

19  
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"ZARAGOZA"

IMPLEMENTACION Y VALIDACION DE UN  
METODO ANALITICO POR CLAP PARA  
CUANTIFICAR AMPICILINA EN DIVERSAS  
FORMAS FARMACEUTICAS.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

IDALIA LETICIA FLORES GOMEZ

Asesor: Q.F.B. Ma. de Lourdes Cervantes





Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

INTRODUCCION .....	1
I. FUNDAMENTACION DEL TEMA.....	2
A. CROMATOGRAFIA .....	2
1. Tipos de Cromatografía.....	3
2. Mecanismos de Separación .....	4
a. Adsorción .....	4
b. Partición .....	4
c. Intercambio Iónico.....	5
d. Exclusión .....	5
B. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS .....	6
1. Tipos de Cromatografía en CLAP.....	8
C. COMPONENTES BASICOS EN UN SISTEMA CLAP .....	9
1. Reservorio ....	10
a. Fase Móvil.....	10
2. Bomba .	10
a. Mecanicas .....	10
1) Recíprocas.....	11
2) Desplazamiento Continuo.....	12
b. Neumaticas.....	12
3. Inyector .....	12
4. Precolumna.....	13
5. Columna .....	13
6. Detector .....	14
a. Índice de Refracción.....	14

b. Luz Ultravioleta (UV).....	15
c. Fluorescencia .....	16
7. Análisis de Datos.....	16
a. Técnicas de Integración de Pico.....	16
1) Altura del Pico .....	16
2) Anchura del Pico.....	17
3) Triangulación .....	17
4) Cortar y pesar.....	17
5) Integrador Disco .....	17
6) Integrador Electrónico .....	18
b. Concentración .....	18
1) Estandár Interno.....	18
2) Calibración Externa.....	19
3) Normalización .....	19
D. AMPICILINA. PROPIEDADES.....	20
1. Formula.....	20
2. Propiedades Químicas .....	20
a. Isómeros .....	20
b. Hidratos .....	20
c. Sales .....	20
d. Apariencia .....	21
3. Propiedades Fisicoquímicas .....	21
a. Espectro .....	21
1) Infrarrojo .....	21
2) Absorción U.V. ....	21
b. Cristales .....	24

1) Modificación de la Estructura Cristalina.....	24
2) Rango de Fusión .....	24
3) Solubilidad .....	24
4) Constante de Ionización, pK .....	24
5) Rotación Óptica .....	24
4. Estabilidad .....	25
a. Rutas Degradativas .....	25
b. Estabilidad de Ampicilina en Soluciones.....	26
c. Estabilidad para polvos de Ampicilina.....	26
d. Hidrólisis catalizada por Ión Cúprico.....	26
5. Métodos de Manufactura.....	26
a. Microbiológico .....	26
b. Química .....	28
6. Métodos de Análisis.....	28
a. Identificación .....	28
b. Cuantificación .....	28
7. Propiedades Farmacológicas.....	28
8. Indicaciones .....	30
9. Reacciones Adversas .....	30
10. Contraindicaciones .....	31
11. Dosis .....	31
D. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS. CONCEPTOS GRALES. ...	32
1. Diseño .....	32
a. Revisión Bibliográfica.....	32
b. Adaptación Parcial.....	32
c. Adaptación Total.....	32

2.	Desarrollo.....	33
	a. Condiciones Cromatográficas Preliminares.....	33
	b. Eficiencia de Extracción.....	33
	c. Selección del Estándar Interno.....	33
3.	Validación.....	33
	a. Definiciones.....	34
	b. Procedimiento de Validación.....	36
	1) Linealidad.....	36
	2) Exactitud.....	37
	3) Precisión.....	37
	a) Repetibilidad .....	38
	b) Reproducibilidad .....	38
	5) Especificidad.....	38
	c. Criterios de Aceptación.....	38
	d. Requisitos Mínimos para Validación.....	39
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	40
III.	OBJETIVOS.....	42
IV.	HIPOTESIS....	42
V.	METODOLOGIA. ....	43
	A. Método General.....	43
	1. Equipo .....	43
	2. Material.....	43
	3. Reactivos .....	44
	4. Soluciones.....	44
	5. Procedimiento.....	45
	B. Diseño Experimental .....	47

1. Linealidad del Sistema.....	47
2. Precisión del Sistema.....	48
3. Exactitud.....	48
4. Linealidad.....	49
5. Precisión.....	50
6. Especificidad.....	51
VI. RESULTADOS . . . . .	52
A. Linealidad del Sistema . . . . .	52
1. Ampicilina Sódica.....	52
2. Ampicilina Trihidrato.....	55
B. Precisión del Sistema.....	57
1. Ampicilina Sódica.....	57
2. Ampicilina Trihidrato.....	58
C. Exactitud del Método.....	59
1. Inyectable.....	59
2. Cápsulas . . . . .	62
3. Suspensión.....	64
D. Linealidad del Método.....	67
1. Inyectable.....	67
2. Cápsulas . . . . .	70
3. Suspensión.....	73
E. Precisión del Método.....	77
1. Inyectable.....	77
2. Cápsulas . . . . .	81
3. Suspensión.....	86

VII. DISCUSION DE RESULTADOS . . . . .	91
A. Linealidad del Sistema . . . . .	91
B. Precisión del Sistema . . . . .	92
C. Exactitud . . . . .	92
D. Linealidad del Método . . . . .	93
E. Precisión del Método . . . . .	95
F. Especificidad . . . . .	96
VIII. CONCLUSIONES . . . . .	97
IX. SUGERENCIAS . . . . .	98
X. ANEXOS . . . . .	99

REFERENCIAS

BIBLIOGRAFIA



## I N T R O D U C C I O N

Durante todo el proceso de fabricación, los productos farmacéuticos deben contar con un alto grado de calidad, de manera tal que el producto final posea las características físicas, químicas y analíticas especificadas . Ante tales requerimientos, aumenta cada día la necesidad de desarrollar mejores métodos de análisis que nos permitan verificar dicha calidad. En la implementación de un método analítico es requisito indispensable en nuestro País ante la Secretaria de Salud la validación de este, para establecer que su capacidad satisface los parámetros mínimos para las aplicaciones analíticas deseadas. En este trabajo una vez establecidos los parámetros de Instrumentación se realizó la validación del método por Cromatografía de Líquidos a Alta Presión (CLAP), para las siguientes formas farmacéuticas Inyectable de 125 mg, 250 mg y 1 g con Ampicilina Sódica, Cápsulas de 500 mg y Suspensión de 125 mg/5 ml con Ampicilina Trihidrato; evaluando los siguientes parámetros: linealidad y precisión del sistema, exactitud (100%), linealidad, reproducibilidad y especificidad del método, así como la estabilidad de la muestra.

Los resultados de las validaciones demuestran en si que el método es lineal, preciso, exacto y específico. Y la muestra es estable por un periodo de 12 horas, por lo que el método puede ser utilizado en la determinación de Ampicilina Base, a partir de Ampicilina Sódica o Ampicilina Trihidrato, en Inyectable, Cápsulas o Suspensiones, respectivamente, con la seguridad de que los resultados obtenidos son confiables.

## I. FUNDAMENTACION DEL TEMA

### A. CROMATOGRAFIA

Las formulaciones farmacéuticas modernas son mezclas complejas que generalmente tienden a ser en la actualidad monofármacos, con un componente activo; y una serie de materiales relativamente inertes, tales como diluentes, desintegrantes, emulsificantes, colorantes y saborizantes, entre otros. Con el fin de asegurar la calidad y estabilidad del producto final, el farmacéutico analista debe ser capaz de separar estas mezclas en componentes individuales para su análisis cuantitativo.

Cabe agregar, que el análisis de un determinado componente en una mezcla puede ser difícil o hasta imposible por la interferencia de una sustancia en la determinación de otra. Ejemplo común de interferencia es la que se observa en Espectroscopía de Absorción cuando dos solutos tienen bandas de Absorción traslapadas.

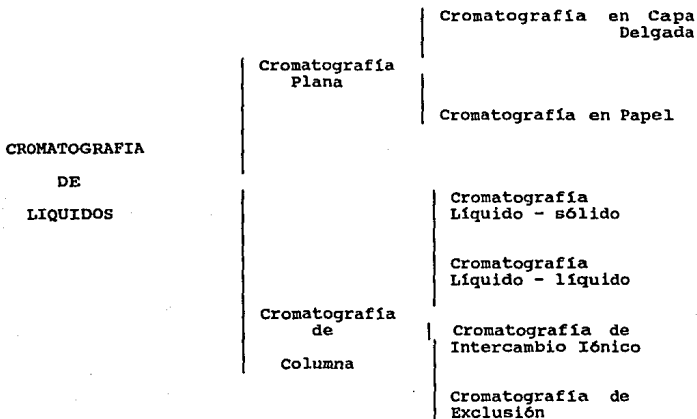
Cuando no se puede aplicar directamente un Método analítico a una mezcla debido a posible interferencia, se hace necesaria la separación de la mezcla de sus componentes. Entre las Técnicas más poderosas de que el analista dispone para la resolución de estas mezclas existe una técnica altamente eficiente llamada CROMATOGRAFIA.(1)

Como esta técnica se halla íntimamente involucrada en todos aspectos del desarrollo y la investigación farmacéutica, el farmacéutico debe poseer un conocimiento, al menos general, de los principios en los cuales se basa la cromatografía .

La Cromatografía es una técnica desarrollada a principios de siglo, esta técnica permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla. En general, es un proceso de migración diferencial en el cual, los componentes de dicha mezcla son transportados por una fase móvil y retenidos selectivamente por una fase estacionaria.

### 1. Tipos de Cromatografía

De acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas, la cromatografía se divide en: (2)



Y en:

CROMATOGRAFIA DE GASES

Cromatografía gas/líquido

Cromatografía gas-sólido

## 2. Mecanismos de Separación

De acuerdo a los mecanismos de separación se dividen en:

a. **Cromatografía de Adsorción.** La fase estacionaria es sólida y la fase móvil, que puede ser un líquido o un gas, los componentes se distribuyen entre las dos fases por una combinación de procesos de adsorción y desorción.

La velocidad a la cual los solutos se mueven o se separan depende del grado de afinidad que tengan estos por la fase estacionaria.(3)

b. **Cromatografía de Partición.** La Fase estacionaria es un líquido, el que en forma de una capa delgada a la cual se apoya en un material sólido inerte, tal como gel de sílice o tierra de diátomeas. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa, El factor que controla el proceso de separación es la solubilidad del compuesto en las dos fases líquidas.(3)

La diferencia entre ambas reside en la naturaleza de las fuerzas que determinan la distribución del soluto entre las dos fases.

c. **Cromatografía de Intercambio Iónico.** Se clasifica usualmente en forma separada. Aunque emplea una fase sólida, la adsorción en la interfase líquido-sólido no es el fenómeno principal. El mecanismo de separación se basa en el equilibrio de intercambio de iones. Ambos efectos, partición y adsorción operan en muchos casos, pero no son el único factor que gobierna por completo el proceso cromatográfico. Consta de una matriz polimérica, sobre una superficie en la cual se han unido químicamente grupos funcionales de tipo iónico; p.e. ácidos carboxílicos o áminas cuaternarias. Los solutos iónicos son retenidos por formación de uniones químicas con los grupos funcionales. En este caso las fases móviles son siempre líquidas. (3)

d. **Cromatografía por Exclusión.** La fase estacionaria es un sólido polimérico que contiene numerosos poros de dimensiones moleculares conocidas. Las moléculas más pequeñas dejan la fase móvil para difundir dentro de los poros mientras que las moléculas que son demasiado grandes como para entrar dentro de los poros son "excluidas" .

La fase móvil en este tipo de cromatografía puede ser líquida o gaseosa. (3)

Las cuatro formas básicas de la cromatografía -Adsorción, Partición, de Intercambio Ionico y Exclusión de Tamaño-, pueden aplicarse al análisis de sistemas farmacéuticos a través del uso de una serie de técnicas que difieren la una de la otra de acuerdo con la naturaleza de la fase estacionaria y móvil, y al

aparato usado para realizar cromatografía. La elección de una técnica en particular depende de una serie de factores incluyendo la complejidad de la muestra, las propiedades físicas y químicas de los compuestos a separar, la resolución requerida, la facilidad y rapidez de la técnica y su capacidad para ser automatizada, la disponibilidad y el costo del equipo, y la necesidad de aislar la sustancias separadas.

#### B. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS

La Cromatografía de Líquidos se usa hoy en día a aquellos métodos en los cuales la separación tiene lugar dentro de una columna empacada. El material de empaque es la fase estacionaria y puede ser un sólido con capacidad adsorptiva o un soporte inerte revestido con una fase líquida. Se usa una fase líquida móvil como diluyente.(4)

El proceso de la cromatografía líquida se realiza en columna empacada. El material de empaque es la fase estacionaria y puede ser un sólido con capacidades adsorptivas o un soporte inerte revestido con una fase líquida móvil como eluyente.

El proceso de la cromatografía líquida puede realizarse usando dos métodos. El primero llamado Cromatografía de Columna Abierta, se deja fluir a la fase móvil a través de la columna empacada bajo la influencia de gravedad, o a lo sumo, a baja presión, p.e. 50-100 psi. En el segundo, la fase móvil es forzada a pasar a través de la columna empacada por la aplicación de alta presión. Este método se llama Cromatografía

Líquida de Alta Resolución (CLAR), debido a las eficiencias extremadamente altas que se obtienen (unos 50 000 platos teóricos por metro), o Cromatografía Líquida de Alta Presión (CLAP), debido a las altas presiones que se necesitan (1000 - 3000 psi).

En la CLAP, el diámetro de la partícula es típicamente de 10  $\mu\text{m}$  o menos, y como resultado de ello las columnas se empaican de forma compactada y desarrollan altas retropresiones que necesitan del bombeo de la fase móvil a través de la columna.(4)

Al igual que todas las demás técnicas cromatográficas, CLAP no es método de identificación, en general es una técnica de separación de gran resolución, pero que no identifica al compuesto que da la señal obtenida en el cromatograma. La comparación de los tiempos de retención no es un método seguro de identificación, ya que aunque estos son característicos de cierto compuestos, no son exclusivos y, por lo tanto, es necesario utilizar otras técnicas para este fin.(5)

En la actualidad no se ha encontrado aún un detector universal y sensible para CLAP, la gran mayoría solo han tenido un éxito limitado lo cual ha impedido, su adopción definitiva. Existen dos tipos de detectores de uso muy generalizado; el de índice de refracción, que es de respuesta universal, su sensibilidad es limitada y el de luz ultravioleta, que es muy sensible, pero su respuesta es selectiva y responde solo a compuestos que absorben radiación UV.(6) En el siguiente cuadro se observan los tipos de Cromatografía en CLAP. (Cuadro 1)

CUADRO 1

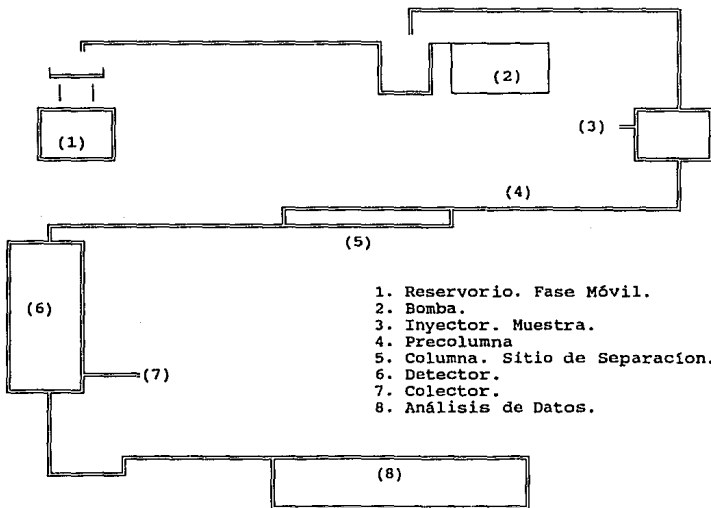
Tipos de Cromatografía en CLAP (7)

Tipo de Separación	Mecanismo	Moléculas que se separan	Solventes Utilizados
Cromat. de Exclusión	Separa moléculas por tamaños. Las más grandes eluyen primero	Desde proteínas y Carbohidratos hasta metacrilatos y neopreno	Tolueno Dioxano Acetona Agua
Cromat. Líq.-Sól.	Adsorción- Separa en base a polaridad. La menos polar eluye primero.	Hidrocarburos y aromáticos. Isómeros y compuestos no polares	Organicos no Ionizable (hexano)
Cromat. Líq.-Liq.	Partición del soluto entre 2 solventes inmiscibles. "Fase estacionaria más Polar".	Monosacáridos, Catcolaminas y aromáticos.	Polar no Polar (Agua-Ace tonitrilo)
Cromat. Líq.-Liq. (Fase Reversa)	Partición del soluto entre 2 solventes inmiscibles. "Fase móvil más Polar".	Herbicidas, Acidos Grasos	Agua con modificadores orgánicos. (Metanol)
Cromat. Intercambio Iónico	Iones de la muestra se intercambian con un contra-ión.	Aminoácidos Nucleótidos	Diversos Buffers orgánicos



### C. Componentes Básicos de un Sistema de CLAP.

Los componentes básicos de un sistema de CLAP están disponibles en diferentes presentaciones. En este caso se considerarán las formas más populares de la configuración y componentes individuales de un sistema; en el esquema No. 1 se ilustran.



ESQUEMA No. 1 (7)

**1. Reservorios.** Los reservorios de los disolventes son de vidrio o acero inoxidable, capaces de tener hasta un litro o más de fase móvil, la cual puede constar de disolventes orgánicos puros o de soluciones acuosas de sales o buffers. Las sustancias usadas para preparar estas mezclas deben ser de la mayor pureza posible, dado que los contaminantes se depositan eventualmente sobre la columna y modifican la eficiencia de la columna o interrumpen la cromatografía. Las fases móviles se someten a tratamientos de degasificación, por medio burbujeo continuo de Helio o Sonicando (por ultrasonido durante una hora), con el fin de eliminar la entrada de aire o gas a la bomba o el detector. Además se debe filtrar para remover partículas extrañas que puedan obturar al sistema.

**a. Fase Móvil.** Como sistema se considera propiamente a la fase móvil, ya que el control de presión, flujo y composición de ésta es de suma importancia.

Las características más considerables que debe presentar toda fase móvil para su utilidad en CLAP. son: Disolver a la muestra. No degradar o disolver a la fase estacionaria. Tener baja viscosidad. Ser compatible con el tipo de detector usado. Tener la polaridad adecuada para permitir una eficiencia conveniente de la muestra en la columna.

Es esencial que la muestra sea soluble en la fase móvil para que pueda ser transportada a través de la columna.

**2. Bomba.** Las columnas utilizadas en CLAP están rellenas

de materiales especiales de partículas muy pequeñas, lo cual hace que la resistencia al flujo de la fase móvil sea muy elevada. Por esta razón se requiere un sistema de bombeo que haga fluir la fase móvil a un flujo razonable, pues de lo contrario el análisis sería muy lento.

Los aspectos más importantes de todo sistema de bombeo son: Presión máxima de operación (usualmente hasta 4000 psi). Intervalo de volúmenes obtenidos. Reproducibilidad y constancia de flujo. Características de flujo (pausado o continuo).

También son importantes las resistencia a líquidos corrosivos, la facilidad para efectuar el cambio de fases móviles y la limpieza del sistema.

De acuerdo con las características de funcionamiento y diseño, se pueden considerar básicamente de dos tipos:

**a. Bombas mecánicas.** Existen dos tipos las cuales son:

1) Bombas recíprocas. Son bombas que desplazan flujos de volumen constante en forma no continua, si no más bien pulsante. La máxima presión que se puede obtener varía según el diseño, pero en general es de aproximadamente 600 atm.

Avances recientes en el diseño de este tipo de bombas lo constituye la bomba de doble pistón, accionado por un solo motor a través de un eje excéntrico, de forma tal que mientras un pistón succiona al disolvente el otro expulsa el líquido fuera de la bomba; el flujo de ambos pistones, ya libre de pulsaciones, es encausado por una vía común. Otro avance notable es el empleo de microprocesadores electrónicos para controlar el

funcionamiento de la bomba, con lo cual es posible mediante dos bombas de este tipo generar programación de fase móvil, también conocidas como gradientes de flujo.

2) Bombas de Desplazamiento continuo. Llamadas también bombas de embolo o bombas de tipo jeringa, son aquellas en que un émbolo o pistón es desplazado en forma continua y uniforme por un motor de precisión, comprimiendo el líquido contenido en una cámara de un cierto volumen, el líquido fluye luego a través de una abertura en la misma cámara y se obtiene así un flujo de volumen constante que puede variar según se desplace el émbolo a mayor o menor velocidad. El flujo desplazado por estas bombas es uniforme y continuo, o sea libre de pulsaciones, pero la capacidad de la bomba es limitada y para llenar la cámara es necesario suspender momentáneamente su operación.

b. Bombas neumáticas. En este sistema de bombeo el líquido es desplazado mediante la presión ejercida por un gas inerte a alta presión, ya sea en forma directa sobre el líquido o bien sobre el recipiente comprimible que lo contiene.

La presión máxima obtenida está limitada al volumen total que pueden bombear y la difusión que presenta el gas en el líquido.

3. Inyectores Se requiere un cuidadoso diseño puesto que debe resistir altas presiones, tener un volumen pequeño y sus cavidades deben ser bien barridas por la fase móvil.

Anteriormente la introducción de la muestra se realizaba

mediante una microjeringa. Actualmente se emplean válvulas inyectoras, aquí la muestra se introduce en la válvula mediante una jeringa, desplaza el líquido y llena el espacio interno en una pequeña porción de tubo capilar de acero (usualmente el volumen contenido en el tubo es de 10 a 100 microlitros). La muestra se inyecta en la columna accionando la válvula de forma tal que la disposición de entrada y de salida se invierte.

4. Precolumna. Se utiliza en casos especiales. La mayoría de los materiales que se utilizan para empacar columnas de CLAP se preparan de gel de sílice que se disolvera lentamente en disolventes cuyos valores de pH estén por debajo de 2 o por encima de 7. Esto da como resultado una disminución del material de empaque, originando espacios muertos en los cuales los solutos separados se vuelven a mezclar o se diluyen provocando, por lo tanto, originan una pérdida de la resolución. Por ello con el fin de reducir esto y proteger los materiales de tipo síliceo de la columna se coloca una pequeña columna de 2 a 5 cm empacada con gel de sílice antes de la columna. El material de esta columna se disuelve preferencialmente, saturando la fase móvil y preservando la columna analítica.

5. Columna. La columna es la parte esencial del sistema puesto que dentro de ella se lleva a cabo la separación de los componentes de la mezcla en estudio. Básicamente la columna consiste en un segmento de tubo de algún material inerte, de diámetro uniforme capaz de resistir altas presiones. El material más usado es el acero inoxidable. La longitud de las columnas es

por lo general, entre 10 a 50 cm. La capacidad de las columnas depende de su longitud, diámetro y material de empaque. Generalmente las columnas más eficaces son de diámetro pequeño (3 mm) y efectúan análisis muy rápidos, su capacidad es limitada, por lo que el tamaño de la muestra debe ser muy reducido.

En la actualidad las columnas empleadas en CLAP han alcanzado un grado de desarrollo sorprendente, siendo común el obtener eficiencias del orden de 50 000 platos teóricos por metro de columna.

Dentro de los avances tecnológicos en columnas encontramos los siguientes: Elaboración de partículas de tamaño reducido ( 3 micras). Uniformidad de tamaño de partículas. Refinamiento en los procesos de empaque de columnas. Procesos químicos muy eficientes en la preparación de materiales de fase estacionaria químicamente unida.

**6. Detectores.** El detector ideal sería aquel que satisficiera los siguientes requisitos: Altamente Sensible. Muy Estable. De lectura continua. De respuesta universal.

Aunque hoy en día no existe un detector ideal y los que hay disponibles sólo son adecuados para ciertas aplicaciones en particular.

**a. Detector de Índice de Refracción.** Mide la diferencia entre los índices de refracción del disolvente puro y de la solución de la muestra que sale de la columna; de esta manera se detecta cualquier cambio en la composición de la fase móvil. La respuesta de este detector es universal y su sensibilidad es

moderada, por lo general del orden de microgramos o partes por millón.

Debido a su respuesta universal es difícil efectuar programaciones de fase móvil con este detector, ya que además es sensible a las variaciones de flujo y de la temperatura. Se requiere tener un control de la temperatura de  $\pm 0.0001^{\circ}\text{C}$ .

b. **Detector de Luz Ultravioleta.** Su funcionamiento se basa en la absorción de luz por parte de la muestra al pasar a través de un haz de luz monocromática ultravioleta. Es lógico suponer que la respuesta de este detector será selectiva, ya que sólo se detectarán los compuestos que absorban luz de la longitud de onda a la que opera el detector.

Hay dos tipos de detectores de luz ultravioleta, el de longitud de onda variable, que no sólo es de aplicación más variada y sensible, sino que también es más costoso, y el fotómetro de luz ultravioleta que funciona a una sola longitud de onda, este es sencillo y económico; además se pueden obtener buenos resultados.

El fotómetro de luz ultravioleta, es relativamente insensible a los cambios de flujo y temperatura; siempre y cuando el disolvente no absorba en grado apreciable a la longitud de onda a trabajar. En condiciones óptimas se puede obtener sensibilidad de hasta 0.005 unidades de absorción, y si el compuesto absorbe intensamente es posible detectar cantidades de muestra del orden de hasta 2 nanogramos.

Se puede considerar a los detectores de luz ultravioleta

como los más sensibles y de uso más generalizado. La muestra no resulta alterada por el proceso de detección y el intervalo lineal es muy amplio; este detector no es sensible a los cambios de flujo o de temperatura y es apto para gradientes de fase móvil.

c. **Detector de Fluorescencia.** En la actualidad es el detector más sensible de que se dispone. En condiciones óptimas es posible detectar cantidades del orden de picogramos.

Hay dos diseños básicos de estos detectores de fluorescencia, los llamados fluorómetros de filtros, que emplean filtros para seleccionar la radiación de excitación y la de emisión, y los espectrofluorómetros que emplean monocromadores.

Los detectores de fluorescencia y los de luz ultravioleta pueden proporcionar espectros de absorción o emisión de las muestras retenidas momentáneamente en sus celdas, lo que permite utilizarlos para realizar análisis cuantitativos.

## 7. Análisis de Datos.

a. **Técnicas de Integración de Picos.** En la actualidad el análisis cuantitativo por medio de CLAP es tan confiable. A continuación se describen cada una de las técnicas que se conocen para integrar las áreas de los picos:

1) Altura del Pico. Aunque el área es una medida más precisa, la altura se emplea mucho porque es muy fácil de obtener, aunque es mucho más sensible a variaciones instrumentales. Si los picos están completamente distorsionados o asimétricos, o la cantidad de la muestra está fuera de



intervalo lineal del detector, no debe usarse esta técnica.

2) Altura por el ancho de la mitad del pico. Si los picos son simétricos tiene aproximadamente la forma de un triángulo, es por esto que el área se obtiene multiplicando la altura del pico por el ancho medio a la mitad de la altura. Esta técnica no es conveniente, ya que por lo general los picos tienden a ser asimétricos.

3) Triangulación. Consiste en trazar tangentes a ambos lados del pico hasta obtener un triángulo con la línea base y luego aplicar la fórmula de la base multiplicada por la mitad de la altura del pico. Este método no es muy preciso y está sujeto a errores al trazar las tangentes.

4) Cortar y Pesar. Esta técnica es laboriosa y lenta, pero bastante precisa. Básicamente lo que hace es determinar el peso por unidad de área del papel especial utilizado en el registrador, recortar después los picos trazados y pesarlos, de esta forma se determina su área. La precisión depende del cuidado que se tenga al recortar, la homogeneidad del papel, entre otros.

5) Integrador de disco. Es el método más convincente; el integrador transforma la señal que recibe el registrador en una serie de trazos en el papel que se puede relacionar con las áreas de los picos, la precisión es muy buena y sólo ofrece cierta dificultad en casos de picos no resueltos por completo o que presentan una desviación de la línea base.

6) Integradores Electrónicos. Los métodos de integración electrónica proporciona datos de una precisión en

muchas ocasiones superior a la del mismo cromatógrafo, la señal que recibe el registrador es transformada directamente en unidades relacionadas con el área y la concentración.

También se emplean sistemas de computación, muchos de estos instrumentos son capaces de presentar directamente resultados y datos completos de análisis, tales como tiempo de retención, áreas, concentración, porcentaje de composición, etc.

b. Concentración. Se lleva a cabo por los siguientes métodos.

1) Estándar Interno. Este método es menos susceptible a errores técnicos y compensa, en algunos casos, errores producidos durante la preparación de la muestra.

Consiste en comparar la relación obtenida entre las áreas obtenidas del compuesto problema y del estándar interno, con diversas concentraciones del compuesto problema. A la muestra problema se le agrega una cantidad conocida del estándar interno y se determina la relación de las áreas (muestra/patrón). Se efectúa así la lectura de composición de la muestra en la gráfica de calibración que se obtiene con las diversas concentraciones mencionadas anteriormente.

La sustancia utilizada como estándar interno debe describir una señal similar al compuesto analizado, estar presente en concentraciones similares, tener un tiempo de retención cercano al del compuesto problema pero sin interferir con él, ser inerte y no formar parte de la muestra.

El método del estándar interno no requiere inyectar

volúmenes de muestra con mucha precisión, además muchos otros errores, por ejemplo, la recuperación de la muestra y variaciones instrumentales se ven compensados porque tanto el compuesto problema como el estándar interno se analizan en las mismas condiciones. En el caso que se desee, se puede llevar a efecto un análisis estadístico de los datos obtenidos para determinar el límite de confiabilidad.

2) Calibración Externa. Consiste en comparar el área correspondiente a cantidades conocidas de la sustancia problema, con el área obtenida para la misma sustancia en la mezcla y cuya concentración se desea determinar. Se procede inyectando en el cromatógrafo cantidades exactas y de concentración conocida para obtener las áreas correspondientes a cada una de las concentraciones inyectadas y con estos datos se construye una curva de calibración, en donde se representa la concentración en función del área del pico, a continuación se inyecta cierto volumen de muestra de composición desconocida, se determina su área y se interpola en la curva de calibración para determinar su concentración.

Claro está que este método es muy sensible a errores en la inyección de patrones y de muestra y que sólo se puede eliminar en el muestreador automático.

3) Normalización. Este método puede aplicarse con o sin factores de corrección, depende de la precisión requerida y de la muestra. Relaciona las áreas obtenidas con el porcentaje de composición de la mezcla.

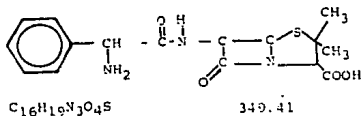
Esta técnica requiere que todos los componentes de la mezcla sean eluidos y que la respuesta del detector sea igual para todos ellos, en general esta condición no se cumple y da lugar a que la normalización de áreas lleve implícito el uso de factores de corrección o de respuesta. La respuesta de diversos compuestos puede variar de acuerdo con el detector usado, por esto se obtienen los factores de respuesta para todos los compuestos de la mezcla.(7)

### C. AMPICILINA PROPIEDADES

#### 1. Formula y Nombre

Ampicilina. Acido [2S-[2  $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,6B (S\*)]]-6-[(aminofemilacetil)-amino]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3,2,0] heptano-2-Carboxílico ó 6[D(-)- $\alpha$ -aminophenylacetamido] acido penicilánico, D(-)- $\alpha$ -aminobencilpenicilino y  $\alpha$ -aminobencilpenicilino.(8)

#### FORMULA DESARROLLADA



C<sub>16</sub> H<sub>19</sub> N<sub>3</sub> O<sub>4</sub> S (349.40); trihidrato (403,45). Potencia: 900 a 1050  $\mu$ g de C<sub>16</sub> H<sub>19</sub> N<sub>3</sub> O<sub>4</sub> S/mg calculados sobre la base anhidra. Ampicilina Sódica. C<sub>16</sub> H<sub>18</sub> N<sub>3</sub>NaO<sub>4</sub> S (371.39)

(403,45). Potencia : no menos de 845  $\mu$ g de ampicilina sobre la base anhidra.

## 2. Propiedades Químicas

### a. Isómeros

La presencia de átomos simétricos de carbono en el lado de la cadena provee de isómeros ópticos. El D-isomero , D(-)- $\alpha$ -aminobencilpenicilino, es más activo que el L-isomero.(9)

### b. Hidratos

Se ha reportado que la ampicilina puede existir en forma anhidra, monohidratada, sesquihidrato y trihidrato.(10)

### c. Sales

Sales de Potasio y Sodio. Sal ampicilina lisosima humana. Sal 2-nitro-1,3-indandiona y se ha preparado la sal de ampicilina de kanamicina .(11)

### d. Apariencia

La ampicilina es un polvo cristalino blanco, fluye libremente. Tiene el olor característico de las ampicilinas.

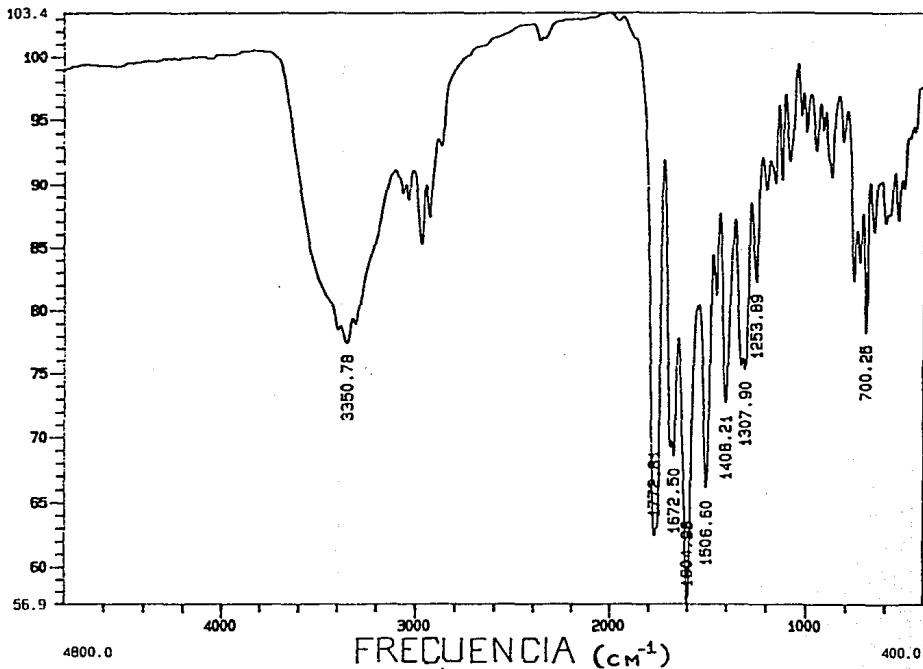
Se encuentra como trihidrato, que es estable a temperatura ambiente. Ampicilina Sódica: Polvo cristalino blanco a blancuzco e higroscópico (12).

## 3. Propiedades Fisicoquímicas

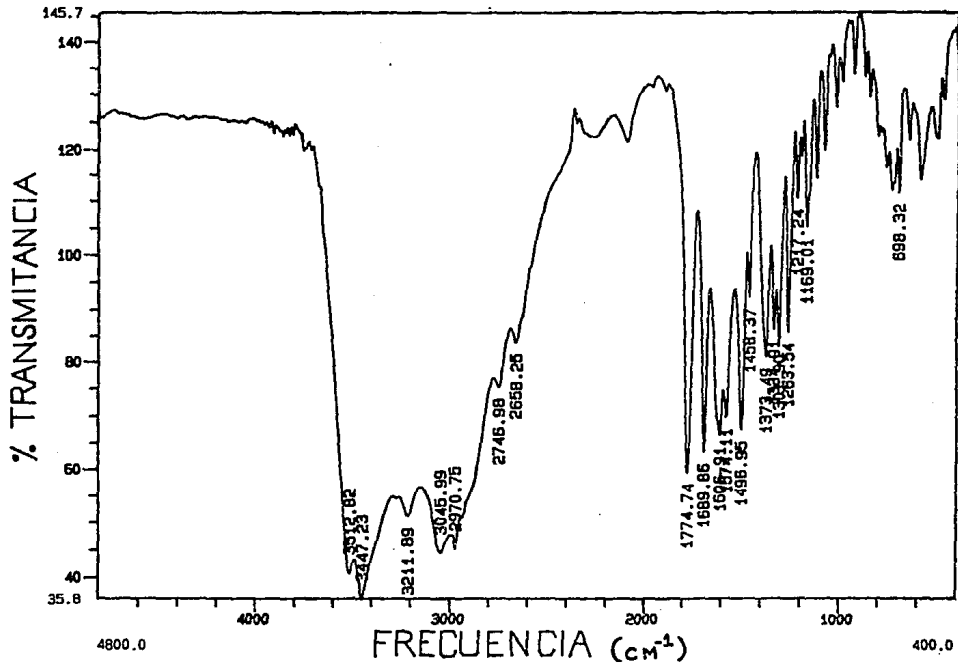
### a. Espectro

1) Espectro Infrarrojo.(IR) El espectro de la Ampicilina Sódica se muestra en la Fig. 1 y el de la Ampicilina Trihidrato en la Fig. 2.

% TRANSMITANCIA



ESPECTRO INFRARROJO ESTANDAR AMPICILINA SODICA ESTERIL  
SOLVENTE KBr AL 1%. BRISTOL MYERS SQUIBB S. A. DE C. V.  
SCANS: 32 RES: 4.0 TIME: 04/24/92 22: 35: 01 FIGURA 1



ESTANDAR DE ESPECTRO DE INFRARROJO DE AMPICILINA TRIHIDRATO  
 SOLVENTE KBr AL 1%. BRISTOL MYERS SQUIBB S. A. DE C. V.  
 SCANS: 32 RES: 4.0 TIME: 04/21/92 20: 23: 56 FIGURA 2

2) **Absorción Ultravioleta.** El espectro Ultravioleta de ampicilina trihidrato , de una sustancia de referencia de Squibb fue registrado en un Espectrofotometro Carry modelo 15 y se calcularon los valores de coeficiente de Absortibilidad (E\*\*). Con los siguientes resultados:

	Longitud de Onda, nm		
	257	262	268
Buffer Fosfatos pH 5.3			
E	8.69	7.81	5.61
Buffer Fosfatos pH 7.0			
E	7.94	6.69	4.55
Buffer Fosfatos pH 9.5			
E	7.28	5.03	-

Cuando se incrementa el pH de la solución buffer el E\*\* decrece. No se obtiene el pico a 268 nm en una buffer de pH 9.5. (13)

#### b. Propiedades Cristalinas

1) **Modificación de la estructura cristalina de Ampicilina.** La cristalización de la ampicilina presenta dos formas que depende de la temperatura de la solución acuosa. La ampicilina anhidra se obtiene de una solución acuosa a una temperatura cercana a los 60°C; el trihidrato se obtiene de una solución acuosa con una temperatura de 50°C. (14)

2) **Rango de Fusión.** La ampicilina monohidratada funde con descomposición a 202°C y la ampicilina sodica a 205°C, la ampicilina anhidra descompone a 199-202°C. El rango de fusión para la ampicilina trihidrato con descomposición es de 214.5°C.



3) **Solubilidad.** Un gramo en aproximadamente 90 ml de agua y 250 ml de alcohol absoluto; prácticamente insoluble en éter y en cloroformo. Ampicilina Sódica: Muy soluble en agua, en solución fisiológica y soluciones isotónicas de dextrosa. (15)

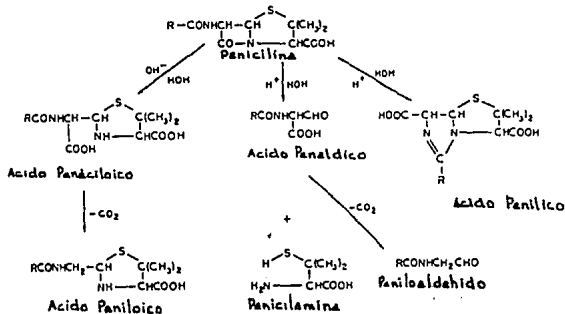
4) **Constante de Ionización, pK.** Se han reportado para la ampicilina  $pK_1 = 2.53 \pm 0.004$  y el  $pK_2 = 7.24 \pm 0.02$ . Jacobson calculo el valor de  $pK_2$  de 7.24 para ampicilina trihidrato y para Ampicilina Sódica:  $pK_{a1} = 2.66$ ;  $pK_{b2} = 7.24$ . (16).

#### 5) Rotación Óptica (17)

Ampicilina Sódica	$\alpha > +209^\circ$	(C = 0.2 en H <sub>2</sub> O)
Ampicilina Sesquihidrato	$\alpha > +283.1^\circ$	(C = 1 en H <sub>2</sub> O)
Ampicilina Anhidra	$\alpha > +287.9^\circ$	(C = 1 en H <sub>2</sub> O)

#### 4. Estabilidad

a. **Rutas Degradativas.** La ruta de degradación de las penicilinas es la hidrólisis. El esquema de la hidrólisis se muestra enseguida: (18)



#### **b. Estabilidad de Ampicilina en soluciones**

La concentración de ampicilina en solución y el tipo de vehículo controlan la degradación. La dextrosa y el manitol actúan como catalizadores en la hidrólisis de la ampicilina. La ampicilina a una concentración del 1% es incompatible con la dextrosa. Una solución normal salina es más recomendable como vehículo para administración intravenosa de ampicilina. La ampicilina sódica es estable entre 5°C y 25°C en una solución al 1% de Cloruro de Sodio.

La ampicilina es inactivada en soluciones de sacarosa, dextrosa a pH alcalinos. La máxima estabilidad de la ampicilina se encontró a pH 5.85. (19)

#### **c. Estabilidad para polvos de ampicilina.**

Los polvos de ampicilina son estables cuando se almacenan en un sistema cerrado a 43% y 81% de Humedad Relativa a temperatura ambiente por 6 semanas. La ampicilina también es estable a 35°C en el mismo sistema por nueve semanas. La ampicilina muestra un pequeño cambio en su contenido o potencia. (20)

#### **d. Hidrólisis Catalizada por el Ion Cuprico.**

El efecto del ión  $\text{Cu}^{+2}$  en la penicilina promueve la degradación para coordinar el complejo de  $\text{Cu}$  (II) y el correspondiente ácido peniciloico. (21)

### **5. Métodos de Manufactura**

#### **a. Microbiológico.**

La ampicilina puede ser preparada microbiológicamente por

incubación de microorganismos p. e., Pseudomonas especies, Kluyvera citrophila, Rhodopseudomonas spheroides, o Micrococcus ureae con ácido 6-amino-penicilánico y  $\alpha$ -fenilglicina., vía acilación enzimática del ácido 6-aminopenicilánico.(22)

#### b. Química

La ampicilina se puede sintetizar por condensación del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) con una protección de  $\alpha$ -fenilglicina.(23). La Ampicilina Sódica: Se prepara en un disolvente orgánico apropiado y se precipita como sal sódica mediante adición de acetato de sodio.(24)

### 6. Métodos de Análisis

#### a. Pruebas de Identificación.

Por Espectroscopía de Infrarrojo. Electrofóresis. Identificación microbiológica. Por Cromatografía de Capa Fina. Cromatografía de Papel.(25)

#### b. Métodos de Cuantificación

- 1) Espectroscopía por Ultravioleta
- 2) Determinación Fluorométrica. Fluidos Biológicos.
- 3) Determinación Polarográfica.
- 4) Cromatografía de Capa Fina.
- 5) Cromatografía de Papel.
- 6) Titulación Iodométrica.
- 7) Titulación Amperométrica.
- 8) Métodos Microbiológicos.(26)

## 7. Propiedades Farmacológicas

Su espectro antibacteriano de la Ampicilina es más amplio que el de las penicilinas naturales, es sensible a la beta lactamasa producida por microorganismos gramnegativos y grampositivos y, por lo tanto, su efectividad es disminuida cuando se aplica al tratamiento de las infecciones producidas por estafilococos. Tiene efecto bactericida e interfiere en la síntesis de la pared bacteriana y facilita su destrucción; esta acción es producto de inhibir la síntesis de peptidoglicano, componente heteropolimérico de la pared celular que proporciona su estabilidad mecánica y rigidez. La ampicilina no debe administrarse conjuntamente con agentes bacteriostáticos (cloranfenicol, tetraciclinas, eritromicina o sulfonamidas) ya que estos inhiben su acción bactericida. Se absorbe bien en el tracto gastrointestinal y después de una dosis oral de 500 mg las concentraciones plasmáticas máximas ( 3 mcg/ml ) se detectan a las 2 horas y persisten en el plasma por 4 horas. Por vía intramuscular (0.5 - 1.0 g) las concentraciones alcanzan 7 a 10 mcg/ml y tienen una vida media aproximada de 90 minutos. Se distribuye por todo el organismo y se une en un 20% a las proteínas plasmáticas. Se elimina rápidamente por la orina y en cierta proporción por la bilis. (27)

La ampicilina es ácidorresistente y por vía oral se absorbe un 40%. La biodisponibilidad depende de la dosis. Se fija a las proteínas plasmáticas en un 8 a 20%. El volumen de distribución es de 0,17 a 0,31 ml/g. Cerca del 45% se excreta intacta con la

orina. Su vida media en el plasma es de  $\frac{1}{2}$  a 1 hora, pero puede durar hasta 20 horas en la insuficiencia renal.

Cabe mencionar que el probenecid aumenta la concentración y la persistencia de la ampicilina en plasma, efecto que también se presenta con la administración concomitante de penicilina G.

#### 8. Indicaciones

Es útil en infecciones por cepas sensibles Shigella, Salmonella, E. coli, H. influenzae, Aerobacter, enterococos, N. gonorrhoeae, N. meningitidis y Pr. mirabilis. Como estas bacterias se hacen resistentes con facilidad elaborando penicilinasas, a menudo se administra ampicilina en combinación con cloxacilina. Su espectro in vitro frente a los cocos grampositivos es similar al de la penicilina G, aunque por lo general un tanto menos eficaz, salvo que es un poco más potente para Strep. fecalis (enterococo). Tiene la mitad de la eficacia frente a Staph. aureus y 1/20 frente a Strep. pyrogenes. Es poco eficaz para los microorganismos productores de penicilasa. (28)

La ampicilina es útil en el tratamiento de infecciones de vías urinarias por E. coli, Pr. mirabilis, N. gonorrhoeae, estreptococos no hemolíticos y enterococos resistentes a la penicilina G. Muchas veces se le combina con la cloxacilina para este fin. Esta indicada en particular en las infecciones del tracto respiratorio por H. influenzae y Strep. pneumoniae juntos. Como la ampicilina se excreta por la bilis, es valiosa para tratar infecciones en el tracto biliar por E. coli o

salmonelas, shigelas o enterococos penicilinorresistentes. La salmonelosis intestinal responde de manera imprevisible. Muchas veces con la ampicilina se obtiene una respuesta satisfactoria en la meningitis infantil cuando la bacteria es un meningococo, neumococo o H. influenzae. En las infecciones mixtas que contienen cocos y bacilos ampicilinosensibles, la ampicilina es preferible en lugar de una combinación con penicilina G y un aminoglucósido. (29)

#### 9. Reacciones Adversas

La ampicilina produce reacciones alérgicas típicas de otras penicilinas. Es 5 veces más alérgica que la fenoximetilpenicilina. La incidencia de erupciones es de un 7%, pero la mayoría de éstas no son de origen alérgico; prevalecen en particular en pacientes con mononucleosis infecciosa. A menudo los pacientes alérgicos a la penicilina G también son alérgicos a la ampicilina. La droga puede, además, causar náuseas y vómitos, diarrea, glositis y estomatitis. (30)

Por otro lado, se puede presentar flebitis después de infusión endovenosa y dolor en el sitio de inyección intramuscular. En niños produce elevación moderada de la transaminasa glutámico oxalacética. Se han reportado algunos casos de nefropatía y otros de agudización de enfermedades renales previas. La mayoría de los efectos adversos disminuyen o desaparecen al suspender la ampicilina.

#### 10. Contraindicaciones

En caso de presentarse las manifestaciones alérgicas debe

suspenderse su administración e iniciar el tratamiento específico (aminas depresoras, antihistaminicos y corticoesteroides). En tratamientos crónicos se deben evaluar periódicamente los sistemas renal, hepático y hematopoyético. Se recomiendan precauciones en el recién nacido y en prematuros, ya que su eliminación es muy lenta.

#### 11. Dosis

La ampicilina puede usarse en la forma anhidra o hidrato, pero la ampicilina comercial suele ser el trihidrato. Para la Ampicilina Sódica tiene las acciones y usos de la ampicilina y es la forma en que se emplea ésta para administración intramuscular e intravenosa. ( Equivalente anhidro. Oral, adultos y niños de 20 Kg o más. 12.5 a 25 mg/Kg de peso corporal (o 250 a 500 mg) cada 6 horas; en caso necesario pueden darse hasta 4 g diarios. Para gonorrea, una sola dosis de 3.5 g con 1 g de probenecid. Lactantes y niños de hasta 20 Kg de peso, 12.5 a 25 mg/Kg cada 6 horas o 16,7 a 33,3 mg/Kg cada 8 horas.

Formas de dosificación. (equivalente anhidro). Cápsulas de 250 y 500 mg; para suspensión oral, 100 mg/ml y 125,250 y 500 mg/5 ml al reconstituir.

Ampicilina Sódica: Intramuscular o intravenosa adultos y niños de 20 kg o más 250 a 500 mg cada 6 horas; para meningitis bacteriana o septicemia, 1 a 2 g cada 3 o 4 horas o bien 18,8 a 25 mg/kg cada 3 horas o 25 a 33 mg/kg cada 4 horas; para gonorrea, 500 mg repetidos cada 8 a 12 horas; el límite diario es

300 mg/kg (16 g). Lactantes y niños de menos de 20 kg, por lo general 6.25 a 25 mg/kg de peso corporal cada 6 horas o bien 8.3 a 33.3 mg/kg cada 8 horas; para meningitis o septicemia dosis para adultos. Formas de dosificación (equivalente de ampicilina anhidra. Estéril: 125, 250 y 500 mg; 1, 2 y 10 gr. Cada gramo contiene 3 mEq de sodio.(31)

#### **D. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS. CONCEPTOS GENERALES.**

Las etapas importantes que se deben considerar para la validación de métodos analíticos son las siguientes:

1. Diseño.
  2. Desarrollo.
  3. Validación.
1. Diseño

a. **Revisión bibliográfica.** La etapa de diseño comprende una revisión exhaustiva, con la finalidad de conocer las propiedades físicas, químicas, estabilidad e interacciones del principio activo; así como los estándares de referencias para la cuantificación del mismo principalmente por CLAP.

b. **Adaptación Parcial.** En esta etapa, como su nombre lo indica comprende una adaptación parcial, esto es parte de las condiciones de preparación de las muestras; así como las condiciones cromatográficas reportadas en la literatura, se adaptan en el diseño del método analítico objeto de estudio.

c. **Adaptación Total.** Es la reproducibilidad fiel de un método analítico reportado en la literatura, en otras palabras, es



la adaptación absoluta de las condiciones de operación que nos especifica un método analítico que se toma como referencia.

## **2. Desarrollo**

Tomando como antecedente que se va a realizar una adaptación parcial del método analítico, se considera en primera instancia, la etapa de desarrollo cubrirá los siguientes puntos:

### **a. Condiciones Cromatográficas Preliminares.**

1) Optimización: Fase Móvil, pH, Fuerza Iónica, Flujo, Columna Analítica, Tipo de detección

### **b. Eficiencia de Extracción.**

1) Selección: Solvente de elección, Agitación, pH, Tipo de Evaporación, Columna Analítica, Tipo de detección

2) Optimización: Tiempo de Agitación, Tiempo de Sonicación.

**c. Selección del estándar interno.** El estándar interno es a menudo utilizado como parte del método analítico para la cuantificación de un principio activo determinado. Su uso presenta las ventajas de lograr mayor precisión y minimiza al máximo los errores de manipulación que pudieran cometerse durante el análisis.

## **3. VALIDACION.**

Uno de los principales objetivos de la Industria Farmacéutica considera asegurar un método adecuado de control de calidad de los medicamentos, es por esto que la validación retrospectiva y prospectiva hoy en día ha tomado gran importancia.

La validación de los métodos analíticos permite evaluar parámetros estadísticos como son: **Precisión, Exactitud, Linearidad, Reproducibilidad**, entre otros, de estos, se obtiene información sobre la confiabilidad del método analítico que se emplea en el análisis del activo o activos de una forma farmacéutica.

Por otra parte, los criterios que deben cumplir los parámetros estadísticos son establecidos por la Secretaria de Salud del país (México), y Food Drugs Administration (FDA) por parte de Estados Unidos Americanos, las cuales dan una serie de normas o especificaciones legales que respaldan al método analítico, y tomando esta referencia, cada laboratorio de acuerdo a sus necesidades llevará a cabo una validación del método analítico.

Se deben validar los métodos analíticos para principios activos, formas farmacéuticas, métodos indicadores de estabilidad, así como los métodos de control para la eficiencia del sistema. Para una validación se debe reunir la documentación siguiente: Procedimiento de Validación, Criterios de aceptabilidad y Reporte de Validación.

Por otra parte, para lograr un mejor entendimiento de la validación de métodos analíticos es conveniente seguir un esquema que señala paso por paso. Es decir, seguir los puntos siguientes:

- a. Definiciones
- b. Procedimiento de Validación
- c. Criterios de Aceptación.

**d. Requisitos Mínimos**

**a. Definiciones**

- 1) **Formulación:** Mezcla de todos los ingredientes incluyendo el principio activo deescrito en el expediente de la formula maestra.
- 2) **Producto:** Mezcla de todos los componentes para lograr una formula obtenida mediante el proceso de manufactura.
- 3) **Sustancia de Referencia:** Sustancia patrón del fármaco certificado de acuerdo a las Normas Oficiales.
- 4) **Placebo:** Formulación o producto preparado omitiendo el principio activo.
- 5) **Preparación de la Sustancia de Referencia:** incluyendo el principio activo descrito en el expediente de la formula maestra.
- 6) **Preparación de la Muestra:** Una formulación producto preparado como lo especifica en el procedimiento analítico.
- 7) **Placebo Adicionado:** Placebo preparado en cantidad equivalente a la del producto y adicionado a concentraciones variables de la sustancia patrón de referencia dentro de un intervalo de concentración especificado.
- 8) **Exactitud:** La concordancia que existe entre un valor obtenido experimentalmente y el valor verdadero.
- 9) **Precisión:** La repetibilidad de los resultados dentro de una serie de repeticiones.
- 10) **Reproducibilidad:** Es la concordancia entre los

resultados individuales obtenidos con el mismo método y material de prueba pero bajo diferentes condiciones; considerando analista, equipo, reactivo y día.

11) **Especificidad:** La selectividad del método analítico en presencia de un placebo específico y/o de los productos de degradación.

12) **Cantidad mínima cuantificable:** La cantidad mínima a la cual el método analítico es lo suficientemente preciso para producir un estimado satisfactorio de una concentración desconocida.

13) **Cantidad máxima cuantificable:** La concentración donde la sensibilidad comienza a cambiar, por ejemplo la función de calibración es no lineal.

14) **Sensitividad:** Incremento mínimo de concentración medible que esta definido por la pendiente de la gráfica respuesta-concentración y el incremento mínimo de respuesta medible o la desviación estándar de la respuesta variable.

#### **b. Procedimiento de Validación**

1) **Linealidad.** Adicionar placebos del producto en cantidades conocidas del principio activo, cubriendo un intervalo de concentraciones de acuerdo a la aplicación del método analítico; llevarlo a cabo en diferentes días, incluyendo cada uno de ellos la preparación de reactivos soluciones de referencia. En forma paralela analizar soluciones de referencia y si es necesario analizar una curva de referencia con la finalidad de calcular recobros de principio activo a partir del

placebo.

Los placebos adicionados se preparan a una concentración en que el placebo permanezca constante y equivalente al producto.

El Método analítico se considera validado unicamente para la formulación específica y dentro del intervalo de concentración estudiado.

Analizar cada muestra y su solución de referencia siguiendo el método propuesto.

Registrar y tabular las respuestas correspondientes a cada concentración de la muestra, considerando como el valor "X" a las cantidades del principio activo, y como el valor "Y" a la respuesta obtenida (áreas, alturas, mg recuperados, porciento del agregado recuperado, etc.)

2) **Exactitud.** Pueden emplearse los resultados de porcentos recuperados de la linealidad, pero siempre calculados en base a la cantidad adicionada.

Si no se utilizan los resultados de la linealidad, hacer 10 recobros adicionando placebo del producto con cantidades conocidas del principio activo y analizar las muestras de manera independiente por el mismo analista y en el mismo equipo.

### 3) **Precisión.**

a) **Repetibilidad.** Analizar al menos seis muestras de un lote del producto terminado utilizando el método descrito.

Registrar y calcular la respuesta obtenida en

por ciento del etiquetado o en mg encontrados.

b) **Reproducibilidad.** El diseño más comodo y que consume menos tiempo es el siguiente:

Analizar una muestra homogénea de un lote en particular por triplicado, para cada uno de los analistas en dos días diferentes.

Tabular los resultados, donde "Y" es el resultado de cada analista (primer subíndice en cada día (segundo subíndice) para cada repetición (tercer subíndice)

5) **Especificidad.**

La prueba de especificidad del método se realiza de acuerdo a su aplicación, en el caso para producto terminado solamente se efectuará las probables interferencias debidas a los excipientes. (32)

**c. Criterios de Aceptación**

PARAMETRO A EVALUAR	CROMATOGRAFIA % C.V.	ESPECTROF. % C.V.	TITRIMET. % C.V.
PRECISION SIST.	2 máx.	2 máx.	3-5 máx.
LINEALIDAD SIST.	1.5	3.0	3.0 a 5.0
EXACTITUD	2 máx.	2 máx.	3-5 máx.
LINEALIDAD MET.	2.0	3.0	3.0 a 5.0
PRECISION MET.	2 máx.	3 máx.	3 máx.

**d. REQUISITOS MINIMOS PARA VALIDACION DE METODOS ANALITICOS**

PARAMETRO A EVALUAR	PARA CONTROL QUIMICO	BIODISPONIBILIDAD	ESTABILIDAD
EXACTITUD	X	*	X
LINEALIDAD Y PRECISION	X	X	X
LIMITE DE DETECCION		*	X
ESPECIFICIDAD INTERFERENCIAS	X	*	X
ESPECIFICIDAD ESTABILIDAD		*	X
ESTIMACION DE LA MUESTRA	X *	X	X

\* Puede requerirse de acuerdo a especificaciones de la prueba.

## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Actualmente se considera que una parte integral del desarrollo o implementación de un método analítico es la Validación del mismo, principalmente porque es un requisito ante la Secretaria de Salud y debe probarse para establecer que su capacidad satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

Anteriormente se analizaban la potencia química de la Ampicilina en cualquiera de sus presentaciones, por el clásico método iodométrico, y aún se determina la potencia microbiológica. Debido a que así lo requiere oficialmente el Code of Federation Regulation (CFR) para antibióticos, es decir es el método oficial.

En Inyectable se utiliza Ampicilina Sódica, en cápsulas y Suspensiones se usa Ampicilina Trihidrato.

En la actualidad se hizo necesario el desarrollo de un método con mayores ventajas como las que ofrece la Cromatografía de Líquidos a Alta Presión (CLAP). Tales como especificidad (por realizarse a cabo la mejor separación o resolución de la sustancia de interés), sensibilidad (de cuantificación), costo del análisis, por el menor tiempo en que se realiza.

Así mismo, la necesidad de las Industrias por encontrar un equipo de mayor eficiencia, como lo es un Cromatografo de Líquidos programable con automuestreador o inyector automático.



Por este cambio tan radical de instrumentación se hace necesario técnicamente la calificación del equipo y por supuesto la Validación del método analítico, con la finalidad de establecer los parámetros óptimos de trabajo rutinario en un Laboratorio de Control de Calidad. Y para cumplir finalmente con los requisitos oficiales que solicita la Secretaría de Salud en nuestro país.

### III. OBJETIVOS

#### **OBJETIVO GENERAL**

1. Implementar y Validar un Método analítico por Cromatografía de Líquidos a Alta Presión, para cuantificar Ampicilina en sus diversas formas farmacéuticas.

#### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Establecer los parámetros de Manejo en el nuevo equipo.
2. Verificar la eficiencia de la Metodología Analítica, a través de la validación.
3. Establecer las concentraciones que se manejaran en cada una de las formas farmacéuticas evaluadas.

### IV. HIPOTESIS

Al efectuar la validación del método implementado por Cromatografía de Líquidos a Alta Presion para Ampicilina, será factible analizar dicho principio activo cualquiera de sus presentaciones.

## V. METODOLOGIA

### A. METODO GENERAL

#### 1. Equipo

- Balanza Analítica Marca Ohaus. Modelo Galaxy 160
- Potenciómetro Beckman 71 pHMETER con electrodo Combinado
- Cromatógrafo Watters Modelo 600 EWISP. Sistem Controller
- Detector Tunable Absorbancia. Watters 484
- Automuestreador y/o Inyector Watters 712 DWISP
- Columna  $\mu$ -Bondapack C 18 125 Å de 10  $\mu$ m y de 3.9 x 300 mm-Hm. Parte No. 27321. Empacada en acero inoxidable.
- Computadora (PC). NEC.

#### 2. Material

- Matraz Volumétrico de 1000 mL
- Matraces volumétricos de 50 mL
- Pipetas Volumétricas de 5 mL.
- Frascos Viales con tapa. Millipore No. 78514.
- Jeringa desechable de 5 mL
- Soporte de Polipropileno. Filtratonsvorsata 13 mm.
- Filtro de Acetato de Celulosa de 0.45  $\mu$ . Sartorius No. 11106-13-N. Lote 0191 11106 900721.
- Aparato de Filtración Millipore de 47 mm con Sistema de Prensa
- Filtro Membrana de 0.45  $\mu$  HV. Millipore.

### 3. Reactivos

- Acetonitrilo Grado HPLC Mallinckrod Chromar . Lote 2856 KHAH.
- Dodecil Sulfato de Sodio. Merck catálogo 13760 . No se sustituye por otro reactivo.
- Acido Fórmico. JT Baker. Cat. 0128. Lote 38229. Grado Análítico
- o-o'-Bifenol. Aldrich. Cat. 11.5819
- Agua Destilada de la Planta de Bristol.
- Ampicilina USP
- Ampicilina Sódica Estándar Secundario. Lote Fys 1556-AS Potencia: 932.91  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de ampicilina base.
- Ampicilina Trihidrato Estándar Secundario. Lote Fys 4555 ATC. Potencia: 862.05  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de ampicilina base
- Helio de Alta pureza. Marca Aga.
- Nitrogeno de Alta pureza. Marca Aga.

### 4. Soluciones

- **Solución Stock:** (0.035 M dodecil sulfato de sodio/ 2.0 M de ácido fórmico). En un matraz volumétrico de 1000 ml, adicionar 10.1 gr de dodecil sulfato de sodio y 87 ml de ácido fórmico. Disolver y llevar a volumen con agua. Se debe tener cuidado de evitar la espuma. Almacenar en refrigeración y en un contenedor adecuado.
- **Solución Diluyente:** 30% de Acetonitrilo: 70 % Agua.
- **Solución de Estándar Interno:** Colocar aproximadamente 160 mg de O-O'-Bifenol en un matraz volumétrico de 200 ml, llevar a volumen con solución diluyente.

## 5. Método

### a. Preparación del Equipo y parámetro de Operación

Encender el equipo de acuerdo al Procedimiento de operación para Cromatógrafo de Líquidos de Alta Presión.

Modelo 600E WISP\*.

Verificar la presencia de Helio y Nitrogeno

Temperatura de la Columna: ambiente

Velocidad de Flujo: 3 ml/min.

Detector: 254 nm con atenuación de 0.1.

Volumen de inyección: 25  $\mu$ l

Concentración del Estándar: 2.5 mg/ml de Ampicilina base.

### b. Preparación de la Fase Móvil

Fase Móvil: 30% acetonitrilo, 0.2 M ácido fórmico, 0.0035 M de dodecilsulfato de sodio, cbp agua. Un pH aparente de 2.4

En un matraz volumétrico de un litro agregar 100 ml de la Solución Stock y 300 ml de Acetonitrilo. Diluir a la marca de aforo con agua destilada. Filtrar al vacío a través de membrana 0.45  $\mu$  de poro (HV) Millipore. El pH aparente de la fase móvil debe estar en un intervalo de 2.3 a 2.5.

Antes de pasar por la columna burbujear Helio durante 10 minutos a 100 ml/min, para desgasificar.

\*. Procedimiento Bristol No. 020-PL-91.

### **c. Preparación del Estándar**

Pesar aproximadamente 146 mg de Ampicilina Trihidrato estándar colocarlo en un matraz volumétrico de 50 ml y agregar 5 ml de estándar interno. Disolver y diluir a volumen con solución diluyente. Colocar un filtro membrana de 0.45  $\mu$  Sartorius, sobre la superficie ranurada del soporte de propileno, colocar el empaque y cerrar el soporte con la otra parte del filtro. Ensamblar con una jeringa y purgar el filtro con la solución a trabajar. Recibir el filtrado en un vial, tapar e identificar cada vial con la leyenda "estándar".

El estándar una vez identificado se coloca en el carril correspondiente del inyector automático.

### **d. Preparación de las muestras**

Pesar la muestra, y tratar igual que el estándar. Recibir el filtrado en un vial, tapar e identificar cada vial con la leyenda "muestra". Las muestras una vez identificadas se colocan en el carril correspondiente del inyector automático.

### **e. Programación para Inyección**

Ya colocadas el estándar y las muestras en el inyector, registrar la concentración del estándar como ampicilina base en mg/ml y registrar el peso de la muestra en g. Programar el Sistema Controlador con los parámetros de operación e indicar 2 inyecciones por frasco vial de estándar y muestra. Imprimir la información de las áreas de las muestras y el estándar.

## B. Diseño Experimental

### 1. Linealidad del Sistema de Medición

El primer parámetro analítico a evaluar es la Linealidad del sistema de medición, esto permite establecer si el análisis a un solo punto (una concentración del estándar) es adecuada. Este estudio permite establecer si se cumple la Ley de Lambert-Beer, fenómeno espectroscópico para aquellas moléculas que absorben emisiones de luz ultravioleta. Por el diseño del método la linealidad contempla balanza analítica, material volumétrico, sistema y analista.

#### a. Objetivo

Establecer la linealidad del sistema en el intervalo de concentración del 80 a 120 % en la fase móvil. El 100 % es una concentración de 2.4 mg/ml de ampicilina base a partir de ampicilina sódica y/o trihidrato.

#### b. Criterio de Aceptación

Asociación altamente significativa entre las áreas relativas y la concentración de ampicilina, dado un modelo de regresión lineal simple.

El coeficiente de determinación de áreas relativas-concentración de ampicilina, debe ser como mínimo de 0.98 en caso contrario se detecta falta de ajuste al modelo de regresión lineal simple.

El coeficiente de variación de la regresión lineal simple debe ser como máximo 1.5 %. (ver pág. 39) . En el intervalo de

confianza al 95% del parámetro ordenada al origen modelo de regresión lineal simple de cantidad adicionada -cantidad recuperada de ampicilina debe incluir el cero.

## 2. Precisión del Sistema de Medición

El siguiente parámetro analítico a evaluar en la determinación de la confiabilidad de esta metodología analítica es la Precisión del Sistema. Esto permite establecer la variación propia del Sistema, que por el diseño del método los constituye el equipo propio (CLAP), analista, material volumétrico y balanza analítica. El sistema del método está basado en la absorción de la ampicilina a la luz ultravioleta.

### a. Objetivo

Establecer la precisión del sistema a una concentración aproximada de 2.4 mg/ml de ampicilina base en fase móvil, a partir de ampicilina sódica y trihidrato.

### b. Criterio de Aceptación

La Desviación Estándar Relativa de las áreas relativas debe ser menor al 1.5%. (ver pág. 39)

## 3. Exactitud del Método

Si la Linealidad del sistema es satisfactorio, el siguiente parámetro a evaluar es la exactitud a un porcentaje fijo, esto permite establecer si el análisis presenta o no error sistemático constante. Este estudio permite además establecer la repetibilidad de la metodología analítica.



#### a. Objetivo

Establecer la exactitud y repetibilidad del método a una concentración aproximada de 130 mg de ampicilina base.

#### b. Criterio de Aceptación

En el intervalo de confianza al 95% de confianza para el recobro experimental, debe incluir el 100%. El coeficiente de variación de los recobros experimentales debe ser como máximo de 2.5 %. (ver pág. 39)

#### 4. Linealidad del Método

Si la exactitud del método a un porcentaje fijo es satisfactoria, el siguiente parámetro analítico a evaluar es la linealidad del método. Este estudio permite establecer:

Si al variar la cantidad adicionada, varía la cantidad recuperada. Si la relación entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada, describe un modelo de regresión lineal simple.

Si la variación de la cantidad recuperada es aceptable.

#### a. Objetivo

Establecer la linealidad del método en el intervalo de concentración del 80% (2 mg/ml) al 120 % (3 mg/ml) de la cantidad adicionada.

#### b. Criterio de Aceptación

Asociación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada de ampicilina, dado un modelo de regresión lineal simple.

El coeficiente de determinación de áreas relativas-

concentración de ampicilina debe ser como mínimo de 0.98 y/o no se detecta falta de ajuste al modelo de regresión lineal simple de áreas relativas concentración de ampicilina.

En el intervalo de confianza al 95% del parámetro ordenada al origen modelo de regresión lineal simple de cantidad adicionada -cantidad recuperada de ampicilina debe incluir el cero.

En el intervalo de confianza al 95% del parámetro pendiente del modelo de regresión lineal simple de cantidad adicionada -cantidad recuperada de ampicilina debe incluir el uno.

El coeficiente de variación de la regresión lineal simple debe ser como máximo 2.5 %. (ver pág. 39)

##### 5. Precisión del Método

Si la linealidad del método es satisfactoria, el siguiente parámetro a evaluar es la precisión del método.

Este estudio permite establecer:

Si el método analítico es reproducible en diferentes corridas por un mismo analista. Si el método analítico es reproducible por diversos analistas.

Establecer límites de control para los resultados analíticos generados bajo las mismas condiciones (equipo, reactivos, analista y corrida).

El esquema básico del estudio de precisión es interanalista/intercorridas. El estudio permite establecer

si los resultados analíticos se ven influenciados por las fuentes de variación corrida y analista.

a. Objetivo

Establecer si el método es reproducible en distintas corridas independientes por un mismo analista.

Establecer si el método es reproducible por distintos analistas. Establecer límites de control para los resultados analíticos.

b. Criterio de Aceptación

El coeficiente de variación total no debe exceder el 3%.

No se debe detectar efecto significativo del analista o su magnitud de su efecto no debe exceder el 3%.

No se debe detectar efecto significativo de la corrida o su magnitud de su efecto no debe exceder el 3%. (ver pág. )

6. Especificidad

Para Control de Calidad se realiza de la siguiente manera: analizar placebos del producto con el método propuesto.

Identificar las respuestas del (los) activos(s), excipientes en caso de tenerla.

Confirmar que el método desarrollado sea capaz de separar la sustancia de interés de cualquier interferencia presente.

De nos ser así, optimizar el método o desarrollar otro.

**VI. RESULTADOS****A. Linealidad del Sistema de Medición****1. Ampicilina Sódica**

En la Tabla 1, se reporta el peso de las muestras y el área obtenida para la Ampicilina Sódica y el Estándar Interno.

T A B L A 1			
MUESTRA	PESO (mg)	AREA AMPICILINA SODICA	AREA ESTANDAR INTERNO
1	111.0	852030	7456931
		852793	7478741
2	112.7	855870	7473381
		859924	7503741
3	111.8	850850	7480891
		854834	7472811
4	139.2	1074242	7472091
		1078107	7480921
5	139.0	1042236	7208441
		1037613	7212221
6	139.4	1061269	7424181
		1063295	7396621
7	166.8	1276179	7413831
		1276726	7420071
8	166.4	1323838	7710701
		1328975	7732141
9	166.9	1286961	7449741
		1290052	7476251

De la tabla 1 se genera la tabla 2, donde se reporta la concentración, el área relativa de cada inyección (cada muestra se inyecta por duplicado) y el promedio aritmético del área relativa de cada muestra.

A partir de la tabla 2, se obtiene la información de cantidad adicionada (mg/ml) y propiedad medida (área relativa promedio, con el fin de definir a la variable predictoría a la cantidad adicionada (x) y ala propiedad medida como variable de respuesta (y)

T A B L A 2			
MUESTRA	CONCENTRACION MG/ML (X)	AREA RELATIVA	PROMEDIO ARITMETICO (Y)
1	2.07106	0.1142601 0.1140289	0.1141445
2	2.10278	0.1145224 0.1145993	0.1145609
3	2.08599	0.1150731 0.1143925	0.1147328
4	2.59722	0.1437672 0.1441142	0.1439407
5	2.59349	0.1445854 0.1438687	0.1442271
6	2.60095	0.1429476 0.1437541	0.1433508
7	3.11219	0.1721348 0.1720638	0.1720993
8	3.10472	0.1716884 0.1718767	0.1717825
9	3.11405	0.1727524 0.1725533	0.1726528

a. El análisis estadístico consiste en:

- 1) Ajuste de la relación bivariada al modelo de regresión simple

$$y = m x + b$$

Al sustituir los datos en las ecuaciones 1.2 y 1.3:

$$m = 0.05633451 \text{ uar/mg/ml}$$

$$b = -0.0028884 \text{ uar}$$

Donde uar = unidades de área relativa

b. Estimación de la variación de la variable de respuesta ajustada al modelo y la media de asociación entre las variables dado el modelo.

Al sustituir la información en las ecuaciones 1.4, 1.5 y 1.6:

$$S_{xy} = 0.0006217 \text{ uar}$$

$$CV = 0.4332716 \%$$

$$r^2 = 0.99946$$

c. Determinar si existe asociación entre ambas variables (predictoria y de respuesta). El análisis de la varianza de regresión lineal simple se describe en la tabla 3.

T A B L A 3  
T A B L A D E A N A D E V A

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F cal
REGRESION	GLR = 1	SCR= 0.0049925	MCR=0.0049925	12915.15**
ERROR DE REGRESION	GLER = 7	SCER= 0.0000027	MCER= 3.86561 10	

d. Estimación por intervalo con una confianza del 95% para el valor del parámetro de la ordenada al origen. Al sustituir en las ecuaciones respectivas:

$$-0.00597 \text{ uar} < B < 0.00020$$

## 2. Ampicilina Trihidrato

En la Tabla 1, se reporta el peso de las muestras y el área obtenida para la Ampicilina Trihidrato y el Estándar Interno.

T A B L A 1			
MUESTRA	PESO (mg)	AREA AMPICILINA TRIHIDRATO	AREA ESTANDAR INTERNO
1	116.3	770924	6969201
		765928	6943901
2	116.8	779896	7031441
		781674	7033491
3	116.5	774692	6966221
		783547	7049721
4	146.2	921770	6661231
		925981	6675991
5	146.3	983571	7071091
		982457	7443921
6	146.2	994695	7172071
		995795	7172921
7	175.8	1160717	7343241
		1159415	6912941
8	175.4	1258881	7504671
		1262401	7510471
9	175.9	1136534	6792501
		1139575	6801901

De la tabla 1 se genera la tabla 2, donde se señala la concentración, el área relativa de cada inyección (cada muestra se inyecta por duplicado) y el promedio aritmético del área relativa de cada muestra. A partir de la tabla 2, se obtiene la información de cantidad adicionada (mg/ml) y propiedad medida (área relativa promedio), con el fin de definir a la variable

predictoria a la cantidad adicionada (x) y a la propiedad medida como variable de respuesta (y).

T A B L A 2			
MUESTRA	CONCENTRACION MG/ML (x)	AREA RELATIVA	PROMEDIO ARITMETICO (y)
1	2.00513	0.1106187 0.1103022	0.1104604
2	2.01375	0.1109155 0.1111359	0.1110257
3	2.00858	0.1111978 0.1111458	0.1111718
4	2.51891	0.1383783 0.1385683	0.1384733
5	2.52236	0.1390974 0.1319811	0.1355393
6	2.52063	0.1386900 0.1388269	0.1387885
7	3.03097	0.1580660 0.1677166	0.1628913
8	3.02407	0.1677463 0.1660854	0.1679158
9	3.03269	0.1673218 0.1675377	0.1674297

a. El análisis estadístico consiste en:

- 1) Ajuste de la relación bivariada al modelo de regresión simple

$$y = m x + b$$

Al sustituir los datos en las ecuaciones 1.2 y 1.3:

$$m = 0.05409 \text{ uar/mg/ml}$$

$$b = 0.001889 \text{ uar}$$

Donde uar = unidades de área relativa



b. Estimación de la variación de la variable de respuesta ajustada al modelo y la media de asociación entre las variables dado el modelo. Al sustituir la información en las ecuaciones 1.4, 1.5 y 1.6:

$$S_{y.x} = 0.00191061 \text{ uar}$$

$$CV = 1.38265033 \%$$

$$r^2 = 0.99443646$$

c. Determinar si existe asociación entre ambas variables (predictoria y de respuesta). El análisis de la varianza de regresión lineal simple se describe en la tabla 3.

T A B L A 3  
T A B L A D E A N A D E V A

FUENTE DE GRADOS DE VARIACION LIBERTAD		SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F cal
REGRESION	GLR = 1	SCR= 0.00456743	MCR=0.0045674	1251.14 **
ERROR DE REGRESION	GLER = 7	SCER= 0.0000255	MCER=0.00000365061	

d. Estimación por intervalo con una confianza del 95% para el valor del parámetro de la ordenada al origen. Al sustituir en las ecuaciones respectivas:

$$-0.00735 \text{ uar} < B < 0.011124 \text{ uar.}$$

## B. Precisión del Sistema de Medición

### 1. Ampicilina sódica

En la Tabla 1 se muestra el peso de las muestras y el estándar, así como las áreas de las muestras, estándar y estándar interno. La variable de respuesta que se va a proceder a analizar es el área relativa, la cual se obtiene al sustituir los datos en la ecuación 2.1.

T A B L A 1				
MUESTRA	PESO MG	AREA AMPICILINA SODICA	AREA ESTANDAR INTERNO	AREA RELATIVA
1	139.0	1079506	7470921	0.144494
2	139.0	1083364	7516781	0.14412
3	139.0	1087316	7565391	0.143722
4	139.0	1094613	7609501	0.143848
5	139.0	1097951	7626051	0.143974
6	139.0	1097027	7637321	0.143640
S	145,8	1032626 1033495	7521341 7529821	0.137293 0.137254

La variable de respuesta que se va a proceder a analizar es el área relativa, la ecuación a sustituir es la 2.1, de donde se genera la tabla 3.

El coeficiente de Variación (CV) de la variable de respuesta se calcula y al sustituir en las ecuaciones 2.2, 2.3 y 2.4.

$$s = 0.000311$$

$$y = 0.143968$$

$$CV = 0.216143 \%$$

El Valor de CV cumple con el criterio de aceptación, por lo que el sistema se considera preciso.

## 2. Ampicilina Trihidrato

En la Tabla 1 se muestra el peso de las muestras y el estándar, así como las áreas de las muestras, estándar y estándar interno. La variable de respuesta que se va a proceder a analizar es el área relativa, la cual se obtiene al sustituir los datos en la ecuación 2.1.

T A B L A 1				
MUESTRA	PESO MG	AREA AMPICILINA SODICA	AREA ESTANDAR INTERNO	AREA RELATIVA
1	146.1	921770	6661231	0.1383783
2	146.1	925081	6675991	0.1385683
3	146.1	926271	6678321	0.1386980
4	146.2	994695	7172071	0.1386900
5	146.2	995795	7172921	0.1388269
6	146.2	996561	7173461	0.1390627
S	145,8	1032626 1033495	7521341 7529821	0.1372930 0.1372540

La variable de respuesta que se va a proceder a analizar es el área relativa, la ecuación a sustituir es la 2.1, de donde se genera la tabla 2. El coeficiente de Variación (CV) de la variable de respuesta se calcula y al sustituir en las ecuaciones 2.2, 2.3 y 2.4.

$$s = 0.000231$$

$$y = 0.138704$$

$$CV = 0.167068 \%$$

El Valor de CV cumple con el criterio de aceptación, por lo que el sistema se considera preciso.

### C. Exactitud del Método

#### 1. Inyectable

En la Tabla 1 se reporta el peso de las muestras y el estándar, así como sus áreas obtenidas respectivamente.

En base a la Tabla 1 se genera la tabla 2 donde se señala, el área relativa de cada inyección (cada muestra se inyecta por

duplicado) y el promedio aritmético de cada muestra, el mismo procedimiento se hace para el estándar.

T A B L A 1			
MUESTRA	PESO MG	AREA AMPICILINA SODICA	AREA ESTANDAR INTERNO
1	139.0	1086344 1094852	7515941 7558411
2	139.2	1074242 1078107	7472091 7480921
3	139.0	1057450 1064231	7358141 7441801
4	139.0	1042236 1037613	7208441 7212221
5	139.4	1061269 1063295	7424181 7396621
S	139.4	1087723 1088514	7517951 7539611

T A B L A 2			
MUESTRA	CANTIDAD ADICIONADA MG	AREA RELATIVA	PROMEDIO ARITMETICO
1	129.67449	0.1445386 0.1448521	0.144695
2	129.86107	0.1437672 0.1441142	0.143941
3	129.67449	0.1437115 0.1434640	0.143588
4	129.67449	0.1445854 0.1438687	0.144221
5	130.04765	0.1429476 0.1437541	0.143351
S	130.04765	0.1446834 0.1437541	0.144528

El porcentaje de Recobro (y) se obtiene con la ecuación 3.2, al efectuar los cálculos indicados se obtiene la tabla 3, en la cual se indica la cantidad adicionada, la cantidad recuperada y el porcentaje de recobro para las 5 muestras.

T A B L A 3			
MUESTRA	CANTIDAD ADICIONADA mg	CANTIDAD RECUPERADA mg	PORCENTAJE DE RECOBRO
1	129.67449	130.19828	100.4039
2	129.86107	129.51922	99.73675
3	129.67449	129.20167	99.63537
4	129.67449	129.77690	100.0789
5	130.04765	128.98447	99.18554

El análisis estadístico consiste en:

a. Estimación de la media aritmética (y), de la Desviación Estándar (s) y coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro.

$$y = 99.80811 \%$$

$$s = 0.412523 \%$$

$$CV = 0.413316 \%$$

b. Estimación por intervalo con una confianza del 95% para el valor del porcentaje de recobro. Dado por la ecuación 3.6. Al sustituir:

$$99.295908 \% < \mu < 100.32032 \%$$

c. Prueba de hipótesis: Donde  $\mu = 100 \%$

$$H_0 : X = \mu \quad t_{cal} = -0.208 \quad t_{tab} = 2.37$$

$$H_a : X \neq \mu \quad t_{cal} < t_{tab} \quad -0.208 < 2.37$$

Con el estadigráfico de contraste "t" de student.

Por lo cual se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ). El Método se considera exacto para la forma farmacéutica inyectable.

## 2. Cápsulas

En la Tabla 1 se muestra el peso de las muestras y el placebo, el estándar, así como las áreas obtenidas.

T A B L A 1				
MUESTRA	PESO (mg) AMPICILINA	PESO DEL PLACEBO (mg)	AREA AMPICILINA TRIHIDRATO	AREA ESTANDAR INTERNO
1	144.7	1.70	958571 964482	6948681 7006071
2	144.4	1.20	947030 947378	6884461 6902841
3	144.2	1.90	983024 984943	7176741 7194441
4	144.4	1.30	991725 994840	7230211 7243951
5	144.6	1.20	1009450 1009419	7400721 7402441
Est.	146.1		983960 987212	7085611 7103291

En base a la Tabla 1 se genera la tabla 2 donde se reporta, el área relativa de cada inyección (cada muestra se inyecta por duplicado) y el promedio aritmético de cada muestra, el mismo procedimiento se hace para el estándar.

El porcentaje de Recobro ( $\gamma$ ) se obtiene con la ecuación 3.2 , al efectuar los cálculos indicados se obtiene la tabla 3, en la cual se reporta la cantidad adicionada, la cantidad recuperada y el porcentaje de recobro para las 5 muestras.

T A B L A 2			
MUESTRA	CANTIDAD ADICIONADA MG	AREA RELATIVA	PROMEDIO ARITMETICO
1	124.739	0.13795 0.13766	0.13781
2	124.480	0.13756 0.13724	0.13740
3	124.308	0.13697 0.13690	0.13694
4	124.480	0.13716 0.13733	0.13725
5	124.652	0.13640 0.13636	0.13638
S	126.290	0.13887 0.13898	0.13892

El porcentaje de Recobro (y) se obtiene con la ecuación 3.2 , al efectuar los cálculos indicados se obtiene la tabla 3, dicha tabla señala la cantidad adicionada, la cantidad recuperada y el porcentaje de recobro para las 5 muestras.

T A B L A 3			
MUESTRA	CANTIDAD ADICIONADA mg	CANTIDAD RECUPERADA mg	PORCENTAJE DE R E C O B R O
1	124.739	124.930	100.16
2	124.480	123.570	100.07
3	124.308	124.150	99.87
4	125.480	124.430	99.96
5	125.652	123.640	99.19

El análisis estadístico consiste en:

- a. Estimación de la media aritmética (y), de la Desviación

Estándar (s) y coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro.

$$y = 99.7715 \%$$

$$s = 0.3365 \%$$

$$CV = 0.3372 \%$$

b. Estimación por intervalo con una confianza del 95% para el valor del porcentaje de recobro. Dado por la ecuación 3.2. Al sustituir:

$$99.3537 \% < \mu < 100.1892 \%$$

c. Prueba de hipótesis: Donde  $\mu = 100 \%$

$$H_0 : X = \mu \quad t_{cal} = -0.303 \quad t_{tab} = 2.37$$

$$H_a : X \neq \mu \quad t_{cal} < t_{tab} \quad -0.303 < 2.37$$

Con el estadigráfico de contraste "t" de student.

Por lo cual se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ). El Método se considera exacto para la forma farmacéutica Cápsulas.

### 3. Suspensión

En la Tabla 1 se muestra el peso de las muestras y el placebo, el estándar, así como las áreas obtenidas.

En base a la Tabla 1 se genera la tabla 2 donde se reporta, el área relativa de cada inyección (cada muestra se inyecta por duplicado) y el promedio aritmético de cada muestra, el mismo procedimiento se hace para el estándar.

El porcentaje de Recobro (y) se obtiene con la ecuación 3.2, al efectuar los cálculos indicados se obtiene la tabla 3, en la cual se reporta la cantidad adicionada, la cantidad recuperada y el porcentaje de recobro para las 6 muestras.



T A B L A 1

MUESTRA	PESO(mg) AMPICILINA	PESO DEL PLACEBO(G)	AREA AMPICILINA TRIHDRATO	AREA ESTANDAR INTERNO
1	145.9	2.0832	1032789 1045494	7668551 7754981
2	144.6	2.0842	1045244 1048633	7672631 7777791
3	144.6	2.0838	1055662 1049559	7798311 7739651
4	145.9	2.0837	1043523 1048072	7752961 7777291
5	145.8	2.0834	1019933 1012305	7586411 7508341
6	146.1	2.0840	1047379 1050533	7765817 7780031
Est.	146.3	2.0832	1053092 1042805	7756091 7704431

T A B L A 2

MUESTRA	CANTIDAD ADICIONADA MG	AREA RELATIVA	PROMEDIO ARITMETICO
1	125.77310	0.134678 0.134815	0.134747
2	124.65243	0.134477 0.134824	0.134651
3	125.65243	0.135370 0.135608	0.135489
4	125.77310	0.134596 0.134760	0.134679
5	125.68689	0.134442 0.134824	0.134633
6	125.94551	0.134870 0.135029	0.134950
S	126.11792	0.135776 0.135351	0.135564

T A B L A 3			
MUESTRA	CANTIDAD ADICIONADA mg	CANTIDAD RECUPERADA mg	PORCENTAJE DE R E C O B R O
1	125.77310	125.358238	99.06715
2	124.65243	125.268557	100.49420
3	124.65243	126.048693	101.12010
4	125.77310	125.294484	99.61946
5	125.68689	125.252108	99.65407
6	125.94551	125.546870	99.68348

El análisis estadístico consiste en:

a. Estimación de la media aritmética ( $\bar{y}$ ), de la Desviación Estándar ( $s$ ) y coeficiente de variación (CV) del porcentaje de recobro.

$$\bar{y} = 100.042 \%$$

$$s = 0.62653 \%$$

$$CV = 0.62628 \%$$

b. Estimación por intervalo con una confianza del 95% para el valor del porcentaje de recobro. Dado por la ecuación 3.2. Al sustituir:

$$99.3828 \% < \mu < 100.6978 \%$$

c. Prueba de hipótesis: Donde  $\mu = 100 \%$

$$H_0 : X = \mu \quad t_{cal} = 0.029 \quad t_{tab} = 2.37$$

$$H_a : X = \mu \quad t_{cal} < t_{tab} \quad 0.029 < 2.37$$

Con el estadigráfico de contraste "t" de student.

Por lo cual se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ). El Método se considera exacto para la forma farmacéutica Suspensión.

**D. Linealidad del Método de Medición****1. Inyectable**

En la Tabla 1 se reporta el peso de las muestras y el estándar, así como sus áreas obtenidas respectivamente.

T A B L A 1			
MUESTRA	PESO (mg)	AREA AMPICILINA SODICA	AREA ESTANDAR INTERNO
1	111.0	852030 852793	7456931 7478741
2	112.7	855870 859924	7473381 7503741
3	111.8	860850 854834	7480891 7472811
4	139.0	1086344 1094852	7515941 7558411
5	139.0	1057450 1064231	7358141 7418101
6	139.4	1061269 1063295	7424181 7396621
7	166.8	1276179 1276726	7413831 7420071
8	166.4	1323838 1328975	7710701 7732141
9	166.9	1286961 1290052	7449741 7476251
Est.	139.4	1087723 1088514	7547951 7539611

De la Tabla 1 se genera la tabla 2, donde se reporta la cantidad adicionada, el área relativa de cada inyección, (cada muestra se inyecta por duplicado y el promedio aritmético del área relativa de cada muestra.

La cantidad recuperada se calcula mediante la ecuación 4.1.

T A B L A 2				
MUESTRA	CANTIDAD (x) ADICIONADA mg	AREA RELATIVA	PROMEDIO ARITMETICO	CANTIDAD (y) RECUPERADA mg
1	103.55301	0.1142601 0.1140289	0.1141445	102.7083
2	105.13896	0.1145224 0.1145993	0.1145609	103.0829
3	104.29934	0.1150731 0.1143925	0.1147328	103.2377
4	129.67449	0.1445386 0.1434640	0.1446953	130.1982
5	129.67449	0.1437115 0.1434640	0.1435878	129.2016
6	130.04765	0.1429476 0.1437541	0.1433508	128.9884
7	155.60936	0.1721348 0.1720638	0.1720993	154.8566
8	155.23622	0.1716884 0.1718767	0.1717825	154.5715
9	155.70268	0.1727524 0.1725533	0.1726528	155.3546
Est.	130.04765	0.1446834 0.1443727	0.144528	

El análisis estadístico consiste en:

- a. Ajuste de la relación bivariada al modelo de regresión simple

$$y = m x + b$$

Al sustituir los datos en las ecuaciones 4.3 y 4.4

$$m = 1.0139588 \text{ mgr/mga}$$

$$b = -2.5614854 \text{ mgr}$$

Donde

mgr = miligramos recuperados.

mga = miligramos adicionados.

b. Estimación de la variación de la variable de respuesta ajustada al modelo y la media de asociación entre las variables dado el modelo. Al sustituir la información en las ecuaciones 4.5, 4.6 y 4.7:

$$S_{y.x} = 0.6556847 \text{ mgr}$$

$$CV = 0.5077574 \%$$

$$r^2 = 0.999256$$

c. Determinar si existe asociación entre ambas variables (predictoria y de respuesta). El análisis de la varianza de regresión lineal simple se describe en la tabla 3.

T A B L A 3  
T A B L A D E A N A D E V A

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F cal
REGRESION	GLR = 1	SCR= 4041.9830	MCR=4041.9830	2423.58**
ERROR DE REGRESION	GLER = 7	SCER= 3.009451	MCER=0.4299215	

d. Prueba de hipótesis para la ordenada al origen:

$$H_0 : B = 0 \quad t_{cal} = -1.87 \quad t_{tab} = 2.37$$

$$H_a : B = 0 \quad t_{cal} < t_{tab} \quad -1.87 < 2.37$$

Con el estadígrafo de contraste "t" de student.

Por lo tanto se considera que el método posee una ordenada al origen igual a "cero".

e. Estimación por intervalo con una confianza del 95% para el valor del parámetro de la ordenada al origen. Al sustituir en la ecuación 4.9:

$$-5.8144184 \text{ mgr} < B < 0.6914475 \text{ mgr}$$

## f. Prueba de hipótesis para la pendiente:

$$\begin{array}{lll} H_0 : M = 1 & t_{cal} = 1.32 & t_{tab} = 2.37 \\ H_a : M = 1 & t_{cal} < t_{tab} & 1.32 < 2.37 \end{array}$$

Por lo tanto se considera que el método posee una pendiente igual a "uno".

g. Estimación por intervalo con una confianza del 95% para el valor del parámetro del coeficiente de regresión (pendiente).

El intervalo de confianza está dado por la ecuación 4.10:

$$0.9892316 \text{ mgr/mga} < M < 1.038686 \text{ mgr/mga}$$

## 2. Cápsulas

En la Tabla 1 se reporta el peso de la Ampicilina, el placebo y el estándar así como sus respectivas áreas.

De la Tabla 1 se genera la tabla 2, donde se reporta la cantidad adicionada, el área relativa de cada inyección, (cada muestra se inyecta por duplicado y el promedio aritmético del área relativa de cada muestra. La cantidad recuperada se calcula mediante la ecuación 4.1.

El análisis estadístico consiste en:

## a. Ajuste de la relación bivariada al modelo de regresión simple

$$y = m x + b$$

Al sustituir los datos en las ecuaciones 4.3 y 4.4:

$$m = 0.96149 \quad \text{mgr/mga}$$

$$b = 4.04712 \quad \text{mgr}$$

Donde

mgr = miligramos recuperados.      mga = miligramos adicionados.

T A B L A 1

MUESTRA	PESO(mg) AMPICILINA	PESO DEL PLACEBO(mg)	A R E A AMPICILINA	AREA ESTANDAR INTERNO
1	116.9	1.3	888663 812431	7418531 7457091
2	116.1	1.3	834291 837678	7574251 7604361
3	116.3	1.3	805261 806521	7420151 7418651
S	145.2		1018988 1017136	7468461 7442921
4	144.7	1.7	958571 964482	6948681 7006071
5	144.4	1.2	947030 947378	6846611 6902841
6	144.2	1.9	983024 984943	7176741 7194441
7	173.5	1.8	1221508 1224750	7411791 7412891
8	173.4	1.1	1208146 1211308	7315201 8111871
9	173.7	1.4	1163062 1163910	7019051 7013981
Est.	146.1		983960 987212	7085671 7103291

b. Estimación de la variación de la variable de respuesta ajustada al modelo y la media de asociación entre las variables dado el modelo.

Al sustituir la información en las ecuaciones respectivas:

$$S_{y.x} = 2.38601 \quad mgr$$

$$CV = 1.92319 \quad \%$$

$$r^2 = 0.98828$$

T A B L A 2

MUESTRA	CANTIDAD (x) ADICIONADA mg	AREA RELATIVA	PROMEDIO ARITMETICO	CANTIDAD (y) RECUPERADA mg
1	100.77365	0.1090058 0.1089474	0.108977	99.90
2	100.08401	0.1101483 0.1101575	0.110153	100.97
3	100.25642	0.1085720 0.1087153	0.108644	99.59
S	125.16966	0.1364388 0.1366581	0.136548	
4	124.73864	0.1379500 0.1376637	0.137807	124.93
5	124.48002	0.1375565 0.1372446	0.137401	124.57
6	124.30761	0.1369735 0.1369033	0.136938	124.15
7	149.56567	0.1648060 0.1652189	0.165012	149.60
8	149.47947	0.1651115 0.1493253	0.157240	142.55
9	149.73809	0.1657007 0.1659414	0.165821	150.33
Est.	125.94551	0.1388661 0.1389795	0.138923	

c. Determinar si existe asociación entre ambas variables (predictoria y de respuesta). El análisis de la varianza de regresión lineal simple se describe en la tabla 3.

T A B L A 3. T A B L A D E A N A D E V A

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F cal
REGRESION	GLR = 1	SCR= 3361.0928	MCR=3361.0928	590.38 **
ERROR DE REGRESION	GLER = 7	SCER= 39.85114	MCER=5.69304	



d. Prueba de hipótesis para la ordenada al origen:

$$\begin{array}{lll} H_0 : B = 0 & t_{\text{cal}} = 0.808 & t_{\text{tab}} = 2.37 \\ H_a : B = 0 & t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}} & 0.808 < 2.37 \end{array}$$

Con el estadígrafo de contraste "t" de student.

Por lo tanto se considera que el método posee una ordenada al origen igual a "cero".

e. Estimación por intervalo con una confianza del 95% para el valor del parámetro de la ordenada al origen. Al sustituir en la ecuación 4.9:

$$-7.7832 \text{ mgr} < B < 15.8774 \text{ mgr}$$

f. Prueba de hipótesis para la pendiente:

$$\begin{array}{lll} H_0 : M = 1 & t_{\text{cal}} = -2.76 & t_{\text{tab}} = 2.37 \\ H_a : M = 1 & t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}} & -2.76 < 2.37 \end{array}$$

Por lo tanto se considera que el método posee una pendiente igual a "uno".

g. Estimación por intervalo con una confianza del 95% para el valor del parámetro del coeficiente de regresión (pendiente):

El intervalo de confianza está dado por la ecuación 4.10:

$$0.8679 \text{ mgr/mga} < M < 1.0551 \text{ mgr/mga}$$

### 3. Suspensión

En la Tabla 1 se muestran los pesos de la ampicilina, placebo y estandar así como su respectivas áreas.

De la Tabla 1 se genera la tabla 2, donde se reporta la cantidad adicionada, el área relativa de cada inyección, (cada muestra se inyecta por duplicado y el promedio aritmético del área relativa de cada muestra. La cantidad recuperada se calcula mediante la ecuación 4.1.

T A B L A 1				
MUESTRA	PESO(mg) AMPICILINA	PESO (G) PLACEBO	AREA AMPICILINA	AREA ESTANDAR INTERNO
1	116.5	2.0837	810114 812994	7453571 7507811
2	116.8	2.0842	846852 845958	7805011 7802571
3	117.1	2.0828	840917 842045	7633851 7689841
4	145.9	2.0832	1032789 1045494	7668551 7754981
5	144.6	2.0838	1055662 1049559	7798311 7739651
6	145.8	2.0834	1019933 1012305	7586411 7508341
7	175.5	2.0842	1277142 1278850	7762921 7774161
8	175.3	2.0830	1269620 1266752	7630531 7639901
9	175.4	2.0834	1137637 1139440	7027441 7028821
Est.	146.3		1053092 1042805	7756091 7704431

El análisis estadístico consiste en:

a. Ajuste de la relación bivariada al modelo de regresión simple

$$y = m x + b$$

Al sustituir los datos en las ecuaciones 4.3 y 4.4

$$m = 1.017914 \text{ mgr/mga}$$

$$b = -1.457160 \text{ mgr}$$

Donde

mgr = miligramos recuperados.

mga = miligramos adicionados.

T A B L A 2				
MUESTRA	CANTIDAD (x) ADICIONADA mg	AREA RELATIVA	PROMEDIO ARITMETICO	CANTIDAD (y) RECUPERADA mg
1	100.42883	0.108688 0.108286	0.108487	100.9281
2	100.68744	0.108501 0.108420	0.108460	100.9034
3	100.94606	0.110156 0.110950	0.109829	102.1788
4	125.77310	0.134678 0.134815	0.134747	125.3582
5	124.65243	0.135370 0.135608	0.135489	126.0487
6	125.68689	0.134442 0.134824	0.134633	125.2521
7	151.28978	0.164518 0.164500	0.164509	153.0465
8	151.11737	0.166386 0.165807	0.166097	154.5438
9	151.20357	0.161884 0.162109	0.161997	150.7097
Est.	126.11792	0.135776 0.135351	0.135563	

b. Estimación de la variación de la variable de respuesta ajustada al modelo y la media de asociación entre las variables dado el modelo.

Al sustituir la información en las ecuaciones respectivas:

$$S_{y.x} = 1.316178 \text{ mgr}$$

$$CV = 1.040049 \%$$

$$r^2 = 0.9969531$$

c. Determinar si existe asociación entre ambas variables (predictoria y de respuesta). El análisis de la varianza de regresión lineal simple se describe en la tabla 3.

T A B L A 3  
T A B L A D E A N A D E V A

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F cal
REGRESION	GLR = 1	SCR= 3967.839	MCR=3967.839	2290.4696**
ERROR DE REGRESION	GLER = 7	SCER= 12.12627	MCER=1.732325	

d. Prueba de hipotesis para la ordenada al origen:

$$\begin{array}{lll}
 H_0 : B = 0 & t_{\text{cal}} = -0.53 & t_{\text{tab}} = 2.37 \\
 H_a : B = 0 & t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}} & -0.53 < 2.37
 \end{array}$$

Con el estadigráfo de contraste "t" de student.

Por lo tanto se considera que el método posee una ordenada al origen igual a "cero".

e. Estimación por intervalo con una confianza del 95% para el valor del parámetro de la ordenada al origen. Al sustituir en las ecuaciones 4.9.

$$-7.86621 \text{ mgr} < B < 4.9518892 \text{ mgr}$$

f. Prueba de hipotesis para la pendiente:

$$\begin{array}{lll}
 H_0 : M = 1 & t_{\text{cal}} = -2.33 & t_{\text{tab}} = 2.37 \\
 H_a : M = 1 & t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}} & -2.33 < 2.37
 \end{array}$$

Por lo tanto se considera que el método posee una pendiente igual a "uno".

g. Estimación por intervalo con una confianza del 95% para el valor del parámetro del coeficiente de regresión (pendiente):

El intervalo de confianza está dado por la ecuación 4.10.

$$0.9676216 \text{ mgr/mga} < M < 1.0680274 \text{ mgr/mga}$$

**E. Precisión del Método de Medición**

**1. Inyectable**

En la Tabla 1 se muestra el peso de las muestras, área de ampicilina y estándar interno del analista 1. En la Tabla 2 las áreas repectivas del analista 2.

T A B L A 1

C O R R I D A 1			
MUESTRA	PESO (mg)	AREA AMPICILINA SODICA	AREA ESTANDAR INTERNO
1	138.7	1058621.6 1057085.9	725078.711 725418.211
2	139.2	1067646.0 1066362.6	733872.061 737062.341
3	139.7	1188198.5 1202578.5	853198.501 857342.751
S	146.5	1027744.5 1033232.9	731369.141 734549.531
C O R R I D A 2			
1	138.6	1057425 1058209	7568461 7598271
2	138.7	1059431 1053440	7629741 7624661
3	138.8	1035008 1038045	7685141 7712791
S	145.6	1042805 1053092	7704431 7756091

T A B L A 2

C O R R I D A 1			
MUESTRA	PESO (mg)	AREA AMPICILINA SODICA	AREA ESTANDAR INTERNO
1	137.8	1095933 1097333	7568461 7598271
2	138.3	1093290 1094108	7629741 7624661
3	139.6	1099549 1102385	7685141 7712791
S	148.0	1087847 1081640	7704431 7756091
C O R R I D A 2			
1	138.6	1091773 1093933	7668721 7913861
2	138.2	1096111 1095990	7998541 7989891
3	140.4	1097526 1099930	7961071 7981361
S	146.0	1052391 1050368	7654711 7684831

De la Tabla 1 y 2 se genera la tabla 3, donde se reporta el área relativa de cada inyección, (cada muestra se inyecta por duplicado y el promedio aritmético del área relativa de cada muestra, para la combinación analista-día.

Con la información de la tabla 3, se genera la concentración de cada muestra para cada corrida-analista, con la ecuación 5.1. Que da lugar a la tabla 4, donde se reporta la matriz de resultados de ampicilina base ( $\mu$ /mg) por combinación analista-día.

T A B L A 3				
ANALISTA/DIA	MUESTRA	AREA RELATIVA	PROMEDIO ARITMETICO	
1 / 1	1	1.4600092 1.4572089	1.458609	
	2	1.4548121 1.4467739	1.450793	
	3	1.3926401 1.4026819	1.397661	
	Estándar	1.4548121 1.4467739	1.405927	
	1 / 2	1	0.1397146 0.1392697	0.139492
	2	0.1388554 0.1394737	0.139165	
	3	0.1346765 0.1345874	0.134632	
	Estándar	0.1353513 0.1357761	0.135564	
	2 / 1	1	0.1427620 0.1426704	0.142716
		2	0.1434270 0.1432560	0.143342
3		0.1449332 0.1476478	0.146291	
Estándar		0.1411655 0.1411848	0.141180	
2 / 2		1	0.1384673 0.1382299	0.142176
		2	0.1370388 0.1371720	0.143342
	3	0.1378616 0.1378123	0.146291	
	Estándar	0.1374827 0.1366866	0.141180	

El análisis estadístico consiste :

a. Definir el modelo que represente la relación entre la variable de respuesta y los factores bajo evaluación:

$$y_{ijk} = \mu + \epsilon_i + \zeta_j(i) + \epsilon_k(ij)$$

T A B L A 4			
A N A L I S T A			
		1	2
D	1	832.9735	798.18509
		831.4966	804.59098
		803.9221	828.86273
I	2	830.6624	813.36973
		829.3095	802.87275
		802.8773	820.00537

b. Establecer si las fuentes de variación (analista corrida) afectan a la variable de respuesta mediante un análisis de varianza. La tabla de análisis de varianza se describe en la tabla 5.

T A B L A 5

FUENTE DE VARIACION	GRADOS LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F cal
$\epsilon_i$	GLA = 1	SCA= 334.4859	MCA=334.59	F = 77.24 ** A
$\zeta_j(i)$	GLC = 2	SCC= 8.661260	MCC=4.33063	F = 0.56 NS C
$\epsilon_k(ij)$	GLE = 8	SCE= 1699.4270U*MCE=212.42838}		

\*\* Altamente significativo

NS No significativo.

Dado que existe efecto del analista, la magnitud de su efecto se calcula con la ecuación 5.3.1. El cual puede expresarse como coeficiente de variación del analista, mediante la ecuación 5.3.2. Al sustituir:

$$SA = 7.41793 \mu\text{g}/\text{mg}$$

$$CV = 0.9084\%$$

c. Calcular el coeficiente de variación total, por la ecuación 5.4.

$$CV = 1.6687 \%$$



d. Calcular la diferencia máxima para un mínimo de 2 determinaciones analíticas obtenidas bajo las mismas condiciones de análisis. La variación debida a la metodología analítica se calcula con la ecuación 5.5. Al sustituir :

$$SM = 14.57492 \mu\text{g}/\text{mg}$$

Que expresado en términos de Coeficiente de Variación (CV) por la ecuación 5.6. Al sustituir:

$$CV = 1.78484 \% \\ M$$

Por lo que la magnitud máxima expresada en porcentaje de la diferencia de manera conservadora, como mínimo 2 determinaciones analíticas bajo las mismas condiciones esta dada por la ecuación 5.7. Al sustituir:

$$\delta_{\text{máx}} = 7.14$$

## 2. Cápsulas

En la Tabla 1 se muestra el peso de las muestras, área de ampicilina y estandar interno del analista 1. En la Tabla 2 las áreas respectivas del analista 2.

De la Tabla 1 y 2 se genera la tabla 3, donde se reporta el área relativa de cada inyección, (cada muestra se inyecta por duplicado y el promedio aritmético del área relativa de cada muestra, para la combinación analista-día.

Con la información de la tabla 3, se genera la concentración de cada muestra para cada corrida-analista, con la ecuación 5.1 . Que da lugar a la tabla 4, donde se reporta la matriz de resultados de ampicilina base ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) por combinación analista-día.

T A B L A 1

C O R R I D A 1			
MUESTRA	PESO (mg)	AREA AMPICILINA SODICA	AREA ESTANDAR INTERNO
1	145.1	1034537 1036542	7702491 7719311
2	145.4	1031294 1032953	7630851 7639801
3	145.9	1033108 1034751	7635781 7663301
S	145.6	1042805 1053092	7704431 7756091
C O R R I D A 2			
1	144.7	1024202 1025466	7754231 7784481
2	145.0	1021414 1030142	7819411 7850141
3	146.0	1057243 1062255	7938711 7881591
S	146.0	1062327 1058573	7624021 7636501

El análisis estadístico consiste :

a. Definir el modelo que represente la relación entre la variable de respuesta y los factores bajo evaluación:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \phi_j(i) + \epsilon_k(ij)$$

b. Establecer si las fuentes de variación (analista corrida) afectan a la variable de respuesta mediante un análisis de varianza. La tabla de análisis de varianza se describe en la tabla 5.

T A B L A 2

C O R R I D A 1			
MUESTRA	PESO (mg)	AREA AMPICILINA SODICA	AREA ESTANDAR INTERNO
1	145.2	1055757 1054795	7948491 7918011
2	145.6	1044352 1044986	7796711 7824971
3	146.0	1057783 1060345	7904801 7906691
S	146.0	1052391 1050368	7654711 7684831
C O R R I D A 2			
1	145.7	1063991 1061745	7754911 7771351
2	145.4	1058743 1059709	7746961 7763291
3	146.0	1097775 1100497	7951031 7967871
S	148.0	1087847 1081646	7706181 7660621

T A B L A 5

FUENTE DE VARIACION	GRADOS LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F cal
$\epsilon_i$	GLA = 1	SCA= 72.949617	MCA=72.949617	F = 0.08 NS A
$\zeta_j(i)$	GLC = 2	SCC=1759.87649	MCC=879.93824	F = 59.53 ** C
$\epsilon_k(ij)$	GLE = 8	SCE= 118.24614	MCE=14.78677	

\*\* Altamente significativo  
NS No significativo.

El análisis indica que no existe efecto de los analistas, pero si de las corridas, es decir el método es reproducible por los analistas pero no es reproducible en distintas corridas en al menos uno de los analistas.

T A B L A 3			
ANALISTA/DIA	MUESTRA	AREA RELATIVA	PROMEDIO ARITMETICO
1 / 1	1	0.1343120 0.1342790	0.134296
	2	0.1351479 0.1352067	0.135177
	3	0.1352982 0.1350267	0.135163
	Estándar	0.1353513 0.1357761	0.135564
1 / 2	1	0.1320829 0.1317320	0.131908
	2	0.1306254 0.1312259	0.130926
	3	0.1331756 0.1347767	0.133976
	Estándar	0.1393394 0.1386201	0.138980
2 / 1	1	0.1328248 0.1322146	0.133120
	2	0.1339477 0.1335450	0.133746
	3	0.1338152 0.1341073	0.133961
	Estándar	0.1374827 0.1366806	0.137082
2 / 2	1	0.1372022 0.1366229	0.136913
	2	0.1366655 0.1365025	0.136584
	3	0.1380670 0.1381168	0.138092
	Estándar	0.1411655 0.1411956	0.141181

T A B L A 4			
A N A L I S T A			
		1	2
D	1	843.0015	827.4449
		846.7862	829.6794
		843.7916	828.7357
I	2	812.1169	835.3856
		804.4041	835.1006
		817.5084	840.8500
A			

Dado que existe efecto de la corrida, la magnitud de su efecto se calcula con la ecuación 5.3.3. El cual puede expresarse como coeficiente de variación de la corrida, mediante la ecuación Al sustituir:

$$SC = 16.9819 \text{ MG/G}$$

$$CV_C = 2.05 \%$$

Este último valor es la magnitud de variación de las corridas.

c. Calcular el coeficiente de variación total, por la ecuación 5.4.

$$CV = 1.60 \%$$

d. Calcular la diferencia máxima para un mínimo de 2 determinaciones analíticas obtenidas bajo las mismas condiciones de análisis. La variación debida a la metodología analítica se calcula con la ecuación 5.5. Al sustituir :

$$SM = 3.8446 \text{ mg/g}$$

Que expresado en términos de Coeficiente de Variación (CV) por la ecuación 5.6. Al sustituir:

$$CV_M = 0.46 \%$$

Por lo que la magnitud máxima expresada en porcentaje de la diferencia de manera conservadora, como mínimo 2

determinaciones analíticas bajo las mismas condiciones esta dada por la ecuación 5.7. Al sustituir:

$$\delta_{\text{máx}} = 1.85 \%$$

### 3. Suspensión

En la Tabla 1 se muestra el peso de las muestras, área de ampicilina y estándar interno del analista 1. En la Tabla 2 las áreas respectivas del analista 2.

T A B L A 1

C O R R I D A 1			
MUESTRA	PESO (mg)	AREA AMPICILINA SODICA	AREA ESTANDAR INTERNO
1	2.2811	922977 928258	7555631 7570891
2	2.3242	927260 934328	7395501 7459141
3	2.3209	897427 896806	7317461 7336161
S	146.5	983154 984525	7483641 7494891
C O R R I D A 2			
1	2.3034	980726 982588	7024201 7054521
2	2.3076	928853 928537	7220381 7238181
3	2.3138	1062296 1064928	8075911 8098991
S	146.1	983960 987212	7085671 7103291

De la Tabla 1 y 2 se genera la tabla 3, donde se reporta el área relativa de cada inyección, (cada muestra se inyecta por

duplicado y el promedio aritmético del área relativa de cada muestra, para la combinación analista-día.

T \* A B L A 2

C O R R I D A 1			
MUESTRA	PESO (mg)	AREA AMPICILINA SODICA	AREA ESTANDAR INTERNO
1	2.3051	893635 881221	7375431 7319021
2	2.3055	883863 916262	7333541 7486431
3	2.2970	924383 924383	7564001 7564001
S	145.4	1005501 893063	7424511 7367211
C O R R I D A 2			
1	2.3030	1038855 1043082	7772471 7783801
2	2.3010	1047851 1052289	7922711 7955121
3	2.3000	951627 955526	7464521 7516131
S	146.0	1067386 1068486	8028481 7920891

Con la información de la tabla 3, se genera la concentración de cada muestra para cada corrida-analista, con la ecuación 5.1. Que da lugar a la tabla 4, donde se reporta la matriz de resultados de ampicilina base ( $\mu$ /mg) por combinación analista-día.

T A B L A 3				
ANALISTA/DIA	MUESTRA	AREA RELATIVA	PROMEDIO ARITMETICO	
1 / 1	1	0.1220675 0.1226080	0.122338	
	2	0.1253816 0.1252594	0.125321	
	3	0.1226418 0.1222445	0.122443	
	Estándar	0.1313737 0.1313594	0.131367	
	1 / 2	1	0.1396210 0.1392848	0.139453
2 / 1	2	0.1286432 0.1282831	0.128463	
	3	0.1315388 0.1314889	0.131574	
	Estándar	0.1388661 0.1389795	0.138923	
	2 / 1	1	0.1211637 0.1204014	0.120783
	2 / 2	2	0.1205233 0.1223896	0.121457
3		0.1222082 0.1222082	0.122208	
Estándar		0.1354299 0.1212213	0.128326	
2 / 2		1	0.1336582 0.1340067	0.133833
2 / 2		2	0.1322591 0.1322781	0.132269
	3	0.1274866 0.1271300	0.137308	
	Estándar	0.1329499 0.1348946	0.133922	

El análisis estadístico consiste :

a. Definir el modelo que represente la relación entre la variable de respuesta y los factores bajo evaluación:

$$y_{ijk} = \mu + E_i + \zeta_j(i) + \epsilon_k(ij)$$



T A B L A 4			
A N A L I S T A			
		1	2
D	1	51.55878	51.179752
		51.83628	51.456378
		50.71814	51.966427
I	2	54.88672	54.613512
		50.60085	54.022262
		51.52937	52.018938
A			

b. Establecer si las fuentes de variación (analista corrida) afectan a la variable de respuesta mediante un análisis de varianza. La tabla de análisis de varianza se describe en la tabla 5.

T A B L A 5

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F cal
$\epsilon_i$	GLA = 1	SCA=1.41941214	MCA=1.4194121	F = 0.38 NS A
$\zeta_j(i)$	GLC = 2	SCC=7.51004454	MCC=3.7550222	F = 2.02 NS C
$\epsilon_k(ij)$	GLE = 8	SCE=14.8622213	MCE=1.8577776	

NS No significativo.

El análisis indica que no existe efecto de las fuentes de variación sobre la variable de respuesta, es decir, el método es reproducible entre los analistas, y es reproducible en distintas corridas por un mismo analista.

c. Calcular el coeficiente de variación total, por la ecuación 5.4..

$$CV = 2.81 \%$$

d. Calcular la diferencia máxima para un mínimo 2 determinaciones analíticas obtenidas bajo las mismas condiciones de análisis. La variación debida a la metodología analítica se calcula con la ecuación 5.5. Al sustituir :

$$SM = 1.3630 \text{ mg/g}$$

Que expresado en términos de Coeficiente de Variación (CV) por la ecuación 5.6. Al sustituir:

$$CV_M = 2.61 \%$$

Por lo que la magnitud máxima expresada en porcentaje de la diferencia de manera conservadora, como mínimo 2 determinaciones analíticas bajo las mismas condiciones esta dada por la ecuación 5.7. Al sustituir:

$$\delta_{\text{máx}} = 10.44 \%$$

## VII. DISCUSION DE RESULTADOS

### A. Linealidad del Sistema de Medición

T A B L A 1					
PRINCIPIO ACTIVO	PENDIENTE m	ORDENADA b	D.S.R. Sy.x	COEF. VAR. CV	COEF. DETER. r <sup>2</sup>
AMPICILINA SODICA	0.05633	-0.0288	0.000621	0.43327 %	0.99946
AMPICILINA TRIHIDRATO	0.05409	0.00188	0.001910	1.3826 %	0.994436

PRINCIPIO ACTIVO	F cal	INTERVALO DE CONFIANZA ORDENADA (b)
AMPICILINA SODICA	12915.15**	-0.00597 uar < B < 0.0020 uar
AMPICILINA TRIHIDRATO	1251.14**	-0.00735 uar < B < 0.01112uar

1. Como se puede observar existe una asociación altamente significativa por la F cal encontrada (\*\*), para ambas, Ampicilina Sódica y Ampicilina Trihidrato. Entre la concentración de ampicilina y el área relativa, en el caso de ampicilina sódica en el intervalo de 2.07106 a 3.11405 mg/ml y para ampicilina trihidrato en el intervalo de 2.005 a 3.033 mg/ml.

2. El modelo lineal representa de manera correcta la relación entre la concentración de ampicilina y el área relativa.

3. La variación del área relativa en el intervalo de concentración de ampicilina sódica de 2.07106 a 3.11405 mg/ml es de 0.43%. Y la variación del área relativa en el intervalo de

concentración de ampicilina trihidrato de 2.005 a 3.033 mg/ml es de 1.38%.

4. La ordenada al origen de la relación lineal concentración de ampicilina-área relativa es cero. Para ambas ampicilinas.

#### B. Precisión del Sistema de Medición

T A B L A 1			
PRINCIPIO ACTIVO	MEDIA Y	DESVIACION S	COEF. VAR. CV
AMPICILINA SODICA	0.143968%	0.000311%	0.21614 %
AMPICILINA TRIHIDRATO	0.138704%	0.000231%	0.167068%

1. El valor del C.V. cumple con el criterio de aceptación por lo que el Sistema se considera preciso, tanto para ampicilina sódica como ampicilina trihidrato.

#### A. Exactitud del Método

TABLA 1				
FORMA FARMACEUTICA	MEDIA Y	DESVIACION S	COEF. VAR. CV	INTERVALO DE CONFIANZA
INYECTABLE	99.8081 %	0.41252%	0.41331 %	99.29596% < $\mu$ < 100.3203 %
CAPSULAS	99.7715 %	0.3365 %	0.3372 %	99.3537 % < $\mu$ < 100.1892 %
SUSPENSION	100.040 %	0.0265 %	0.0262 %	99.3203 % < $\mu$ < 100.6975 %

1. Como se puede observar el Método carece de error sistemático constante a una cantidad adicionada al 100%, por lo tanto es exacto a éste porcentaje en las tres formas farmacéuticas.

2. En el intervalo de confianza para el valor del parámetro (media poblacional del recobro experimental) se incluye el 100%.

3. La repetibilidad del Método para la inyectable, cápsulas y suspensión es adecuada el Coeficiente de Variación es Menor de 2.5 %.

4. Se cumplen los criterios de aceptación en la exactitud del método a un porcentaje fijo. Se considera exacto a una cantidad de 2.5 mg/ml de ampicilina base, a partir de ampicilina sódica o trihidrato.

#### D. Linealidad del Método de Medición

TABLA 1

FORMA FARMACEUTICA	PENDIENTE m	ORDENADA b	D.S.R. Sy.x	COEF. VAR. CV	COEF. DETER. r <sup>2</sup>
INYECTABLES	1.013958	-2.56148	0.655684	0.50775 %	0.999256
CAPSULAS	0.96149	4.04712	2.38601	1.92319 %	0.98828
SUSPENSION	1.017914	-1.45716	1.31617	1.040049%	0.996453

FORMA FARMACEUTICA	F cal	INTERVALOS DE ORDENADA (b)	CONFIANZA PENDIENTE (m)
INYECTABLES	2423.5**	-5.8144 < B < 0.69144	0.989231 < M < 1.03868
CAPSULAS	590.38**	-7.7832 < B < 15.8774	0.8679 < M < 1.0551
SUSPENSION	2290.4**	-7.86621 < B < 4.95188	0.967621 < M < 1.06802

1. INYECTABLE. Como se puede observar existe una asociación altamente significativa por la F cal encontrada (\*\*), entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada de ampicilina base en un intervalo de 103.55301 a 155.70268 mg.

El modelo lineal representa de manera correcta la relación entre la cantidad adicionada y recuperada en el intervalo antes mencionado.

En el intervalo de confianza al 95% del parámetro ordenada al origen se incluye el cero. Y en el parámetro pendiente se incluye el uno.

Así mismo el coeficiente de variación de la regresión lineal simple es menor de 2.5 %.

2. CAPSULAS. Como se puede observar existe una asociación altamente significativa por la F cal encontrada (\*\*), entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada de ampicilina base en un intervalo de 100.08 mg (80.6%) a 149.74 mg (119.79%).

El modelo lineal representa de manera correcta la relación entre la cantidad adicionada y recuperada en el intervalo antes mencionado. Efecto altamente significativo del modelo de regresión lineal y coeficiente de determinación mayor de 0.98

En el intervalo de confianza al 95% del parámetro ordenada al origen se incluye el cero, por lo cual el método carece de error sistemático proporcional constante. Y en el parámetro pendiente se incluye el uno, por lo que el método carece de error sistemático proporcional consistente.

Así mismo el coeficiente de variación de la regresión lineal simple es menor de 2.5 %.

3. SUSPENSION. Como se puede observar existe una asociación altamente significativa por la F cal encontrada (\*\*), entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada de ampicilina base en un intervalo de 100.4283 mg a 151.2978 mg.

El modelo lineal representa de manera correcta la relación entre la cantidad adicionada y recuperada en el intervalo antes mencionado. Efecto altamente significativo del modelo de regresión lineal y coeficiente de determinación mayor de 0.98

En el intervalo de confianza al 95% del parámetro ordenada al origen se incluye el cero, por lo cual el método carece de error sistemático proporcional constante. Y en el parámetro pendiente se incluye el uno, por lo que el método carece de error sistemático proporcional consistente.

Así mismo el coeficiente de variación de la regresión lineal simple es menor de 2.5 %.

#### E. Precisión del Método de Medición

Establecer si las fuentes de variación, (analista y corrida) afectan a la variable de respuesta.

FORMA FARMACEUTICA	F cal	EFECTO	MAGNITUD DEL EFECTO	COEFICIENTE DE VARIACION
INYECTABLE	$F_A = 77.24^{**}$	ANALISTA	$SA=7.41\mu\text{g}/\text{mg}$	$CV_A = 0.90 \%$
CAPSULAS	$F_C = 59.53^{**}$	CORRIDA	$SC=16.98\text{mg}/\text{g}$	$CV_C = 2.0 \%$
SUSPENSION	$F_A = 0.38 \text{ NS}$ $F_C = 2.02 \text{ NS}$	N O E X I S T E E F E C T O		

FORMA FARMACEUTICA	COEF. VAR. TOTAL	DIFERENCIA MAXIMA	COEF. VAR. METODO	MAGNITUD MAXIMA
INYECTABLE	$CV = 1.66\%$	$SM= 14.57 \mu\text{g}/\text{mg}$	$CVM = 1.78 \%$	$\delta = 7.14 \%$
CAPSULAS	$CV = 1.60\%$	$SM= 3.84 \mu\text{g}/\text{mg}$	$CVM = 0.46 \%$	$\delta = 1.85 \%$
SUSPENSION	$CV = 2.81\%$	$SM= 1.36 \mu\text{g}/\text{mg}$	$CVM = 2.61 \%$	$\delta = 10.44 \%$

1. **INYECTABLE.** Como se puede observar el coeficiente de variación total no excede el 3%.

La magnitud del efecto del analista no excede el 3.0%  
No se detecta efecto de la corrida.

2. **CAPSULAS.** Como se puede observar el coeficiente de variación total no excede el 3%.

La magnitud del efecto de la corrida no excede el 3.0%  
No se detecta efecto del analista.

3. **SUSPENSION.** Como se puede observar el coeficiente de variación total no excede el 3%.

No se detecta efecto de la corrida.  
No se detecta efecto del analista.

#### **F. Especificidad**

Los resultados obtenidos para la especificidad demuestran que no hay interferencia para la determinación de Ampicilina Trihidrato en cápsulas y suspensión (ver cromatograma anexo 2 y 3)



## VIII. CONCLUSIONES

1. La respuesta obtenida por el Sistema demuestra que este es lineal y preciso, además existe una alta asociación entre la concentración de ampicilina y el área relativa (variable de respuesta).
2. El Método es lineal, exacto, preciso y reproducible bajo las condiciones de operación normal.
3. El método evaluado es específico para determinaciones rutinarias de Laboratorio de Control de Calidad.
4. El método evaluado es válido para ser usado en la determinación de uniformidad de contenido de Ampicilina Sódica en Inyectables, Ampicilina Trihidrato en Cápsulas y Suspensión.

**IX. SUGERENCIAS**

1. Realizar un estudio más completo de Especificidad, comparando los productos de degradación obtenidos de la Ampicilina y confrontarlos con sus respectivos estándares; para evaluar el método como indicativo de estabilidad.
2. Efectuar el estudio de Tolerancia del método con diferente marca de disolvente, diferente marca de columna y cambio de pH en la fase móvil.
3. Efectuar el estudio de estabilidad de la muestra en solución a intervalos de 24, 48 y 72 horas, para evaluar a la misma.

**X. ANEXOS****ANEXO 1. FORMULAS****1. Linealidad del Sistema de Medición**

2.1 Ajuste al modelo de regresión simple:

$$\bar{y} = m x + b$$

y = variable de respuesta

x = variable predictoría

m = coeficiente de regresión

b = ordenada al origen

1.2 Para m:

$$m = \frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{n(\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

1.3 Para b:

$$b = \frac{\sum y - m(\sum x)}{n}$$

1.4 Para la Desviación Estándar de Regresión (Sy.x)

$$Sy.x = \sqrt{\frac{\sum y^2 - m(\sum xy) - b(\sum y)}{n-2}}$$

1.5 Para el Coeficiente de Variación (CV):

$$CV = \frac{Sy.x}{\bar{y}} \cdot 100$$

1.6 Para el Coeficiente de Determinación (r<sup>2</sup>):

$$r^2 = \frac{[n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[n(\sum x^2) - (\sum x)^2][n(\sum y^2) - (\sum y)^2]}$$

1.7 El Análisis de la Varianza en regresión lineal simple se describe en la tabla 3.

T A B L A 3  
T A B L A D E A N A D E V A

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F cal
REGRESION	GLR= 1	$SCR = m (\Sigma xy) + b(\Sigma y) - \frac{(\Sigma y)^2}{n}$	$MCR = \frac{SCR}{GLR}$	$\frac{MCR}{MCER}$
ERROR DE REGRESION	GLER= n-2	$SCER = \Sigma y^2 - m(\Sigma xy) - b(\Sigma y)$	$MCER = \frac{SCER}{GLER}$	

1.8 El Intervalo de Confianza del 95% para el valor del parámetro de la ordenada al origen está dado por:

$$b - t_{0.975, n-2} S_b < B < b + t_{0.975, n-2} S_b$$

Donde:

$$S_b = S_{y \cdot x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{x^2}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}}}$$

## 2. Precisión del Sistema de Medición

2.1 Area Relativa:

$$A_r = \frac{A_m}{A_{si}}$$

A<sub>r</sub> = Area Relativa

A<sub>m</sub> = Area de la Muestra

A<sub>si</sub> = Area del Estándar Interno

2.2 Coeficiente de Variación:

$$CV = \frac{s}{y}$$

s = desviación estándar de y

y = media aritmética de y

2.3 Para s:

$$s = \sqrt{\frac{n \sum y^2 - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

2.4 Para y:

$$y = \frac{\sum y}{n}$$

2.5 Para el calculo de la Potencia de la Ampicilina:

$$Pr = \frac{A_m P_s W_s}{A W_m}$$

$A_m$  = Area Relativa Promedio de las muestras

$P_s$  = Potencia del Estándar  $\mu\text{g}/\text{mg}$

$A_s$  = Area Relativa promedio del estándar

$W_m$  = Peso de la muestra en mg

$W_s$  = Peso del estándar en mg

### 3. Exactitud del Método

3.1 Para la cantidad recuperada:

$$CR = \frac{A_m}{A_s} P_s$$

CR = Cantidad recuperada en mg

$A_m$  = Area relativa promedio de la muestra

$A_s$  = Area relativa promedio del estándar

$P_s$  = Potencia del estándar en mg/g

3.2 El porcentaje de recobro (y) se obtiene con la siguiente ecuación.

$$y = \frac{CR}{CA} \cdot 100$$

Donde:

CA = Cantidad adicionada en mg de ampicilina base.

3.3 Coeficiente de Variación del porcentaje de recobro:

$$CV = \frac{s}{y}$$

s = desviación estándar de y

y = media aritmética de y

3.4 Para s:

$$s = \sqrt{\frac{n \sum y^2 - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

3.5 Para y:

$$y = \frac{\sum y}{n}$$

3.6 Estimación por el intervalo de confianza del 95% para el verdadero valor de porcentaje de recobro. El intervalo es:

$$\bar{y} - t_{0.975, n-1} \frac{s}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{y} + t_{0.975, n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

#### 4. Linealidad del Método

4.1 Para la cantidad recuperada:

$$CR = \frac{A_m}{A_s} P_s$$

CR = Cantidad recuperada en mg  
 Am = Area relativa promedio de la muestra  
 As = Area relativa promedio del estándar  
 Ps = Potencia del estándar en mg/g

4.2 Ajuste de la relación bivariada al modelo de regresión simple:

$$\hat{y} = m x + b$$

y = variable de respuesta  
 x = variable predictoria  
 m = coeficiente de regresión  
 b = ordenada al origen

4.3 Para m:

$$m = \frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{n(\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

4.4 Para b:

$$b = \frac{\sum y - m(\sum x)}{n}$$

4.5 Estimación de la variación de la variable de respuesta ajustada al modelo y la medida de asociación entre las variables dado el modelo mediante la Desviación Estándar de Regresión ( $S_{y.x}$ )

$$S_{y.x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - m(\sum xy) - b(\sum y)}{n-2}}$$

4.6 Para el Coeficiente de Variación (CV):

$$CV = \frac{S_{y.x}}{y} \cdot 100$$

4.7 Para el Coeficiente de Determinación ( $r^2$ ):

$$r^2 = \frac{[n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[n(\sum x^2) - (\sum x)^2][n(\sum y^2) - (\sum y)^2]}$$

4.8 El Análisis de la Varianza en regresión lineal simple se describe en la tabla 3.

T A B L A 3  
T A B L A D E A N A D E V A

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F cal
REGRESION	GLR= 1	SCR = $m(\sum xy) + b(\sum y) - \frac{(\sum y)^2}{n}$	MCR = $\frac{SCR}{GLR}$	MCR
ERROR DE REGRESION	GLER= n-2	SCER = $\sum y^2 - m(\sum xy) - b(\sum y)$	M CER = $\frac{SCER}{GLER}$	M CER

4.9 El Intervalo de Confianza del 95% para el valor del parámetro de la ordenada al origen está dado por:

$$b - t_{0.975, n-2} S_b < B < b + t_{0.975, n-2} S_b$$

Donde:

$$S_b = S_{y.x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{x^2}{\sum x^2 - (\sum x)^2/n}}$$

4.10 Estimación del intervalo de confianza al 95% para el valor del parámetro del coeficiente de regresión (pendiente):

$$m - t_{0.975, n-2} S_m < M < m + t_{0.975, n-2} S_m$$

Donde:

$$S_m = S_{y \cdot x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

## 5. Precisión del Método

5.1 Para el calculo de la concentración de cada muestra para cada corrida-analista con la siguiente ecuación:

$$C_m = \frac{A_m P_s W_s}{A_s W_m}$$

Donde:

$C_m$  = Cantidad de ampicilina base en la muestra mg/g.

$A_m$  = Area relativa promedio de la muestra.

$A_s$  = Area relativa promedio del estándar.

$W_s$  = Peso del estándar de ampicilina en mg.

$W_m$  = Peso de la muestra de ampicilina trihidrato en mg.

$P_s$  = Potencia del estándar de ampicilina trihidrato en mg/g de ampicilina base.

5.2 Definir el modelo que represente la relación entre la variable de respuesta y los factores bajo evaluación:

$$Y_{ijk} = \mu + \epsilon_i + \zeta_{j(i)} + \epsilon_{k(ij)}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  = Variable de Respuesta

$\mu$  = Media poblacional de la variable de respuesta.

$\epsilon_i$  = Efecto del analista en la variable de respuesta. ( $i=1..a$ )

$\zeta_{j(i)}$  = Efecto de la corrida en la variable de respuesta. ( $j=1..c$ )

$\epsilon_{k(ij)}$  = Error de método. ( $k=1..r$ )

$k(ij)$



5.3 Establecer si las fuentes de variación (analista y corrida) afectan a la variable de respuesta mediante el análisis de la varianza. La tabla de varianza se describe en la tabla 5.

T A B L A 5  
T A B L A D E A N A D E V A

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F cal
$K_i$	$GLA = a - 1$	$SCA = \frac{\sum y_{i..}^2}{cr} - \frac{y_{...}^2}{acr}$	$MCA = \frac{SCA}{GLA}$	$F = \frac{MCA}{MCC}$
$C_{j(i)}$	$GLC = c - 1$	$SCC = \frac{\sum \sum y_{ij.}^2}{r} - \frac{\sum y_{i..}^2}{acr}$	$MCC = \frac{SCC}{GLC}$	$F = \frac{MCC}{MCE}$
$\epsilon_{k(ij)}$	$GLE = a - 1$	$SCE = \frac{\sum \sum \sum y_{ijk}^2}{r} - \frac{\sum \sum y_{ij.}^2}{acr}$	$MCE = \frac{SCE}{GLE}$	

5.3.1. Si existe efecto del analista, se calcula la magnitud de su efecto con la sig. ecuación:

$$SA = \sqrt{\frac{MCA - MCC}{rc}}$$

5.3.2 El cual puede expresarse como coeficiente de variación del analista, mediante la siguiente ecuación

$$CV = \frac{SA}{A} \cdot 100 = \frac{SA}{\frac{Y_{...}}{acr}} \cdot 100$$

5.3.3 Si existe efecto de las corridas, se calcula la magnitud de su efecto con la sig. ecuación:

$$SC = \sqrt{\frac{MCC - MCE}{r}}$$

5.3.4 El cual puede expresarse como coeficiente de variación de la corrida, mediante la siguiente ecuación

$$CV = \frac{SC}{C \cdot \frac{y...}{\alpha cr}} * 100$$

5.4 Calcular el coeficiente de variación total, que esta dado por la siguiente ecuación

$$CV = \frac{\sqrt{\frac{\sum \sum y_{ijk}^2 - y...^2}{\alpha cr}}}{\frac{y...}{\alpha cr}} * 100$$

5.5 Calcular la diferencia máxima de como mínimo 2 determinaciones analíticas obtenidas bajo las mismas condiciones de análisis. La variación debida a la metodología analítica se calcula con la siguiente ecuación:

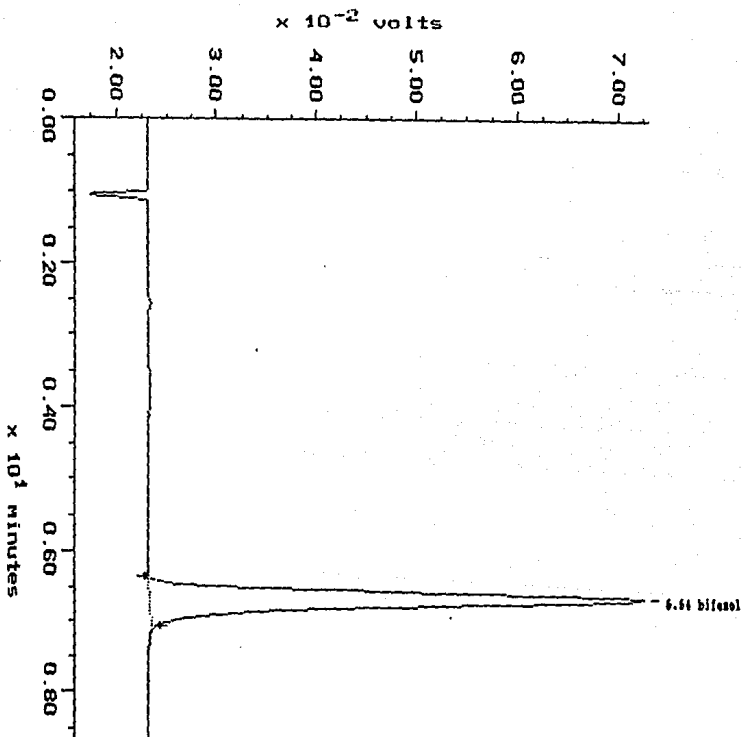
$$SM = \sqrt{MCE}$$

5.6 Expresado en términos de coeficiente de variación (CV) es:

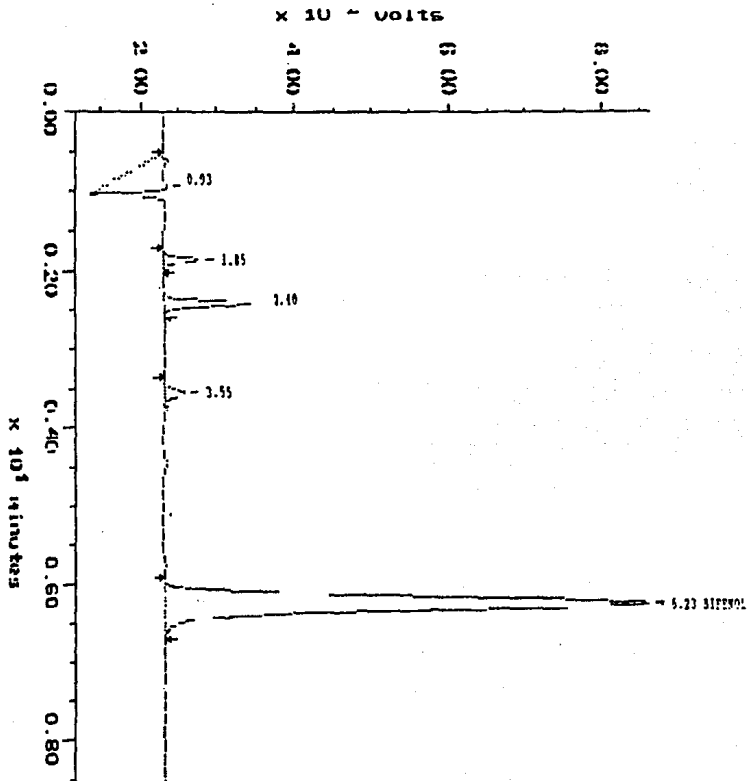
$$CV = \frac{SM}{M \cdot \frac{y...}{\alpha cr}}$$

5.7 La magnitud máxima expresada en porcentaje de la diferencia de manera conservadora de como mínimo 2 determinaciones analíticas bajo la mismas condiciones se calcula con la siguiente ecuación:

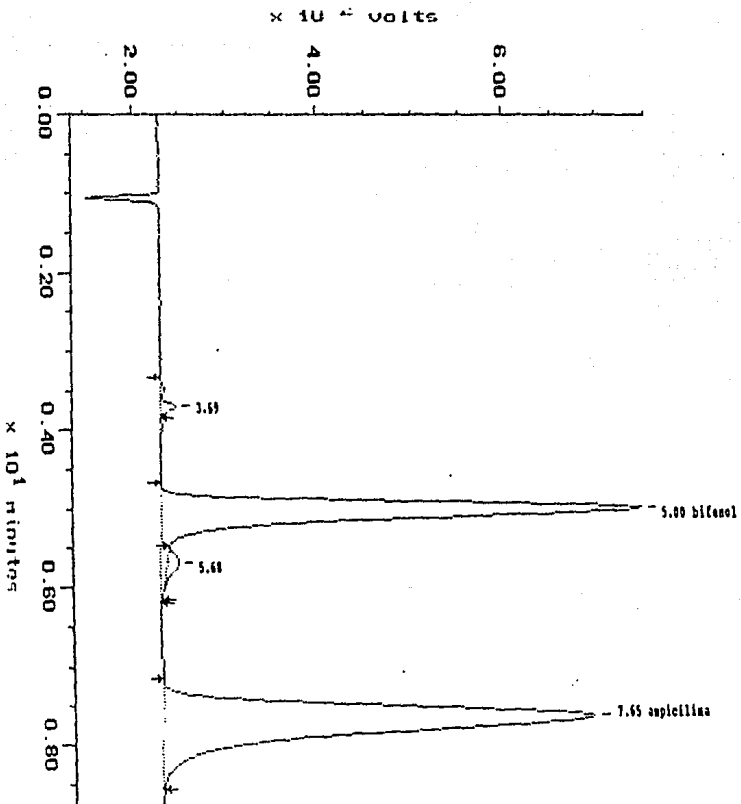
$$\delta_{\text{máx}} = \frac{4 * CV}{M}$$



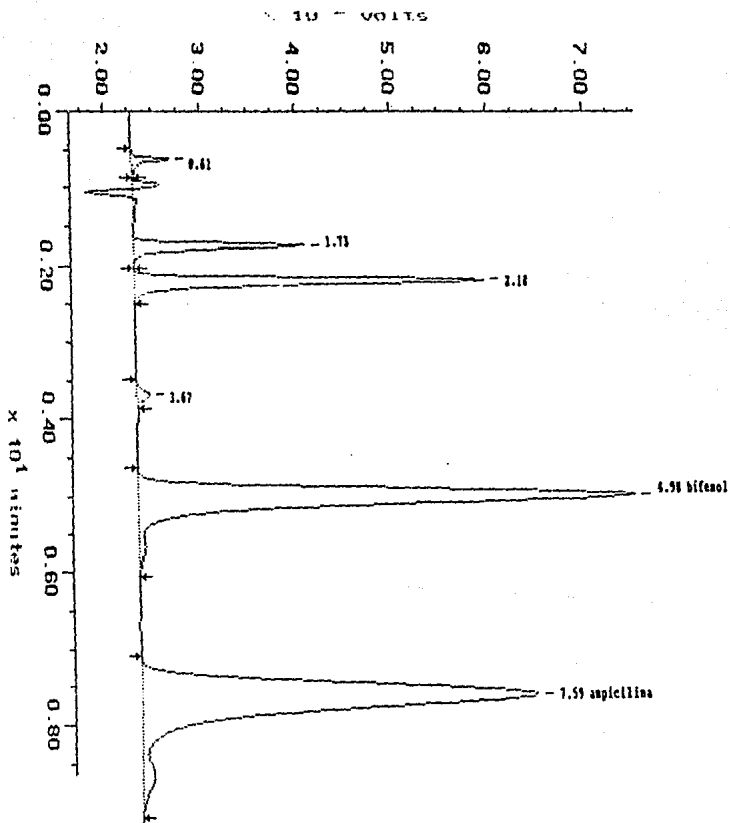
ANEXO 2. Especificidad del método para cápsulas.  
Confrontación contra excipiente. Estearato de magnesio.



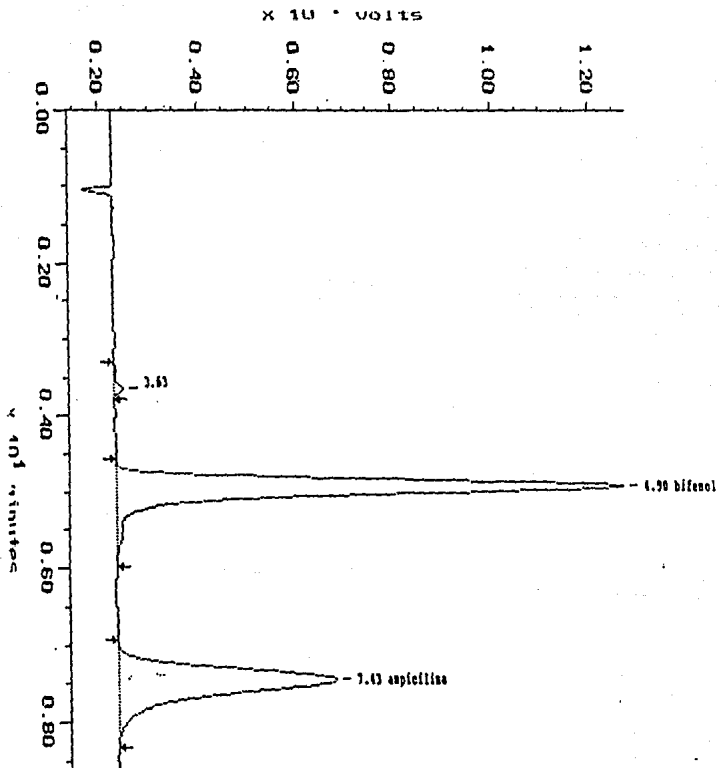
ANEXO 3. Especificidad del método para suspensión.  
 Confrontación contra excipiente. Estearato de magnesio.



ANEXO 4. Placebo cargado con estándares para cápsulas.



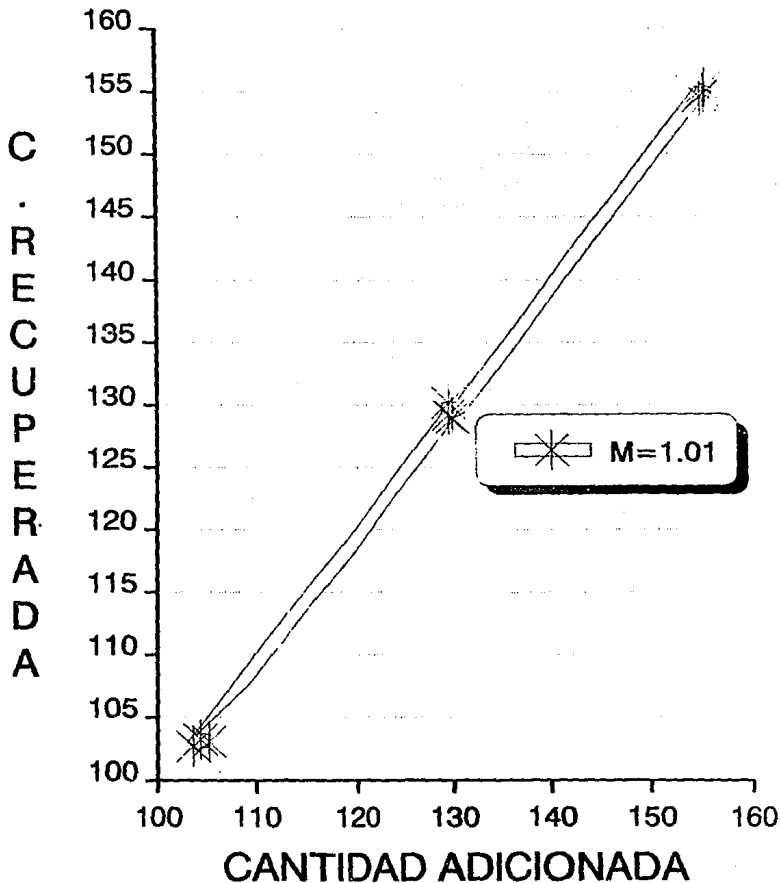
ANEXO 5. Placebo cargado con estándares para suspensión.



ANEXO 6. Producto Terminado: Inyectable.  
BRISTOL MYERS SQUIBB DE MEXICO S. A. DE C. V.

# GRAFICA No. 1

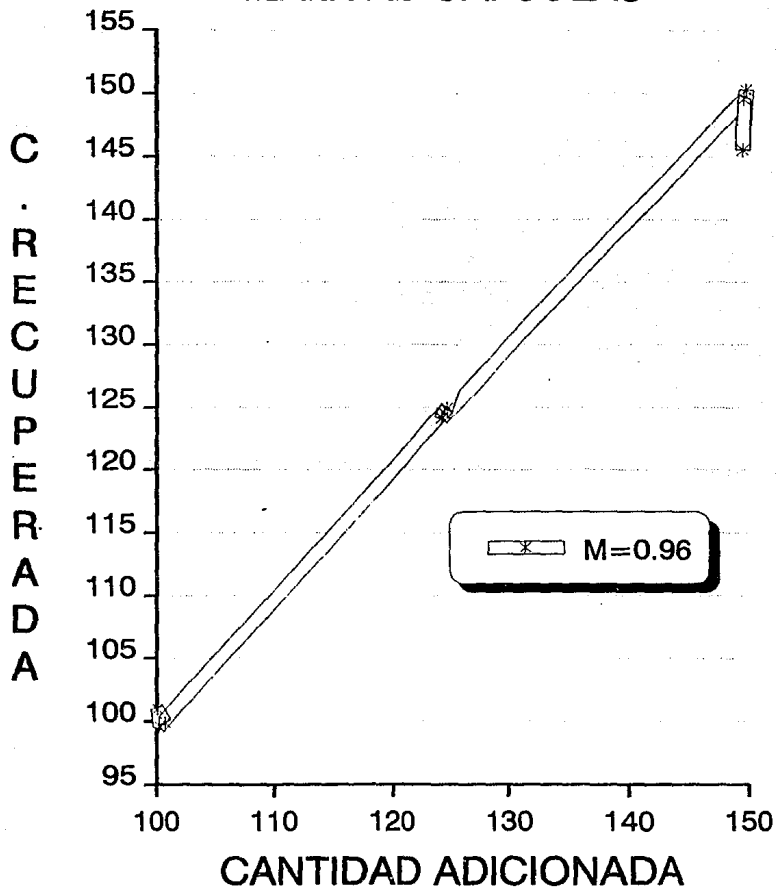
## LINEALIDAD INYECTABLE





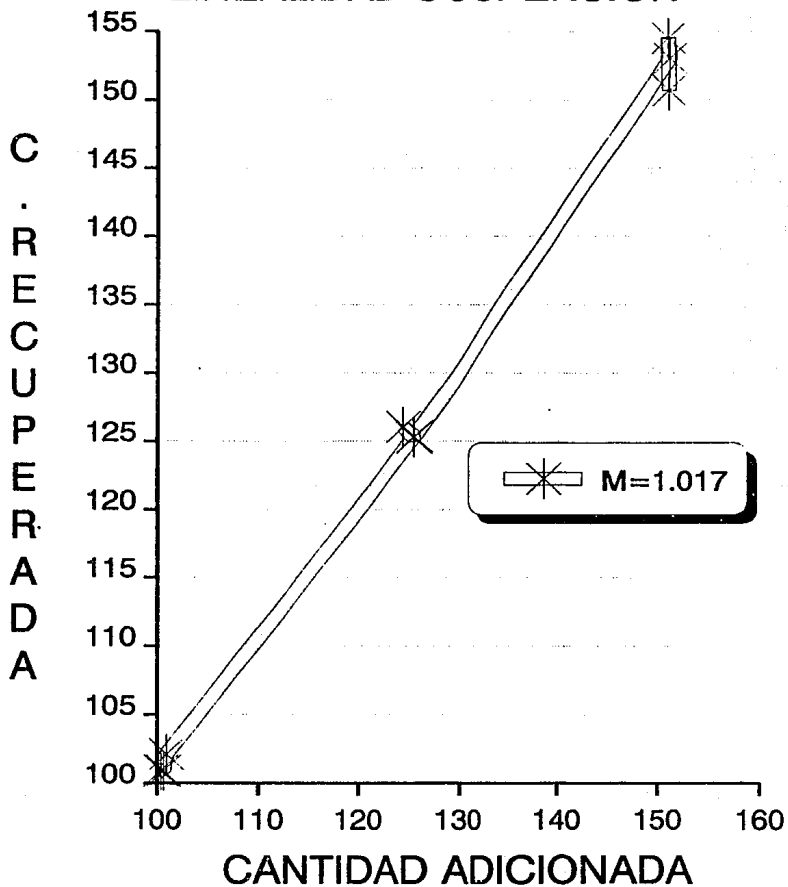
# GRAFICA No. 2

## LINEALIDAD CAPSULAS



# GRAFICA No. 3

## LINEALIDAD SUSPENSION



### LISTA DE REFERENCIAS

1. Remington, "Farmacia", 17ª ed. Ed. Medica Panamericana S. A., p.809-810.
2. Remington, "Farmacia", 17ª ed. Ed. Medica Panamericana S. A., p.1620-1621.
3. Jones B. N., J. Lig. Chromat. 4, 565, 1981.
4. Geronimo Bello, "La Cromatografía Líquida de Alta Resolución", Pharma News 1 (5), p.32, 1990.
5. Harold M, Macnair y Benjamin Esquivel, "Cromatografía de Líquidos a Alta Presión", Washington D.C.
6. Geronimo Bello, "La Cromatografía Líquida de Alta Resolución", Pharma News 1 (5), p.30, 1990.
7. Geronimo Bello, "La Cromatografía Líquida de Alta Resolución", Pharma News 1 (5), p.32, 1990.
8. The Merck Index, 8th. Ed. (1968), p.75.
9. Doyle, F. P., Int. Congr. Chemother. Proc., 3rd, Stuttgart 1963; C. A. 64 8893 (1966)
10. Austin, K. W. B., Belg. 63. 974, 1964; C.A. 62, 8952A (1965)
11. Laboratories Baco, S. A., Span. 331. 283. 1967; C. A. 62687s (1968).
12. The United States Pharmacopeia, XVIII, P. 44.
13. Lerner, H. The Squibb Institute for Medical Research. Private Communication, 1972.
14. Austin, K. W. B., Belg. 63. 974, 1964; C.A. 62, 8952A (1965)
15. March J. R. and Weiss, P. J., J. Assoc. of Anal. Chem. 50, 457 (1967)
16. Rapson, H.D.C. and Bird, A. E., J. Pharm. Pharmacol.,. Suppl. 15, 22 (1963)
17. Doyle, F. P, Fosker, G. R. and Smith, H., J. Chem Soc., 1962, 1440.
18. Dunham, J. M., "Analytica Profiles of Drug Substance", Vol. I, Ed. K. Florey, Academic Press, New York and London, 1972 p. 262.

19. George, M. J., The Squibb Institute for Medical Research. Private Communication, 1964.
20. Weiss, P. J, and Palmer, R. V., Antimicrob. Agents Chemother. 1964, 355 - 9. (Publ. 1965)
21. Cressman, W. A., Sugita, E. T., and Niebergall, P. J., J. Pharm. Pharmacol. 18, 801, (1966)
22. Nara Takashi, Gen. Offen., 1. 945, 607. C. A. 73, 99384W (1970)
23. Ekstrom, B., and Sjober. B., Acta Chem. Scand. 19 281 (1965)
24. Anon. Ind. Chem. 39 (10), 513 (1963)
25. Coclers, L. and Versolato, A. J. Pharm. Belg. 24, 475 (1969)
26. Sinsheimer, J. E. and Burckhalter, J. H., J. Pharm. Sci. 58, 104 (1969)
27. Klein, J.O., and Wilcox C., Am J. Med. Sci. 245, 544 (1963)
28. Klein, J.O., and Wilcox C., Am J. Med. Sci. 245, 544 (1963)
29. Bunn, P.A., Antimicrob. Agents Chemoter. 1961, 739 (1962)
30. Goodman S. Louis, Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 5ª Ed. Nueva Editorial Interamericana. p. 961, 1978.
31. Juárez Ayala José. "Un acercamiento a la Validación de Métodos Analíticos". Pharma News, 1 (5), 16-20, 1990
32. Juárez Ayala José. Parámetros Estadísticos y Procedimientos de Validación, Criterios de Aceptacion. Pharma News 1, (6), 15-20, 1990.  
Métodos Analíticos". Pharma News, 1 (5), 16-20, 1990

## BIBLIOGRAFIA

1. Alcantara Pineda Alejandro. Valida. Versión 1.0. Centro de A. F. de Estudios Tecnológicos. Asociación Farmacéutica Mexicana.
2. Bello Geronimo, "La Cromatografía Líquida de Alta Resolución", Pharma News 11 (5), 28-32, 1990.
3. Bowman W. C. Farmacología. Bases Bioquímicas y patológicas. Aplicaciones Clínicas. Nueva Editorial Interamericana p. 34.26, 1984.
4. Cavenaghi L. Statistical evaluation of the results obtained with the analytical Methods used for the quality control medicines. Drug development & Industrial Pharmacy. 13 (14), 2571-1615, 1987.
5. Clarke E.G.C., Isolation and Identification of Drugs, Vol I. The Pharmaceutical Press, London 1978, pag. 25-28
6. Connors, K. A. Curso de Análisis Farmacéutico, 2a. ed. Editorial Reverté, Barcelona, España, 1981. p. 25-28
7. Comisión Permanente de la Farmacopea, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Secretaría de Salud, 5ªed. (1988)
8. "Current Concepts for Validation of Compendial Pharmacopeial Forum, The United States Pharmacopeial Convention Inc. 1986
9. Feigenbaun A. U. Control Total de Calidad, Ed. CECSA. México, 1984

10. Florey, K. "Analytical Profiles of Drugs Substances". Ed. Academic Press, N. Y., vol 2, p. 4 - 61. 1982.
11. Gennaro, A.R., Remington Farmacia, vol I, 17a. ed. Ed. Medica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 1987, pág. 809-845
12. Horwitz W. The variability of methods of analysis used analytical Pharmaceutical Chemistry. Jouurnal of the Adac, 60 (6), 1355-1363, 1977.
13. Juárez Ayala José. "Un acercamiento a la Validación de Métodos Analíticos". Pharma News ,1 (5), 16-20, 1990.
14. Juárez Ayala José. Paramétros Estadísticos y Procedimientos de Validación, Criterios de Aceptación.. Pharma News ,1 (6), 15-20, 1990.
15. Massart D.L. Evaluation and optimization of laboratory methods and analytical Procedures. Elsevier scientific publishing company. The netherlands. (1978)
16. Manual de Procedimientos de Validación de Métodos Analíticos. Laboratorios Bristol Myers Squibb S. A. de C. V.