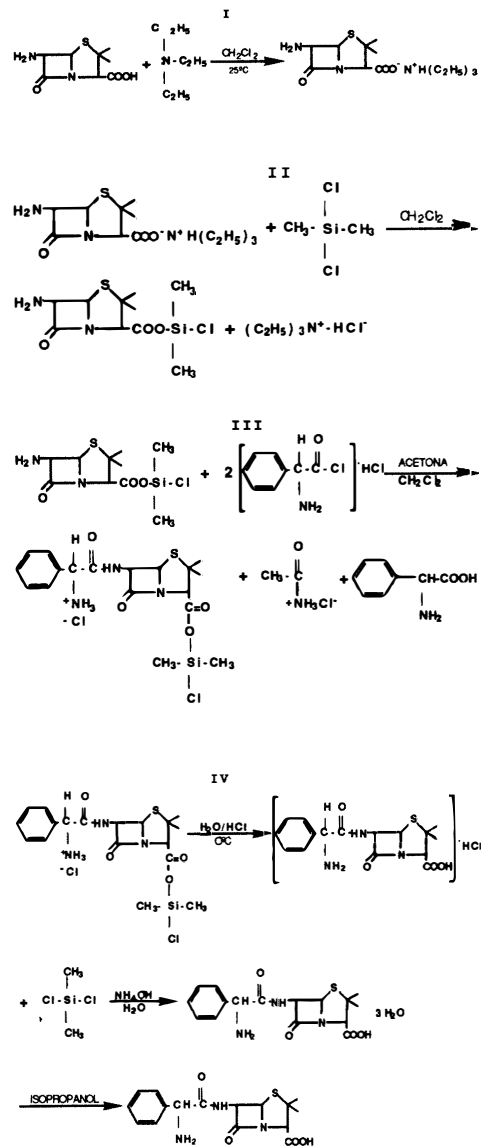


FIGURA 6

Otra forma de producir ampicilina es vía N(alfa-carboxibencil)- β -aminocrotonato de metilo con protección de la fenilglicina (8). Ver Figura 5.

La ruta de obtención de la ampicilina a nivel nacional y con base en la cual se propone la monografía general para esta materia prima se ilustra en la Figura 6.

Si se comparan las rutas de obtención a nivel mundial (Figuras 1 a 5) con la ruta que se sigue a nivel nacional (Figura 6) se nota en general la protección de la alfa-fenilglicina y la posterior condensación con el 6-APA mientras que en el país se protege el grupo carboxilo del 6-APA y luego se condensa con el clorhidrato de cloruro de alfa-fenilglicina.

Es importante anotar que dependiendo de la ruta que se emplee para la obtención de la ampicilina la calidad biofarmacéutica se verá afectada por los residuales que pudieran encontrarse en la materia prima.

Es importante anotar que el cloruro de metileno, la acetona y el isopropanol no se exigen como control de residuos en ninguna de las farmacopeas oficiales en el país, y en la ruta de obtención a nivel nacional se utilizan en gran medida por lo que podrían estar presentes en la materia prima por lo cual se deben incluir los ensayos correspondientes en la monografía.

Como un marco de referencia para poder proponer la monografía para este fármaco producido en el país se resumen en la tabla anterior las exigencias que tienen las farmacopeas para esta materia prima. Ver Tabla No. 1A.

Los límites para residuales del fármaco que pudieran estar presentes se fijan teniendo en cuenta los criterios de toxicidad expresados en (19) para cada sustancia contaminante.

Con base en todas las consideraciones anteriores se propone la siguiente monografía para la ampicilina sintetizada en el país:

- Nombre del compuesto
- Fórmula estructural
- Fórmula condensada y peso molecular
- Nombres comerciales en el país
- Aspecto físico y tamaño de partícula
- Punto de fusión
- Rotación específica

- pH
- Pérdida por secado
- Identificación
- Solubilidad
- Humedad
- Cristalinidad
- Metales pesados
- Cenizas sulfatadas
- Cloruros
- Claridad de la solución
- Cloruro de metileno
- Acetona
- Isopropanol
- Dimetilanilina
- Valoración Yodométrica
- Valoración espectrofotométrica
- Valoración biológica
- Pruebas de seguridad

Es importante anotar que la valoración biológica y las pruebas de seguridad están siendo evaluadas en trabajos paralelos a éste, por cuanto el aporte de este artículo se enfoca hacia la caracterización fisicoquímica.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales:

Para la caracterización fisicoquímica, la valoración y detección de impurezas en este estudio, se contó con cuatro muestras de ampicilina anhidra materia prima, identificadas con los números 1, 2, 3 y 4 procedentes del mercado nacional

TABLA 1 A

EXIGENCIAS DE LAS FARMACOPEAS PARA LA AMPICILINA MATERIA PRIMA

USP XXII	BP 88	FARMACOEPA ALEMANA	FARMACOEPA INTERNACIONAL
CONTENIDO: 90% - 105% IDENTIFICACION: ESPECTRO I.R. CRISTALINIDAD. pH: 3,5 - 6,0 PERDIDA DE SECADO <2% DIMETILANILINA <20 ppm VALORACION: HPLC	CONTENIDO: 96% - 105% IDENTIFICACION: ESPECTRO I.R. pH: 3,5 - 5,5 DIMETILANILINA <20ppm VALORACION: VOLUMETRICA CLARIDAD DE LA SOLUCION METALES PESADOS <10ppm CENIZAS SULFATADAS <0,5% HUMEDAD <2%	CONTENIDO: 96% - 105% IDENTIFICACION: ESPECTRO I.R. pH: 3,5 - 5,5 DIMETILANILINA <20ppm VALORACION: POTENCIOMETRICA CLARIDAD DE LA SOLUCION METALES PESADOS <10ppm CENIZAS SULFATADAS <0,5% HUMEDAD <2% ROTACION OPTICA +200°-300°	CONTENIDO: 95% - 105% IDENTIFICACION: ESPECTRO I.R. pH: 3,5 - 6,0 VALORACION: ESPECTROFOTOMETRICA HUMEDAD <2% ROTACION OPTICA +200°-305°

y suministradas por el Programa de Desarrollo de Medicamentos perteneciente al Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. También se utilizó el patrón de ampicilina anhidra Lote No.36499 fabricado por Gist Brocards, potencia de 1000 μ /mg de XI-87.

Datos Generales

Los puntos de fusión fueron tomados en el fusímetro eléctrico Electrothermal Melting Point Apparatus. Se utilizó el polarímetro Carl Zeiss Jena, el potenciómetro pH meter Fisher accument model 210, Balanza analítica mettler H 18, cromatógrafo de gases Perkin Elmer sigma 2000 con integrador LCI 100, equipado con detector de ionización de llama de hidrógeno, espectrofotómetro PERKIN-ELMER 552 de doble haz con lámpara de Deuterio y Tugsteno como fuente de radiación, y sistema de lectura digital ($\pm 0,001$) y analógico con celdas de cuarzo (sílica 6H) de 1 cm de espesor. Para las lecturas se emplearon como parámetros instrumentales un ancho físico de rendija de 100 μ m y una velocidad de barrido espectral de 240 nm/minuto.

Metodología:

1. Caracterización Físicoquímica.

1.1. Aspecto Físico.

Se realizó una descripción general de cada una de las muestras de ampicilina en polvo, teniendo en cuenta parámetros como color, olor, forma de los cristales y el tamaño de partícula se determinó por el método de observación directa al microscopio (20), tomando 300 datos para cada una de las muestras.

1.2. Punto de fusión.

Los puntos de fusión fueron tomados por triplicado en fusímetro eléctrico y con capilar, de acuerdo al método descrito en la Farmacopea Británica (21); en la curva de calibración del aparato realizada con patrones normalizados.(22)

1.3. Rotación específica.

Se determinó la rotación específica a soluciones al 0,25%, previo secado a peso constante y por triplicado para cada una de las muestras y el patrón en un polarímetro CARL ZEISS JENA, fuente de radiación línea D de sodio a una temperatura de 19,5°C de acuerdo a la metodología dada en la Farmacopea Británica. (21, 23)

1.4. Determinación de pH.

Se efectuó por triplicado a una solución de 0,25% en el potenciómetro pH meter Fisher accumet model 210, una

eficiencia del electrodo del 94% y temperatura de 18,5°C. Se siguió el método descrito en la USP XXI (24).

1.5. Pérdida por secado.

Se utilizó la metodología consignada en la USP XXI (24), se evaluó por triplicado en estufa de vacío a una presión de 5 mm de Hg, temperatura de 60°C por tres horas.

1.6. Identificación.

Como criterio de identificación se realizaron espectros al infrarrojo en una dispersión de bromuro de potasio (KBr) para cada una de las muestras comparadas con el espectro dado por el patrón según la metodología expresada en la Farmacopea Británica (21).

También se realizó una cromatografía en capa fina para las muestras y el patrón según la metodología dada en la USP XXII (25) utilizando una solución de ampicilina en acetona, agua, tolueno y ácido acético glacial (650:100:100:25), sílica gel como fase estacionaria y revelador Nihidrina al 3% en etanol. Ver Tabla 4. (26, 27, 28)

1.7. Solubilidad.

Se realizaron ensayos de solubilidad a una temperatura de 19,5°C en agua, acetona, cloroformo, éter y en soluciones 0,1N de HCl y NaOH, según el método consignado en las guías de Análisis Orgánico I. Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Ver Tabla 3. (29, 30)

1.8. Humedad.

Se determinó la humedad por triplicado para cada muestra y el patrón, por el método de Karl Fisher dado en la Farmacopea Británica (21) utilizando 0,3 g de materia prima.

1.9. Cristalinidad.

Se realizó con base en la metodología expresada en la USP XXI (24) observando el fenómeno de birrefringencia con el microscopio de luz polarizada.

2. Determinación de los parámetros espectroscópicos

Se realizó un espectro infrarrojo para las muestras y el patrón de ampicilina, en una dispersión de bromuro de potasio, utilizando de 10 a 15 mg de muestra. Se utilizó la metodología consignada en la Farmacopea Británica (21) y en la USP XXI (24).

3. Detección y cuantificación de contaminantes.

3.1. Metales pesados.

Se realizaron tres ensayos para cada una de las muestras utilizando la metodología consignada en la Farmacopea Británica test C (21), utilizando una solución patrón de plomo (10 ppm), a temperatura de 800°C, buffers de acetatos de pH 3,5 y tiocetamida como generador del ión sulfuro.

3.2. Cenizas sulfatadas.

Se siguió el método II consignado en la Farmacopea Británica (21). Este ensayo se realizó por triplicado para cada una de las muestras utilizando 0,5 g de la materia prima.

3.3. Dimetilanilina.

Se siguió el método descrito en la USP XXII (25) por cromatografía de gases. El cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de llama de hidrógeno y una columna de acero inoxidable de 6 pies y 1/4 de pulgada con 3% de OV-17/Chromosorb WHP 80-100 mesh. Nitrógeno como gas de arrastre a una velocidad de flujo de 36 mL/minuto.

3.4. Cloruros.

Se realizaron ensayos turbidimétricos para la detección de cloruros, de acuerdo con la metodología dada en la USP XXI (24) y en la BP 80 (21) utilizando como precipitante nitrato de plata 0,25 M en medio acidulado con HNO₃ 2 M. Ver Tabla 4.

3.5. Sulfatos

Prueba turbidimétrica de acuerdo al método consignado en la USP XXI (24) y en la BP 80 (21). La solución se acidula con ácido clorhídrico 2M y como precipitante se utiliza una solución de cloruro de bario 0,25 M. Ver Tabla 4.

3.6. Criterio de pureza.

Se utilizaron las metodologías descritas por Iain J. McGilveray y col (31) y la USP XXII (25), utilizando cromatografía en capa fina, sílica gel como fase estacionaria y como eluyente acetona-ácido acético (95:5). Ver Tabla 4.

3.7. Claridad de la solución.

Se realizó según metodología expresada en la BP 80 (21) utilizando como patrón de opalescencia hexamina y sulfato de hidrazonio y las ampicilinas se solubilizaron en ácido clorhídrico 1M y en hidróxido de amonio 2M. Ver Tabla 6.

4. Valoración de las muestras y el patrón de ampicilina.

4.1. Valoración yodométrica.

Se siguió el método propuesto en la USP XXI (24) usando agua como solvente para la ampicilina y una concentración inicial de 1,25 mg/mL.

4.2. Valoración método imidazol-mercurio.

Según el método consignado en la Farmacopea Británica (21), la lectura de las absorbancias se realizó en un espectrofotómetro PERKIN-ELMER 552 a una longitud de onda de 325 nm.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la descripción general de cada una de las muestras de ampicilina se encontró concordancia con las características de aspecto físico informadas en la literatura (24). Tabla I. En la determinación del tamaño de partícula por el método de observación directa al microscopio (20) para las muestras y el patrón de ampicilina, se realizó un histograma que reveló lo siguiente:

Para la muestra 1 se observa que la moda está en el intervalo entre 32-42,6 μ con 78 datos en este intervalo representando un 26% de la muestra. El 69% de los datos se encuentran concentrados en un intervalo de 21,3-63,9 μ . El 90%, es decir, 270 datos se encuentran en un intervalo entre 21,3-117,2 μ por lo tanto se clasifica esta muestra como un polvo muy fino según la BP 88 (32).

En la muestra 2 se observa que la moda está en un intervalo de 157,99-175,00 μ con 91 datos en este intervalo que representan un 30,4% de la muestra analizada. El 82,6% de los datos están concentrados en el intervalo entre 106,8-226,2 μ . El 90%, es decir, 279 datos se ubican dentro del intervalo de 38,47-226,3 μ por lo que se clasifica esta muestra como un polvo fino según la BP 88 (32).

La muestra 3 presenta una moda en el intervalo entre 1267,9-1531,3 μ con 76 datos que representan el 25,3% del total de los datos de la muestra analizada. El 92,3% están localizados en el intervalo entre 214-2058,3 μ por lo cual esta muestra se clasifica como un polvo grosero, según la BP 88 (32).

En la muestra 4 se observa que la moda está en un intervalo entre 142,2-230,9 μ con 88 datos representando el 29,3% de la muestra. El 92,3% de los datos se encuentran en un intervalo de 53,5-763,1 μ por lo cual se clasifica como un polvo moderadamente grosero según la BP 88 (32).

Para el patrón de ampicilina la moda se encuentra en un intervalo entre 96,1-117,4 μ con 161 datos representando un 53,6% de la muestra analizada. El 93% de los datos se encuentran en el intervalo entre 53,4-181,5 μ por lo que se clasifica como un polvo fino según la BP 88 (32).

La muestra 1 coincide con el tamaño de partícula del patrón pero posee un 51,3% de partículas muy fina por debajo del rango del 90% de distribución de tamaño de partícula del patrón.

La muestra 2, 3 y 4 tienen un tamaño de partícula superior al patrón; en especial la muestra 3 cuyo tamaño de partícula es muy elevado.

Los resultados obtenidos para el punto de fusión se encuentran dentro de los límites expresados en la literatura para la ampicilina anhidra (24) (Tabla 2) y su baja variación (± 1 °C) podría tomarse como un indicio de un adecuado grado de pureza de las materias primas.

En cuanto a la rotación específica, se encuentra dentro de los límites expresados en la literatura (24) para la ampicilina anhidra a excepción de la muestra 2 cuyo valor está por debajo del límite inferior, lo que sugiere la presencia del isómero L(-). (Tabla 2).

La evaluación del pH muestra que los valores de las soluciones al 0,25% se encuentran dentro de los límites teóricos (25) y por lo tanto se podría decir que la materia no tiene contaminantes que aporten o reciban electrones capaces de alterar este parámetro significativamente.

La humedad libre que puede presentar la materia prima está dentro del valor permitido en las Farmacopeas Oficiales como se expresa en la Tabla 2, (21). De la misma manera el porcentaje de humedad cumple con los requisitos dados en la BP80 (21) para la ampicilina anhidra, lo cual permite un adecuado flujo del polvo para el proceso de elaboración del medicamento y evita procesos de hidrólisis que pudiera presentar el fármaco.

En el ensayo de C.C.D. como criterio de identificación se observa que las cuatro muestras y el patrón presentan valores similares de Rf (Tabla 4) por consiguiente las muestras corresponden a ampicilina anhidra.

La evaluación del ensayo de cristalinidad mostró que las partículas en todas las muestras presentan birrefringencia y zonas oscuras al ser observadas en el microscopio de luz polarizada en montaje con aceite mineral lo cual coincide con lo expresado en la USP XXI (24).

TABLA 1. ASPECTO FÍSICO

MUESTRA	COLOR	OLOR	FLUJO	TAMAÑO DE PARTICULA (μ m) (Intervalo 90%)	CLASIFICACION (BP 88 (32))
1	Blanco	Caract.	Libre	21,3 - 117,2	Polvo muy fino
2	Blanco	Caract.	Libre	38,5 - 226,3	Polvo fino
3	Blanco	Caract.	Libre	214,0 - 2058,3	Polvo grosero
4	Blanco	Caract.	Libre	53,5 - 763,1	Polvo moder. grosero
PATRON	Blanco	Caract.	Libre	53,4 - 181,5	Polvo fino

TABLA 2. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA

MUESTRA	**P.F. °C	19,5 *[] D	*pH	PERDIDA POR SECADO (%)	HUMEDAD (%)	C.C.D. Rf
1	200,0-201,0	+295,3	5,0	0,05	0,44	0,32
2	201,0-202,0	+270,6	4,9	0,03	0,51	0,32
3	199,5-200,0	+282,0	4,9	0,04	0,47	0,32
4	200,0-200,5	+282,0	4,9	0,03	0,42	0,32
PATRON VALOR	199,5-200,0	+288,6	4,8	0,04	0,54	0,32
TEORICO	199,0-202,0(25)	280-+305(24)	3,5-5,5	<2% (21)	<1,5%(25)	—

* Solución 0,25%

** Corregido

TABLA 3. SOLUBILIDAD

MUESTRA	AGUA	ETANOL	ACETONA	ETER	CLOROFORMO	NaOH 0,1 M	HCl 0,1 N
1	E.S.					S	S
2	E.S.					S	S
3	E.S.					S	S
4	E.S.					S	S
PATRON	E.S.					S	S

E.S. = Escasamente Soluble

Temperatura = 19,5 °C

| = Insoluble

S = Soluble

TABLA 4. DETERMINACION DE LOS CONTAMINANTES

MUESTRA	METALES PESADOS	CENIZAS SULFATADAS	CLORUROS	SULFATOS	Rf1	C.C.D. Rf2	Rf3
1	< 10 ppm	0,09%	< 20 ppm	< 20 ppm	0,19	0,32	0,71
2	< 10 ppm	0,13%	< 20 ppm	< 20 ppm	0,19	0,32	0,71
3	< 10 ppm	0,09%	< 20 ppm	< 20 ppm	0,19	0,32	0,71
4	< 10 ppm	0,14%	< 20 ppm	< 20 ppm	0,19	0,32	0,71
PATRON	< 10 ppm	0,03%	< 20 ppm	< 20 ppm	0,19	0,32	0,71
VALOR TEORICO	< 10 ppm(21)	< 0,05%(21)	< 20 ppm(24)	< 20 ppm(24)	_____	_____	_____

Las soluciones de ampicilina en HCl 1M y en hidróxido de amonio 2M son claras y su opalescencia no es mayor que la de la solución de referencia I (21), por lo tanto las muestras no presentan contaminantes insolubles o sustancias de carácter oleoso que pudieran comunicarle opalescencia.

Los ensayos de solubilidad mostrados en la Tabla 3 concuerdan con lo expresado por las Farmacopeas oficiales en Colombia (25, 32) para la ampicilina anhidra.

El espectro infrarrojo evidenció las siguientes bandas de absorción al I.R. en cm⁻¹ 3334 tensión N-H para amina secundaria (8), de 2622 para la amina primaria NH₂, 1775 señal del grupo carbonilo del anillo β-Lactámico, 1694 grupo carbonilo de la amida y el ácido, (8), 1393 y 1381 señales del anillo aromático.

Las muestras de ampicilina presentaron bandas de absorción al I.R. a igual longitud de onda que el patrón, lo cual permite demostrar su identidad. En la determinación de los contaminantes de las muestras de ampicilina Tabla 4, se observó que la presencia de metales pesados es menor que 10 ppm, y la presencia de cloruros y sulfatos dentro de los límites permitidos por las farmacopeas (20 ppm).

En cuanto a la cromatografía en capa delgada que se implementó como criterio de pureza e identificación, tanto las muestras como el patrón presentaron tres manchas Tabla 4; con Rf de 0,19, 0,32 y 0,71, la mancha con Rf 0,32 al revelarla con Nihidrina y secado de la placa a 60°C presenta una coloración café intensa que demuestra la presencia de un compuesto con grupos aminoácidos.

La mancha de Rf 0,19 presenta una coloración muy tenue lo que significa que está en muy poca proporción y sugiere la presencia del ácido penicilínico. La mancha de Rf 0,71 no presentó coloración con Nihidrina pero da fluorescencia al ultravioleta, con lo que se deduce que es un compuesto que no tiene grupos aminos NH₂ y podría tratarse del ácido penilínico.

Con el objeto de determinar la presencia de dimetilnilina como contaminante se realizó la determinación por cromatografía de gases.

El estudio cromatográfico de las muestras de ampicilina seleccionadas se hizo en las condiciones indicadas por la USP XXII (25) y en las condiciones fijadas por los autores del trabajo.

Las condiciones fijadas fueron:

Columna OV-17 al 3% de acero inoxidable de 6 pies y 1/4 de pulgada / Chromosorb WHP 80-100 mesh.

Temperatura de la columna: 120 °C y 220 °C

Fase móvil: Nitrógeno

Velocidad de flujo: 36 mL/minuto

Detector: de ionización de llama de hidrógeno

Temperatura del detector: La Farmacopea no la estipula, se trabajó a 170 °C

Concentración del patrón de dimetilanilina 20 ppm

Volumen de inyección: La Farmacopea no lo indica, se fijó en un microlitro en todos los casos.

Los cromatogramas obtenidos en las condiciones fijadas fueron los siguientes:

En el cromatograma correspondiente a la muestra patrón de dimetilanilina de concentración 20 ppm a 120 °C, se observó la presencia de una señal a un tiempo de retención de 2,39 minutos atribuible a la dimetilanilina

Los cromatogramas de las muestras de ampicilina 1, 2 y 4 trabajadas en las mismas condiciones experimentales no se observa la señal correspondiente a la dimetilanilina mientras que en cromatograma de la muestra 3, se observó la presencia de una señal a un tiempo de retención de 2,39 minutos atribuible a la dimetilanilina. El área y la altura de estos valores fueron inferiores a los valores presentados por el patrón de dimetilanilina de concentración 20 ppm, lo cual revela la presencia de dimetilanilina en la muestra 3 pero dentro de los niveles permitidos por la USP XXI (24).

En el cromatograma del patrón de ampicilina a 120 °C y 220 °C no presenta ninguna señal, por lo que deduce la ausencia de dimetilanilina.

Con el objeto de observar el comportamiento de la muestra patrón y las muestras de ampicilina, en condiciones de temperatura diferentes a las indicadas por la Farmacopea Americana USP XXII (25). Se eligió una temperatura de 220 °C para la columna y de 270 °C para el inyector y el detector.

Las demás condiciones fueron las señaladas anteriormente.

Los resultados observados fueron los siguientes:

En el cromatograma correspondiente a la muestra patrón de dimetilanilina no se aprecia una señal que pueda atribuirse a la presencia de este compuesto, es decir, a esta temperatura no se logra la separación.

En los cromatogramas correspondientes a las muestras de ampicilina 1, 2, 3 y 4 se observó lo siguiente.

Los cromatogramas de las muestras 1 y 2 difieren de los cromatogramas de las muestras 3 y 4, mostrando estos últimos la presencia abundante de señales en número y en intensidad atribuibles a posibles compuestos presentes en las muestras de ampicilina. Igualmente se aprecian algunas diferencias cualitativas entre los cromatogramas de las muestras 3 y 4, y si se tiene en cuenta que las dos muestras son de la misma procedencia pero de lotes diferentes, esto sugiere fallas de uniformidad en el proceso de obtención, pues en el cromatograma de la muestra 3 se observa la presencia de mayor número de posibles residuales o productos de descomposición a la temperatura de trabajo, comparativamente con el cromatograma de la muestra 4.

Estas observaciones permiten sugerir un estudio detallado, con el objeto de identificar cada uno de los compuestos presentes en los cromatogramas de las muestras 3 y 4 con el propósito de precisar si corresponden a residuales de los componentes usados para la síntesis, los cuales no se detectan en las condiciones fijadas por las Farmacopeas Oficiales (21, 25, 28). Si se trata de residuos, necesariamente tendría que tenerse en cuenta su toxicidad con el objeto de fijar los límites permisibles, para la ampicilina sintetizada en el país.

Para los posibles solventes residuales como acetona, cloruro de metileno e isopropanol usados en la ruta sintética de la ampicilina fabricada en el país, no fue posible realizar su detención y cuantificación por cuanto no se logró contar con columnas adecuadas según la metodología expresada en las Farmacopeas (24, 25) para realizar una cromatografía de gases con detector de conductividad térmica, sin embargo se hace referencia a estos solventes en las recomendaciones del presente trabajo.

La valoración de las muestras y el patrón de ampicilina por los métodos yodométrico y espectrofotométrico están dentro de los parámetros establecidos por las Farmacopeas Oficiales en el país, (21, 25, 28) como puede verse en la Tabla 5.

Las muestras y el patrón de ampicilina analizadas presentaron resultados dentro de los límites permitidos por las Farmacopeas oficiales en Colombia como se puede observar en la Tabla 6.

CONCLUSIONES

- Las muestras de ampicilina de producción nacional cumplen con la mayoría de las exigencias de las Farmacopeas oficiales en el país.

- Aunque el tamaño de partícula no se describe como una prueba oficial en las Farmacopeas Oficiales, esta característica incide marcadamente en los procesos tecnológicos utilizados para la obtención de formas farmacéuticas sólidas. En el

TABLA 5. VALORACION MUESTRAS Y PATRON DE AMPICILINA

MUESTRA	* VALORACION YODOMETRICA	* VALORACION YODOMETRICA
1	99,04	99,15
2	99,20	99,43
3	99,36	99,43
4	99,68	99,72
PATRON	100,00	100,05

* Valoración expresada en porcentaje (%)

presente estudio se evidenció la gran dispersión en el tamaño de partícula entre los lotes y dentro de un mismo lote, lo que sugiere falta de uniformidad en el proceso de obtención de la materia prima.

- De acuerdo a los resultados obtenidos por cromatografía de gases de las muestras de ampicilina, se detectó la presencia de dimetilanilina en la muestra 3 dentro de los límites aceptados por la USP XXII, mientras que en la muestra patrón no se encontraron residuos de dimetilanilina. Cuando el estudio se realizó a temperaturas mayores a la indicada por la Farmacopea (32), se evidenció la presencia de residuos y/o productos de descomposición que no fueron encontrados en la ampicilina patrón.

- De acuerdo a los resultados obtenidos y a lo descrito en la literatura (BP/88) el patrón de ampicilina anhidra corresponde a un polvo fino. Las materias finas de producción nacional varían desde polvo fino hasta polvo grosero. Esto implicaría la adecuación del proceso de manufactura desarrollado para una ampicilina con características de polvo fino, en la obtención de medicamentos en forma sólida con éste fármaco, cuando se utilicen materias primas que correspondan a una clasificación como la encontrada para las muestras de ampicilina objeto de este estudio.

Agradecimientos: Los autores agradecen al programa de investigación "Diseño, Desarrollo, Formulación y Evaluación de Productos Farmacéuticos" dirigido por el Profesor Alfonso Rodríguez Hernández y financiado por COLCIENCIAS.

BIBLIOGRAFIA

1. Doyle, F. P. J. *Chem. Soc.*, 1440, (1962).
2. Clarke, H., Johnson, J.R. and Robinson, R. "*The Chemistry of Penicillin*", University Press, 3th Princeton. N.J. (1949). pp 48.

TABLA 6. PARAMETROS AMPICILINA ANHIDRA

ENSAYO	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MUESTRA 3	MUESTRA 4	PATRON
Nombre del Compuesto	Ampicilina	Ampicilina	Ampicilina	Ampicilina	Ampicilina
Aspecto Físico (24)	Corresponde	Corresponde	Corresponde	Corresponde	Corresponde
Tamaño de Partícula (20)	21,3-117,2 μ	38,5-226,3 μ	214,0-2058,3 μ	53,5-763,1 μ	53,4-181,5 μ
Clasificación (32)	Muy Fino	Polvo Fino	Polvo grosero	Mod. grosero	Polvo Fino
Punto de Fusión °C (24)	200,0-201,0	201,0-202,0	199,5-200,0	199,0-202,0	200,0-201,0
Rotación Específica (24)	+295,3 °	+270,6 °	+282,0 °	+282,0 °	+288,6 °
pH (24)	5,0	4,9	4,9	4,9	4,8
Pérdida de secado (24)	0,05	0,03	0,04	0,03	0,05
% Humedad (24)	0,44	0,51	0,47	0,42	0,54
Cristalinidad (24)	Corresponde	Corresponde	Corresponde	Corresponde	Corresponde
Claridad de la Solución	Clara (32)	Clara (32)	Clara (32)	Clara (32)	Clara (32)
Solubilidad (32)	Corresponde	Corresponde	Corresponde	Corresponde	Corresponde
Espectro I.R. (32)	Corresponde	Corresponde	Corresponde	Corresponde	Corresponde
Metales pesados ppm (24)	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Cenizas Sulfatads % (32)	0,09	0,13	0,09	0,14	0,03
Cloruros ppm (25)	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
Sulfatos ppm (25)	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
Criterio de pureza	Rf1 0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
e identidad (25)	Rf2 0,32	0,32	0,32	0,32	0,32
	Rf3 0,71	0,71	0,71	0,71	0,71
Valoración Yodométrica (24)	99,04%	99,20%	99,36%	99,68%	100,00%
Valoración Espectrofotométrica (32)	99,15%	99,43%	99,43%	99,43%	100,05%
Dimetilanilina ppm (32)	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20

3. Gourevitch, A. Wolfe, S., and Leiv, J. "Antimicrob Agents Chemother", KlaussNerit, 4th ed. Boston, (1961). pp 136-138.
4. Morin, R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 1401 (1969).
5. Nara Takashi, Misawa, Masanaru. and Okachi. Ryo, Gen. Pat. Germ No. 1,945, 607, August. vía C.A.73 99384 W (1970).
6. Kaufman. W., *Int. Congr. Chemother. Proc.*, 3rd, Stuttgart, 1963, 2, 1248- 50 (1963) (Pub. 1964); vía C.A. 65, 19016h (1966).
7. Kaufman. W., and Bayer, K., U. S. Pat. No. 3,079,307, February 26, vía C.A. 58, 13093h (1963).
8. Florey, Claus. "Analytical Profiles of Drugs Substances". Vol 2. Ed. Academic Press New York (1973). pp 927.
9. Mestre. J. R., Pat. Span. No. 291,104, September 10, 1963; vía C.A. 61, 1869g (1964).
10. Marsh, J. R., *J. Assoc. of Anal. Chem.* 50. 457 (1967)
11. Bellamy, L. J., "The Infrared spectra of complex molecules", Methuen, 2th edition, London, (1958) pp 266.
12. Dane, E. and Dockner, I., *Chem. Ber.*, 98. 789 (1965).
13. Cole, M., *Biochem. J.*, 115 (4), 747-56. (1969)
14. Ekstrom, B., Gomez-Sevilla, AS., Mollberg, R., Thelin, H. and Sjobreg, B., *Acta Chem. Scand.* 19, 281 (1965)
15. Sjoberg, B.O.H. and Ekstrom, B.A., Pat. Brit. No. 940.489, October 30, 1963, vía C.A. 61, 2941h (1964).
16. Sjoberg, B.O.H. and Ekstrom, B.A., Pat. Belg. No. 620.519, November 14, 1962; vía C.A. 58, 11501h (1963).
17. Soulal, M.J., Pat. Brit. No. 975-379, November 18, 1964; vía C.A. 62, 3890f (1965)
18. Beecham, Group Ltda., Pat. Fr. No. 1,365,220. June 1964; vía C.A. 61, 13316f (1964).
19. Toxic and Hazardous 4 ed. The International Technical Information Institute. Japan. 1976.
20. Martin A.N., "Physical Pharmacy" ed. Lea & Febiger Philadelphia, (1960). pp 574-585.
21. British Pharmacopoeia 80, Her Majestyc Office, London, (1980).
22. Florey, K., *Analytical Profiles of Drug Substances* 4, 61 (1973).
23. Rapson, H.D.C., Pat. Brit. No. 1,016,875; vía C.A. 68, 95807j (1968).
24. The United States Pharmacopoeia XXI, Revision Mack Publishing Company, Easton, (1985). pp 59-60.
25. The United States Pharmacopoeia XXII, Revision Mack Publishing Company, Easton, (1990). pp 39.
26. The Merck Index, 10th edition, Merck & Co., Inc. Rahway, (1983) pp. 587.
27. The International Pharmacopoeia, 3th edition, World Health Organization, Geneva, (1981) pp 37.
28. Deutsches Arzneibuch, 9 Ausgabe, Amtliche Ausgabe Deutscher Apotheker, (1986), pp 516-517.
29. Departamento de Química. U.N. "Guías de Laboratorio Química Orgánica I". Bogotá (1985).
30. Doyle, F. P., Pat. Brit. No. 902, 703 Aug. Vía C.A. 58 5694h (1963).
31. Mc Gilveray, Iain J., and Strickland, Robert, D., *J. Pharm. Sci.* 56 (1) Jan. (1962).