

**DETECCION DE LOS PRODUCTOS DE LA DEGRADACION Y DEL GRADO DE PUREZA DE FARMACOS POR DSC****DETECTION OF THE DEGRATION PRODUCTS AND PURITY OF DRUGS BY DSC**A. Brown-Gómez<sup>1\*</sup>, T. Márquez<sup>2</sup> y E. Besada<sup>2</sup><sup>1</sup> Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), Vía Blanca 804 y C. Central, A. Postal 4026, La Habana, Cuba.<sup>2</sup> Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Ave. 26 No. 1605 La Habana, Cuba.

Recibido 8 Septiembre 2003; Aceptado 26 Enero 2004

**Resumen**

El presente trabajo nos muestra como a partir de una técnica termoanalítica se pueden detectar los productos de degradación involucrados en los procesos de formulación y producción de medicamentos con el fin asegurar que éstos cumplan con las especificaciones de pureza indispensables para asegurar su inocuidad para consumo humano. La reproducibilidad de los resultados obtenidos con el DSC de muestran la confiabilidad de la técnica en la determinación del grado de pureza de los fármacos.

*Palabras claves:* pureza de medicamentos, calorimetría diferencial de barrido (DSC), productos de degradación, reproducibilidad, confiabilidad.

**Abstract**

In this paper it is shown that the degradation products arising from the formulation and production of drugs can be monitored using thermoanalytical techniques, ensuring the drugs comply with the purity specifications required to deem them harmless for human consumption. The reproducibility of the results obtained with the DSC proved the reliability of the method for determining the drugs purity.

*Keywords:* drugs purity degree, differential scanning calorimetry (DSC), degradation products, reproducibility, reliability.

**1. Introducción**

Desde el punto de vista económico, la obtención de materiales químicos de referencia y su posible validación es de vital importancia, si se tiene en cuenta que la producción, conservación y distribución de los mismos en el mercado internacional asciende a costos muy elevados por unidad.

La Calorimetría Diferencial de Barrido nos permite a partir de la medición de un parámetro físico llevar a cabo estudios de pureza (Brown y Michelena, 1993; Domínguez y col., 1998; Haines, 1995) en materiales cuya masa molar es conocida. El presente trabajo abarcará cuatro productos derivados de la degradación de las benzodiazepinas (Connors y col., 1986; De la Guardia y col., 1989), las cuales forman parte

de los llamados agentes ansiolíticos sedativos, que en la práctica médica se utilizan para el tratamiento sintomático de la siconeurósis con vistas a reducir la ansiedad, la tensión y las agitaciones patológicas (Gardner y col., 1998).

Esta técnica a pesar de no ofrecer información acerca de las estructuras moleculares, si nos permite conocer las temperaturas de depresión de las posibles impurezas, cuyos productos de degradación serán derivados de las benzofenonas que se obtienen por vía de síntesis con un rendimiento entre 40 y 80%. La presencia de estos, determina entre otras cosas, el tiempo de consumo prefijado para un medicamento sin afectar la actividad del mismo (Connors y col., 1986; NOM-073-SSA1, 1993).

\*Autor para la correspondencia: E-mail: [adob@icidca.edu.cu](mailto:adob@icidca.edu.cu)  
Tel./Fax: (007) 537338236

Para el empleo de esta técnica se requiere de una pequeña cantidad de muestra a partir de la cual se pueden medir una gran cantidad de parámetros (Duswalt, 1974; Giron, 2000a,b) que nos permiten completar la caracterización del material estudiado. El control de la calidad de las materias primas y los productos terminados depende directamente de los procesos de degradación que pueden manifestar estos materiales ya sea por falta de condiciones óptimas de almacenamiento, variaciones de temperatura o factores vinculados a los procesamientos industriales (Lachman y De Luca, 1976).

Con este trabajo se pretende demostrar la importancia que tiene un estudio interlaboratorio en la validación de métodos analíticos tomando como referencia una técnica rápida y que requiere de muy poca cantidad de muestra. Además, aporta datos importantes acerca de la precisión del método, cuando los análisis se efectúan bajo las mismas condiciones, sobre la misma muestra y por el mismo analista, todo esto, generalmente en un corto intervalo de tiempo y en un mismo laboratorio, lo cual responde a lo que comúnmente denominamos repetibilidad (Montgomery, 1991). También nos da una medida de la precisión de los resultados para una misma muestra pero en condiciones diferentes, al variar el analista y el equipamiento utilizado. A esto último se le denomina reproducibilidad y nos permite hablar de la precisión interlaboratorios

cuando las muestras son analizadas en instalaciones distintas.

## 2. Metodología experimental

Un estudio de precisión requiere la repetición del análisis sobre la misma muestra para comprobar la eficiencia del método que incluye desde la preparación de la muestra por el analista hasta la lectura instrumental. Esto generalmente se logra abarcando tres tipos de estudios: repetibilidad, reproducibilidad y robustez (Montgomery, 1991) a partir de criterios estadísticos muy bien fundamentados. Para el estudio interlaboratorio se tomaron cuatro sustancias de referencia con sus respectivos productos de degradación, Tabla 1.

Las muestras fueron procesadas en un DSC-20 (Mettler-Toledo Inc., Columbus, Ohio, EUA) acoplado a un integrador TA-3000 ubicado en los laboratorios del CIDEM y un DSC-25 TA 4000. Se pesaron aproximadamente 5 mg de muestra utilizando portamuestras de aluminio y barriendo un intervalo de temperatura entre 80 y 350 °C en régimen dinámico, a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min.

Cada experiencia fue realizada por triplicado con vistas a comprobar la precisión del método a partir de los valores obtenidos y procesados (Dollimore, 1996).

Tabla 1. Sustancias de referencia con sus productos de degradación.

Sustancias de referencia	Productos de degradación
Clorodiazepóxido	2 amino 5 clorobenzofenona (A)
Flunitracepán	2 metilamino 5 nitro 2 fluor benzofenona (B)
Diazepán	2 metilamino 5 clorobenzofenona (C)
Nitrazepán	2 amino 5 nitrobenzofenona (D)

### 3. Resultados y discusión

La Calorimetría Diferencial de Barrido utiliza la temperatura de fusión y la masa molecular del material objeto de estudio, obteniendo resultados cuantitativos del grado de pureza a partir de la ecuación de Van't Of. (Montgomery, 1991):

$$T_f = T_0 - X_2 (R \times T_0^2 / \Delta H_f) \quad (1)$$

Donde:

- $T_f$ : temperatura de la muestra en un instante dado.
- $T_0$ : temperatura de fusión de la sustancia pura.
- R: constante de los gases (8.314 J/mol K). de la ausencia de impurezas contaminantes.

$\Delta H_f$ : calor molar de fusión del componente principal.

$X_2$ : fracción molar del segundo componente (impurezas).

Para los cuatro productos de degradación analizados los valores del grado de pureza estuvieron dentro de un intervalo entre 99.3 y 100%; Tabla 2. Los termogramas que se muestran en las Figs.1, 2, 3 y 4 son una clara evidencia del alto grado de pureza del material de degradación que se pretende utilizar como material de referencia químico. La definición e intensidad con que se detecta el pico endotérmico para cada muestra son clara evidencia del comportamiento del producto y

Valor promedio del grado de pureza y temperatura de fusión alcanzados en el estudio interlaboratorio.

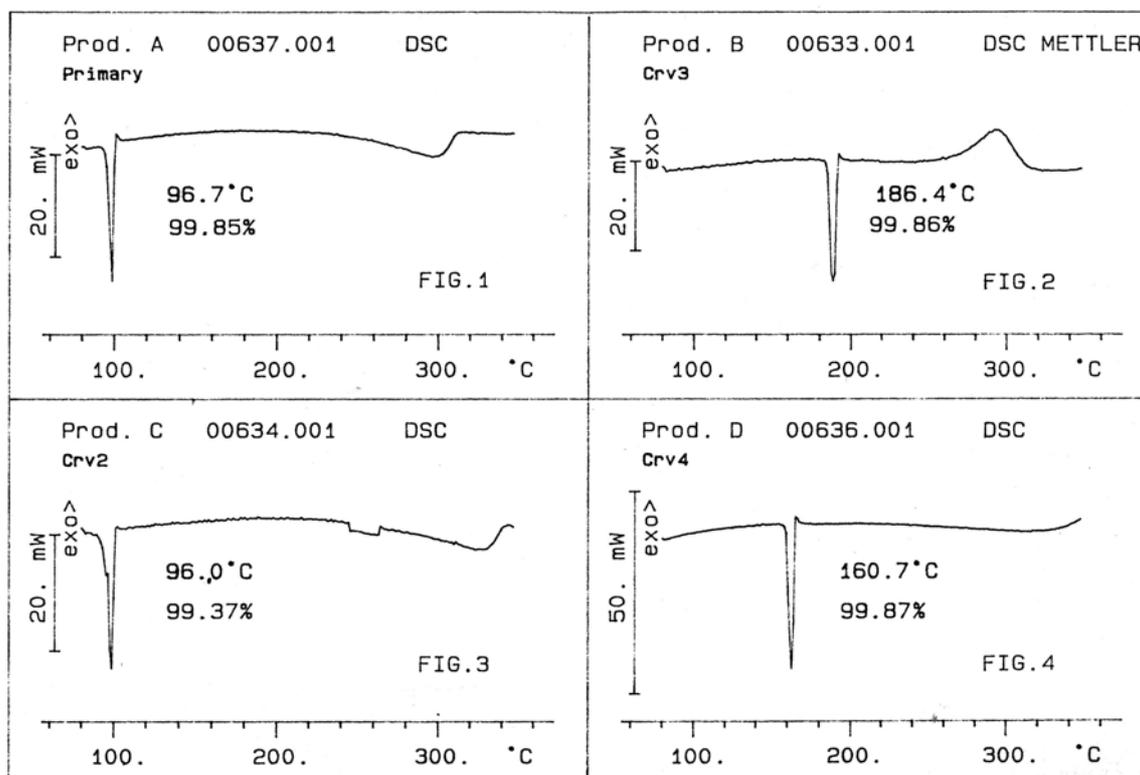


Fig. 1, 2, 3 y 4. Termogramas de pureza de los productos de degradación A, B, C y D.

Los resultados reportados en la Tabla 3 para cada producto y entre cada laboratorio, son una muestra de repetibilidad y reproducibilidad que se obtiene a partir del uso de esta técnica para una misma muestra (Montgomery, 1991), aún cuando se difiere en el instrumental utilizado.

En la Fig. 5 se muestra el comportamiento de los resultados anteriores. La incertidumbre de los datos representa en forma grafica como la distribución de los datos es similar para cada laboratorio, presentando una distribución asimétrica en las colas y en el centro. Las colas grandes se corresponden con los valores del producto C,

el cual reporta porcentos de purzas más bajos que el resto de los productos de degradación estudiados.

Lo anterior puede corroborarse en la Fig. 6, donde se muestra el comportamiento que siguen los productos analizados en ambos laboratorios y se destaca que la mayor variabilidad en cuanto a porcentos de pureza, se corresponde con el producto D para cada laboratorio.

En la Tabla 4 se resumen los resultados promediados para los dos laboratorios a partir del estudio de confiabilidad para la técnica empleada.

Tabla 2. Valores obtenidos en cada cromatograma para cada producto.

Productos de degradación	MM (g/mol)	T <sub>f</sub> (°C)	Pureza (%)
A	231.68	96-97	99.85
B	313.3	186.3-186.6	99.86
C	284.7	95.0-96.0	99.37
D	242.14	160.7-161.2	99.87

Tabla 3. Repetibilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos para cada producto en cada laboratorio.

Laboratorio	ICIDCA (DSC 25)				CIDEM (DSC 20)				
	Producto	A	B	C	D	A	B	C	D
% P		99.85	99.83	99.38	99.91	99.84	99.86	99.38	99.75
		99.86	99.90	99.38	99.90	99.85	99.85	99.35	99.88
		99.86	99.89	99.38	99.91	99.86	99.86	99.38	99.88
T <sub>f</sub> (°C)		96.7	186.8	95.0	160.7	96.7	186.3	96.0	160.7
		96.8	186.6	96.0	160.7	96.6	186.3	96.0	160.6
		96.9	186.5	96.0	160.8	96.7	186.3	96.0	160.7

Tabla 4. Resultados promediados para ambos laboratorios.

Laboratorio	Producto	V. Medio, %P	Desv. Estándar	V. Medio, T <sub>f</sub> (°C)	Desv. Estándar
ICIDCA	A	99.8566	0.005774	96.7000	0.000000
	B	99.8733	0.037859	186.6333	0.152753
	C	99.3800	0.000000	95.96667	0.057735
	D	99.9067	0.005774	160.7333	0.057735
CIDEM	A	99.8533	0.011547	96.66667	0.057735
	B	99.8567	0.005774	186.3000	0.000000
	C	99.3700	0.017321	96.00000	0.000000
	D	99.8367	0.075056	160.6667	0.057735

Figura 5. Ploteo de Caja de Bigotes por laboratorio.

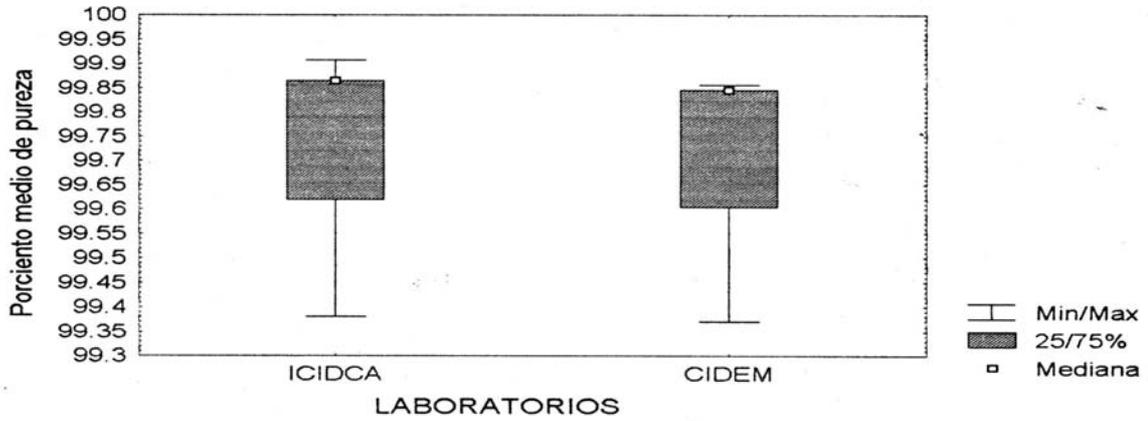


Fig 6. Valores promedios de pureza para cada laboratorio y producto.

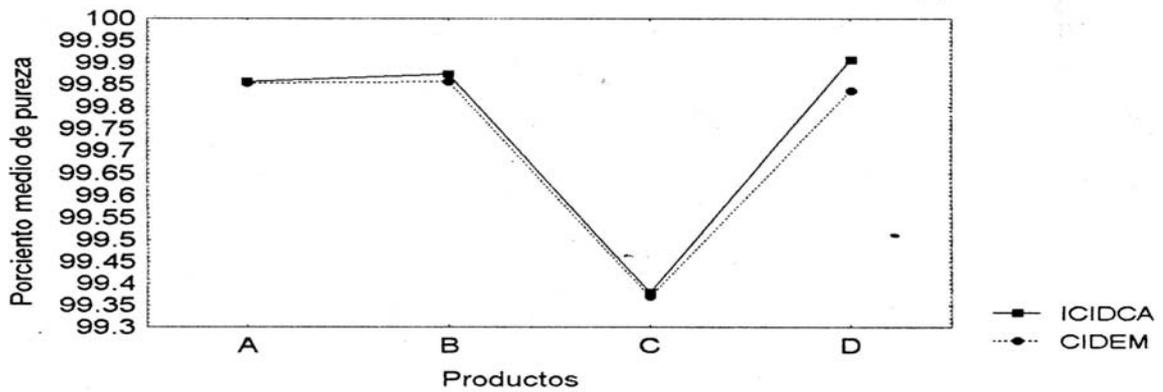


Fig. 5 y 6. Comportamiento estadístico de los resultados obtenidos.

En la Tabla 5 se muestran los resultados del cálculo de las fuentes de variación para cada producto mostrando los resultados que la variabilidad entre laboratorios es pequeña, siendo menor la correspondiente a las observaciones del producto A y mayor las correspondientes al producto D (Dollimore, 1996). Este comportamiento corrobora lo apreciado anteriormente en las Figs. 5 y 6.

El análisis de varianza que se relaciona en la Tabla 6 nos ayuda a fundamentar que el 98% de la variabilidad de todos los datos depende de los distintos niveles de prueba (productos) que se utilizaron, correspondiendo un 2% a la variabilidad entre laboratorios y entre observaciones (Black y Pidgeon, 1990).

Tabla 5. Fuentes de variación de los productos de degradación.

Varianza	A	B	C	D
$S^2_L$	0.000017	0.000417	0.000150	0.007350
$S^2_e$	0.000083	0.000733	0.000150	0.002833
$S^2_R$	0.000000	0.001150	0.000800	0.010183

$S^2_L$ : representa la varianza entre laboratorios (ICIDCA, CIDEM)  
 $S^2_e$ : varianza de repetibilidad (o dentro de cada laboratorio)  
 $S^2_R$ : varianza de reproducibilidad

Tabla 6. Factores que influyen en la variabilidad de los datos a partir del análisis de varianza.

Fuentes de Varianza	Suma de cuadrados	% total	Grados de libertad	Cuadrado medio
Laboratorios	0.003746	0.3407	1	0.003746
Productos	1.076411	97.8971	3	0.358804
Observaciones	0.003435	0.3124	2	0.001717
Lab. x Prod.	0.004194	0.3814	3	0.001398
Lab. x Observ.	0.000404	0.0368	2	0.000202
Prod. x Observ.	0.003603	0.3277	6	0.000600
Lab. x Prod. x Observ.	0.007740	0.7040	6	0.001290
Total	1.099533	100.0000	23	0.047806

Como puede observarse a partir de los resultados alcanzados, el estudio colaborativo interlaboratorio requiere de un estudio de robustez que nos muestra la influencia de pequeños cambios sobre la fiabilidad del método analítico aplicado, localizando aquellos factores que originan fluctuaciones menores y aquellos que requieren de una atención especial ya que dan origen a variaciones más significativas, en nuestro caso, las variaciones más significativas corresponden a los productos utilizados. De esto se deriva, que debe conocerse la estabilidad del producto objeto de estudio para así garantizar su conservación a la hora del análisis evitando comprometer la precisión. Esta técnica puede ser utilizada en un control rutinario de identificación y de igual forma en estudios de selectividad donde se precisa la máxima información sobre impurezas y productos de degradación potencialmente presentes en una muestra, así como excipientes u otros componentes.

### Conclusiones

La Calorimetría Diferencial de Barrido demuestra ser una técnica capaz de estudiar la calidad de un producto terminado y su posible uso como material de referencia químico con porcentajes de error muy bajos.

El estudio interlaboratorio permite verificar la repetibilidad y reproducibilidad del método a pesar de las variaciones a que son sometidas las muestras analizadas.

A partir de los métodos estadísticos utilizados se puede establecer la precisión de una técnica desde la preparación de una muestra hasta la lectura instrumental.

El estudio de productos de degradación debe ser de absoluta observancia en los medicamentos para poder prevenir daños colaterales.

### Agradecimientos

Agradecemos la colaboración de los investigadores del CIDEM con nuestro centro para la culminación de estos trabajos así como la del comité editor que permita la publicación de este artículo.

### Referencias

- Black, P. B. y Pidgeon, D. (1990). *Purity Determination of Standard Analytical Reference Materials by Differential Scanning Calorimetry*. Government Reports Announcment Index (EUA), 90(23), 1-11.
- Brown, A. y Michelena, G. (1993). Aplicación de la calorimetría diferencial de barrido al estudio del complejo coloidal hierro-dextrana. *Revista del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar* 27, 45-59.
- Connors, K. A., Amidon, G. L. y Stella, V. J. (1986). *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists*. 2ª ed. Wiley, Nueva York, EUA.
- De la Guardia, M., Salvador, A., Gómez, M. J. y De Benzo, Z. A. (1989). Rapid hydrolysis of benzodiazepines to benzophenones in a microwave oven. *Analytica Chimica Acta* 224(1), 123-126.
- Dollimore, D. (1996). Thermal analysis. *Analytical Chemistry* 68(12), 63-71.
- Domínguez, A. M., Brown, A., Montano, R. y Díaz, C. (1998). Evaluación de la pureza del dicloral urea como herbicida cañero. *Revista del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar* 32, 25-28.
- Duswalt, A. A. (1974). Practice of obtaining kinetic data by differential scanning calorimetry. *Thermochimica Acta* 8(1-2), 57-68.
- Gardner, C., Nakata, Y. y Walker, R. J. (1998). General pharmacology. *General Pharmacology* 31(5), I-IX.

- Giron, D. (2000a). Characterization of pharmaceuticals by thermal analysis. *American Pharmaceutical Review* 3(2), 53-54, 56, 58-61.
- Giron, D. (2000b). Characterization of pharmaceuticals by thermal analysis - Part II. *American Pharmaceutical Review* 3 (3), 43, 46-47, 50,52-53.
- Haines, P.J. (1995). *Thermal Methods of Analysis. Principles, Applications and Problems*. Blackie Academic & Professional, Londres, Reino Unido.
- Lachman, L. y De Luca, P. (1976). Kinetic principles and stability testing of pharmaceuticals. *Theory and Practice in Industrial Pharmacy* 2, 32-77.
- Montgomery, D.C. (1991). *Diseño y Análisis de Experimentos*. Grupo Editorial Iberoamérica. México, D. F., México.
- NOM-073-SSA1 (1993). Norma Oficial Mexicana: Estabilidad de Medicamentos. Secretaría de Salud. México, D. F., México.