

119
205



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

VALIDACION DE UN METODO MICROBIOLÓGICO
PARA CUANTIFICAR LINCOMICINA EN UN
PRODUCTO INYECTABLE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
SALVADOR RIVAS LINARES



CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

INDICE

INTRODUCCION	1
CAPITULO I.	
GENERALIDADES.	
Lincomicina	3
Estabilidad	4
Clasificación	6
Clorhidrato de Lincomicina	8
Clorhidrato de Lincomicina	
Inyectable	9
Espectro de Acción	11
Mecanismo de Acción	11
Absorción. Distribución	
y Excreción	12
Efectos Adversos	13
Usos Terapeuticos	13
VALIDACION.	
Definición	14
1. Linealidad	15
2. Exactitud	15
3. Precisión	16
3.1. Repetibilidad	17
3.2. Reproducibilidad	17

4. Especificidad	18
5. Tolerancia del Sistema	18
5.1. Estabilidad de la Muestra	
Analítica	19

CAPITULO II.

PARTE EXPERIMENTAL.

Material y Equipo utilizado	20
Procedimiento para realizar	
la Técnica	22
Preparación del Microorganismo	25
Preparación del Estándar	
Curva Estándar	28
Preparación de la Muestra	28
Fórmula Cualitativa - Cuantitativa	29

VALIDACION DEL METODO MICROBIOLÓGICO.

EVALUACION DEL SISTEMA.

Linealidad	30
Precisión	30

EVALUACION DEL METODO.

Linealidad	31
Precisión.	
a) Repetibilidad	31
b) Reproducibilidad	32

Exactitud al 100 %	32
Especificidad	32
Tolerancia del Sistema.	
Estabilidad de la Muestra Analítica	33

CAPITULO III.

RESULTADOS.

EVALUACION DEL SISTEMA.

Linealidad	34
Precisión	39

EVALUACION DEL METODO.

Linealidad	41
Precisión.	
a) Repetibilidad	43
b) Reproducibilidad	45
Exactitud	48
Especificidad	50
Estabilidad de la Muestra Analítica	52
Evaluación Estadística	62

CAPITULO IV.

CONCLUSIONES	63
BIBLIOGRAFIA	65

INTRODUCCION.

La Validación de los diferentes procesos de manufactura de los productos farmacéuticos: así como de los métodos analíticos para la cuantificación de los principios activos de dichos productos, es actualmente un requisito que debe ser realizado en la Industria Farmacéutica, para asegurar que dicho proceso ó método es el más adecuado y cumple con las expectativas para las cuales fué desarrollado.

Por consiguiente el validar los métodos cromatográficos, químicos y microbiológicos utilizados en el Laboratorio de Control de Calidad es un paso que debe llevarse a cabo para comprobar la efectividad de los métodos de cuantificación y así obtener resultados confiables, que nos aseguren que los productos farmacéuticos al llegar a los usuarios, presentan un nivel de calidad óptimo.

En el presente trabajo se lleva a cabo la validación de un método microbiológico utilizado para la cuantificación de Clorhidrato de Lincomicina en un producto inyectable.

El método ya se encuentra desarrollado y es aplicado en Laboratorio de Control de Calidad donde se desarrolla el tema y el objetivo de este trabajo es llevar a cabo su validación, para demostrar que la metodología seguida, cumple con los parámetros de validación establecidos.

El método microbiológico utilizado para cuantificar Clorhidrato de Lincomicina es el de Cilindro Placa, por

consiguiente se lleva a cabo una adecuación de los puntos sugeridos en una validación para poder aplicarlos adecuadamente en este método.

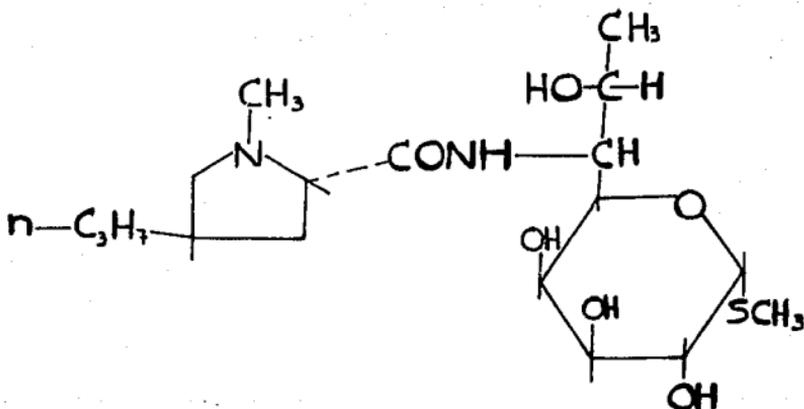
Después de desarrollados todos los puntos de la validación, los resultados se tratan estadísticamente para obtener resultados globales y conclusiones respecto al trabajo realizado y así conocer si se cumplió con el objetivo que es la validación del método de cuantificación del Clorhidrato de Lincomicina.

CAPITULO I. GENERALIDADES

LINCOMICINA.

NOMBRE GENERICO : Lincomicina. (1)

ESTRUCTURA :



C₁₈H₃₄N₂O₆S

peso por mol : 406.53

Forma disponible :

Clorhidrato de Lincomicina Monohidratado

C₁₈H₃₄N₂O₆S:HCL:H₂O, peso por mol : 461.01

Propiedades Físicas : pKa = 7.92. El Clorhidrato es fácilmente soluble en agua. estable a la luz y al aire. pero sufre pérdida de la molécula de agua entre 50 °C y 150 °C.

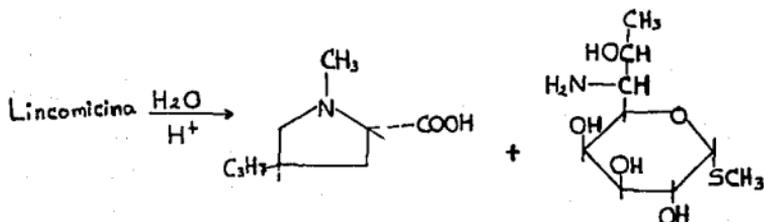
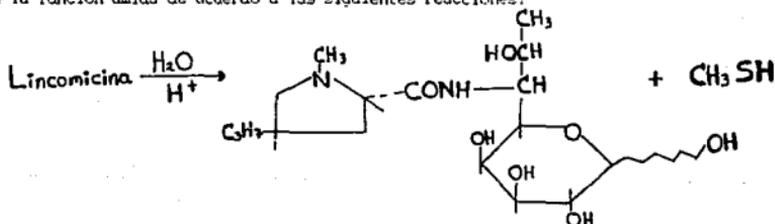
Arriba de 200 °C ocurre su descomposición con pérdida del metil mercaptano. (2)

ASPECTOS DE SU ESTABILIDAD :

La Lincomicina sufre la hidrólisis del grupo tioglicosido (catalizada por ácido) y la hidrólisis de la función amida (probablemente catalizada por base o por ácido). En medio muy ácido la Lincomicina se degrada en la misma proporción que la Clindamicina (estructuralmente casi similar), arriba de valores de pH = 1.5 la Lincomicina es tan estable como la Clindamicina.

Cinética de Reacciones:

La Lincomicina sufre la hidrólisis del grupo tioglicosido y de la función amida de acuerdo a las siguientes reacciones:



Ambas reacciones son catalizadas por ácido. La Lincomicina presenta degradación en HCL 0.1 N a 70 °C. con un tiempo de vida media de 39 horas ($K_{abs} = 4.85 \text{ E } -6, 1/\text{seg}$), presentando la reacción un primer orden.

A 37 °C en HCL 0.1 N la Lincomicina es estable durante 48 horas; Por ello la inestabilidad de la Lincomicina en el estómago antes de ser absorbida o durante su formulación o cuantificación no presenta problemas.

Comportamiento frente al pH :

Ha sido confirmado que a pH = 1.1 la Lincomicina tiene un tiempo de vida media de 39 horas. casi muy similar al de la Clindamicina en las mismas condiciones. El perfil del rango del pH para la degradación de la Lincomicina no está especificado. sin embargo. sobre las bases de las reacciones conocidas y los datos publicados (4,5). estos nos pueden dar la expectativa de que la Lincomicina es muy estable (con respecto a su hidrólisis). tanto como la Clindamicina a valores de pH arriba de 1.5.

En la región ácida la hidrólisis del grupo tioglicósido y de la función amida pueden tener lugar; en la región alcalina la hidrólisis de la función amida es la reacción predominante.

Energía de Activación:

Puesto que en medio muy ácido la Lincomicina y la Clindamicina presentan comportamientos similares. a pH =1.1 la

energía de activación de Arrhenius para la hidrólisis de la Clindamicina reportada por Oesterling (6) es 38.0 ± 1.2 Kcal/mol bajo las mismas condiciones. la Lincomicina es probable que tenga el mismo valor de energía de activación. A altos valores de pH las reacciones y su cinética de los dos compuestos pueden ser diferentes.

CLASIFICACION.

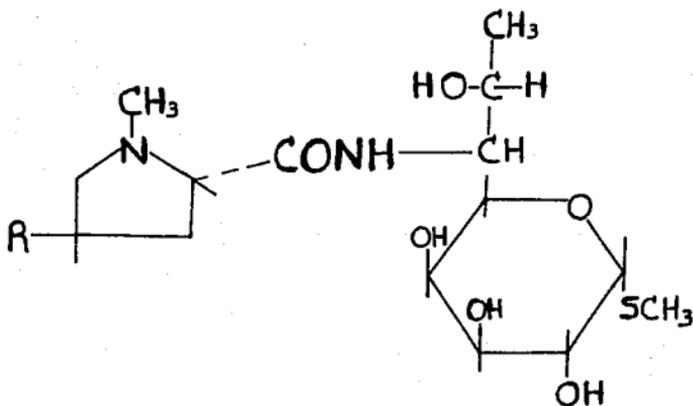
La Lincomicina A es un antibiótico antibacteriano que junto a la Lincomicina B, es obtenida de los cultivos de Streptomyces linconensis, variedad lincolnensis NRRL 2936. También es producida por el Streptomyces spinosus NRRL 3890, por el Streptomyces pseudoauriscolus chemovar linmuceticus NRRL 3985 y el S. variabilis liniabilis NRRL 5618. Este último microorganismo no sintetiza la Lincomicina B; el antibiótico se purifica y se utiliza como Clorhidrato.

Esta constituida por dos partes de 9 átomos de carbono cada una unidas entre sí por un enlace amídico. Una de las partes es el trans-1-metil-4-propil-1-prolina, conocida como ácido propilhídrico (PHA), y la otra parte es el metil 6-amino-6-8-dideoxi-1-tio D-eritro- α -D-galacto-octopiranosido ó metil α -tiolincoaminida (MIL).

La Lincomicina A siempre viene acompañada de un coproducto de la fermentación, llamado Lincomicina B, por su gran parecido

estructural, la proporción de la Lincomicina B producida siempre es menor al 5%. La única diferencia entre la Lincomicina A y la Lincomicina B, es la presencia de un grupo etilo en lugar de un grupo propilo en la posición 4 del aminoácido. Se cree que la formación de la Lincomicina B es una aberración, ya que el microorganismo la produce en mucho menor proporción que la Lincomicina A. (7)

Las estructuras químicas de las Lincomicinas A y B, se muestran en la siguiente figura:



R : CH₃-CH₂-CH₂- Lincomicina A.

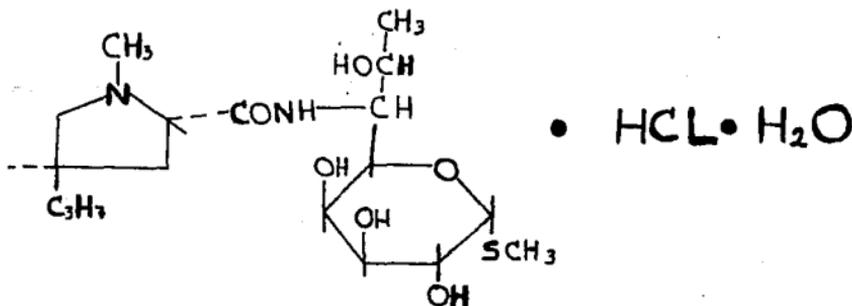
R : CH₃-CH₂- Lincomicina B.

La Lincomicina cuando se encuentra como base libre es soluble en metanol, etanol, butanol, isopropanol, etilacetato, n-butilacetato, amilacetato, acetona, metiletilacetona, isopropil-n-butilcetona, cloruro de metileno, cloroformo, dicloruro de isopropilo. (8)

El Clorhidrato de Lincomicina B es muy soluble en agua, soluble en metanol y etanol y relativamente insoluble en solventes orgánicos menos polares.

La Lincomicina B como base libre es soluble en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos. Su peso molecular como base libre es de 392 g/mol; el pKa reportado es de 7.68. (9)

CLORHIDRATO DE LINCOMICINA.



C₁₈H₃₄N₂O₆S:HCL:H₂O

peso por mol = 461.01

anhídra peso por mol = 443.0

El Clorhidrato de Lincomicina tiene una potencia equivalente a no menos de 790 mcg. de Lincomicina base por mg.

Estándar de Referencia : Referencia Estándar de Clorhidrato de Lincomicina USP. No necesita secarse antes de su uso.

Identificación : El espectro de absorción de la Lincomicina dispersada en aceite mineral, exhibe máximos unicamente a la misma longitud de onda que un estándar de referencia primario, preparado en las mismas condiciones de Clorhidrato de Lincomicina USP.

Rotación Específica : Entre +135 ° y +150 °, calculada sobre la base anhidra, en una solución que contiene 20 mg/ml.

pH : Entre 3.0 - 5.5 en solución (1 en 10).

CLORHIDRATO DE LINCOMICINA INYECTABLE.

El inyectable de Clorhidrato de Lincomicina es una solución estéril de Clorhidrato de Lincomicina en agua para inyección.

Este debe contener el equivalente de no menos del 90.0 % y no más del 120.0 % de Lincomicina base ($C_{18}H_{34}N_2O_6S$); esta presentación contiene alcohol bencílico como conservador.

pH : Entre 3.0 - 5.5

Estándar de Referencia : Estándar de Clorhidrato de Lincomicina USP. No necesita secarse antes de su uso.

Sustancias Depresoras : Cuando se diluye con solución salina estéril de prueba, para llegar a una concentración de 3.0 mg de Lincomicina base por ml, debe seguir los requerimientos de la prueba para sustancias depresoras (USP. 101). la dosis para esta prueba es de 1.0 ml/Kg.

Pirógenos : Cuando se diluye en solución salina estéril libre de pirógenos, para tener una concentración de 0.5 mg de Lincomicina base por ml, debe seguir los requerimientos del método general para pirógenos (USP . 151). la dosis para esta prueba es de 1.0 ml/Kg.

Esterilidad : Cumple con los requerimientos de la prueba de esterilidad (USP , 71), el proceso usado para la prueba es filtración por membrana. (10)

ESPECTRO DE ACCION.

A concentraciones menores de 0.5 mcg/ml. la Lincomicina inhibe el desarrollo in vitro de: D.pneumoniae grupo A. Streptococcus pyogenes. Streptococcus viridans y Bacillus anthracis. A concentraciones menores a 2 mcg/ml inhibe el desarrollo de: Corynebacterium diphtheriae, Clostridium tetani y Clostridium perfringes.

La susceptibilidad del Staphylococcus aureus a este antibiótico es variable, puede ser sensible a concentracion de 2 mcg/ml. y alrededor del 15% de la especie son sensibles hasta concentraciones cercanas a 5 mcg/ml. El antibiótico es altamente activo para muchos tipos de Bacteroides y otros anaerobios.

MECANISMO DE ACCION.

La Lincomicina actúa exclusivamente en la subunidad 50 S de los ribosomas bacterianos, suprimiendo la formación de proteínas bacterianas, mediante la inhibición de la formación de los enlaces peptídicos.

ABSORCION, DISTRIBUCION Y EXCRECION.

La Lincomicina es rápidamente absorbida en el tracto gastrointestinal, pero no en su totalidad. Los niveles en sangre son menores cuando la droga es tomada después de ingerir alimentos. De 20 % al 35 % de la dosis, cuando se administra por vía oral es absorbida, presentando concentraciones plasmáticas alrededor de 2 a 5 mcg/ml, cuando se ha tomado una dosis de 500 mg. Los niveles son mantenidos a la mínima concentración inhibitoria para muchos microorganismos gram positivos durante 6 a 8 horas.

Cuando se administra por vía intramuscular, el nivel máximo de concentración se alcanza a los 30 minutos. Con una dosis de 600 mg cada 12 horas, los niveles máximos alcanzados son entre 15 y 20 mcg/ml.

El tiempo de vida media biológico de la Lincomicina después de una administración por vía oral, intramuscular o intravenosa es aproximadamente de 5 a 6 horas.

La excreción urinaria de la Lincomicina y Clindamicina es limitada y variable; aproximadamente el 5 % de la dosis oral y el 15 % de la dosis parenteral aparecen en la orina.

La bilis puede ser una importante vía de excreción de este antibiótico, ya que aparece en forma activa en las heces, después de una administración oral o parenteral, sugiriendo una excreción por la bilis o a través de la pared del intestino o por ambas partes.

La Lincomicina es distribuida en fluidos intracelulares, extracelulares, y es detectable en muchos tejidos humanos.

EFFECTOS ADVERSOS.

En el 20 % de los casos, la administracion oral de la Lincomina puede causar diarrea. evidencias preeliminarias sugieren que la Clindamicina no, y esta es una de las ventajas que tiene sobre ella. Otros de los efectos indeseables que pueden presentarse despues de una terapia con Lincomicina por via oral son: estomatitis, nauseas, vomitos, enterocolitis, urticaria.

Por una terapia parenteral se pueden presentar, aunque muy raras veces neutropenia, leukopenia y trombopenia, las cuales desaparecen cuando es suspendido el tratamiento. Otros efectos indeseables son: angioedemia, anafilaxis, fotosensitividad y problemas cardiopulmonares (despues de una rapida infusion intravenosa).

USOS TERAPEUTICOS.

La Lincomicina es efectiva para infecciones en el hombre causadas por: Pneumococci, Streptococcus pyogenes (grupo A), Streptococcus mitis y Staphylococcus aureus. La droga es reportada con buenos resultados contra el acné vulgar y enfermedades supurativas de la piel. (11. 12)

VALIDACION.

La Validación es la comprobación de que un proceso o método analítico, se lleva a cabo y da resultados que cumplen con los objetivos para los cuales se diseña.

En la actualidad una parte muy importante del desarrollo de un método analítico es su validación; es decir, que el método debe ser evaluado para demostrar su efectividad.

El procedimiento para llevar a cabo la validación es único y va de acuerdo a las características del proceso o método que se quiera validar. Pero generalmente los parámetros que son evaluados en una validación son: linealidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud, especificidad y tolerancia de un método analítico.

El procedimiento tiene que ser encaminado para que cubra tres etapas importantes de la validación:

La primera es identificar los parámetros apropiados que se aplicarán en la validación del proyecto específicamente.

La segunda es diseñar los experimentos para que se lleve a cabo la evaluación de dichos parámetros.

La tercera incluye la interpretación de los resultados de acuerdo a los procedimientos que se llevaron a cabo y así comprobar si el método se encuentra validado o no.

Para llevar a cabo una validación se incluyen los siguientes parámetros:

1.- Linealidad: Es la medida del grado en el cual la curva de calibración analítica se aproxima a una línea recta, o bien el grado en el cual la sensibilidad (Γ) es constante, siendo ésta última la relación entre la pendiente de una curva de calibración (m) y la variabilidad de los puntos experimentales o error estándar de regresión (Sy/x):

$$\Gamma = m / Sx/y$$

La linealidad de una respuesta obtenida (áreas, altura de picos, zonas de inhibición, transmitancia, absorbancia, etc.) graficado contra la concentración del principio activo que se este cuantificando, es evaluada para asegurar una proporción directa sobre un rango de trabajo anticipado.

Los estadísticos utilizados para evaluar este parámetro son: Coeficiente de Variación de los porcentajes de recuperación (CV), coeficiente de correlación ($r \geq 0.99$), pendiente (m), intercepto de la curva con el eje de las ordenadas (b), coeficiente de determinación ($r^2 \geq 0.98$).

2.- Exactitud: Es la concordancia entre un valor determinado experimentalmente (promedio de la población) y el valor aceptado como referencia o verdadero.

Los estadísticos utilizados para evaluar este parámetro son:
Coeficiente de variación de los porcentajes recuperados (CV),
donde: para métodos cromatográficos $CV \leq 2\%$

para métodos químicos y espectrofotométricos $CV \leq 3\%$

para métodos microbiológicos $CV \leq 5\%$.

En el intervalo de confianza (IC) para la media debe localizarse el 100%.

También se evalúa mediante una comparación del valor medio obtenido prácticamente y el valor teórico, mediante una prueba "t" de Student.

3.- Precisión: Es la concordancia entre mediciones repetidas de una misma propiedad, es decir la distribución de medidas individuales alrededor de su promedio; se expresa en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

Para evaluar la precisión del método se realiza el método completo en seis replicas de una muestra completa; en cambio, la precisión del sistema se realiza para considerar solamente el error debido al sistema de operación y no al error atribuido a la preparación de la muestra.

Para evaluar este parámetro se utiliza el coeficiente de variación (CV), el cual para el sistema es:

para métodos analíticos $CV \leq 1.5\%$

para métodos microbiológicos $CV \leq 5\%$.

y para el método es de :

para métodos cromatográficos $CV \leq 2\%$

para métodos microbiológicos $CV \leq 5\%$

para métodos químicos y espectrofotométricos
 $CV \leq 3\%$.

3.1.- Repetibilidad : Es la precisión de un método expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un analista, utilizando la misma técnica y aparato para la cuantificación respectiva.

Para evaluar este parámetro se utiliza el coeficiente de variación (CV) con los criterios de acuerdo al método utilizado según lo referido anteriormente en el inciso No. 3.

Además se utiliza la prueba "t" de Student , para hacer una comparación entre la media de los porcentajes obtenidos prácticamente y la media del valor teórico.

3.2.- Reproducibilidad : Es la precisión de un método expresada como la concordancia entre determinaciones realizadas por diferentes analistas, en distintos días, llevando a cabo la misma técnica analítica, en el mismo o en diferente laboratorio, con el mismo equipo o con otro diferente.

Para evaluar este parámetro se utiliza el coeficiente de variación (CV) con los criterios de acuerdo al método usado, según lo referido anteriormente en el inciso No. 3.

También se evalúa mediante una comparación de las medias de los resultados obtenidos por ambos analistas, mediante una prueba "t" de Student.

4.- Especificidad : Es el grado en el cual la medición o respuesta se debe a la sustancia a ser determinada y no a otras sustancias, estas sustancias incluyen excipientes, contaminantes y productos de degradación. En un método indicador de estabilidad se debe demostrar que la degradación de productos no interfiere en la respuesta dada por la sustancia que se está cuantificando.

Cuando se demuestre que la respuesta analítica obtenida solo se debe a la sustancia de interés, el método se llamará específico y podrá ser utilizado como indicador de estabilidad.

5.- Tolerancia del sistema : En este parámetro se determina como se afecta la cuantificación de la sustancia de interés cuando se varía una condición de operación determinada. Para el método de Cilindro Placa se puede variar:

- Los medios de cultivo utilizados para la capa base o para la capa siembra.

- La cantidad de microorganismo usada para la prueba.

- El tiempo en que se puede usar la solución en donde se encuentra la sustancia de interés sin que ésta sufra cambios significativos (Estabilidad de la muestra analítica).

- El tiempo de incubación de las cajas petri con el microorganismo inoculado, antes de leerlas.

5.1.- Estabilidad de la Muestra Analítica. En este parámetro se establece el periodo de tiempo en que la muestra en solución puede mantenerse antes de analizarse sin exponer la exactitud del método.

El criterio para evaluar este parámetro está dado por la comparación entre la media del porcentaje recuperado del primer análisis con la media del porcentaje recuperado del segundo análisis y/o con la del tercer análisis si es que lo hubiese mediante la "t" de Student ; y así con la información obtenida establecer las condiciones de almacenamiento adecuadas para las muestras. (13. 14)

CAPITULO II. PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL Y EQUIPO UTILIZADO EN LA CUANTIFICACION DE CLORHIDRATO DE LINCOMICINA MEDIANTE LA TECNICA DE CILINDRO PLACA.

a) Material Biológico.

- Medio para antibióticos No. 1 (Bioxón)
- Medio para antibióticos No. 11 (Bioxón)
- Medio de Caldo Soya Trypticaseína (Bioxón)
- Micrococcus luteus. ATCC. 9341 (UC. 130)
- Solución Reguladora de Fosfatos pH= 8.0 ± 0.1 : (0.1 M)
- Solución Salina Isotónica al 0.85 % (S.S.I.)

b) Material para la técnica.

- Cajas petri de vidrio de 20 mm de profundidad * 100 mm de diámetro (aproximadamente).
- Cilindros metálicos de 6.0 mm de diámetro * 10 mm de largo. Cada dimensión tiene una tolerancia de ± 0.1 mm
- Varillas metálicas con capacidad aproximada para 50 cilindros.
- Válvulas para llenado de cajas petri.
- Jeringas estériles de 5 ml y 20 ml.
- Micropipeta con una capacidad de 200 mcl - 1000 mcl.
- Matraces Erlenmeyer con capacidad de 500 ml y 1000 ml.
- Pipetas volumétricas con capacidad de 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml y 5 ml.
- Pipetas graduadas con capacidad de 10 ml.

- Matraces aforados con capacidad de 25 ml, 50 ml y 100 ml.
- Frascos viales con capacidad de 30 ml y 50 ml.
- Tubos de vidrio de 22 mm de diámetro * 190 mm de largo.
- Botellas de Roux.
- Mechero.
- Asa Bacteriológica.
- Perilla de Seguridad.

c) Equipo e Instrumental para la prueba.

- Autoclave.
- Incubadora con una temperatura entre 32 °C - 35 °C.
- Lector de zonas de inhibición (halos). Fisher - Lilly o equipo similar.*
- Balanza Analítica.
- Colocador de cilindros manual.
- Refrigerador.
- Espectrofotómetro (UV/VIS).

* Se utilizó para la prueba el Fisher -Lilly.

PROCEDIMIENTO SEGUIDO PARA LLEVAR A CABO LA METODOLOGIA.

- Preparar y esterilizar el medio para la capa base y para la capa siembra de acuerdo a las instrucciones del marbete de los medios.

- Envolver las cajas petri vacías y las válvulas, llenar las varillas metálicas con los cilindros; esterilizar todo en la autoclave a 121 °C durante 35 minutos.

- Enfriar el medio de la capa base a 48 °C aproximadamente, llenar las cajas petri en zona de mechero, agregar 21 ml de capa base a cada caja. Colocarlas sobre una superficie plana y dejar que solidifiquen.

- Enfriar el medio de la capa siembra a 45 °C - 48 °C aproximadamente, y agregar la cantidad del microorganismo (Micrococcus luteus) en suspensión requerida, con una jeringa estéril; mezclar perfectamente y agregar a cada caja 4 ml del medio inoculado en zona de mechero, extender perfectamente sobre la capa base y dejarlas solidificar sobre una superficie plana.

- Con el colocador de Cilindros, colocar 6 cilindros en cada caja.

- Con micropipeta, agregar a cada uno de los cilindros 300 mcl de la muestra.

- Para cada punto de la curva estándar o de cada muestra se ocupan 3 cajas, llenándose cada una de acuerdo a la figura "A".

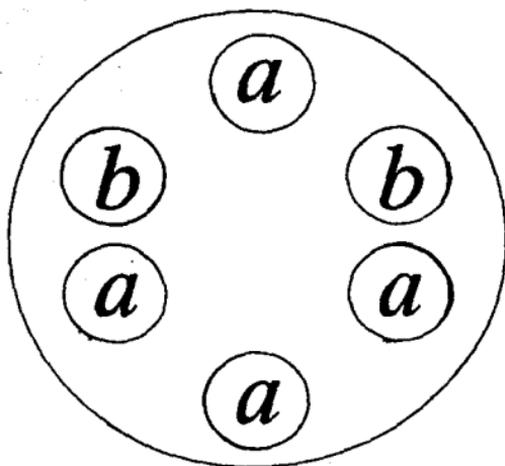


figura "A"

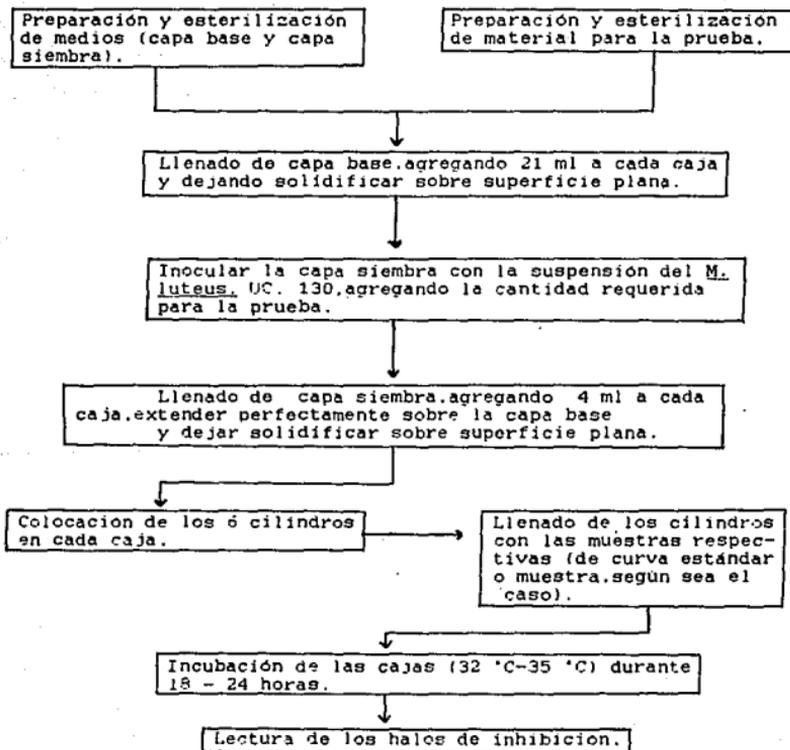
a = aquí se coloca la solución estándar que tiene la concentración que equivale al 100% .

b = aquí se coloca la solución estándar del punto de la curva correspondiente o la muestra .

- Meter las cajas en la incubadora a una temperatura de 32 °C - 35 °C; durante 18-24 horas.

- Después del tiempo de incubación. leer los halos de inhibición; para proceder a realizar los cálculos respectivos y obtener los resultados experimentales.

DIAGRAMA DE BLOQUES PARA LA PRUEBA.



PREPARACION DEL MICROCOCCUS LUTEUS ATCC. 9341 UTILIZADO EN EL METODO DE CUANTIFICACION.

- Abrir en zona de mechero una ampollita que contenga el Micrococcus luteus ATCC. 9341, y pasar el contenido a un matraz que contiene 300 ml de TSB (Caldo Soya Trypticaseína), e incubarlo durante 24 horas a una temperatura de 32 °C-35 °C.

- Preparar Botellas de Roux con 250 ml cada una, de medio para antibióticos No. 1.

- Preparar tubos de 22 mm de diámetro * 190 mm de largo con 25 ml cada uno, de medio para antibióticos No. 1.

- Esterilizar las Botellas y los tubos a 121 °C durante 15 minutos (15 libras de presión).

- Inclinar las Botellas y los tubos para que solidifiquen y la superficie de contacto con el agar sea mayor.

- Sembrar en zona de mechero con asa bacteriológica el Micrococcus luteus del matraz con caldo a los tubos con agar inclinado.

- Incubar los tubos durante 24 horas a 32 °C-35 °C.

- Después de la incubación, resuspender el crecimiento de un tubo con 3 ml de solución salina isotónica al 0.85% (previamente esterilizada), y pasarlos a una Botella de Roux: distribuir perfectamente sobre toda la superficie . incubar la botella a 32 °C-35 °C durante 24 horas.

- Después de la incubación de la Botella de Roux, resuspender el crecimiento con 50 ml de solución salina isotónica al 0.85% y pasar todo el resuspendido a un vial, el cual se tapa. Esta será la suspensión del microorganismo que se utilizará para inocular la capa siembra.

- La suspensión tendrá una caducidad de 2 semanas en refrigeración, después de las cuales se prepararán nuevas suspensiones para poder ser usadas.

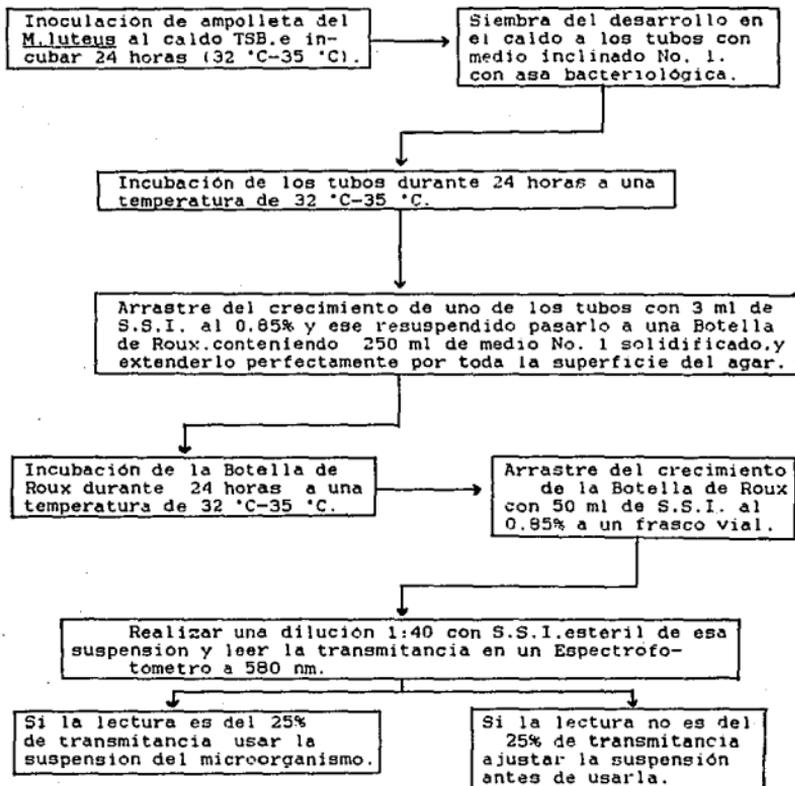
- La estandarización de la suspensión se hace de la siguiente manera:

De acuerdo a la F.E.U.M. Quinta Edición la suspensión se estandariza realizando una dilución de ella, a una proporción 1:40 y leyendo la transmitancia a una longitud de onda = 580 nm, en un Espectrofotómetro adecuado. Si la lectura obtenida es del 25% de transmitancia, la suspensión se puede utilizar, si no, ajustar la suspensión hasta que la dilución recomendada dé la lectura de transmitancia señalada.

* Ajuste de la suspensión: a) Si la suspensión presenta una transmitancia menor, se debe diluir, agregando solución salina isotónica al 0.85% estéril.

b) Si la suspensión presenta una transmitancia mayor, se debe concentrar, agregando más Micrococcus luteus, de acuerdo al procedimiento.

DIAGRAMA DE BLOQUES PARA LA PREPARACION DEL MICROORGANISMO.



PREPARACION DEL ESTANDAR.

Curva estándar.

- Pesar el estándar primario de Clorhidrato de Lincomicina potencia del 87.6%, para preparar una solución patrón que tenga una concentración de 1000 mcg/ml.

- A partir de esa solución patrón, se hacen las diluciones necesarias, para finalmente tener 5 soluciones estándares con las siguientes concentraciones cada una :

3.2 mcg/ml que equivale al 64% de la concentración.

4.0 mcg/ml que equivale al 80% de la concentración.

5.0 mcg/ml que equivale al 100% de la concentración.

6.25 mcg/ml que equivale al 125% de la concentración.

7.8 mcg/ml que equivale al 156% de la concentración.

- Todas las diluciones y aforos se hacen con Solución Reguladora de Fosfatos pH = 8.0 ± 0.1 (0.1 M).

- Con estas 5 soluciones estándares se corre la curva estándar, en la cual se llenan 3 cajas de cada concentración de acuerdo a la figura "A", dibujada anteriormente.

Preparación de la muestra.

- Las muestras trabajadas para cualquier parámetro de la validación se preparan unicamente mediante diluciones hasta

llegar a la concentración requerida. La concentración requerida al hacer las diluciones es la de 5.0 mcg/ml = 100%. Realizar las diluciones correspondientes de la muestra inyectable (300 mg/ml) para llegar a la concentración del 100% y poder comparar esta, con una solución estándar que contiene la misma concentración y así poder calcular su potencia.

- Las diluciones y aforos se hacen utilizando Solución Reguladora de Fosfatos pH = 8.0 ± 0.1 (0.1 M).

* FORMULA CUALITATIVA - CUANTITATIVA.

MARRETE:

Clorhidrato de Lincomicina _____ 300 mg.

Vehículo c.b.p. _____ 1 ml.

VALIDACION DEL METODO MICROBIOLÓGICO.

EVALUACION DEL SISTEMA.

LINEALIDAD: Esta prueba se realizó para asegurar que el rango de concentración de Lincomicina trabajado, da una respuesta lineal. Llevándose a cabo mediante el análisis por duplicado de soluciones estándares de Lincomicina, las cuales tienen una concentración del 64%, 80%, 100%, 125%, 156%, del valor normal de análisis.

Las tablas No. 1 y 2 muestran los resultados obtenidos y dan origen a las gráficas 1 y 2, y al análisis estadístico para demostrar la linealidad del sistema.

PRECISION: Esta prueba se realizó analizando seis soluciones estándares de Lincomicina con una concentración del 100% del valor normal de análisis; tomándose tres soluciones a partir de una solución stock preparada un día, y las otras tres soluciones, a partir de otra solución stock preparada otro día diferente.

Los datos obtenidos en esta parte se encuentran en la tabla No. 3 con el análisis estadístico correspondiente.

EVALUACION DEL METODO.

LINEALIDAD: Se determinó analizando tres placebos a los cuales se les adicionó Clorhidrato de Lincomicina a tres diferentes concentraciones 80% , 100% y 125% del valor normal de análisis ; y de cada concentración se prepararon tres muestras diferentes, las cuales fueron analizadas el mismo día, por el mismo analista.

La tabla No. 4 y la gráfica No. 3 muestran los datos obtenidos en esta parte y el análisis estadístico correspondiente.

PRECISION :

A) REPETIBILIDAD. Se realizó analizando seis muestras de un mismo lote del producto, el cual tiene el 100% de la concentración normal de análisis. Las muestras fueron analizadas por un mismo analista, en un mismo día.

Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla No. 5, presentándose el análisis estadístico correspondiente.

B) REPRODUCIBILIDAD. Esta prueba se realizó analizando seis muestras de un mismo lote del producto, dos analistas diferentes, durante dos días diferentes, realizando el análisis de tres muestras cada analista por día.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 6 presentándose después el análisis estadístico correspondiente.

EXACTITUD AL 100% . Esta prueba se realizó analizando seis placebos, a los cuales se les adicionó Clorhidrato de Lincomicina.

Realizándose seis pesadas individuales, las cuales corresponden al 100% de la concentración normal de análisis. Este análisis se realizó en las mismas condiciones de operación (mismo analista, mismo día).

Los resultados se presentan en la tabla No.7. con el análisis estadístico correspondiente.

ESPECIFICIDAD. Esta prueba se realizó considerando que el método es utilizado en control de calidad; que el Clorhidrato de Lincomicina , no presenta productos de degradación, en las condiciones de producción en las cuales se realiza, ni tampoco con las condiciones en las cuales se cuantifica.

Por lo tanto unicamente se analizaron tres muestras individuales del placebo preparado para conocer si éste no presenta actividad inhibitoria en el desarrollo del microorganismo de prueba, y así comprobar la especificidad del método: es decir que la inhibición en el desarrollo del microorganismo única y exclusivamente se debe a la actividad de la Lincomicina, cuando ésta se encuentra presente.

El resultado obtenido de esta parte se presenta en la tabla No. 8.

TOLERANCIA DEL SISTEMA:

- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA. En esta parte se prepararon seis muestras de un lote del producto, el cuál contiene el 100% de la concentración normal de análisis. Esas seis muestras fueron analizadas el mismo día de su preparación y después se guardaron ya preparadas : una parte de cada muestra en el refrigerador y la otra parte se dejó a temperatura ambiente, durante 24 y 48 horas y se analizaron bajo las mismas condiciones de operación, después de cada tiempo.

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas No. 9, 10 y 11, con el análisis estadístico correspondiente.

CAPITULO III. RESULTADOS

LINEALIDAD DEL SISTEMA

ESTANDAR: CLORHIDRATO DE LINCOMICINA.

CORRIDA # 1

MICROORGANISMO: MICROCOCCUS LUTEUS. ATCC:9341

DATOS DE LA CURVA

CONC.(%)	64.00	100.00	80.00	100.00	125.00	100.00	156.00	100.00
Ln.Conc	4.16	4.61	4.38	4.61	4.83	4.61	5.05	4.61
CAJA No.	DIAMETRO DE ZONA							
1	18.20	20.20	19.40	20.40	21.00	20.60	22.20	20.40
2	18.40	20.80	19.20	20.20	21.40	20.60	22.00	20.80
3	18.60	20.60	19.00	20.80	21.60	20.40	22.40	20.20
4	18.80	20.40	19.60	20.40	21.20	20.20	22.60	20.80
5	18.60	20.60	19.00	20.60	21.40	20.80	22.40	20.60
6	18.40	20.80	19.40	20.20	21.00	20.60	22.00	20.40
7	18.20	20.40	19.20	20.80	21.60	20.80	22.20	20.20
8	18.60	20.20	19.40	20.60	21.40	20.40	22.60	20.40
9	18.20	20.60	19.60	20.60	21.20	20.60	22.40	20.60
TOTAL PROMEDIO	166.00 18.44	184.60 20.51	173.80 19.31	184.60 20.51	191.80 21.31	185.00 20.56	200.80 22.31	184.40 20.49

LINEALIDAD DEL SISTEMA

ESTANDAR: CLORHIDRATO DE LINCOMICINA.

CORRIDA # 2

MICROORGANISMO: MICROCOCCUS LUTEUS. ATCC:9341

DATOS DE LA CURVA

CONC.(%)	64.00	100.00	80.00	100.00	125.00	100.00	156.00	100.00
Ln.Conc	4.16	4.61	4.38	4.61	4.83	4.61	5.05	4.61
CAJA No.	DIAMETRO DE ZONA							
1	18.60	20.80	19.40	20.60	21.80	20.20	22.20	20.60
2	18.80	20.60	19.20	20.40	21.20	20.40	22.00	20.40
3	18.00	20.20	19.80	20.80	20.80	20.80	22.60	20.20
4	18.60	21.00	19.00	20.60	21.40	20.40	21.80	20.80
5	18.40	20.80	19.60	20.40	21.40	20.80	22.00	20.80
6	18.20	20.40	19.60	20.80	21.60	20.60	22.60	20.60
7	18.80	20.80	19.40	20.40	21.60	20.80	22.40	20.40
8	18.60	20.80	19.80	20.80	21.80	20.80	22.80	20.60
9	18.40	20.40	19.40	20.80	21.20	20.40	22.20	20.80
TOTAL	166.40	185.80	175.20	185.60	192.80	185.20	200.60	185.20
PROMEDIO	18.49	20.64	19.47	20.62	21.42	20.58	22.29	20.58

LINEALIDAD DEL SISTEMA								
ESTANDAR: LINCOMICINA CLORHIDRATO						GLOBAL		
MICROORGANISMO: MICROCOCCUS LUTEUS ATCC:9341								
DATOS DE LA CURVA								
CONC. (%)	64.00	100.00	80.00	100.00	125.00	100.00	156.00	100.00
Ln. Conc.	4.16	4.61	4.38	4.61	4.83	4.61	5.05	4.61
CORRIDA	DIAMETRO DE ZONA							
1	18.44	20.51	19.31	20.51	21.31	20.56	22.31	20.40
2	18.49	20.64	19.47	20.62	21.42	20.58	22.29	20.58
TOTAL	36.93	41.15	38.78	41.13	42.73	41.14	44.60	41.07
PROMEDIO	18.47	20.58	19.39	20.57	21.37	20.57	22.30	20.54

DATOS EXPERIMENTALES

A GRAFICAR:

Ln. Conc.	Diametro de zona
4.16	18.47
4.38	19.39
4.61	20.57
4.83	21.37
5.05	22.30

PROMEDIO GLOBAL 100%

20.57

PUNTO BAJO =

18.49

PUNTO ALTO =

22.35

DATOS TEORICOS

A GRAFICAR:

Ln. Conc.	Diametro de zona
4.16	18.49
4.38	19.44
4.61	20.44
4.83	21.40
5.05	22.35

VALIDACION DEL METODO MICROBIOLÓGICO PARA
LA CUANTIFICACION DE LINCOMICINA

EVALUACION DEL SISTEMA

LINEALIDAD

TABLA No. 1

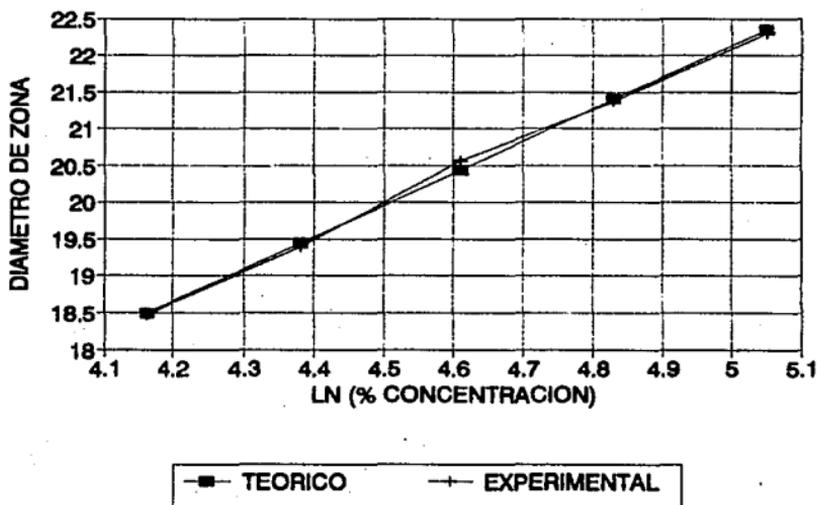
Concentracion (mcg/ml)	% Conc.	La. (% Conc.)	Diametro de zona teorico experimental	Diametro de zona obtenido experimentalmente
3.20	64.00	4.16	18.49	18.47
4.00	80.00	4.38	19.44	19.39
5.00	100.00	4.61	20.44	20.57
6.25	125.00	4.83	21.40	21.37
7.80	156.00	5.05	22.35	22.30

TABLA No. 2

Cantidad adicionada (mcg)	Diametro de zona obtenido experimentalmente	Cantidad recuperada (mcg)	% de Recuperacion
3.20	18.47	3.19	99.69
4.00	19.39	3.99	99.75
5.00	20.57	5.03	100.60
6.25	21.37	6.24	99.84
7.80	22.30	7.78	99.74

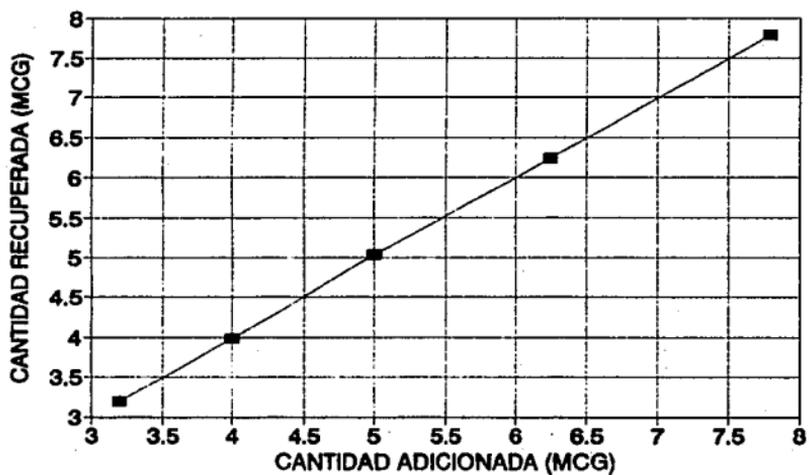
LINEALIDAD DEL SISTEMA

GRAFICA No. 1



LINEALIDAD DEL SISTEMA

GRAFICA No. 2



RESULTADOS DE LINEALIDAD DEL SISTEMA

A) DE LA COLUMNA % DE RECUPERACION SE OBTIENE:

- 1.-MEDIA (x)= 99.924%
- 2.-DESVIACION ESTANDAR (DE)= 0.381746
- 3.-COEFICIENTE DE VARIACION (CV)= 0.382036%

B) DE LA GRAFICA No. 1 SE OBTIENE:

- 1.-PENDIENTE (M)= 4.324378
- 2.-ORDENADA AL ORIGEN (B)= 0.501911
- 3.-COEFICIENTE DE REGRESION (R)= 0.998776
- 4.-COEFICIENTE DE DETERMINACION (R²)= 0.997555
- 5.-ERROR ESTANDAR DE REGRESION (SY/X)= 0.087161

C) DE LA GRAFICA No. 2 SE OBTIENE:

- 1.-PENDIENTE (M)= 0.997336
- 2.-ORDENADA AL ORIGEN (B)= 0.009981
- 3.-COEFICIENTE DE REGRESION (R)= 0.999945
- 4.-COEFICIENTE DE DETERMINACION (R²)= 0.999892
- 5.-ERROR ESTANDAR DE REGRESION (SY/X)= 0.021797

SIENDO LOS RESULTADOS DEL INCISO A Y C LOS QUE NOS AYUDAN PARA

COMPROBAR LA LINEALIDAD DEL SISTEMA.

EVALUACION DEL SISTEMA

PRECISION DEL SISTEMA

TABLA No. 3

No. de Solucion estandar	Cantidad Adicionada (mcg)	Cantidad Recuperada (mcg)	% Recuperacion
1	5.0	5.00	100.00
2	5.0	4.95	98.99
3	5.0	4.95	98.99
4	5.0	5.05	101.04
5	5.0	5.08	101.57
6	5.0	4.85	96.94

A) DE LA COLUMNA DE CANTIDAD RECUPERADA SE OBTIENE:

- 1.-Media (x)= 4.98
- 2.-Desviacion estandar (DE) = 0.082462
- 3.-Coeficiente de variacion (CV)= 1.655863%
- 4.-Varianza (S)= 0.006799

B) DE LA COLUMNA DE % DE RECUPERACION SE OBTIENE:

- 1.-Media (x)= 99.59%
- 2.-Desviacion estandar (DE)= 1.669340
- 3.-Coeficiente de variacion (CV)= 1.676212%
- 4.-Varianza (S)= 2.786696

CONTINUANDO CON LA EVALUACION DE LA PRECISION DEL SISTEMA SE CALCULA LO SIGUIENTE:

DE LA COLUMNA % DE RECUPERACION SE OBTIENE:

1.- El intervalo de confianza (IC) al 95% :

Para un $\alpha = 0.05$, con grados de libertad (g.l = 5), tenemos una T teórica al 95% = 2.015 . n = 6

Por consiguiente se tiene: $x \pm T$ teórica al 95% (DE / $\sqrt{6}$)

$$99.59 \pm 2.015 (1.669340 / \sqrt{6})$$

$$99.59 \pm 1.373232$$

Por lo tanto el (IC) al 95% = (98.216768 , 101.323232)

2.- Interferencia acerca de la media :

Hipótesis propuestas : Hipótesis nula : $H_0 : X = \mu$

Hipótesis alterna : $H_a : X + \mu$

El estadístico de prueba es :

$$T \text{ práctica} = (X - \mu) / (DE / \sqrt{n}); \text{donde : } \mu = 100.00$$

$$T \text{ práctica} = (99.59 - 100.00) / (1.669340 / \sqrt{6})$$

$$T \text{ práctica} = -0.601609$$

Si la $-T$ teórica < T práctica < + T teórica, se acepta la hipótesis nula. Por lo tanto como : $-2.015 < -0.601609 < 2.015$, se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alterna, comprobándose la precisión del sistema.

EVALUACION DEL METODO

LINEALIDAD DEL METODO

TABLA No. 4

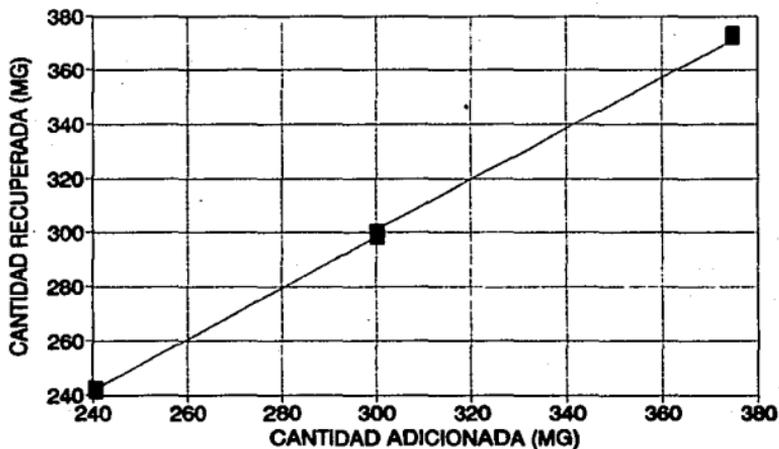
CANTIDAD ADICIONADA (mg)	% ADICIONADO EN BASE AL 100.00% = 300.00 mg	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% RECUPERADO EN BASE AL 100.00% = 300.00 mg	% DE RECUPERACION.
240.60	80.20	240.31	80.10	99.88
240.60	80.20	243.46	81.15	101.19
240.60	80.20	242.41	80.80	100.75
300.30	100.10	298.70	99.57	99.47
300.30	100.10	297.40	99.13	99.03
300.30	100.10	301.31	100.44	100.34
374.76	124.92	371.28	123.76	99.07
374.76	124.92	372.90	124.30	99.50
374.76	124.92	374.52	124.84	99.94

DE LA COLUMNA % DE RECUPERACION SE OBTIENE:

- 1.- Numero de datos (n) = 9
- 2.- Desviacion estandar (DE) = 0.739286
- 3.- Varianza (S) = 0.546544
- 4.- Media (\bar{x}) = 99.91%
- 5.- Coeficiente de variacion (CV) = 0.739952%

LINEALIDAD DEL METODO

GRAFICA No. 3



POR MEDIO DEL ANALISIS DE REGRESION LINEAL DE LA GRAFICA No. 3 SE OBTIENEN LOS SIGUIENTES RESULTADOS :

- 1.- Coeficiente de regresión (r) = 0.999594.
- 2.- Coeficiente de determinación (r²) = 0.999190
- 3.- Pendiente (m) = 0.975877
- 4.- Ordenada al origen (b) = 6.841586
- 5.- Error estándar de regresión (Sy / x) = 1.729565

PARA CONOCER SI EN EL INTERVALO DE CONFIANZA (IC) PARA LA MEDIA SE LOCALIZA EL 100% RECUPERADO, SE CALCULO LO SIGUIENTE :

Intervalo de confianza (IC) al 95% =

$$x \pm T \text{ teórica al } 95\% (DE / \sqrt{n})$$

donde para un $\alpha = 0.05$, con g.l = n-1 ; (g.l = 8), se tiene una

T teórica al 95% = 1.860 ; donde : n = 9

$$x = 99.91\%$$

$$DE = 0.739286$$

$$IC \text{ al } 95\% = 99.91 \pm 1.860 (0.739286 / \sqrt{9})$$

$$IC \text{ al } 95\% = 99.91 \pm 0.458357$$

$$IC \text{ al } 95\% = (99.451642 , 100.368357)$$

Por lo tanto como en el IC para la media si se localiza el 100% recuperado ,se corrobora que nuestro método es lineal.

PRECISION DEL METODO**REPETIBILIDAD DEL METODO**

TABLA No. 5

ANALISTA	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% DE RECUPERACION
A	300.00	300.00	100.00
A	300.00	292.70	97.56
A	300.00	298.53	99.51
A	300.00	297.06	99.02
A	300.00	302.97	100.99
A	300.00	298.53	99.51

DE LA COLUMNA % DE RECUPERACION SE CALCULA LO SIGUIENTE:

- 1.- Media (\bar{X}) = 99.432%
- 2.- Desviacion estandar (DE) = 1.134573
- 3.- Coeficiente de variacion (CV) = 1.141054%
- 4.- Varianza (S) = 1.287256
- 5.- Numero de datos (n) = 6

SIGUIENDO CON LA EVALUACION DE LA REPETIBILIDAD DEL METODO SE CALCULAN LOS SIGUIENTES PARAMETROS:

1.- El intervalo de confianza (IC) al 95% :

Para un $\alpha = 0.05$. con grados de libertad ($g.l = n-1$), donde $n = 6$ tenemos que $g.l = 5$ y una T teórica al 95% = 2.015

Por consiguiente se tiene: $X \pm T$ teórica al 95% (DE / \sqrt{n})

$$99.432 \pm 2.015 (1.134573 / \sqrt{6})$$

$$99.432 \pm 0.933323$$

Por lo tanto el (IC) al 95% = (98.498677 , 100.365323)

2.- Interferencia acerca de la media:

Hipótesis propuestas: Hipótesis nula : $H_0 : X = \mu$

Hipótesis alterna: $H_a : X \neq \mu$

El estadístico de prueba es :

$$T \text{ práctica} = (X - \mu) / (DE / \sqrt{n}) ; \text{ donde: } \mu = 100.00$$

$$T \text{ práctica} = (99.432 - 100.00) / (1.134573 / \sqrt{6})$$

$$t \text{ práctica} = -1.226285$$

Si la $-T$ teórica $<$ T práctica $<$ $+T$ teórica , se acepta la hipótesis nula. Por lo tanto como : $-2.015 < -1.226285 < 2.015$, se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alterna, comprobándose la repetibilidad del método.

PRECISION DEL METODO

REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

TABLA No. 6				
ANALISTA	DIA	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% DE RECUPERACION
A	1	300.00	292.70	97.57
A	1	300.00	300.00	100.00
A	1	300.00	298.53	99.51
B	1	300.00	301.65	100.55
B	1	300.00	298.36	99.45
B	1	300.00	295.11	98.37
A	2	300.00	296.13	98.71
A	2	300.00	301.30	100.43
A	2	300.00	294.84	98.28
B	2	300.00	303.03	101.01
B	2	300.00	304.56	101.52
B	2	300.00	303.03	101.01

DE LA COLUMNA % DE RECUPERACION SE OBTIENE:

- 1.- Media (X) = 99.701 %
- 2.- Desviacion estandar (DE) = 1.260984
- 3.- Coeficiente de variacion (CV) = 1.264766 %
- 4.- Varianza (S) = 1.590081
- 5.- Numero de datos (n) = 12

EVALUACION ESTADISTICA DE LA REPRODUCIBILIDAD

Comparacion de las medias de ambos analistas, en ambos días, mediante la "t" de Student.

El estadístico de prueba cuando $n = n_{II}$ es:

$$t = \frac{X_{II} - X}{\left(S^2/n + S^2_{II}/n_{II} \right)^{1/2}} ; \text{ para :}$$

$$g.l. = n + n_{II} - 2$$

$$\alpha = 0.05$$

Donde para el :

Analista A

Analista B

Media (X) = 99.083%

Media (X_{II}) = 100.318%

Varianza (S^2) = 1.182147

Varianza (S^2_{II}) = 1.400896

Número de datos (n) = 6

Número de datos (n_{II}) = 6

Pruebas de hipótesis:

Hipótesis nula : $H_0 = X = X_{II}$

Hipótesis alterna : $H_a = X \neq X_{II}$

$$g.l. = 6 + 6 - 2 = 10$$

$$T \text{ práctica} = 100.318 - 99.083 / \left(1.182147/6 + 1.400896/6 \right)^{1/2}$$

$$T \text{ práctica} = 1.882248.$$

Como se trata de un ensayo bilateral o "en dos sentidos", con

$n + n_{II} - 2$ grados de libertad, la hipótesis nula se rechaza cuando:

$T \text{ práctica} < - T \text{ teórica con } \alpha / 2$ ó $T \text{ práctica} > + T \text{ teórica}$
con $\alpha / 2$.

Esto es si $- T \text{ teórica } \alpha / 2 < T \text{ práctica} < + T \text{ teórica } \alpha / 2$,se
acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alterna.

Como la $T \text{ teórica } \alpha / 2 = 2.228$; entonces :

$- 2.228 < 1.882248 < + 2.228$,Se acepta la hipótesis nula y se
rechaza la hipótesis alterna , es decir, la media para ambos
analistas en los dos días, estadísticamente es la
misma, comprobándose que el método es reproducible.

EXACTITUD DEL METODO**AL 100.00% DE LA CONCENTRACION NORMAL DE ANALISIS**

TABLA No. 7			
MUESTRA No.	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% DE RECUPERACION
1 (18)	300.08	297.49	99.14
2 (19)	300.10	297.51	99.14
3 (20)	300.05	300.05	100.00
4 (31)	300.17	305.42	101.75
5 (33)	300.10	297.51	99.14
6 (35)	300.03	302.64	100.87

DE LA COLUMNA % DE RECUPERACION SE OBTIENE:

- 1.- Media (X) = 100.007% .
- 2.- Desviacion estandar (DE) = 1.098902
- 3.- Coeficiente de variacion (CV) = 1.098825
- 4.- Varianza (S) = 1.207587
- 5.- Numero de datos (n) = 6

SIGUIENDO CON LA EVALUACION DE LA EXACTITUD DEL METODO AL 100.00%
SE CALCULA LO SIGUIENTE:

1.- El intervalo de confianza (IC) al 95% :

Para un $\alpha = 0.05$. con grados de libertad ($g.l = n-1$), donde $n=6$
tenemos que $g.l = 5$ y una T teórica al 95% = 2.015

Entonces se tiene : $X \pm T$ teórica al 95% (DE / \sqrt{n})

$$100.007 \pm 2.015 (1.098902 / \sqrt{6})$$

$$100.007 \pm 0.903979$$

Por lo tanto el (IC) al 95% = (99.103021 , 100.910979)

2.- Interferencia acerca de la media:

Hipótesis propuestas: Hipótesis nula: $H_0 : X = \mu$

Hipótesis alterna: $H_a : X \neq \mu$

El estadístico de prueba es :

$$T \text{ práctica} = (X - \mu) / (DE / \sqrt{n}) ; \text{ donde: } \mu = 100.00$$

$$T \text{ práctica} = (100.007 - 100.00) / (1.098902 / \sqrt{6})$$

$$T \text{ práctica} = 0.015603$$

Si la $-T$ teórica $<$ T práctica $<$ $+T$ teórica , se acepta la hipótesis nula. Por lo tanto como : $-2.015 < 0.015603 < 2.015$, se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alterna, comprobándose la exactitud del método al 100% .

ESPECIFICIDAD DEL METODO

TABLA No. 8			
MUESTRA No:	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% DE RECUPERACION
1	0.00	0.00	0.0
2	0.00	0.00	0.0
3	0.00	0.00	0.0

La tabla No. 8 acumula los resultados de las tres hojas de calculo (unicamente se presenta una de ellas, como ejemplo), correspondientes a la especificidad del metodo, en las cuales no se presento diametro de zona (halo de inhibicion) en las cajas, debido a que no se encuentra presente la Lincomicina, y por consiguiente se comprueba que el metodo es especifico.

ESPECIFICIDAD DEL METODO

51

HOJA DE CALCULO. MUESTRA No. 1

ESTANDAR : CLORHIDRATO DE LINCOMICINA
MICROORGANISMO: MICROCOCCUS LUTEUS. ATCC: 9341

DATOS DE LA CURVA

DATOS DEL PROBLEMA

CONC. 181 64.00 100.00 80.00 100.00 125.00 100.00 156.00 100.00
Lw.Conc. 4.16 4.61 4.38 4.61 4.63 4.51 5.05 4.61

ESTINDAP

CAJA No. DIAMETRO DE ZONA DIAMETRO DE ZONA DIAMETRO DE ZONA DIAMETRO DE ZONA

Lec. No. 100.00 PROBLEMA

1	16.80	19.80	19.00	20.20	21.60	20.60	21.80	20.20
2	17.00	20.40	19.20	20.60	21.00	20.40	22.00	20.00
3	16.80	20.80	19.60	20.40	21.40	20.00	22.40	20.40
4	17.20	20.60	19.00	20.80	21.60	20.20	21.80	20.60
5	17.80	20.80	19.60	20.40	21.20	20.80	22.60	19.60
6	17.60	20.00	19.80	20.20	21.00	20.00	22.00	20.40
7	17.60	20.60	20.00	20.80	21.40	20.60	22.60	20.80
8	17.40	20.80	19.80	20.60	21.80	20.20	21.80	20.60
9	17.80	20.20	19.20	20.40	21.00	20.60	22.00	20.40
TOTAL	156.00	184.00	175.20	184.40	192.00	183.40	199.00	183.20
PROMEDIO	17.33	20.44	19.47	20.49	21.33	20.38	22.11	20.36

1	20.20	0.00
2	20.60	0.00
3	20.40	0.00
4	20.20	0.00
5	20.00	0.00
6	20.60	0.00
7	20.20	0.00
8	20.80	0.00
9	20.60	0.00
TOTAL	183.60	0.00
PROMEDIO	20.40	0.00

PROMEDIO DE LOS 100% = C = 20.42

PUNTO BAJO = 17.85
PUNTO ALTO = 22.42

M = 5.13

100% REAL OBTENIDO: 20.14
AJUSTE: -20.40
VALOR A INTERPOLAR: -0.26
LECTURA: 1.87
ASUMIDO (MG/ML): 0.00
RESULTADO (MG/ML): 0.00

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.**TABLA No. 9****Muestras recién preparadas.**

MUESTRA No.	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% DE RECUPERACION
1	300.00	300.00	100.00
2	300.00	303.23	101.08
3	300.00	293.64	97.88
4	300.00	301.61	100.54
5	300.00	296.80	98.93
6	300.00	304.86	101.62

DE LA COLUMNA % DE RECUPERACION SE OBTIENE :**Media (X) = 100.008%****Desviacion estandar (DE) = 1.394366****Coficiente de Variacion (CV) = 1.394254%****Varianza (S) = 1.944256****Numero de datos (n) = 6**

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.

TABLA No. 10 - A			
Muestras analizadas a las 24 horas.		Temperatura ambiente	
MUESTRA No.	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% DE RECUPERACION
1	300.00	302.89	100.96
2	300.00	297.14	99.05
3	300.00	298.57	99.52
4	300.00	298.57	99.52
5	300.00	301.44	100.48
6	300.00	301.44	100.48

DE LA COLUMNA % DE RECUPERACION SE OBTIENE :

Media (X) = 100.002%

Desviacion estandar (DE) = 0.741037

Coficiente de Variacion (CV) = 0.741022%

Varianza (S) = 0.549137

Numero de datos (n) = 6

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.

TABLA No. 10 - B			
Muestras analizadas a las 24 horas.		Refrigeracion	
MUESTRA No.	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% DE RECUPERACION
1	300.00	294.31	98.10
2	300.00	298.57	99.52
3	300.00	298.57	99.52
4	300.00	301.44	100.48
5	300.00	300.00	100.00
6	300.00	298.57	99.52

DE LA COLUMNA % DE RECUPERACION SE OBTIENE :

Media (X) = 99.523%

Desviacion estandar (DE) = 0.796032

Coficiente de Variacion (CV) = 0.799847%

Varianza (S) = 0.633666

Numero de datos (n) = 6

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.**TABLA No. 11 - A****Muestras analizadas a las 48 horas.****Temperatura ambiente**

MUESTRA No.	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% DE RECUPERACION
1	300.00	300.00	100.00
2	300.00	304.05	101.35
3	300.00	297.99	99.33
4	300.00	300.00	100.00
5	300.00	302.02	100.67
6	300.00	292.06	97.35

DE LA COLUMNA % DE RECUPERACION SE OBTIENE :**Media (X) = 99.783%****Desviacion estandar (DE) = 1.375582****Coficiente de Variacion (CV) = 1.378573%****Varianza (S) = 1.892227****Numero de datos (n) = 6**

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA.

TABLA No. 11 - B			
Muestras analizadas a las 48 horas.		Refrigeracion	
MUESTRA No.	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)	% DE RECUPERACION
1	300.00	300.00	100.00
2	300.00	308.16	102.72
3	300.00	297.99	99.33
4	300.00	296.00	98.67
5	300.00	300.00	100.00
6	300.00	302.02	100.67

DE LA COLUMNA % DE RECUPERACION SE OBTIENE :

Media (X) = 100.232%

Desviacion estandar (DE) = 1.395929

Coficiente de Variacion (CV) = 1.392697%

Varianza (S) = 1.948617

Numero de datos (n) = 6

SIGUIENDO CON LOS CALCULOS ESTADISTICOS DE LA ESTABILIDAD DE LA MUESTRA SE REALIZA LO SIGUIENTE:

Comparación estadística de las medias entre muestras analizadas a diferentes tiempos.

- Prueba entre muestras analizadas recién preparadas y muestras analizadas a las 24 horas, estando éstas a Temperatura Ambiente.

El estadístico de prueba cuando $n = n_{II}$ es:

$$t = X_{II} - X / (S^2/n + S^2_{II}/n_{II})^{1/2} ; \text{ para :}$$

$$\text{g.l.} = n + n_{II} - 2$$

$$\alpha = 0.05$$

Donde para :

Muestras recién preparadas

Muestras analizadas a las 24 horas; T.A.

Media (X_{II}) = 100.008

Media (X) = 100.002

Varianza (S^2_{II}) = 1.944256

Varianza (S^2) = 0.549137

Número de datos (n_{II}) = 6

Número de datos (n) = 6

Pruebas de Hipótesis :

Hipótesis nula : $H_0 = X = X_{II}$

Hipótesis alterna : $H_a = X \neq X_{II}$

$$\text{g.l.} = 6 + 6 - 2 = 10$$

$$T \text{ práctica} = 100.008 - 100.002 / (0.549137/6 + 1.944256/6)^{1/2}$$

$$T \text{ práctica} = 0.009307$$

Como se trata de un ensayo bilateral o "en dos sentidos", con $n + n_{II} - 2$ grados de libertad, la hipótesis nula se rechaza cuando:

T práctica $< - T$ teórica con $\alpha / 2$ ó T práctica $> + T$ teórica con $\alpha / 2$.

Esto es si $- T$ teórica $\alpha / 2 < T$ práctica $< + T$ teórica $\alpha / 2$, se acepta la Hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alterna.

Como la T teórica $\alpha / 2 = 2.228$; entonces:

Como $- 2.228 < 0.009307 < + 2.228$, se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alterna, es decir, la media para ambas condiciones estadísticamente es la misma.

Nota : Se realizarán las demás pruebas, utilizando el mismo estadístico de prueba, por ello únicamente se pondrán los valores a usar y el resultado final, al cual se llega siguiendo el mismo criterio ya mencionado anteriormente.

- Prueba entre muestras analizadas recién preparadas y muestras analizadas a las 24 horas, estando éstas en Refrigeración.

Pruebas de Hipótesis:

$$\text{Hipótesis nula : } H_0 = X = X_{\Pi}$$

$$\text{Hipótesis alterna : } H_a = X \neq X_{\Pi}$$

Donde para :

Muestras recién preparadas

Muestras analizadas a las 24 horas. Refrigeración.

$$\text{Media } (X_{\Pi}) = 100.008\%$$

$$\text{Media } (X) = 99.523\%$$

$$\text{Varianza } (S^2_{\Pi}) = 1.944256$$

$$\text{Varianza } (S^2) = 0.633666$$

$$\text{Número de datos } (n_{\Pi}) = 6$$

$$\text{Número de datos } (n) = 6$$

$$\text{g.l.} = 6 + 6 - 2 = 10 ; T \text{ teórica } \alpha / 2 = 2.228$$

$$T \text{ práctica} = 100.008 - 99.523 / (0.633666/6 + 1.944256/6)^{1/2}$$

$$T \text{ práctica} = 0.739916.$$

Por lo tanto como : $- 2.228 < 0.739916 < + 2.228$, se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alterna, es decir la media para ambas condiciones estadísticamente es la misma.

- Prueba entre muestras analizadas recién preparadas y muestras analizadas a las 48 horas, estando éstas a Temperatura Ambiente.

Pruebas de Hipótesis :

$$\text{Hipótesis nula : } H_0 = X = X_{\Pi}$$

$$\text{Hipotesis alterna : } H_a = X \neq X_{\Pi}$$

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Donde para :

Muestras recién preparadas

Muestras analizadas a las 48
48 horas. T.A.

Media (X_{Π}) = 100.008%

Media (X) = 99.783%

Varianza (S^2_{Π}) = 1.944256

Varianza (S^2) = 1.892227

Número de datos (n_{Π}) = 6

Número de datos (n) = 6

g.l. = 6 + 6 - 2 = 10 ; T teórica $\alpha / 2 = 2.228$

T práctica = $100.008 - 99.783 / (1.892227/6 + 1.944256/6)^{1/2}$

T práctica = 0.281378.

Por lo tanto como: $-2.228 < 0.281378 < +2.228$, se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alterna, es decir la media para ambas condiciones estadísticamente es la misma.

- Prueba entre muestras analizadas recién preparadas y muestras analizadas a las 48 horas, estando éstas en Refrigeración.

Pruebas de Hipótesis :

Hipótesis nula : $H_0 = X = X_{\Pi}$

Hipótesis alterna : $H_a = X \neq X_{\Pi}$

Donde para :

Muestras recién preparadas

Muestras analizadas a las 48
horas. Refrigeración.

Media (X) = 100.008%

Media (X_{Π}) = 100.232%

Varianza (S^2) = 1.944256

Varianza (S^2_{Π}) = 1.948617

Número de datos (n) = 6

Número de datos (n_{Π}) = 6

g.l. = 6 + 6 - 2 = 10 ; T teórica $\alpha / 2 = 2.228$

T práctica = $100.232 - 100.008 / (1.944256/6 + 1.948617/6)^{1/2}$

T práctica = 0.278092.

Por lo tanto como : $-2.228 < 0.278092 < + 2.228$, se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alterna, es decir la media para ambas condiciones estadísticamente es la misma.

Por consiguiente con las 4 pruebas estadísticas realizadas se obtiene que la muestra preparada (antes de colocarla en los penicilindros), es estable, si se guarda a Temperatura Ambiente ó en Refrigeración, durante 24 y 48 horas, y se puede volver a utilizar sin que los resultados de la cuantificación se alteren considerablemente, es decir, sin que se arriesgue precisión en los resultados.

EVALUACION ESTADISTICA. (15, 16)

Para la evaluación de los parámetros de validación, se lleva a cabo el cálculo de los estadísticos mencionados en cada parámetro, empleándose las siguientes fórmulas :

- Media (\bar{x}) = $\Sigma (x) / n$

- Pendiente de la curva (m) =

$$n (\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y) / n (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2$$

- Intercepto con el eje de las ordenadas (b) = $y - mx$

- Coeficiente de correlación (r) =

$$n (\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y) / ((n \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2)(n \Sigma y^2 - (\Sigma y)^2))^{1/2}$$

- Error estándar de regresión (S_y / x) =

$$(\Sigma (y - \hat{y})^2 / n-2)^{1/2} \text{ , donde } \hat{y} \text{ es el valor}$$

predicho a partir de la curva de regresión $y = mx + b$.

- Varianza (S^2) = $\Sigma (x - \bar{x})^2 / n - 1$

- Desviación estándar (S) = $(\Sigma (x - \bar{x})^2 / n - 1)^{1/2}$

- Error Estándar (ES) = $S / (n)^{1/2}$

- Coeficiente de Variación (CV) = $(S / \bar{x}) * 100$

- Intervalo de confianza para el 95% de probabilidad
(IC al 95% de probabilidad) =

$$\bar{x} \pm t \text{ teórica al 95\% } (S / \sqrt{n})$$

- Distribución "t" de Student (t) =

$$\bar{x} - \mu / (S / \sqrt{n})$$

CAPITULO IV.

CONCLUSIONES.

Con base en los resultados obtenidos de los diferentes parámetros de validación desarrollados, se puede establecer que el método de Cilindro Placa utilizado para la cuantificación de Clorhidrato de Lincomicina en un producto inyectable es :

Lineal : Ya que cumple con los requisitos establecidos como son: coeficiente de correlación (r) mayor a 0.99, ordenada al origen (b) aproximadamente 0. para el sistema; y coeficiente de variación (CV) menor a 5 %, coeficiente de determinación (r^2) mayor a 0.98 para el método.

Exacto : Puesto que se obtuvo un coeficiente de variación (CV) menor a 5 % en el método. Y en el intervalo de confianza para la media se localizó el 100 %.

Preciso : Ya que se obtuvieron coeficientes de variación menores a 5 % para el sistema y para el método. Además cuando se realizó la reproducibilidad para el método, se demostró que las medias obtenidas por los dos analistas son estadísticamente iguales.

Específico : Aquí se demostró que con un placebo en la solución de prueba, no se presenta inhibición sobre el desarrollo del microorganismo. Por lo tanto se comprobó que el método es específico.

Tolerable : Solo en el aspecto de poder guardar el Clorhidrato de Lincomicina como muestra analítica ya preparada (en solución), las 24 y 48 horas, después de su preparación.

Obteniéndose que en los resultados no se pierde precisión.

Por todo lo antes señalado, se concluye que se cumplió con el objetivo del trabajo, ya que se demostró que el método analizado cumple con los requisitos de linealidad, precisión, exactitud y especificidad, para poder ser usado como método de Control de Calidad, para la cuantificación de Clorhidrato de Lincomicina en un producto inyectable; y por consiguiente ha quedado validado.

BIBLIOGRAFIA.

1) Chemical Stability of Pharmaceuticals a Handbook for pharmacists.

Kenneth A. Connors; Gordan L. Amidón; Valentino J. Stella
Second Edition. A Willey - Interscience Publication.
pp. 524 - 528.

2) Remington's Pharmaceutical Sciences. (15 th. ed.)
Philadelphia College of Pharmacy and Science. Philadelphia. 1975

3) Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos.
Quinta Edición. México. 1988.

4) Journal Pharmaceuticals Science.
A.A. Forist. L.W. Brown. and M.E. Royer; 54. 476 (1965)

5) Journal Pharmaceuticals Science.
T.O. Oesterling and E.L. Rowe; 59. 175 (1970)

6) Journal Pharmaceuticals Science.
T.O. Oesterling; 59. 63 (1970)

7) Encyclopaedia of Antibiotics.
Glasby John. S; Second Edition. Ed: John Wiley and Sons. London
Great Britain. 1979; pp. 281 - 282.

8) The Merck Index.
9) A new Lincomycin - related antibiotic.
Argodelis, A.D; J.A. Fox and T.E. Eble. U - 21. 699; Biochemistry
4. (1965). pp. 698 - 703.

10) USP XXII

- 11) The Pharmacological Basis of Therapeutics.
Goodman; Fourth Edition; 1970. The Macmillan Company.
pp. 1296 - 1297.
- 12) Antibiotics. Vol. I. Mechanism of Action.
Edited by David Gottlieb and Paul D. Shaw.
Springer - Verlag. 1967; New York Inc. pp. 440 - 445.
- 13) Guía para la Validación de Métodos Analíticos.
Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México
A.C; México, 1990.
- 14) Validation of Analytical Methods by FDA Laboratories.
Guerra, Johnny; Pharmaceutical Technology; Marzo, 1986. Volumen
10 N.3. pp. 74 - 84.
- 15) Probabilidad y Estadística para Ingenieros.
Miller, Irwin y Freud John; Primera Edición; Ed. Reverte. México
D.F. 1967. pp. 150 - 159, 167 - 168, 215 - 220.
- 16) Introducción a la Estadística Matemática.
Erwin Kreyszing; Ed. Limusa. 1987. pp. 314. 354.