

5.7  
277c  
.79  
CC.QQ.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

095741  
E. I.

COMPARACIÓN DE UN MÉTODO FÍSICO-QUÍMICO CON EL MÉTODO  
MICROBIOLÓGICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL ESTOLATO DE  
ERITROMICINA EN JARABE

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO POR:

DELMY RUTH AGREDA RODRÍGUEZ

PARA OPTAR AL TÍTULO DE :

LICENCIADA EN

QUÍMICA Y FARMACIA

Septiembre 1979



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

Lic. José Luis Argueta Antillón

SECRETARIO

Lic. Oscar Armando Acevedo Velásquez

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANO

Dr. Atilio Avendaño Juárez

SECRETARIO

Dra. Luz Gardis de Miralda



ASESOR:

Dra. Lucía Elizabeth Banegas de Salazar

JURADO CALIFICADOR:

Dra. Malvina de Franco

Dra. Bertha Alicia Pino de Bellegarrigue

Lic. Ana Julia Lafñez de Lara

LUGAR DE PRACTICAS:

Laboratorios de Microbiología y de Control de Calidad de Productos Farmacéuticos de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.



## A G R A D E C I M I E N T O S

- A la Dra. Lucía Elizabeth B. de Salazar, por su acertada Asesoría
  
- A las Dras. Bertha Alicia Pino de Bellegarrigue y Malvina de Franco, a la Lic. Ana Julia Lafnez de Lara, por la pronta corrección y revisión del trabajo.
  
- A las Licenciadas Cristela de Salinas y Arely Pineda P. - por su valiosa y desinteresada colaboración, lo mismo que a todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización del mismo.

# INDICE

CAPITULO		<u>Pag.</u>
I	INTRODUCCION	1
	A. Objetivo	2
	B. Revisión Bibliográfica	3
II	PARTE EXPERIMENTAL	18
	A. Materiales y Reactivos	19
	1. Materiales y reactivos del Método microbiológico	19
	2. Materiales y reactivos del Método Físico-Químico	20
	B. Métodos	21
	1. Muestreo	21
	2. Método de valoración del estolato de eritromicina por el Método Microbio- lógico.	21
	3. Método de Valoración del Estolato de Eritromicina por el Método Físico - Químico.	31

## INDICE DE TABLAS

TABLA N°		<u>Pag.</u>
1	SOLUBILIDADES DEL ESTOLATO DE ERITROMICINA	7
2	RESULTADOS DE PH Y HUMEDAD	39
3	RESULTADOS DE LOS DIAMETROS DE INHIBICION DE LAS MUESTRAS (YA CORREGIDOS) Y SUS CORRESPONDIENTES DATOS INTERPOLADO EN LA CURVA.	40
4	RESULTADOS DE POTENCIA (% SOBRE LO ROTULADO) DE LAS MUESTRAS POR EL METODO MICRO BIOLOGICO.	46
5	LECTURAS OBTENIDAS POR EL METODO FISICO QUIMICO.	47
6	CONCENTRACION (% SOBRE LO ROTULADO) SEGUN EL METODO FISICO QUIMICO.	48
7	COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR LOS METODOS ENSAYADOS.	49

## INDICE DE GRAFICAS

GRAFICA N°		Pag.
1	CURVA TIPO DE DIAMETROS DE INHIBICION (EN MM) VRS. CONCENTRACION (MCG/ML) - DE LAS MUESTRAS PARA LA 1a. DETERMINACION.	41
2	CURVA TIPO DE DIAMETRO DE INHIBICION ( EN MM) VRS. CONCENTRACION (MCG/ML) DE LAS MUESTRAS PARA LA 2a. DETERMINACION.	42
3	CURVA TIPO DE DIAMETRO DE INHIBICION (EN MM) VRS. CONCENTRACION (MCG/ML) PARA LA 3a. DETERMINACION.	43
4	CURVA TIPO DE DIAMETROS DE INHIBICION ( EN MM) VRS. CONCENTRACION (MCG/ML) DE LAS MUESTRAS PARA LA 4a. DETERMINACION.	44
5	CURVA DE TIPO DE DIAMETROS DE INHIBICION (EN MM) VRS. CONCENTRACION ( EN MCG/ML) DE LAS MUESTRAS PARA LA 5a. - DETERMINACION.	45



CAPITULO		<u>Pag.</u>
III	RESULTADOS	34
IV	DISCUSION	50
V	CONCLUSIONES	55
VI	APENDICE	58
VII	BIBLIOGRAFIA	78

## A. OBJETIVO.

El presente trabajo tiene como finalidad seleccionar un método físico químico, para la cuantificación del estolato de eritromicina en jarabe, y comparación del mismo con el método microbiológico para determinar si los resultados obtenidos son equivalentes y reproducibles. De ser así podría ser recomendado como método de rutina en los laboratorios de control de calidad, por las múltiples ventajas que presenta, las cuales serán mencionadas al concluir el trabajo.

Se espera con este trabajo contribuir con los laboratorios de control de calidad, que carecen de equipo y personal especialmente entrenado en Microbiología, para que puedan analizar sus muestras contando con el equipo comunmente utilizado en análisis físico químicos.

El método físico químico que se desarrolló en el método colorimétrico del xantidrol, y el microbiológico es el método oficial de cilindro - placa.

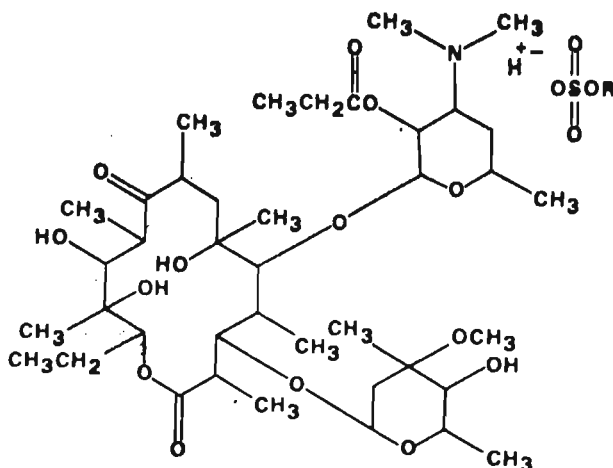
Se proporciona además al final del trabajo un apéndice que contiene las especificaciones para el estolato de eritromicina, tanto para materia prima como producto terminado, reglamentados por el Code de Regulaciones Federales de la Administración de Drogas y Alimentos - de los Estados Unidos.

El estudio fue realizado tanto en muestras nacionales, como extranjeras, tomándose como criterio para la selección, el hecho que tuvie--

ran demanda en el mercado de nuestro país.

## B. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

1. Los sinónimos para el estolato de eritromicina son: propionato de eritromicina lauril sulfato, propionato de eritromicina dodecil sulfato, sal del lauril sulfato del éster propiónico de eritromicina, monopropionil eritromicina lauril sulfato, propionil eritromicina lauril sulfato.



Fórmula empírica:  $C_{52}H_{97}NO_{18}S$  Peso molecular: 1056.43

R en la fórmula estructural representa el radical lauril, el cual es predominantemente un hidrocarburo alifático en el  $C_{12}$ . El compuesto tiene una actividad teórica de 694.9 mcg/mg de eritromicina base. <sup>1/</sup>

<sup>1/</sup> K. Florey, Analytical Profiles of Drugs Sustances, Vol. I, (New York: Academic Press, 1972), p 103.

## 2. Descripción .

El compuesto es un polvo blanco, cristalino, esencialmente inodoro y sin sabor. <sup>1/</sup>

## 3. Solubilidad.

Marsh y Weiss han reportado la solubilidad del estolato de eritromicina. <sup>2/</sup> Tabla N° 1

## 4. Espectro infrarrojo.

El espectro infrarrojo de estolato de eritromicina es el método más comúnmente aceptado para la identificación del compuesto.

El espectro de una solución clorofórmica de 10 mg de estolato de eritromicina es representado en la figura 1.

## 5. Espectro ultravioleta.

La máxima absorción de la solución acuosa del monopropionil eritromicina está a 285 nm.

El espectro ultravioleta de una solución clorofórmica de 10 mg de estolato de eritromicina, a una velocidad de la carta de 20 nm/min se representa en la figura 2.

---

<sup>1/</sup> Ibid p. 104

<sup>2/</sup> Ibid p 105

ORIGIN ESTABLISHMENT OF ERITROMICINA PERKIN-ELMER

PURITY REFERENCIA STANDARD

M.S.P.

SPEED NORMAL PAST X

SLITS NORMAL X NIDE

PHASE liquida

CONCENTRATION 10 mg/min

THICKNESS 0.200 mm

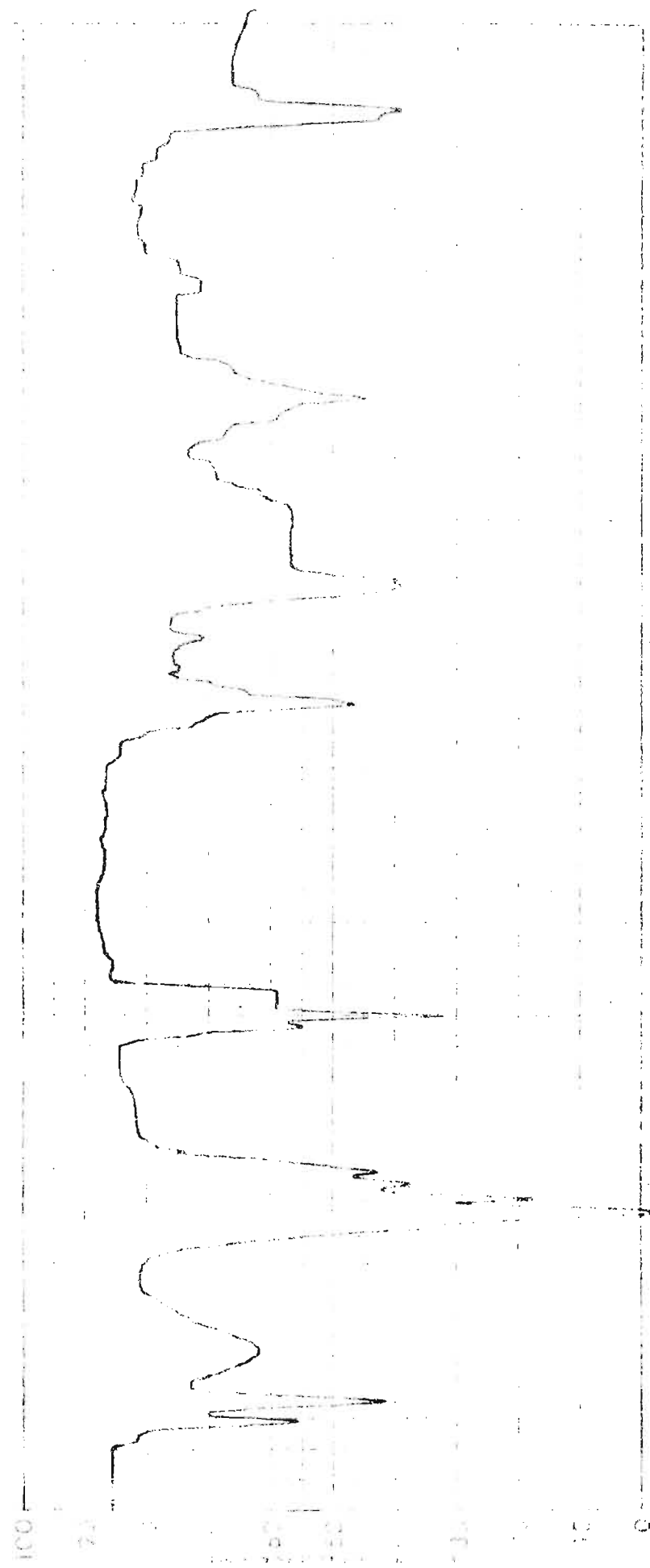
DATE 27/VI/79

OPERATOR AJM

REMARKS  
Espectro del Estolato de Eritromi-  
cina en cloroformo.

REFERENCE

4000 3500 3000 2500 2000 1500 1000



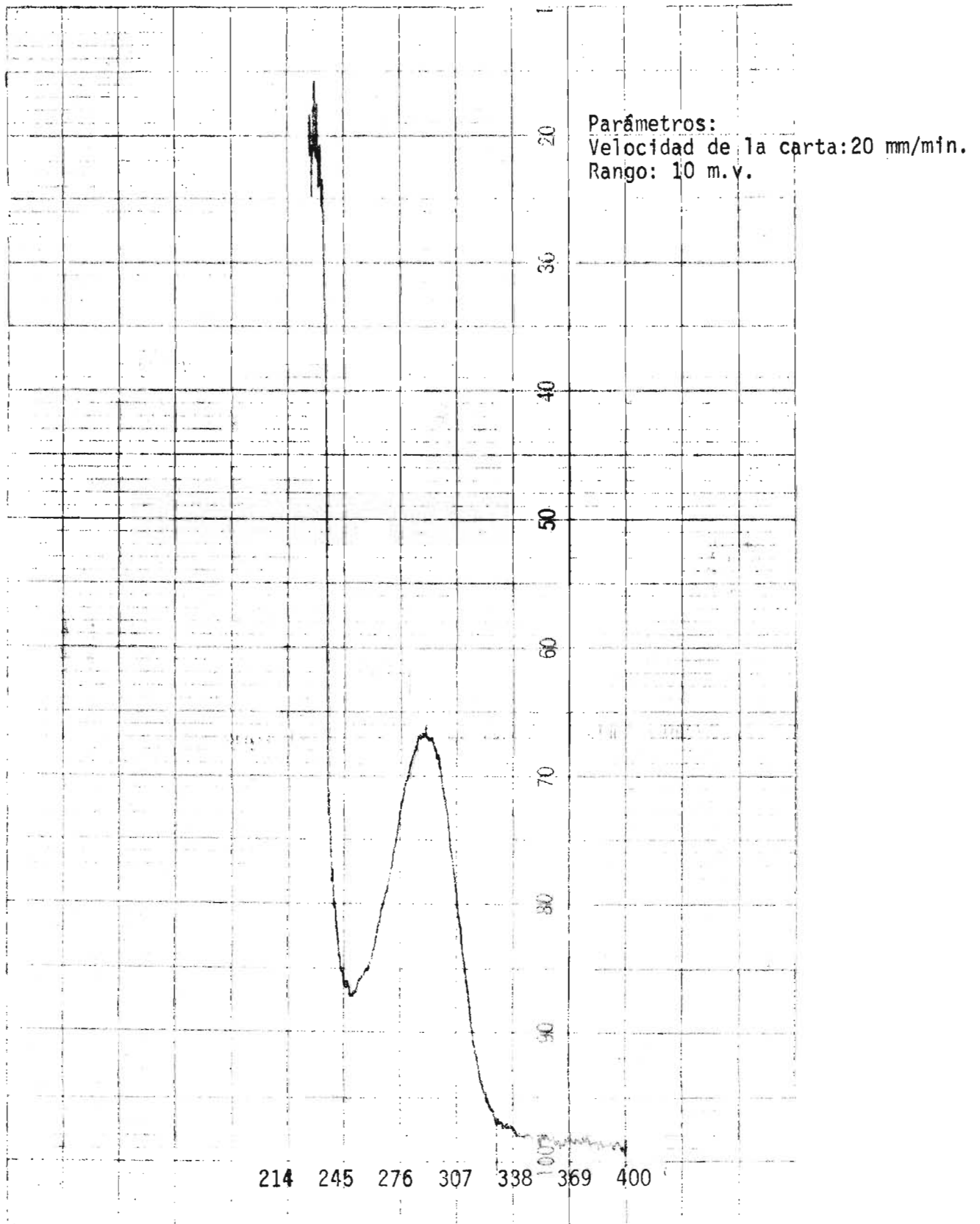


FIG.No.2. Espectro U.V. del Estolato de Eritromicina en Cloroformo a una concentración de 10mg/ml.

TABLA N.º 1

## SOLUBILIDADES DE ESTOLATO DE ERITROMICINA

S o l v e n t e	Relación de soluto a solvente mg/ml
Agua	0.160
Metanol	> 20
Etanol	> 20
Isopropanol	> 20
Alcohol isoamílico	> 20
Ciclohexano	0.080
Eter de petróleo	0.058
Benceno	0.922
Iso octano	0.050
Tetracloruro de carbono	0.058
Acetato de etilo	> 20
Acetato de isoamilo	1.250
Acetona	> 20
Metil etil cetona	> 20
Diethyl eter	0.228
Cloruro de etileno	> 20
Cloroformo	> 20
Disulfuro de carbono	0.088
Piridina	> 20
Formamida	> 20
Etilénglicol	> 20
Propilénglicol	> 20
Dimetil sulfoxide	> 20
1,4 dioxano	> 20
NaOH 0.1 N	12.330
HCl 0.1 N	0.168

## 6. Punto de Fusión.

El punto de fusión del estolato de eritromicina es 135-140°C y va acompañado de descomposición.

## 7. pka

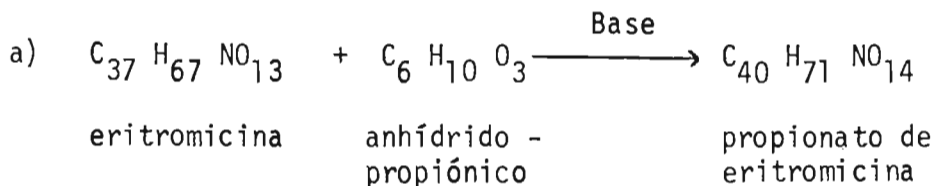
El pka para el estolato de eritromicina en 66% de dimetil formamida/34% de agua es de 6.9.

## 8. Cristalinidad.

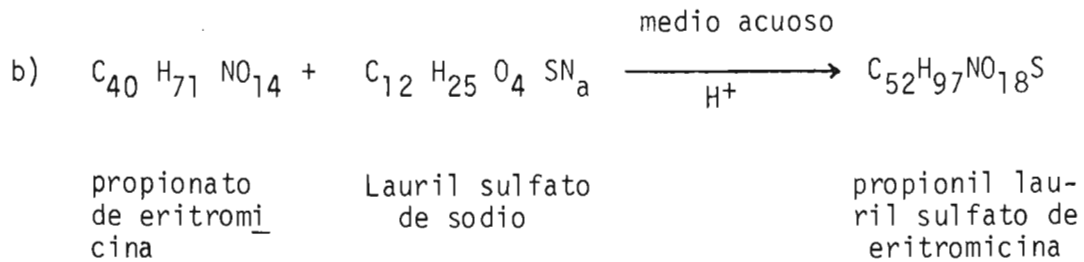
En aceite y examinado con un microscopio polarizante, el propionil lauril sulfato de eritromicina exhibe birrefringencia y posiciones de extinción cuando se gira la plataforma del microscopio.

## 9. Síntesis.

El propionil éster de eritromicina se prepara por reacción del anhídrido propiónico o el cloruro propiónico y eritromicina en presencia de bicarbonato o carbonato de potasio tal como se presenta en el paso (a). El estolato de eritromicina (paso b) se forma por la adición del lauril sulfato de sodio al éster disuelto en acetona acidificada y se aísla por dilución con agua.







## 10. Estabilidad.

El estolato de eritromicina difiere de otras formas de eritromicina en que es extremadamente estable a la hidrólisis ácida. La eritromicina liberada del éster por medio de hidrólisis alcalina está sujeta a una rápida descomposición en soluciones fuertemente ácidas. Kavanag estableció que la degradación de la eritromicina aumenta con un incremento en la temperatura y decrece con un aumento de pH, arriba de 8.0. Las soluciones acuosas bufferizadas de eritromicina base son totalmente estables a este pH.

Las soluciones acetónicas de la forma del éster son estables, mientras que preparaciones en acetona del propionil lauril sulfato de eritromicina no lo son. Los polvos y formulaciones secas son estables por más de cinco años; las preparaciones líquidas se convierten en inaceptables después de dos años debido a un sabor desagradable. <sup>1/</sup>

## 11. Productos metabólicos.

Ambas, eritromicina y propionil eritromicina, están presentes In-vivo después del uso terapéutico del estolato de eritromicina.

<sup>1/</sup> Ibid. p. 111

En estudios usando microsomas de conejo, Mao y Tardrew <sup>1/</sup> reportaron que la eritromicina es demetilada a des-N-metil eritromicina y formaldehído. El propionil eritromicina es también demetilada a des-N-metil propionil eritromicina, sin embargo, la velocidad de demetilación fue menor que la de eritromicina. El propionil des-N-metil eritromicina podría subsecuentemente convertirse a des-N-metil eritromicina. Stephens et al, demostraron que la completa actividad antibacteriana en sangre total, suero, plasma y orina en individuos, dos horas después de la quinta dosis de 250 mg de estolato de eritromicina, del 20 al 25%, estaba presente como eritromicina, y del 75 al 80% como propionil eritromicina. Esta relación permaneció relativamente constante durante el curso del tratamiento. <sup>2/</sup>

## 12. Métodos de Análisis.

En varios países, algunos autores han realizado diferentes métodos de análisis para la cuantificación del estolato de eritromicina:

### a) Análisis Espectrofotométricos

#### 1. Infrarrojo

Washburn reportó que la potencia de la eritromicina puede ser rápidamente determinada por absorbancia a  $10.46 \mu$ . La investigación de bandas localizadas a 7.29, 9.02, 9.88 y  $10.64 \mu$  determinó que solamente la última banda mostraba

<sup>1/</sup> Ibid, p. 111

<sup>2/</sup> Ibid, p.112

correlación con la actividad obtenida por el método micro - biológico. El estolato de eritromicina puede ser cuantificado por determinación de la absorbancia infrarroja a  $9.9 \mu$  siempre que la anhidroeritromicina esté ausente, debido a - que este compuesto produce incremento en la aparente potencia de la eritromicina. <sup>1/</sup>

## 2. Ultravioleta

El análisis ultravioleta para el estolato de eritromicina, - es básicamente el descrito por Kuzel y colaboradores <sup>2/</sup> quie nes desarrollaron un método de rutina para ser aplicada en - forma de dosificación, muestras en procesos y caldos de fermentación. Dicho método se basa en efectuar una suave hidrólisis alcalina de la eritromicina, la cual presenta un máximo de absorción a 236 nm. A fin de eliminar interferencias que absorben a esa misma longitud de onda se lleva un blanco lo cual se logra aplicándole un tratamiento ácido a la muestra.

Se determina la absorción a 236 nm. La diferencia de absorbancia entre los dos tratamientos leídos a una misma longitud de onda (236 nm), será la debida únicamente a la eritromicina, ya sea en el caso de muestras degradadas o en caldos de fermentación.

---

<sup>1/</sup> Ibid. p. 112

<sup>2/</sup> N.M. Kuzel and H.F. Coffey, "Automated Analysis of Erythromycin" J. Pharm. Scie. v 56, N° 4, (1967) p . 522.

Debido a que el número de muestras en un laboratorio puede ser muy grande, Kuzel introdujo la automatización del método anteriormente descrito obteniéndose gran confiabilidad. El método usa un analizador automático básico (Technicon - Auto Analyzer) y un espectrofotómetro (Hitachi Perkin Elmer).

### 3. Colorimetría

Sangavi N.M. y Chandramoan H.S. <sup>1/</sup> desarrollaron un método de ensayo basado en la estimación colorimétrica de eritromicina y sus sales (estolato, estearato y etil succinato) las cuales son hidrolizadas con HCl conc., liberando un grupo amino primario libre el cual forma un complejo coloreado con el p-dimetil amino benzaldehído en ácido acético glacial, presentando un máximo de absorción a 488 nm. El complejo coloreado es estable por 10-14 min después de la adición del HCl. La reacción obedece la ley de Beer en un rango grande de concentración; se notó que los productos degradados, microbiológicamente inactivos, interfirieron con el método propuesto. Cuando la eritromicina está mezclada con otros antibióticos, tales como: penicilinas, neomicinas, no interfirieron; las tetraciclinas dieron lecturas debilmente altas. Excipientes tales como almidón, lactosa, talco, estearato de magnesio etc. no interfirieron.

---

<sup>1/</sup> Sanghavi and Chandramoan, "Colorimetric Method of Estimation of Erytromycin". Can J. Pharm. Sci. 10(2), 59-61.

Los resultados obtenidos están de acuerdo con el método oficial microbiológico, también se pudo demostrar que es un método preciso. El método fue descrito para las sales de eritromicina, pero puede ser aplicada a la base libre y a preparaciones farmacéuticas que las contienen.

- Método Colorimétrico del Xantidrol

Existe un método colorimétrico en el cual el estolato de eritromicina al combinarse con el xantidrol ( $C_{13}H_{10}O_2$ ) o ( $C_6H_4CHOHC_6H_4O_4$ ) forma un complejo coloreado, el cual se lee a una longitud de onda de 540 nm. La reacción obedece la ley de Beer. El método es rápido y fácil de realizar.<sup>1/</sup>

- Método Colorimétrico usando Salicilaldehído

N.M. Amer, A.A. Habeeed y M.I. Walsh, <sup>2/</sup> desarrollaron un método colorimétrico adicionando una solución alcohólica de salicilaldehído a una solución alcohólica de eritromicina, produciéndose un débil color amarillo, el cual es intensificado por la adición de agua y presenta un máximo de absorción a 236 nm. Se encontró que el color fue estable en un período de algunas horas y no es afectado por el calentamiento; el color es una función de la concentración del reactivo y la reacción obedece la Ley de Beer en el rango

<sup>1/</sup> Fabio Rojas. Comunicación Personal, Laboratorios OFA, Bogotá, Colombia.

<sup>2/</sup> M.M. Amer, A.A. Habeeed y M.I. Walsh, "Colorimetric Assay for Erytromycin using Salicilaldehyde" J. Drug Res. Egypt. Vol. 6 N° 3 (1974).

de 2 a 6 mg de eritromicina base, la precisión es de 100.65% y el error probable ( $P = 0.05$ ). Los resultados concuerdan con los obtenidos en titulación no acuosa. El método simple, rápido y apropiado como método de rutina para el control de pureza de la eritromicina.

## b. Métodos Cromatográficos

### 1. Cromatografía de Capa Fina

La eritromicina y el estolato de eritromicina pueden ser separados y cuantificados por cromatografía en capa fina.<sup>1/</sup> Las muestras y estándares son aplicadas sobre placas con sílica-gel 254 en cantidades de 50 mcg de estolato de eritromicina y 5-10 mcg de eritromicina base. El solvente desarrollador es metanol. El revelador es una mezcla constituida por etanol al 95%/anisaldehído/ácido sulfúrico concentrado --- (90: 5: 5). Los valores de  $R_f$  del estolato de eritromicina y eritromicina base son 0.7 y 0.35 respectivamente.

### 2. Cromatografía Gas-Líquido

Kiyoshi Tsuji and Jhon H. Robertson desarrollaron un método para la determinación de la eritromicina y sus sales por cromatografía Gas-Líquido. El método implica una sililación previa a la cromatografía, la que es capaz de separar eritromicina A, B, C, anhidroeritromicina A, eritrosalamina, mono y diacetil eritromicina A.

<sup>1/</sup> Florey. Op cit. p 20

La desviación estándar relativa del método para eritromicina A, es menor del 1%.

Los datos indican que todos los hidrógenos activos de los grupos hidroxilo, en esos compuestos, fueron sililados. Este método es, según sus autores, el primero en describir la separación como una buena cuantificación de varias clases de eritromicina por cromatografía de gas. <sup>1/</sup>

### c. Métodos de Análisis Microbiológicos

1. Los métodos para determinar la actividad del estolato de eritromicina se dan en el Analytical Microbiology, <sup>2/</sup> Vols. 1 y 2, y en el Code of Federal Regulation del Food and Drug Administration. <sup>3/</sup>

Se hacen ensayos turbidimétricos usando Staphylococcus aureus ATCC 9144 con un rango de concentración de 0.05 a 2.0 mcg de actividad de eritromicina/ml. Para el método de difusión en placa se emplea Sarcina lutea para la eritromicina liberada del estolato de eritromicina, usando un rango de concentración de 0.5 a 2.0 mcg/ml de la muestra. La prueba es satisfactoria además para la estimación del estolato de eritromicina en líquidos corporales.

<sup>1/</sup> Kiyoshi Tsuji and John H. Robertson. "Determination of Erythromycin and its Derivates by Gas-Liquid Chromatography". Anal. Chem. Vol. 43, N° 7 June 1971.

<sup>2/</sup> Kavanagh F., Analytical Microbiology. Vol. I, Academic Press(1963)

<sup>3/</sup> Code of Federal Regulation del Food and Drug Administration.

El estolato de eritromicina debe ser disuelto en una pequeña cantidad de metanol y llevar a volumen con buffer fosfato pH 8. Es necesaria la hidrólisis, ya sea a 25°C durante toda la noche o a 60°C por dos horas para liberar la eritromicina - base, antes de determinar la actividad microbiológica .<sup>1/</sup>

## 2. Análisis Biocromatográficos

Stephen y colaboradores reportaron un método de dos pasos: cromatografía en papel y difusión en placa para la separación del propionil eritromicina en fluidos corporales. En este procedimiento, el cromatograma se desarrolla primero en metanol absoluto para separar el antibiótico de las proteínas del fluido. El cromatograma es entonces desarrollado por técnica descendente en un sistema conteniendo  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaCl}$ , dioxano y metil etil cetona. Resultando zonas de inhibición que son visualizadas aplicando al cromatograma agar nutritivo conteniendo Sarcina lutea como el microorganismo de prueba. <sup>2/</sup>

---

<sup>1/</sup> <sup>2/</sup> K. Florey Op Cit., 1. 115



## A. MATERIALES Y REACTIVOS

1. Materiales y reactivos del método microbiológico
2. Materiales y reactivos del método físico químico

## B. MÉTODOS

1. Muestreo
2. Métodos de valoración del estolato de eritromicina en jarabe por el método microbiológico.
3. Método de valoración de eritromicina en jarabe por el método físico químico (Xantidrol).

## A. MATERIALES Y REACTIVOS

### 1. Método Microbiológico

#### a) Material

Estufa de 100- 300°C

Autoclave Webeco modelo B N.º fábrica 72244

Incubadora Napco Modelo 320

Medidor de zonas Fisher Lilly

Cilindros de acero inoxidable ( $6.0 \pm 0.1$  mm de diámetro

Interior por  $8.0 \pm 0.1$  mm de diámetro exterior por  $10 \pm 0.1$  mm  
de longitud

Cajas de Petri (20 x 100 mm) con tapadera de porcelana.

Pipetas Mohr de 25 ml (estériles)

Pipetas volumétricas de 1 ml

Botellas Roux

Tubos con tapón de rosca de 16 x 125 mm

Balones volumétricos de 10, 25 y 100 ml

#### b) Reactivos

Solución amortiguadora de fosfato pH  $7.9 \pm 0.1$

Solución salina al 0.9 %

Metanol calidad reactivo

Estolato de eritromicina referencia estandar

c) Medios de Cultivo

Antibiotic medium N° 1 (Difco)

Antibiotic medium N° 11 (Difco)

2. Método Físico Químicoa) Materiales

Tubos de ensayo

Pipetas volumétricas de 1, 2, 4, 5, y 10 ml

Balones volumétricos de 50, 100 y 200 ml

b) Equipo

Baño de vapor

Espectrofotómetro Varian modelo 324 S

Espectrofotómetro U.V. visible Perkin Elmer modelo 124

Registrador Perkin Elmer modelo 56

Espectrofotómetro infrarrojo Perkin Elmer modelo 710 A

Medidor de humedad Beckman KF4B aquameter

Phmetro Perkin Elmer modelo coleman 80

c) Reactivos

Acido acético glacial

Acido clorhídrico 37%

Xantidrol ( $C_6H_4CHOHC_6H_4O$ )

Estolato de eritromicina referencia estandar

Cloroformo

## B. MÉTODOS

### 1. Muestreo

Se seleccionaron cinco muestras, cada una de las cuales representaba a un laboratorio farmacéutico determinado, dos de ellas venían en forma de suspensión y tres eran polvo seco para suspensión oral, estas últimas se reconstituyeron agregando la cantidad de agua hervida y fría especificada en la etiqueta.

Se tomó como criterio para la selección las que tuvieron más demanda en nuestro país, siendo tanto nacionales como extranjeros y se recogieron en las condiciones tales como estaban en el estante del establecimiento farmacéutico.

Cada muestra fue subdividida en cinco alícuotas reproducibles, las cuales fueron sometidas a ensayos individuales en días diferentes aplicándoles el método microbiológico y el físico químico.

### 2. Método Microbiológico

El primer método sobre el cual se trabajó fue el de valoración de estolato de eritromicina como materia prima; a fin de estandarizarla ya que en el ensayo se utilizaría como estandar de trabajo (working standar).

El método oficial es el microbiológico, el cual aparece en el Code of Federal Regulation. Title 21 parts 148 e. 5, 148 e, 12. - 141.110.

El método se basa en la determinación de la potencia del estolato de eritromicina por medición de los halos de inhibición que ocasiona el antibiótico en el crecimiento de Sarcina lutea también conocida con el nombre de Micrococcus luteus ATCC 9341.

#### Preparación de la Muestra

Reconstituir la muestra como lo indica la etiqueta. Tomar un volumen representativo exactamente medido de la suspensión reconstituida y añadir suficiente alcohol metílico para dar una concentración de 2.5 mg de eritromicina base/ml. (estimado). Diluir esta mezcla con suficiente buffer fosfato pH 8.0 0.1 M para dar una concentración de 1.0 mg de eritromicina base/ml (estimado). Hidrolizar en un baño de agua a temperatura constante de 60°C por 2 hrs. o a temp. ambiente por 16-18 hrs. Diluir entonces con buffer fosfato pH 8.0, 0.1 M hasta la concentración de referencia de 1 mcg de eritromicina base por ml.

#### Preparación del microorganismo de prueba

La cepa con la que se trabajó fue proporcionada por la ATCC. <sup>1/</sup>, la cual viene liofilizada en un frasco de doble vial.

#### Indicador para abrir el frasco (vidrio blando)

a) Calentar vigorosamente el extremo final externo del contenedor

---

<sup>1/</sup> American Type Culture Collection. 12301 Paerklawn, Drive Rockville, Maryland (20852), U.S.A.

en la llama de un mechero bunsen y mantenerlo inmóvil por un corto período de tiempo, añadir una o dos gotas de agua para quebrar el vidrio; remover el casquillo contenedor con un golpe de un lápiz y otro objeto similar, remover el vial interior.

b) Preparación del vial solo (vidrio borosilicato)

Estos viales están encerrados en una piel de celulosa la cual debe ser removida (ya sea con una hoja puntiaguda o por humedecimiento con agua por algunos minutos) Limar la ampolleta vigorosamente con una hoja con filo aproximadamente a una pulgada de la punta, desinfectar la ampolla con una gaza humedecida con alcohol, envolver la gaza alrededor de la ampolla y quebrar alrededor del área limada.

Para hacer crecer el cultivo

Asépticamente añadir al material liofilizado 0.3 - 0.4 ml (no más) de medio líquido, con una pipeta pasteur. Mezclar bien y transferir el total de la mezcla a un tubo (conteniendo de 5-6 ml) del caldo recomendado. Las últimas gotas de la suspensión pueden ser transferidas a un tubo de agar inclinado. Incubar a la temperatura adecuada.

Preparación del microorganismo de prueba

El microorganismo deberá mantenerse a 5°C en tubos inclinados de medio de antibiótico N° 1 efectuando resiembras cada semana. Tres días antes de la prueba tomar un tubo que haya sido resem

brado 18 horas antes y agregarle 3 ml de solución salina estéril 0.9 %. Agitar hasta remover el crecimiento del agar y con esta suspensión inocular la superficie de una botella de Roux conteniendo 250 ml de antibiótico N° 1.

Incubar a 32-35°C durante 24 horas. Al término de este tiempo adicionar 50 ml de la solución salina estéril 0.9% . Remover el crecimiento y guardar esta suspensión en condiciones estériles.

#### Ajuste de la suspensión del microorganismo de prueba

Una alícuota de la suspensión se ajusta diluyéndola hasta obtener un 25% de transmisión de luz a una longitud de onda de 580 nm y con este dato se ajusta el volumen total de la suspensión. Se determina el volumen de la suspensión ajustada que se agregará a cada 100 ml de agar, o del medio de cultivo adecuado, por medio de pruebas en placas o en tubos. La suspensión del microorganismo de prueba se conserva en refrigeración y dura 2 semanas.

En el caso del estolato de eritromicina la cantidad de la suspensión así estandarizada que se le agregará a cada 100 ml de medio licuado y enfriado a 48°C es de 1.5 ml.

#### Preparación de las cajas de petri para efectuar la prueba

Adicionar 21 ml de antibiótico medium N° 11 a cada caja pre -

viamente estéril. Usar 12 cajas para la curva tipo y tres para cada problema. Tapar las cajas con cubierta de porcelana porosa y dejar solidificar el medio. Añadir a todas las cajas, 4 ml -- de antibiótico N° 11 inoculado a 48°C (como se indicó anteriormente) y con rápidos movimientos circulares distribuirlos uniformemente en la superficie de la capa base. Dejar solidificar y colocar los cilindros a intervalos de más o menos 60° en un radio de 2.8 cm de la caja.

### Procedimiento General para el Ensayo

#### Preparación del standar

Preparar una solución de referencia estandar USP de estolato de eritromicina pesando con exactitud una cantidad equivalente a 10 mg de eritromicina base en un matraz volumétrico de 10 ml, -- disolver con metanol y aforar.

Tomar 1.0 ml de la solución anterior y transferir a un matraz volumétrico de 100 ml, llevar a volumen con solución reguladora pH 8 (solución tipo concentración 10 mcg/ml) con esta solución preparar la siguiente serie de diluciones:

Solución tipo (ml)	Solución reguladora fosfato pH8 (ml)	Concentración de eritromicina (mcg/ml)
a) 0.6 llevar a vol	10	0.6
b) 0.8 llevar a vol	10	0.8
c) 10.0 llevar a vol	100	1.0
d) 1.2 llevar a vol	10	1.2
e) 1.5 llevar a vol	10	1.5



Esta curva determina la relación entre la concentración del antibiótico y el diámetro de las zonas de inhibición y sirve para interpolar los valores de los problemas y así determinar la concentración correspondiente de la muestra ensayada.

### Valoración del Estolato de Eritromicina

#### Preparación de la curva tipo

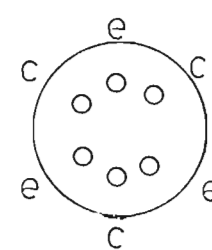
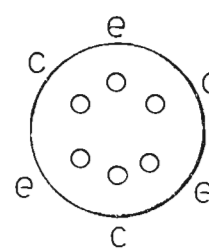
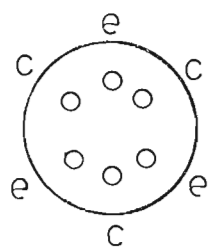
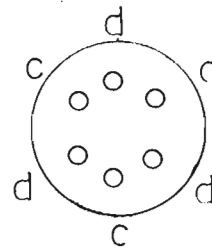
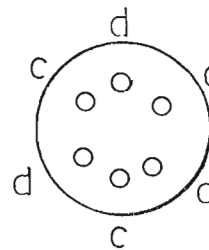
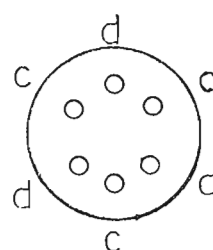
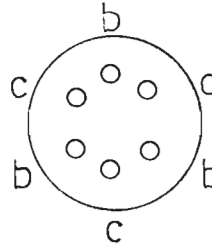
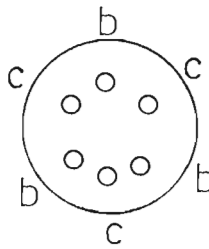
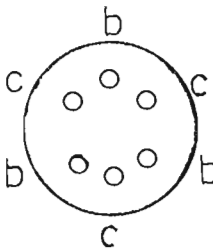
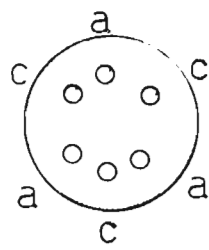
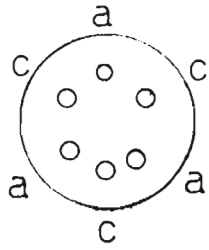
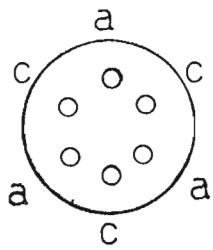
Preparar cuatro series de tres cajas para cada dilución (a,b,d,e) tomando como referencia la dilución (c), la cual será incluida en todas las cajas. Utilizando una pipeta pasteur llenar en forma alterna tres cilindros en cada una de las cajas de una serie, con la dilución que se prueba, y los tres restantes con la dilución de referencia (c) (ver diagrama)

En donde:

- a) = es la concentración del standard 0.6 mcg/ml
- b) = es la concentración del standar 0.8 mcg/ml
- c) = es la concentración del standar 1.0 mcg/ml (el cual va incluido en todas las placas)
- d) = es la concentración del standar 1.2 mcg/ml
- e) = es la concentración del standar 1.5 mcg/ml

Colocar las cajas en la incubadora a 37°C durante 16-18 horas. Re

# PREPARACIÓN DE LAS PLACAS PARA LA ELABORACION DE LA CURVA TIPO.



tirar los cilindros y efectuar las lecturas del diámetro de las zonas de inhibición utilizando un medidor de zonas Fisher Lilly. Promediar las 36 lecturas correspondientes a la dilución de referencia (c) (gran promedio) en las doce cajas (de los estandares). Promediar por separado las 9 lecturas correspondientes a la dilución (c) de las tres cajas de una serie, y también las nueve lecturas correspondientes a la dilución por probar de la curva tipo de cada serie (a, b, d, e).

Corregir los valores promedios obtenidos para cada una de las concentraciones de la curva tipo probadas en las cuatro series de cajas de la siguiente manera:

Tomar el promedio de las 36 lecturas (gran promedio) correspondientes a la dilución de referencia (c) y restarle algebraicamente el promedio de las nueve lecturas obtenidas para la misma dilución (c) en las tres cajas de la serie correspondiente a la dilución que se prueba. El valor obtenido así, sumarlo algebraicamente al promedio de las nueve lecturas correspondientes a la dilución que se prueba y este valor corregido es el que se utiliza para construir la curva tipo. Usando papel semilogarítmico de dos ciclos, trazar la curva de la forma siguiente:

Graficar los valores correspondientes a las concentraciones en  $\mu\text{cg/ml}$  en las ordenadas y los valores corregidos de las lecturas correspondientes a cada una de las diluciones, en el eje de las abscisas y trazar la recta a través de los puntos.

NOTA: Se puede también construir la curva tipo a partir de los diámetros de inhibición corregidos utilizando la siguiente ecuación:

$$L = \frac{3a + 2b + c - e}{5}$$

$$H = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$$

Donde:

L = Cálculo del diámetro para la concentración más baja del estandar de la curva tipo.

H = Cálculo del diámetro para la concentración más alta del estandar en la curva tipo.

c = Promedio del diámetro de las 36 lecturas de la solución de referencia estandar (gran promedio)

a.b.d.e= Promedio de los valores corregidos para las otras soluciones estandar.

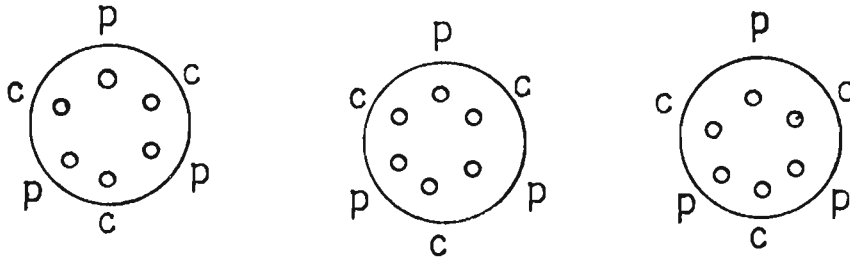
### MUESTRA PROBLEMA

Utilizar series de tres cajas para cada muestra problema.

Llenar tres de los seis cilindros de cada caja con la solución de referencia (c) y los tres restantes con la solución problema (P).

Colocar las cajas en la incubadora a 37°C durante 16-18 horas, me-

dir los halos de inhibición usando un medidor de zonas Fisher-Lilly



En donde:

P = Solución de la muestra, la cual va en una concentración de 1.0 mcg/ml

c = Concentración del estándar de 1.0 mcg/ml (concentración intermedia y que va incluida en todas las placas).

### CALCULOS

Promediar las lecturas correspondientes a la solución de referencia (c) y a la solución problema, si el promedio del problema da un valor más grande que el promedio de la solución de referencia (c), sumar la diferencia entre ambos al 'gran promedio'. Si el promedio del problema es más pequeño que el promedio de la solución de referencia, restar la diferencia entre ambos, del gran promedio.

Este valor corregido del problema es el que se interpola en la curva tipo y se determina la concentración.

Calcular la cantidad de eritromicina base utilizando la siguiente fórmula:

$$c \times d = \text{mg de eritromicina base en la muestra analizada}$$

Donde:

c = Concentración del antibiótico interpolada

d = Factor de dilución

mg de eritromicina base \_\_\_\_\_ Alícuota tomada (1 ml)  
en muestra analizada

Y \_\_\_\_\_ 5 ml

Donde:

Y = mg de eritromicina base en 5 ml de suspensión

$$\% \text{ sobre lo rotulado} = \frac{125 \text{ mg}}{Y} \times 100\%$$

### 3. Método Físico Químico del Xantidrol

Disolver 10 mg de xantidrol en unos 90 ml de ácido acético glacial, agregar 1 ml de ácido clorhídrico y completar a volumen de 100 ml con ácido acético glacial.

#### Preparación de la Solución del Estandar

Pesar la cantidad de referencia estandar o estandar de trabajo -

(working standar) que equivalga a 10 mg de eritromicina.

Disolver en unos 60 ml de ácido acético glacial, completar a 100 ml con el mismo solvente.

#### Preparación de la Muestra

Tomar un volumen que contenga 100 mg de eritromicina base. Disolver en unos 60 ml de ácido acético glacial. Completar a 100 ml - con el mismo solvente y filtrar la solución . Tomar una alícuota de 10 ml y diluir a 100 ml con ácido acético glacial.

#### Procedimiento

- a) En cada uno de dos tubos de ensayo, colocar 1 ml de la solución del estandar, añadir 4 ml de la solución del xantidrol.
- b) En cada uno de dos tubos de ensayo, colocar 1 ml de la solución de la muestra, añadir 4 ml de la solución de xantidrol.
- c) En un tubo de ensayo colocar 1 ml de ácido acético glacial y - añadir 4 ml de xantidrol.
- d) Calentar los tubos durante 10 minutos en baño de vapor.
- e) Enfriar los tubos rápidamente en agua helada
- f) Determinar la absorbancia de las soluciones a una longitud de onda de 540 nm utilizando como blanco el tubo preparado como se indica en la sección (c).

CALCULO

El porcentaje de eritromicina se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{mg de eritromicina base/ml} = \frac{A_M \times C_{st} \times F_D}{A_{St} \times V}$$

Lo anterior expresa la cantidad de eritromicina base encontrada - por ml. La etiqueta rotula eritromicina base por cucharadita -- (5 ml), por lo que el valor anterior debe multiplicarse por 5.

% sobre lo rotulado =

$$\begin{array}{l} 125 \text{ mg} \text{-----} 100\% \\ Y \text{-----} x \end{array}$$

En donde:

$A_M$  = Absorbancia de la muestra

$C_{St}$  = Concentración del estandar

$F_D$  = Factor de dilución

$A_{St}$  = Absorbancia del estandar

y = mg de eritromicina base por 5 ml

V = alícuota tomada (en ml)



En el presente capítulo encontraremos los resultados obtenidos de las determinaciones aplicadas a las muestras analizadas. Tal como se detalla a continuación:

1. pH (ver tabla N° 2)
2. Humedad (ver tabla N° 2)
3. Diámetros de inhibición ya corregidos de las muestras y su correspondiente valor interpolado en la curva de calibración (tabla N° 3)
4. Curvas tipos que se trazaron para obtener los valores interpolados de las muestras en las diferentes determinaciones (ver gráficas - N° s 1, 2, 3, 4, 5).
5. Potencias encontradas para las muestras según el método microbiológico (% sobre lo rotulado).
6. Lecturas obtenidas por el método físico químico (ver tabla N° 5)
7. Concentración de las muestras según el método físico químico (% sobre lo rotulado) (ver tabla N° 6)
8. Comparación de los resultados obtenidos por los dos métodos ensayados (ver tabla N° 7)

#### Determinación de Humedad según el Método de Karl Fisher

Se les determinó humedad a las 3 muestras cuya presentación es la de polvo para suspensión oral, siguiendo el método directo de Karl Fisher, usando como solvente para preparar las muestras una mezcla -

de metanol: cloroformo: tetracloruro de carbono (1:2:2) tal como lo especifica el CFR <sup>1/</sup>. Se usó tartrato de sodio para determinar el equivalente de agua del reactivo de Karl Fisher:

Se obtuvieron los siguientes datos:

- Cantidad del reactivo de Karl Fisher gastados para determinar su equivalente de agua: 11.01 ml.
- Cantidad de tartrato de sodio utilizado para estandarizar el reactivo = 200 mg.
- Cantidad pesada de la muestra para el análisis = 300 mg.
- ml del reactivo de Karl Fisher gastados para la muestra N° 1=2.02 ml
- ml del reactivo de Karl Fisher gastados para la muestra N° 2=2.10 ml
- ml del reactivo de Karl Fisher gastados para la muestra N° 3=1.57 ml
- Contenido de H<sub>2</sub>O en tartrato de sodio deshidratado = 15.66 %

#### CALCULOS

$$1 \text{ ml del reactivo de K.F} = \frac{200 \text{ mg} \times .1566}{11.01 \text{ ml}}$$

$$1 \text{ ml. del reactivo de K.F.} = 2.844 \text{ mg de H}_2\text{O}$$

Este valor puede ser usado en titulaciones subsecuentes para determinar el contenido de humedad de las muestras.

<sup>1/</sup> Code of Federal Regulations

Determinación de Humedad de las Muestras

Utilizando los datos detallados anteriormente tenemos:

Para la muestra N° 3 tenemos:

$$\begin{array}{rcl} 1 \text{ ml del R. de K.F.} & \text{-----} & 2.844 \text{ mg de H}_2\text{O} \\ 2.02 \text{ ml} & \text{-----} & x \end{array}$$

$$x = 5.73 \text{ mg de H}_2\text{O en el peso de muestra}$$

$$\begin{array}{rcl} 5.73 \text{ mg} & \text{-----} & 300 \text{ mg} \\ x & \text{-----} & 100 \text{ mg} \end{array}$$

$$x = 1.91 \%$$

Contenido de humedad en la muestra N° 3 = 1.91%

Para la muestra N° 4 tenemos:

$$\begin{array}{rcl} 1 \text{ ml del R. de K.F.} & \text{-----} & 2.844 \text{ mg de H}_2\text{O} \\ 2.10 \text{ ml} & \text{-----} & x \end{array}$$

$$x = 5.97 \text{ mg de H}_2\text{O en el peso de M}$$

$$\begin{array}{rcl} 5.97 \text{ mg} & \text{-----} & 300 \text{ mg} \\ x & \text{-----} & 100 \text{ mg} \end{array}$$

$$x = 1.99\%$$

Contenido de humedad en la muestra N° 4 = 1.99%

Para la muestra N° 5 tenemos:

$$\begin{array}{r} 1 \text{ ml del R. de K.F.} \quad \text{-----} \quad 2.844 \text{ mg} \\ 1.57 \quad \quad \quad \text{-----} \quad x \end{array}$$

$$x = 4.46 \text{ mg de H}_2\text{O en el peso de M}$$

$$\begin{array}{r} 4.46 \text{ mg de H}_2\text{O} \quad \text{-----} \quad 300 \text{ mg} \\ x \quad \quad \quad \text{-----} \quad 100 \text{ mg} \end{array}$$

$$x = 1.48 \%$$

Contenido de H<sub>2</sub>O en la muestra N° 5 = 1.48 %

TABLA N° 2

DETERMINACION DE pH Y HUMEDAD DE LAS MUESTRAS ENSAYADAS

Clase de De-terminación	Límites	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>
pH	No menor de 5.0	5.6	5.4	5.3	5.7	6.0
	No mayor de 7.0					
Humedad	No mayor del 2%	-	-	1.91%	1.99%	1.48 %

TABLA N° 3

RESULTADOS CORRESPONDIENTES A DIÁMETROS DE INHIBICION CORREGIDOS Y SU CORRESPONDIENTE VALOR INTERPOLADO EN LA CURVA

N° de Determinaciones	M <sub>1</sub> (mm)	D	M <sub>2</sub> (mm)	D	M <sub>3</sub> (mm)	D	M <sub>4</sub> (mm)	D	M <sub>5</sub> (mm)	D
1a.	22.25	1.13	21.65	0.90	21.50	0.85	21.95	1.0	22.53	1.25
2a.	21.57	0.895	21.50	0.865	21.52	0.875	21.44	0.85	22.27	1.10
3a.	21.47	1.05	21.36	1.0	20.71	0.82	21.66	1.12	21.49	1.08
4a.	21.80	0.95	21.73	0.92	21.80	0.95	21.84	0.975	22.76	1.33
5a.	22.0	1.05	21.87	0.99	21.46	0.88	21.47	0.88	21.88	1.01

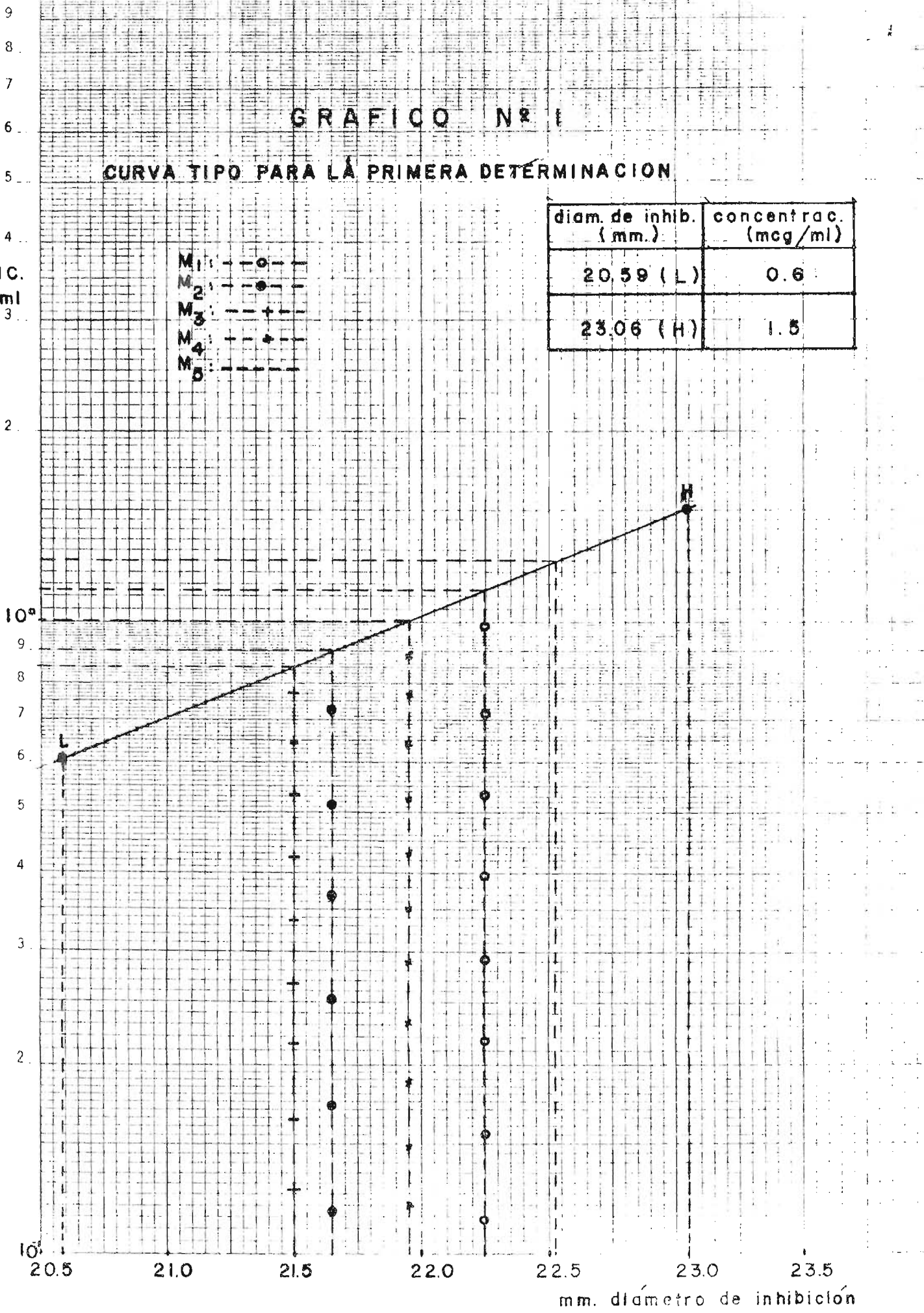
Donde: D = Valores interpolados en la gráfica correspondiente a los problemas  
M<sub>1</sub> --- M<sub>5</sub> = Diámetros de inhibición corregidos correspondientes a los problemas

# GRAFICO Nº 1

## CURVA TIPO PARA LA PRIMERA DETERMINACION

- M<sub>1</sub>: ○
- M<sub>2</sub>: ●
- M<sub>3</sub>: +
- M<sub>4</sub>: \*
- M<sub>5</sub>: -

diam. de inh. (mm.)	concentrac. (mcg/ml)
20.59 (L)	0.6
23.06 (H)	1.5



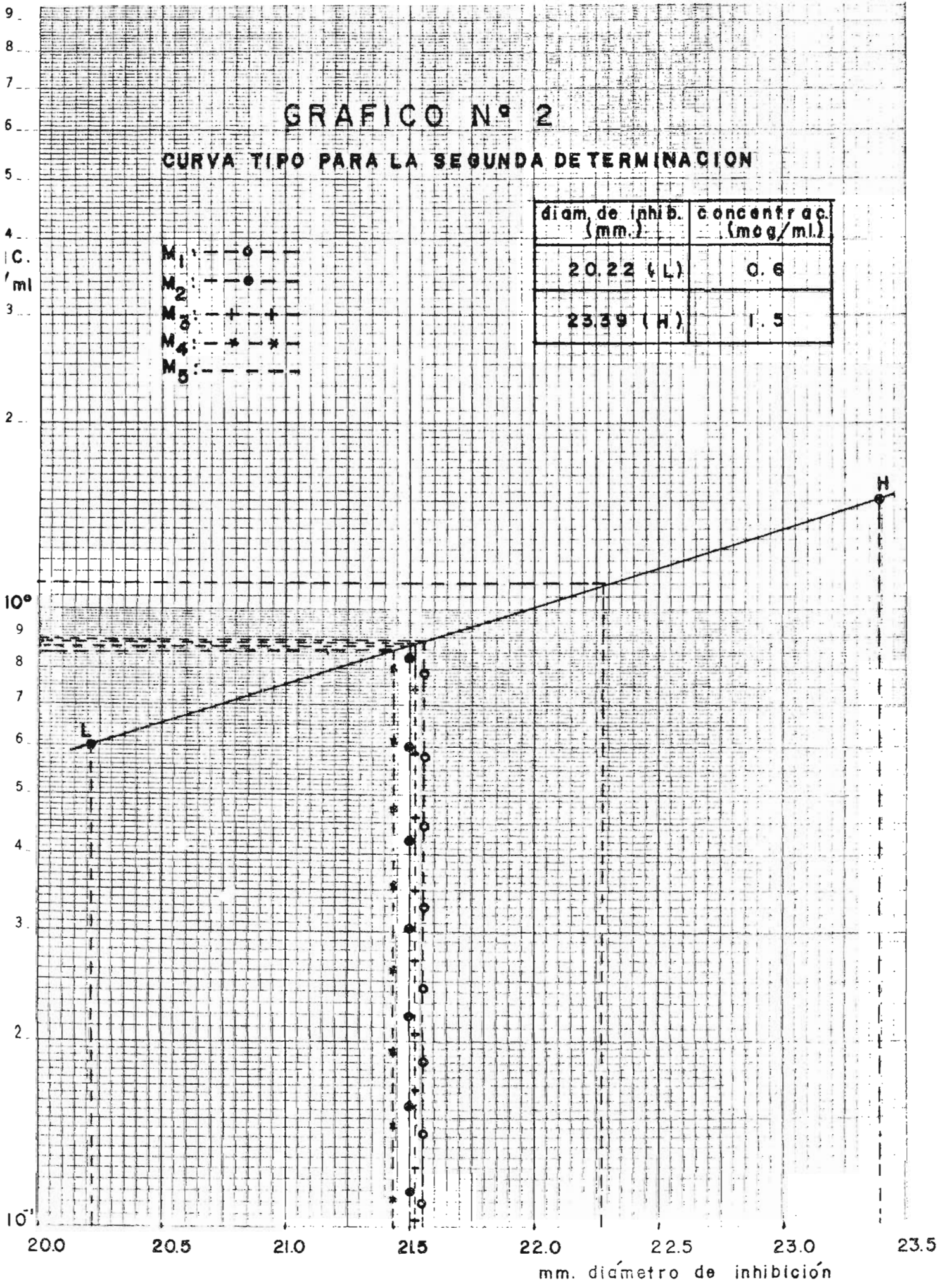
mm. diámetro de inhibición

# GRAFICO N° 2

## CURVA TIPO PARA LA SEGUNDA DETERMINACION

M<sub>1</sub>: - - - o - - -  
 M<sub>2</sub>: - - - ● - - -  
 M<sub>3</sub>: - - - + - - -  
 M<sub>4</sub>: - - - \* - - -  
 M<sub>5</sub>: - - - - - - -

diam. de inhib. (mm.)	concentrac. (mcg/ml.)
20.22 (L)	0.6
23.39 (H)	1.5



200 205 210 215 220 225 230 235 mm. diámetro de inhibición

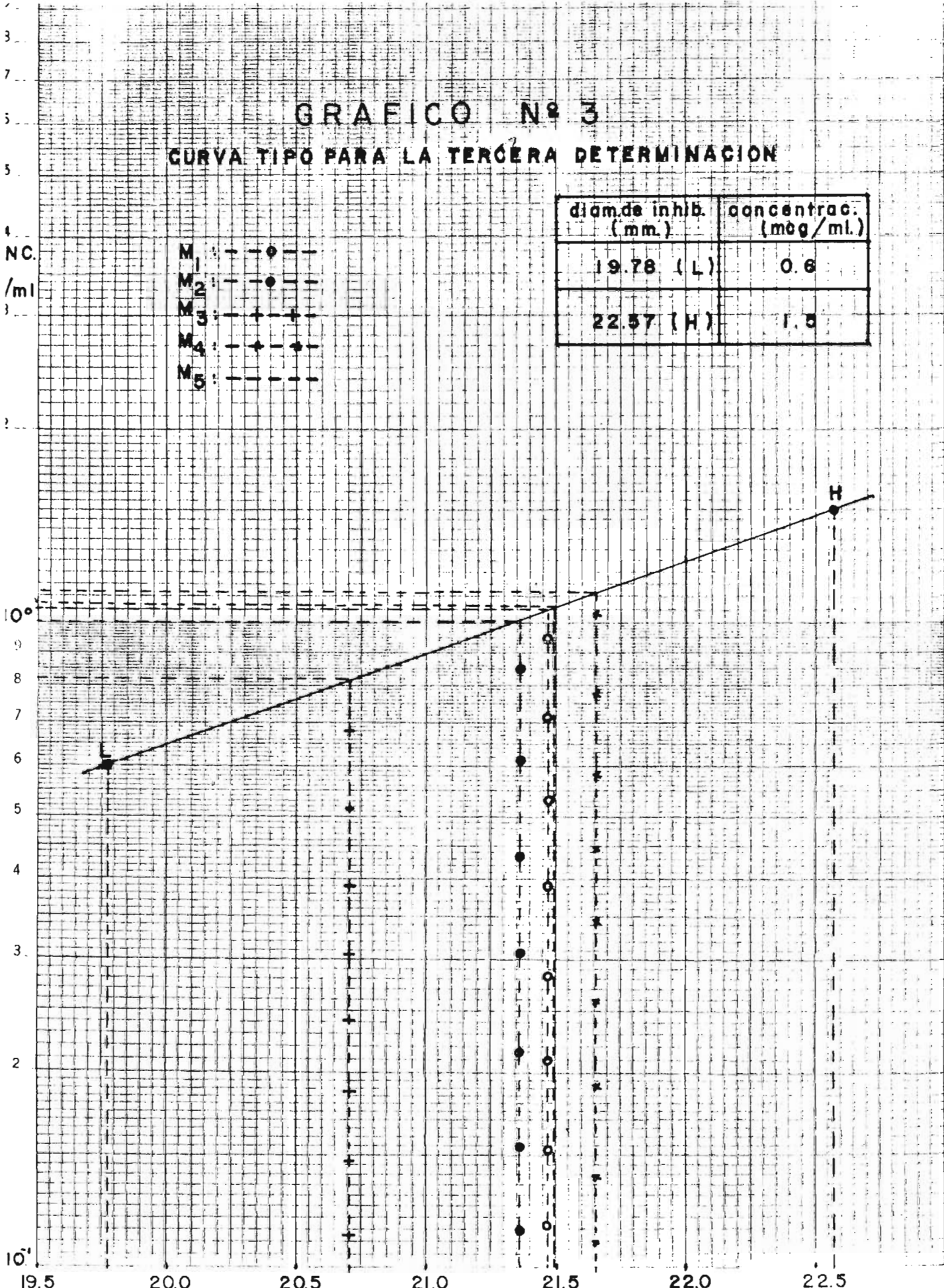


# GRAFICO N° 3

## CURVA TIPO PARA LA TERCERA DETERMINACION

NC.   
 /ml   
 M<sub>1</sub>: - - ○ - -   
 M<sub>2</sub>: - - ● - -   
 M<sub>3</sub>: - - + - -   
 M<sub>4</sub>: - - \* - -   
 M<sub>5</sub>: - - - - -

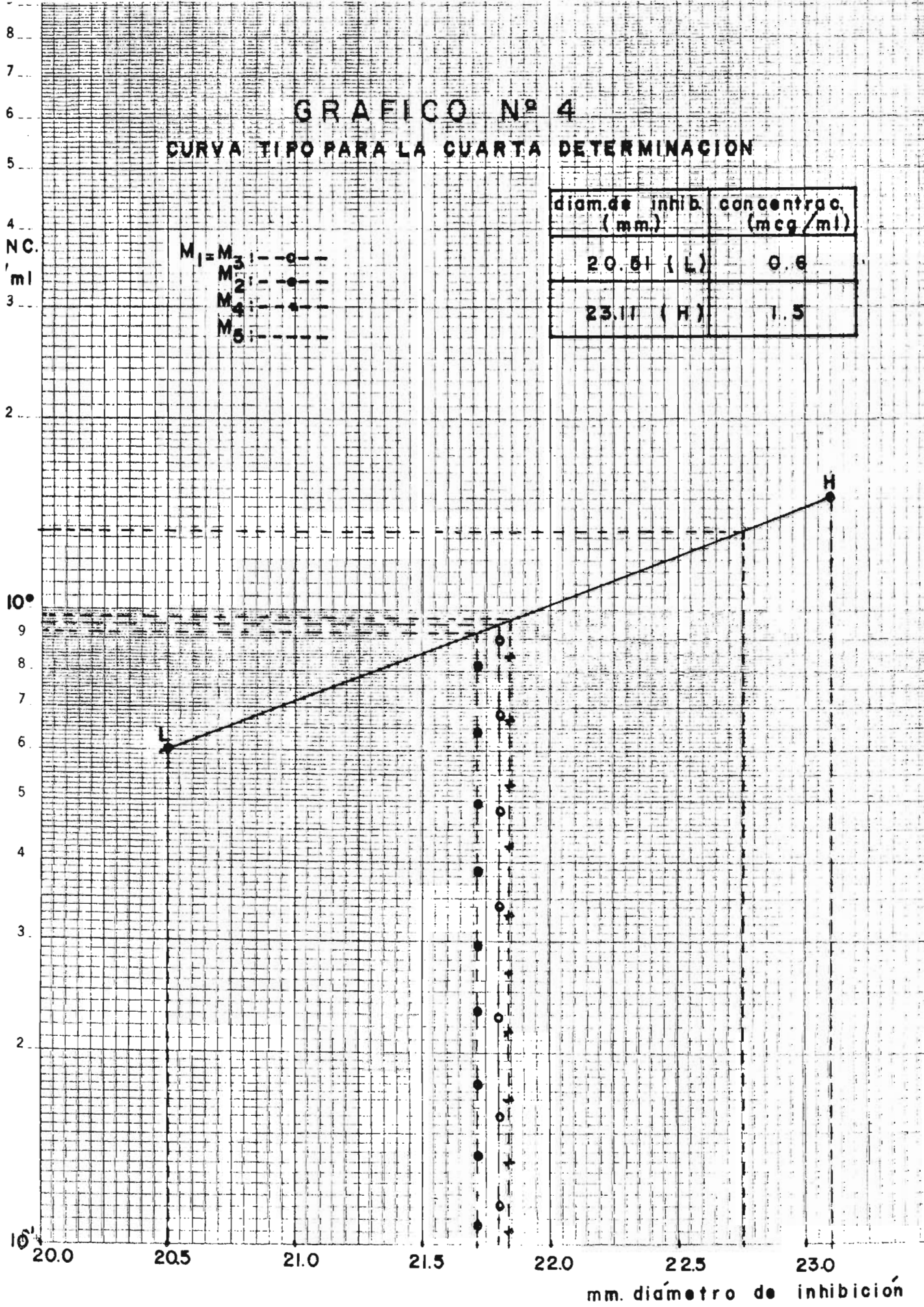
diam.de inhíb. (mm.)	concentrac. (mg/ml.)
19.78 (L)	0.6
22.57 (H)	1.5



mm. diámetro de inhibición

# GRAFICO Nº 4

## CURVA TIPO PARA LA CUARTA DETERMINACION



$M_1 = M_3$  : -o- -  
 $M_2$  : -●- -  
 $M_4$  : -▲- -  
 $M_5$  : -+ -

diam. de inhib. (mm)	concentrac. (mcg/ml)
20.51 (L)	0.6
23.17 (H)	1.5

mm. diámetro de inhibición

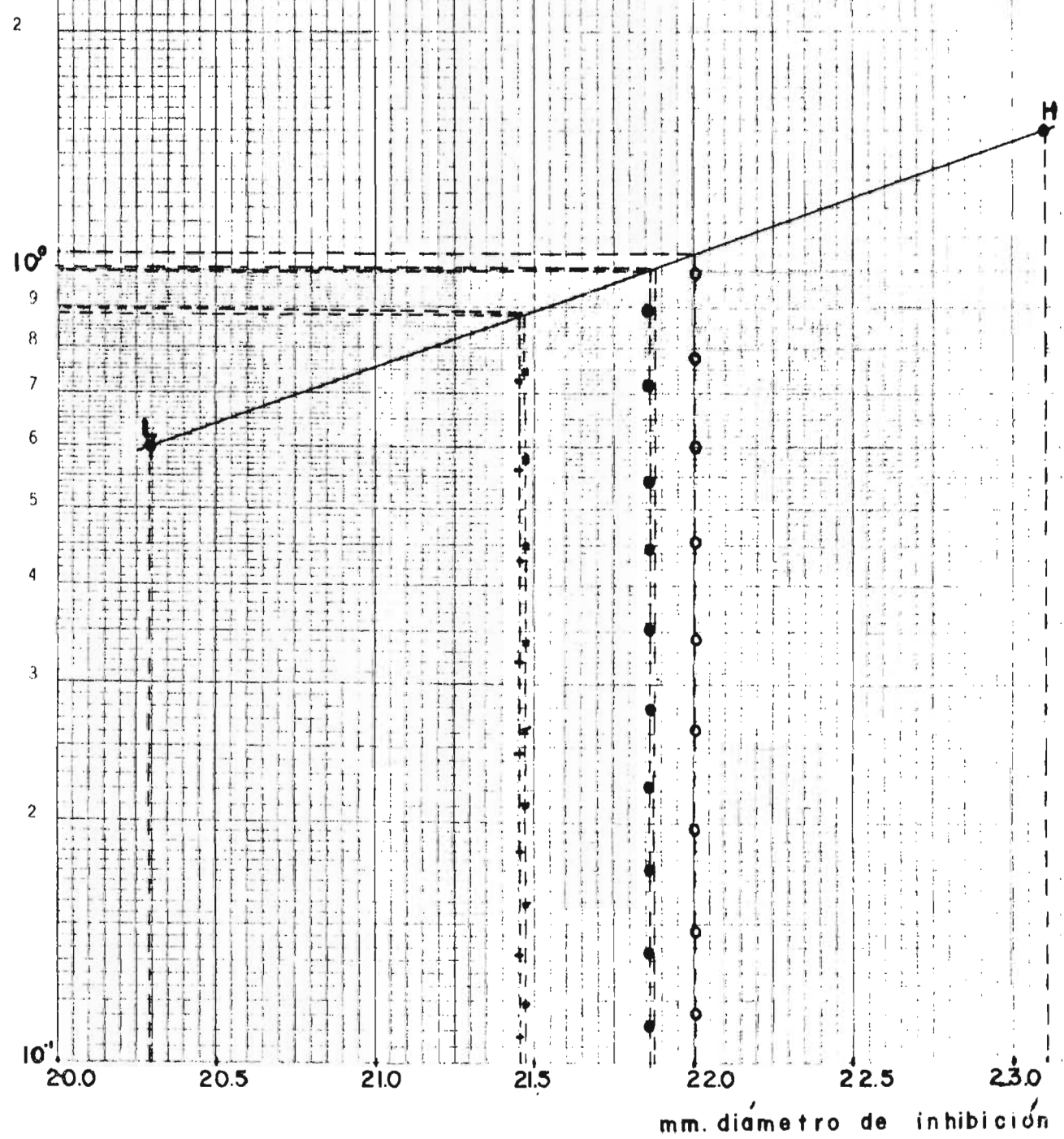
# GRAFICO Nº 5

## CURVA TIPO PARA LA QUINTA DETERMINACION

diam. de inhib. (mm.)	concentrac. (mcg/ml)
20.29 (L)	0.6
23.11 (H)	1.5

NC.  
/ml

- M<sub>1</sub> : ---○---
- M<sub>2</sub> : ---●---
- M<sub>3</sub> : ---+---
- M<sub>4</sub> : ---x---
- M<sub>5</sub> : ---\*---



mm. diámetro de inhibición

TABLA N.º 4  
 POTENCIAS ENCONTRADAS PARA LAS MUESTRAS SEGUN EL METODO  
 MICROBIOLOGICO

N.º de Deter- minaciones	M <sub>1</sub> (%)	M <sub>2</sub> (%)	M <sub>3</sub> (%)	M <sub>4</sub> (%)	M <sub>5</sub> (%)
1a.	113	90	85	100	125
2a.	89.5	86.5	87.5	85	110
3a.	105	100	82	112	108
4a.	95	92	95	97.5	133
5a.	105	99	88	88	101
$\bar{X}$	101.5	93.5	87.5	96.5	115.4

TABLA N° 5  
LECTURAS OBTENIDAS POR EL METODO FISICO QUIMICO

N° de Determinaciones	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>
1a.	0.51	0.52	0.50	0.50	0.70
2a.	0.55	0.53	0.50	0.52	0.72
3a.	0.56	0.53	0.55	0.54	0.74
4a.	0.57	0.54	0.55	0.57	0.74
5a.	0.60	0.54	0.56	0.58	0.75
$\bar{X}$	0.58	0.532	0.53	0.542	0.73

TABLA N° 6

CONCENTRACION DE MUESTRAS SEGUN EL METODO FISICO QUIMICO

N° de Determinaciones	M <sub>1</sub> (%)	M <sub>2</sub> (%)	M <sub>3</sub> (%)	M <sub>4</sub> (%)	M <sub>5</sub> (%)
1a.	83.60	85.24	81.96	81.96	114.75
2a.	88.70	85.48	80.62	83.87	116.12
3a.	90.32	85.48	88.70	87.09	119.35
4a.	89.06	84.37	85.93	89.06	115.62
5a.	93.30	83.07	86.15	89.23	115.38
$\bar{X}$	88.99	84.72	84.67	86.24	116.24

TABLA N° 7

COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR LOS METODOS ENSAYADOS

N° de Deter- minaciones	METODO MICROBIOLOGICO					METODO FISICO QUIMICO				
	M <sub>1</sub> (%)	M <sub>2</sub> (%)	M <sub>3</sub> (%)	M <sub>4</sub> (%)	M <sub>5</sub> (%)	M <sub>1</sub> (%)	M <sub>2</sub> (%)	M <sub>3</sub> (%)	M <sub>4</sub> (%)	M <sub>5</sub> (%)
1a.	113	90	85	100	125	83.60	85.24	81.96	81.96	114.75
2a.	89.5	86.5	87.5	85	110	88.70	85.48	80.62	83.87	116.12
3a.	105.0	100.0	82.0	112.0	108	90.32	85.48	88.70	87.09	119.35
4a.	95.0	92.0	95.0	97.5	133	89.06	84.37	85.93	89.06	115.62
5a.	105.0	99.0	88.0	88.0	101	93.30	83.07	86.15	89.23	115.38
$\bar{X}$	101.5	93.5	87.5	96.5	115.4	88.99	84.72	84.67	86.24	116.24
S	9.26	5.83	4.82	10.7	13.16	3.51	1.03	3.30	3.22	1.80
S $\bar{X}$	4.13	2.60	2.15	4.77	5.87	1.57	0.46	1.37	1.43	0.8
CV	9.12	6.23	5.50	11.08	11.40	3.94	1.21	3.89	3.73	1.54
R	23.5	13.5	10.0	27	32	9.70	2.48	8.08	7.27	4.60

Hay situaciones en que factores tales como la especificad, sensibilidad o practicabilidad justifican el uso de un procedimiento microbiológico más que un método químico.

De acuerdo a los resultados obtenidos y presentados en la tabla N° 2 podríamos decir que todas las muestras en cuanto al valor de humedad y pH cumplen con la norma fijada por el FDA en la que se expresa que el contenido de humedad deberá ser no mayor del 2% y el pH no menor de 5.0 y no mayor de 7.0 . Las muestras N° 1 y N° 2 no se les efectuó la determinación de humedad por encontrarse en suspensión.

Los valores encontrados en las tablas siguientes representan aquellos datos que después de haberles aplicado la prueba de rechazo Q se aceptaron. En la tabla N° 3 se reportan los diámetros de inhibición (en mm) ya corregidos de las diferentes muestras y sus correspondientes datos interpolados en la curva tipo para las muestras (mcg/ml) estudiadas. Siendo estos datos interpolados los que sirvieron para encontrar el porcentaje sobre lo rotulado.

Se observó alguna discrepancia en los datos los cuales podrían considerarse originados por las variantes propias del método microbiológico. Por otra parte es de observarse que los valores corregidos (en mm) para las muestras son más o menos reproducibles, pero sus correspondientes valores interpolados en la gráfica no lo son, esto se debe a que tienen diferente curva tipo, trayendo esto como consecuencia que cada vez que se hace el análisis deberá tirarse la curva tipo.



Los gráficos # 1, #2, #3, #4, #5. representan las diferentes curvas tipo elaboradas en base a la fórmula del dato más bajo (L) y del dato más alto (H) una vez trazadas se interpolaron los datos de diámetro de inhibición corregidos de las muestras en el eje de las abscisas, obteniéndose la concentración (mcg/ml) de las muestras en el eje de las ordenadas. Tanto en los gráficos como en la tabla N° 4 se observó que existe diferencia para una misma muestra ensayada en días diferentes, al respecto podemos decir que los ensayos microbiológicos están sujetos a error experimental en un grado muy parecido al que ocurre en otras valoraciones biológicas.

Se aconseja hacerlos por duplicado en dos o tres días sucesivos y calcular los promedios, a causa de las variaciones de un día a otro son de esta manera mucho más reales que si se usaran valores aislados para expresar la potencia. Estas variaciones indican además que el método microbiológico por ser muy laborioso y largo está sujeto a errores ya sea personales o experimentales, tomando en cuenta los promedios de los análisis en esta tabla, observamos que todas las muestras a excepción de la N° 3 están dentro de los límites de potencia establecidos por el C.F.R.

En la tabla N° 5 observamos que las lecturas obtenidas por el método físico químico son reproducibles ya que no existe mayor dispersión de datos.

En la tabla N° 6 en donde se reportan los porcentajes de principio activo encontrados en las diferentes muestras, observamos que las

muestras se encuentran ligeramente abajo del límite inferior a excepción de la muestra N° 5 que resultó en el límite superior.

Al observar los resultados detallados en la tabla N° 7 la cual representa la comparación de los datos encontrados en los dos métodos ensayados, podemos decir que los resultados obtenidos por el método microbiológico tiene mayor dispersión de datos, lo que originará mayor desviación standar (s) y por consiguiente un coeficiente de variación (C.V.) más amplio, lo que viene a comprobar que este método está sujeto a mayores factores de error que el método físico-químico. Es oportuno mencionar que cuantitativamente un ensayo químico determina la cantidad de un compuesto específico o de un grupo funcional que se encuentra en una muestra dada. En base a la concentración encontrada se deduce la actividad biológica de la muestra. En cambio la valoración biológica mide la actividad biológica real de una determinada muestra, la cual representa la suma de la acción recíproca de diversos factores químicos y físico químicos. Por ejemplo, los datos del análisis químico no dan información de la actividad biológica de indicios de sustancias que no influyen en el análisis químico, por otra parte, la influencia aumentativa o inhibitoria de las variaciones en el estado físico del principio activo no se reflejan en los resultados de los análisis químicos.

La valoración microbiológica presenta las siguientes ventajas: exactitud, especificidad y confianza. La forma de la curva podría cambiar cuando el medio que se usa es inapropiado o si el cultivo de microorganismo se ha contaminado.

Las valoraciones biológicas dejan mucho que desear en varios aspectos aunque son sumamente sensibles y descubren pequeñas diferencias de concentración, su reproducibilidad es mucho menor que la que se obtiene con los métodos químicos . Por otra parte es posible que varíen las técnicas y las interpretaciones según el operador, a pesar de los estrictos requisitos establecidos en las publicaciones oficiales y por ello los resultados dependen mucho del elemento personal.

Si bien es cierto que el método microbiológico mide un aspecto diferente al físico químico tal como fue discutido en el capítulo anterior, analizando los resultados obtenidos se pudo observar que el primero es más exacto ya que los valores de los problemas son más cercanos al valor intermedio del standar y más sensible ya que es capaz de detectar pequeñas diferencias de concentración; aunque, presenta los inconvenientes de ofrecer mayores factores de error, consume mucho tiempo y los resultados de los análisis se obtienen hasta el siguiente día, además se necesita de equipo especial, de personal debidamente entrenado, con alto grado de experiencia y destreza, es además un método relativamente caro.

Basándose en los resultados del análisis físico químico se puede apreciar que es un método más reproducible y más preciso ya que se obtiene menor dispersión de datos, menor coeficiente de variación (C.V.) menor desviación standar(s), durante la práctica se pudo comprobar que es un método rápido, sencillo y bastante económico. Este método podría ser recomendado como un método alternativo para la cuantificación del estolado de eritromicina por las ventajas mencionadas anteriormente y además porque puede ser realizado con el equipo con que comúnmente cuenta un laboratorio de control de calidad, aunque es importante hacer notar que no podría sustituir al método microbiológico por las razones anteriormente expuestas.

Se tendría mayor seguridad de la exactitud del método si se hubiera elaborado una fórmula patrón en la cual se conocería exactamente la cantidad de eritromicina presente, esto en la práctica no fue posi-

ble de realizar por carecer de las materias primas necesarias para la fabricación del producto.

Concluimos que el método físico químico del xantidrol puede ser utilizado como un método alterno para el análisis de suspensión de eritromicina en jarabe debiendo chequear periódicamente su reproducibilidad con el método microbiológico de cilindro placa.

La ley federal de alimentos, medicamentos y cosméticos de los Estados Unidos exige que los antibióticos sean certificados antes de su distribución; la certificación se refiere no solamente a la potencia, sino también a su identidad, seguridad y pureza.

Debido a que el Code of Federal Regulations, que es el libro mediante el cual el organismo federal anteriormente mencionado regula estos medicamentos, es difícil de obtener en nuestro país, se creyó de mucha importancia proporcionar en el presente trabajo la información referente al estolato de eritromicina tanto para materia prima, como para suspensión oral, de tal manera que fuese utilizado como una fuente de consulta para los alumnos y en general para todos los analistas destacados en el control de calidad de productos farmacéuticos.

I. ESPECIFICACIONES PARA EL ESTOLATO DE ERITROMICINA (según el Code de Regulaciones Federales). Title 21. part. g 148e5.

a) Requisitos para la Certificación

1. Standars de identidad, potencia, calidad y pureza.

El estolato de eritromicina es la sal del lauril sulfato del éster propiónico de una clase de eritromicina o una mezcla - de dos o más de tales sales. Se presenta como un polvo blanco. Es soluble en alcohol, alcohol metílico, acetona y cloroformo, pero es prácticamente insoluble en agua. Es tan purificada y secada que:

- i) Contiene no menos de 600 mcg. de eritromicina por mg - calculado sobre la base seca.
- ii) Cumple con la prueba de seguridad.
- iii) Su contenido de humedad no es mayor del 4.0%
- iv) Su pH es no menor del 4.5 y no mayor del 7.0
- v) Da positiva las pruebas de identidad para el estolato de eritromicina.
- vi) Es cristalino.

2. Rotulado.

Deberá ser rotulado de acuerdo con los requerimientos deta -

llados en la página N° 64 de este capítulo.

### 3. Requerimientos para la certificación de muestras

Además de los requerimientos indicados en g 146.2 <sup>1/</sup>. Cada muestra deberá contener:

- i) Los resultados de las pruebas y ensayos sobre la potencia, seguridad, humedad, pH, identidad y cristalinidad del lote.
- ii) Muestras del lote: un mínimo de 10 contenedores, cada uno conteniendo no menos de 300 mg.

#### b) Pruebas y Métodos de Ensayo

- 1) Potencia. Preparar la muestra para el ensayo como sigue:  
Disolver una cantidad exactamente pesada en suficiente alcohol metílico hasta obtener una concentración de 1.0 mg de eritromicina base (estimado) por ml inmediatamente diluir esta solución con buffer fosfato pH 8 0.1 M para dar una concentración de 0.1 mg de eritromicina base por ml (estimados)  
Hidrolizar esta solución en un baño de agua a una temperatura constante de 60°C por 2 horas o a temperatura ambiente por 16-18 hrs. Diluir con buffer fosfato pH 8 0.1 M a la concentración de referencia de 1 mcg de eritromicina base por ml (estimado). Proceder a continuación como se detalla en las pag. 22 a 31 de la parte experimental.

---

<sup>1/</sup> Code of Federal Regulations, pag. 206



- 2) Seguridad. Proceder como se indica en la pág. N° 66.
- 3) Humedad. Proceder como se indica en la pág. N° 67
- 4) pH . Proceder como se indica en la pag. N° 74 usando agua libre de CO<sub>2</sub> para reconstituir la muestra.
- 5) Cristalinidad. Proceder como se indica en la pag. 75
- 6) Pruebas de identidad. Proceder como se indica en las pags. N° 75 - 76

## II. ESPECIFICACIONES DEL ESTOLATO DE ERITROMICINA PARA SUSPENSION ORAL

(según el CFR).

Part. g 148.12

### a) Requerimientos para la certificación

1. Standards de identidad, potencia, calidad y pureza. El estolato de eritromicina para suspensión oral es una mezcla seca de estolato de eritromicina, con adecuadas e inocuas --- sustancias buffers, agentes dispersantes, diluyentes, colorantes y saborizantes. El estolato de eritromicina contiene 25 mg de eritromicina por ml de la suspensión reconstituida. Esta potencia es satisfactoria si no es menor del 90% y no mayor del 115% sobre lo rotulado. Cuando es reconstituido como se indica en la etiqueta debe cumplir con lo siguiente:

- a. Su pH no es menor de 5.0 y no mayor de 7.0
- b. Su contenido de humedad no es mayor del 2.0%

El estolato de eritromicina es usado conforme a los estándares fijados para la materia prima (Ver pág. 60 ).

## 2. Requerimientos para la certificación de muestras,

Además de los requerimientos fijados para materia prima, cada muestra deberá contener:

### i) Resultados de las pruebas y ensayos sobre:

a) El estolato de eritromicina usado en la manufactura del lote para potencia, seguridad, humedad, pH, cristalinidad e identidad.

b) El lote: potencia, humedad y pH.

### ii) Muestras Requeridas:

a) El estolato de eritromicina usado en la manufactura del lote debe contener 10 contenedores inmediatos, cada uno consistiendo en 300 mg.

b) El lote: un mínimo de 6 contenedores inmediatos.

c) Pruebas y métodos de ensayo. (1)

Potencia. Preparar la muestra como sigue: Reconstituir la muestra como indica la etiqueta. Tomar un volumen exactamente representativo de la suspensión reconstituida y añadir suficiente alcohol metílico para dar -

una concentración de 2.5 mg de eritromicina base por ml (estimado). Diluir esta mezcla con suficiente buffer fosfato pH 8 0.1 M para dar una concentración de 1.0 mg de eritromicina base por ml (estimado). Hidrolizar en baño de agua a temperatura constante de 60°C o a temperatura ambiente por 16-18 hrs. Diluir entonces con solución buffer pH 8 0.1 M hasta la concentración de referencia de un 1 mcg de eritromicina base - por ml. Proceder como se indica en la pag.22-31 de la - parte experimental.

3. Humedad. Proceder como se indica en la pag. N° 67 usando el polvo seco.
4. pH. Proceder como se indica en la pag. N° 74 usando la muestra reconstituida como se indica en la etiqueta .

#### METODOLOGIA PARA LAS ESPECIFICACIONES SEÑALADAS

##### 1) Requerimientos para la Rotulación

a) Si un antibiótico es empacado para la venta:

i. Deberá rotularse:

1.1 La etiqueta deberá llevar alguna información adicional requerida para la droga por regulaciones específicas.

- 1.2 Cada paquete deberá llevar sobre un lado de la envoltura del contenedor, la fecha de expiración prescrita para la droga por regulaciones específicas o en lugar de la misma podría usarse una fecha que es 12, 18, 24, 30, 42, 48, 54 o 60 meses después del mes durante el cual el lote fue certificado, si el laboratorio que requiere la certificación ha sometido los resultados de las pruebas y ensayos a juicio de la autoridad competente demostrando así que su producto es estable por tal período de tiempo.
- b) Si es empacado únicamente para el uso del fabricante, cada paquete deberá llevar a un lado de la envoltura o en el contenedor inmediato lo siguiente:
- a) El número de unidades o mcgs de actividad por mg o kg.
  - b) La marca del lote.
  - c) La razón "precaución : ley federal prohíbe dispensar sin prescripción.
  - d) La razón "para uso del fabricante" y si el producto no es estéril la indicación "no es estéril" .
  - e) La fecha de expiración requerida.
  - f) La fecha de expiración para una droga podría ser omitida de la etiqueta del contenedor inmediato si tal contenedor contiene una sola dosis y si es empacado en una envoltura individual o el contenedor lleve la fecha prescrita.

## 2) Prueba de Seguridad

- a) Animales de prueba: Use ratones blancos saludables (preferiblemente de una raza conocida) sin haber sido usados previamente en pruebas de seguridad de drogas, mantenidos con una dieta de alimento en forma de bolita y agua. En el día de la prueba usar solamente aquellas ratas que pesen no menos de - 18 gms. y no más de 25 gms, durante la prueba a cada grupo de ratones administrar la muestra a ensayar y proporcionar - alimentación apropiada y agua. Es deseable una temperatura - ambiental constante durante todo el tiempo.
- b) Preparación y administración de las muestras: Para cada antibiótico se tiene que seleccionar el diluyente apropiado, - dosis de prueba (concentración y volumen) vía de administración y proceder como se indica más adelante.

Si el producto es empacado para la venta, y está empacado - en combinación con el diluyente, diluir el producto como indica la etiqueta y entonces proceder como se indica en este párrafo.

En el caso de estolato de eritromicina el diluyente es goma-acacia al 10%, la concentración de actividad por ml es de - 40 mg, el volumen administrado a cada ratón es de 0.5 ml - y la vía de administración es oral. Para lo cual debe usarse una cánula u otro medio adecuado.

c) Evaluación: Observar las ratas por 48 horas . Notar la mortalidad a las 24 horas y las 48 horas. Si el animal no ha muerto en el período de observación, la muestra pasa la prueba de seguridad. Si uno o más animales mueren, repetir la prueba una o más veces usando para cada prueba 5 ó más ratones no usados previamente, que pesen 20 gm ( $\pm$  0.5 gms c/u). Si se requiere repetir la prueba, la muestra pasa la prueba de seguridad si el número total de ratones muertos no es mayor del 10% del número total de ratones probados, incluyendo los de la prueba original.

### 3) Determinación de Humedad

a) Utilizar un equipo apropiado para aplicar el método de Karl-Fisher.

b) Reactivos. (1) Reactivo de Karl-Fisher. Disolver 125 gm de yodo en 170 ml de piridina, añadir 670 ml de metanol y enfríe . A 100 ml de piridina mantenida en baño de hielo , - añadir dióxido de sulfuro hasta que el volumen llegue a 200 ml. Suavemente añadir esta solución a la mezcla de yodo-metanol, enfriar y mezclar bien. (puede usarse un reactivo de Karl-Fisher comercialmente preparado). Preservar el reactivo en botellas de vidrio tapadas protegidas de la luz y de la humedad del aire.

2) Solución de Metanol. Añadir suficiente agua (usualmente 2

mg/ml) al metanol de tal manera que cada ml de la solución de metanol resultante es equivalente cerca de 0.5 ml del reactivo de Karl-Fisher.

3) Solvente.(i) solvente A. metanol: cloroformo: tetracloruro de carbono (1: 2: 2 por vol).

ii) Solvente B. cloroformo; tetracloruro de carbono (1:1 por volumen).

c) Standarización de los reactivos. (1) Equivalente de agua del reactivo de Karl Fisher. Estandarizar el reactivo de Karl-Fisher, no más de 1 hora antes de usar, por uno de los siguientes métodos:

i) Pesar exactamente 25-35 mg de agua dentro de un vaso de titulación y añadir 20 ml del solvente A. Conectar el agitador y titular hasta el punto final por adición de cantidades medidas del reactivo de Karl-Fisher. Calcular el equivalente de agua del reactivo de Karl-Fisher como sigue:

$$e = \frac{W}{V_T - V_A}$$

Donde:

e = al equivalente de agua del reactivo de Karl-

Fisher en términos de mg de agua por ml

$W$  = es igual a los mg de agua

$V_T$  = es igual a los ml de reactivo de Karl-Fisher usados

$V_A$  = ml del reactivo de Karl-Fisher equivalente a los 20 ml del solvente A.

- ii) Pesar exactamente cerca de 25-35 mg de agua dentro de un vaso seco de titulación. Añadir un exceso de reactivo de Karl-Fisher, conectar el agitador, y titular hasta el punto final con solución de metanol. Calcular el equivalente de agua del reactivo de Karl-Fisher como sigue:

$$e = \frac{W}{V_T - V_m \times f}$$

Donde:

$e$  = equivalente de agua del reactivo de Karl - Fisher en términos de mg de agua por ml.

$W$  = mg de agua

$V_T$  = ml del reactivo de Karl-Fisher

$V_m$  = ml de la solución de metanol usados

$f$  = ml del reactivo de Karl Fisher equivalente a cada ml de la solución de metanol.



- 2) Equivalencia del reactivo de Karl-Fisher de la solución de metanol. Titular un volumen conocido del reactivo de Karl-Fisher con solución de metanol, hasta el punto final. Calcule los ml del reactivo de Karl Fisher equivalente a cada ml de la solución de metanol como sigue:

$$f = \frac{V_T}{V_m}$$

Donde:

$f$  = ml del reactivo de Karl-Fisher equivalente a cada 100 ml de la solución de metanol.

$V_T$  = ml del reactivo de Karl - Fisher usados

$V_m$  = ml de la solución de metanol usados

- 3) Equivalencia del reactivo de Karl-Fisher de los solventes
- i) Solvente A: Use 20 ml del solvente A como la muestra. Conectar el agitador y titular hasta el punto final por adición de cantidades medidas del reactivo de Karl-Fisher.
  - ii) Solvente B: Use 10 ml del solvente B, como la muestra. Añadir un exceso del reactivo de Karl-Fisher a la muestra y conectar el agitador, titular hasta el punto final con la solución de metanol.
  - iii) Calcular el equivalente del reactivo de Karl-Fisher de los

solventes como sigue:

$$V_A = V_T$$

$$V_B = V_T - V_m \times f$$

Donde:

$V_A$  y  $V_B$  = ml del reactivo de Karl-Fisher equivalente a las alícuotas usadas de los solventes A y B respectivamente.

$V_T$  = ml del reactivo de Karl-Fisher usados

$V_m$  = ml de la solución de metanol usados

$f$  = ml del reactivo de Karl-Fisher equivalente a cada ml de la solución de metanol determinado como se indica en el subpárrafo 2.

d) Preparación de la Muestra

Si el límite máximo de humedad es mayor del 1%, pesar exactamente 300 mg de la muestra dentro de un vaso seco de titulación. Si el límite máximo de humedad es menor de 1% pesar exactamente de 1 a 2 gm de la muestra. Proceder como se indica más adelante.

e) Procedimiento para la Titulación y Cálculo. (1)

Procedimiento 1. Añadir 20 ml del solvente A a la muestra.

Conectar el agitador y titular al punto final por adición de cantidades medidas del reactivo de Karl-Fisher. Determinar el porcentaje de humedad en la muestra como sigue:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(V_T - V_A) e \times 100}{W_s}$$

Donde:

e = el equivalente de agua del reactivo de Karl-Fisher - determinado como se indica en el párrafo c(1) de esta sección.

$V_T$  = ml del reactivo de Karl-Fisher usado.

$V_A$  = ml del reactivo de Karl-Fisher equivalente a los 20 ml del solvente A, determinado como se indica en el subpárrafo c(3) de esta sección.

$W_s$  = Peso de la muestra en mg.

- 2) Procedimiento 2. Añadir un exceso del reactivo de Karl-Fisher a la muestra, conectar el agitador y titular hasta el punto final con solución de metanol. Calcule el porcentaje de humedad de la muestra como sigue:

i) Para Polvos:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(V_T - V_{mf}) \times e \times 100}{W_s}$$

En donde:

$V_T$  = ml del reactivo de Karl-Fisher usados

$V_m$  = ml de la solución de metanol usados

$f$  = ml del reactivo de Karl-Fisher equivalente a -  
cada ml de la solución de metanol determinada  
como se indica en el subpárrafo (c) (2) de es-  
ta sección.

$e$  = equivalente de agua del reactivo de Karl-Fisher  
determinado como se indica en el párrafo (c) (1)  
de esta sección.

$W_s$  = Peso de la muestra en mg

- 3) Procedimiento (3) Añadir aproximadamente 20 ml del solvente a un vaso de titulación seco y proceder como se indica en el procedimiento (1) ó (2). No tomar en cuenta el volumen del reactivo usado para determinar el punto final. Inmediatamente introducir una cantidad de muestra exactamente pesada dentro del vaso de titulación y titule hasta el punto final usando el procedimiento 1 ó 2 sin solventes adicionales. Calcule el porcentaje de humedad en la muestra como sigue:

1) Si se sigue el procedimiento 1:

$$\% \text{ de humedad en muestra pesada} = \frac{V_T \times e \times 100}{W_s}$$

ii) Si se usa el procedimiento 2:

$$\begin{array}{l} \text{\% de humedad de la muestra} \\ \text{pesada} \end{array} = \frac{(V_T - V_m f) \times e \times 100}{W_s}$$

en donde:  $V_T$  = ml del reactivo de Karl-Fisher usados

$V_m$  = ml de la solución de metanol usados

$f$  = ml del reactivo de Karl-Fisher equivalente a cada ml de la solución de metanol, determinados como se indica en el párrafo (c) (2) de esta sección.

$e$  = equivalente de agua del reactivo de Karl-Fisher determinados como se indica en párrafo (c) (1) de esta sección.

#### 4. pH.

a) Aparatos. Usar un pHmetro adecuado, equipado con un electrodo de vidrio- calomel.

b) Estandarización. Estandarizar el pHmetro con 2 soluciones - buffer que difieran por lo menos en 2 unidades de pH y de los cuales una esté dentro en 2 unidades de pH del valor esperado de la muestra.

c) Preparación de la muestra: Si es necesario diluir la muestra con agua destilada libre de  $\text{CO}_2$  para llevar a la concentra -

ción especificada en la sección individual para cada antibiótico.

d) Procedimiento de la prueba. Determinar el pH de la muestra a  $25^{\circ}\text{C.} \pm 2^{\circ}\text{C.}$

5. Cristalinidad. Usar el método especificado en la sección individual para cada antibiótico.

Preparar la muestra para el examen, colocando una pequeña cantidad de partículas en aceite mineral, sobre una lámina de vidrio limpia. Examinar la muestra por medio de un microscopio polarizante. Las partículas presentan el fenómeno de birrefringencia y posiciones de extinción cuando el disco rotatorio del microscopio es girado.

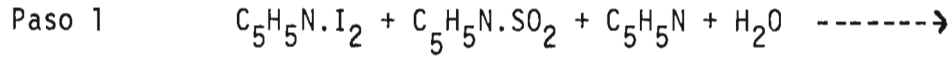
6. Prueba de Identidad por Espectrofotometría Infrarroja,

a) Usar un espectrofotómetro adecuado capaz de desarrollar el espectro de absorción infrarroja en el rango de 2-15 micrones.

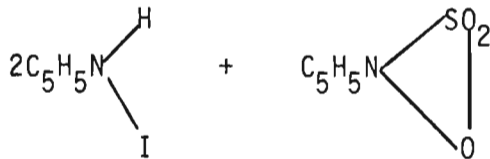
b) Preparación de la muestra. Solución al 1%. Preparar una solución de la muestra al 1% en cloroformo y usar una celda de absorción de 1 mm.

c) Procedimiento. Poner la muestra preparada como se describió anteriormente, en el espectrofotómetro, determinar el espectro de absorbancia infrarroja entre las longitudes de

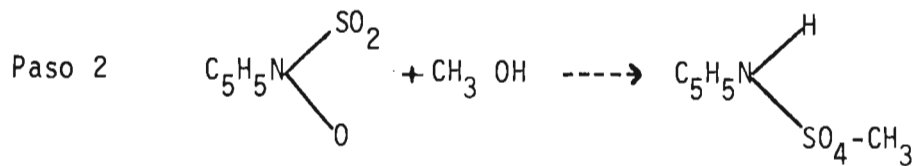
Color rojo oscuro del iodo reactivo de Karl-Fisher



Color amarillo opaco

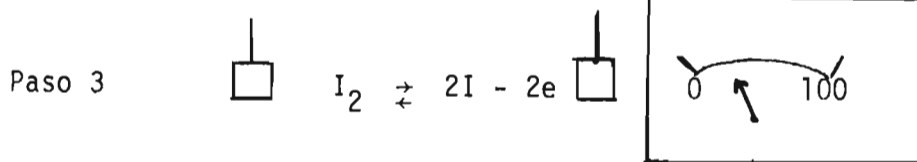


Color amarillo pálido



\*

Exceso del reactivo K.F.



BIBLIOGRAFIA

- 1) ARRET, B., JHONSON, D.P. and KIRSBAUM. A. "Outline of Details for microbiological assays of Antibiotics" , 2a. ed. J. - pharm Sci, 60 (11): 1689-1694. 1971
- 2) AMMER, M.M., HABEEB, A.A. and WALASH, M.I. "Colorimetric assay for Erytromycins, using Salicyladehyde" J. Drug, Res. Egypt, 6(3): 89-94, 1974.
- 3) BRITISH PHARMACOPOEIA, Londres, HMSO, 1973, 506 p. pp106
- 4) CONNORS K. A textbook of Pharmaceutical analysis, 2a. ed. New York, Wiley, 1975. pp. 554-571.
- 5) FARMACOPEA NACIONAL DE MEXICO. 4a. ed. México, Secretaría de Salubridad y Asistencia, 1974, 1198 p.pp 31-42
- 6) FLOREY. K. Analytical Profiles of Drugs Substances, Vol. I. New York. Academic Press. 1972. pp 102-117.
- 7) KAVANAGH, F. Analytical Microbiology, New York, Academic Press 1963. pp. 289- 294.
- 8) SHANGHAVI, N.M. and CHANDRAMOAN , H.S. "Colorimetric method of estimation of Erithr omycin" Can. J. Pharm. Sci., 16(2): - 59-61 1975.
- 9) SANTOS QUIROS, R.I. Biodisponibilidad del Estolato de Eritromicina. Tesis. Lic. en Química y Farmacia. San Salvador, El Salvador, Universidad, Facultad de Química y Farmacia, 1976. 64 p.



- 10) TSUJI. K. and ROBERTSON. J.H. "Determination of Erithromycins and its derivates by Gas-Liquid Chromatography" Anal.Chem. 43(7) : 818-821. 1971.
- 11) U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. ed. Code of Federal Regulations. Washington. Title 21, 1973. 709 p. Sec. 14 8e12,148e5.
- 12) U.S. NATIONAL FORMULARY XIII. Washington. D.C., APHA, 1970  
1012 p. pp 274-275.