

49  
202



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

“DETERMINACION DE LA CINETICA DE  
DEGRADACION DEL ACIDO CLAVULANICO Y  
VALIDACION DEL METODO ANALITICO PARA SU  
CUANTIFICACION”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
OLGA LIDYA GONZALEZ CASTAN

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1994



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.



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUÍMICA

**Jurado Asignado:**

**Presidente :** Prof. Guadalupe Vélez Pratt

**Vocal :** Prof. Etelvina Medrano Barra

**Secretario :** Prof. José Luis Ibarnea

**1er. Suplente :** Prof. Gabriel René Guzmán Martínez

**2do. Suplente:** Prof. Norma Trinidad González Monzón

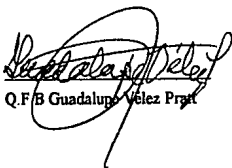
Sitio donde se desarrolló el tema:

**FERMIC S.A DE C.V.**


Reforma 873 Col. Sn. Nicolás Tolentino.

Iztapalapa.

Asesor del Tema.

  
Q.F.B. Guadalupe Vélez Pratt

Asesor Técnico

  
I.B.Q. Laura Margarita Paredes Hdz.

Sustentante.

  
Olga Lidya González Castán

A DIOS :

Por haberme dado la oportunidad de  
realizar uno de mis más grandes anhelos.

A MIS PADRES:

Por todo su apoyo, cariño y comprensión  
en todas mis decisiones.

A MIS HERMANOS :

Javier, Manuel, Verónica, a mi cuñada Vero  
y a mis sobrinos Eduardo y Alejandro: gracias  
por su cariño y por estar siempre conmigo.

A MIS MEJORES AMIGOS :

Eva y Enrique : Los quiero mucho.

A LAIRA Y BARBARA :

Gracias por haberme dado la oportunidad de ser parte de los laboratorios Fermic, S.A. y por todo su apoyo para poder desenvolverme satisfactoriamente en las actividades desarrolladas dentro de esta empresa.

A TODOS MIS COMPAÑEROS DE FERMIC, S.A. :

Carmen, Rosy, Mago, Antonio, Fidel, Fabián, Artemio, Francisco, y demás compañeros; gracias por toda su ayuda y por todos los buenos momentos compartidos.

A CESAR :

Por ser una de las personas que me brindó toda su ayuda y apoyo para la realización de esta tesis. Gracias también por ser una persona muy especial en mi vida. Nunca te olvidaré.

A JUAN CARLOS Y GUSTAVO :

Gracias por toda su ayuda incondicional para la terminación de esta tesis y por estar conmigo en los momentos que más los necesitaba.

Gracia a todas aquellas personas que contribuyeren a la realización de este trabajo. Mil gracias a todos.

# INDICE

	PAG.
<b>CAPITULO I</b>	
Introducción.....	1
<b>CAPITULO II</b>	
GENERALIDADES .....	2
II.1 ESTABILIDAD .....	2
II.2 VALIDACION .....	3
a) Linearidad .....	3
b) Precisión .....	3
c) Repetibilidad.....	4
d) Reproducibilidad .....	4
e) Limite de detección .....	4
f) Limite de cuantificación .....	4
g) Especificidad .....	4
h) Tolerancia .....	4
II.3.- EL ACIDO CLAVULANICO .....	5
<b>CAPITULO III</b>	
Material y Métodos .....	7
Reactivos .....	8
Equipo .....	8
<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	
III.1 VALIDACION .....	9
a) Linearidad del sistema .....	9
b) Precisión.....	9
c) Repetibilidad .....	10
d) Reproducibilidad .....	10
e) Limite de detección .....	11
f) Limite de cuantificación .....	11
g) Especificidad .....	11
h) Tolerancia .....	11

III.2 ESTABILIDAD .....	12
-------------------------	----

## CAPITULO IV

### RESULTADOS

IV. VALIDACION .....	13
----------------------	----

Determinaciones .....	13
-----------------------	----

#### TABLA 1

a) Determinación de la Linearidad .....	16
---	----

#### TABLA 2

b) Determinación de la precisión .....	19
--	----

#### TABLA 3

c) Prueba de Repetibilidad .....	21
----------------------------------	----

#### TABLA 4

d) Prueba de Reproducibilidad .....	23
-------------------------------------	----

#### TABLA 5

e) Determinación del límite de detección .....	25
--	----

#### TABLA 6

f) Determinación del límite de cuantificación .....	27
---	----

g) Especificidad .....	29
------------------------	----

h) Tolerancia .....	39
---------------------	----

IV.2 ESTABILIDAD .....	42
------------------------	----

TABLAS.....GRAFICAS .....	45
---------------------------	----

Estudio de Estabilidad del Clavulanato .....	57
--	----

Análisis Estadístico.....	59
---------------------------	----

TABLAS.....	60
-------------	----

## CAPITULO V

DISCUSION.....	66
----------------	----

CONCLUSIONES .....	69
--------------------	----

APENDICE.....	70
---------------	----

BIBLIOGRAFIA .....	71
--------------------	----



## *CAPITULO I*

## INTRODUCCION

Un control importante que se debe realizar a todo producto farmacéutico para garantizar su eficacia, es el aplicar pruebas de estabilidad mediante las cuales se pueda establecer el periodo de Tiempo en que la dosis del principio activo se mantiene dentro de un rango de actividad terapéutica efectiva, asimismo permite predecir la conservación de la presentación y apariencia física. (1)

Las pruebas de estabilidad acelerada, utilizando condiciones extremas de temperatura, humedad, luz, etc; proporcionan el efecto que tendrían estos factores en condiciones ambientales comunes. (2)

El factor que generalmente se maneja es la temperatura, debido a que acelera la mayoría de los procesos que producen la degradación del principio activo. (3)

Un aspecto del desarrollo de un método analítico es validar su confiabilidad mediante una serie de pruebas. La validación general incluye una evaluación de la precisión, linealidad, sensibilidad, especificidad, sensibilidad, reproducibilidad y exactitud, lo cual proporciona una medida de la capacidad del método. (4)

## **CAPITULO II**

## GENERALIDADES

### II. I ESTABILIDAD

Estabilidad es la propiedad de un medicamento o fármaco contenido en un determinado material de empaque con el fin de mantener entre límites especificados durante el tiempo de almacenamiento y uso las características físicas, químicas, microbiológicas y terapéuticas que tenía en el momento de ser fabricado.

El objetivo de los estudios de estabilidad de un fármaco es establecer la vida útil y determinar las condiciones y el tiempo de almacenamiento para asegurar la integridad de la formulación y/o del fármaco para que cumpla con los fines para los cuales fue creado.

Con objeto de establecer una fecha de caducidad tentativa, los estudios de estabilidad de un fármaco pueden realizarse en forma acelerada; se requerirá de diferentes lotes de producción, fabricados bajo las mismas condiciones y envasados en el mismo material de empaque; el fármaco no debe perder más de un 10% de la potencia mostrada en el análisis inicial, durante un periodo de tres meses.<sup>(5)</sup>

Por medio de estos estudios podrán predecirse la estabilidad y las condiciones de almacenamiento a temperatura de anaquel. Los estudios de estabilidad deben incluir la determinación de los productos de degradación, cualitativa o cuantitativamente.<sup>(1)</sup>

Para determinar la estabilidad de un fármaco, se mide el tiempo que tarda en perder sus propiedades, esto se logra mediante un estudio de cinética química cuyo objetivo es determinar la forma y velocidad con que interaccionan las moléculas bajo determinadas condiciones.

Para determinar la fecha de caducidad es necesario, con la ayuda de los estudios de cinética, obtener el  $t_{90}$ , que es el tiempo que transcurre para que el 90% de la concentración inicial quede sin degradarse.<sup>(7)</sup>

## II.2.- VALIDACION

La validación de un método analítico puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad del método se expresa, en este caso, en términos de parámetros analíticos, que son los siguientes:<sup>(4)</sup>

a).- **Linealidad:** La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, que pueden ser obtenidos directamente o por medio de una operación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un rango determinado.

b).- **Precisión:** Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestras homogéneas del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación.

La precisión es la medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

c).- **Repetibilidad:** Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista usando los mismos aparatos y técnicas.

d).- **Reproducibilidad:** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas en diferentes días en el mismo y/o diferentes laboratorios utilizando el mismo y/o diferentes equipos.

e).- **Límite de Detección:** Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones de operación establecidas.

f).- **Límite de Cuantificación:** Es la menor concentración de la sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

g).- **Especificidad:** Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

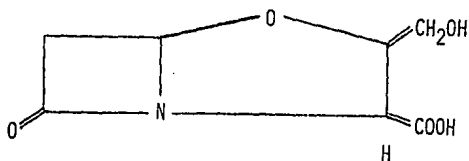
h).- **Tolerancia :** Es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos del análisis de muestras bajo una variedad de condiciones normales como diferentes laboratorios, diferentes analistas, diferentes instrumentos, diferentes lotes de reactivos, diferentes lapsos de tiempo en los ensayos, diferentes temperaturas, diferentes días, etc. La tolerancia es normalmente expresada como la falta de influencia de estos resultados de operación y las variables en el desarrollo del método analítico. La tolerancia es una medida de la reproducibilidad bajo las condiciones normales de las condiciones operacionales esperadas de laboratorio a laboratorio y de analista a analista.

Para el análisis se utilizó la cromatografía de líquidos ya que es una técnica que proporciona grandes ventajas como son: una mayor velocidad en los análisis, una buena resolución, resultados cuantitativos, tiene una buena sensibilidad y tiene un amplio espectro de aplicaciones; además de ser una técnica muy sencilla y fácil de aplicar.<sup>(13)</sup>

### II.3. EL ACIDO CLAVULANICO

La molécula de interés para este estudio es el ácido clavulánico al que corresponde el nombre químico de ácido 3-(2hidroxietiliden)-7oxo-4-oxa-1-azabicyclo-3.2.0-heptano-2- carboxílico ( $C_8H_9NO_3$ ); con un peso molecular de 199.16 24g/mol y con poder rotatorio de  $[\alpha]^{24} = + 54x$  ( $C = 1.0$ ) en  $DMSO_{(8)}$

SU FORMULA ESTRUCTURAL ES LA SIGUIENTE :



El ácido clavulánico es un antimicrobiano  $\beta$ -lactámico potente que se produce por fermentación utilizando una cepa de *Streptomyces clavuligerus*. Terapéuticamente se utiliza el clavulanato de potasio ( $CK C_8H_8KNO_3$ ) que corresponde a la sal potásica del ácido clavulánico, el cual en combinación con otros antibióticos es un potente inhibidor de las cepas resistentes a los antibióticos como las penicilinas.<sup>(11)</sup>

El CK ( $C_8H_8KNO_5$ ) tiene un peso molecular de 237.23g/mol. Es un polvo higroscópico inestable al aire y a la luz, soluble en agua, poco soluble en disolventes orgánicos; su pH de máxima estabilidad es de 6.39; se estabiliza en una mezcla con avicel y en ocasiones utilizando butilhidroxianisol (BHA) como antioxidante; se conserva en recipientes perfectamente cerrados y al abrigo de la luz. (10)

Se realizó un estudio con 60 pacientes los cuales padecían una infección tractourinaria resistente a la amoxicilina a los cuales se les administró amoxicilina con ácido clavulánico; se observó que la administración de 500mg de amoxicilina trihidratada con 125mg de clavulanato de potasio cada 8 horas por 7 días erradica una alta proporción de infecciones tractourinarias causadas por organismos resistentes a la amoxicilina; la administración con los alimentos reduce la prevalencia de náusea. El estudio de la farmacocinética en pacientes sanos demostró que el ácido clavulánico no tiene efecto significativo en la absorción, distribución o excreción de la amoxicilina. Ambos agentes antimicrobianos fueron rápidamente absorbidos en el tracto gastrointestinal, las concentraciones encontradas en el suero, aproximadamente 60 min. después de la administración, demostraron que ambos tienen un tiempo de vida media entre 60 y 70 minutos, la amoxicilina fue recuperada en la orina en unas 6 horas, pero poco menos del 50% se recuperó del ácido clavulánico. (9)



## **CAPITULO III**

## **MATERIAL Y METODOS:**

Matraces volumétricos de 100 ml

Matraces volumétricos de 500 ml

Matraces volumétricos de 1000 ml

Matraces volumétricos de 10 ml

Vasos de precipitados de 50 ml

Vasos de precipitados de 1000 ml

Vasos de precipitados de 2000 ml

Pipetas graduadas de 1 ml

Pipetas graduadas de 5 ml

Pipetas graduadas de 10 ml

Pipetas volumétricas de 3 ml

Pipetas volumétricas de 6 ml

Cubetas (para Karl Fisher)

Jeringas de vidrio de 10 ml

Microjeringas de 10  $\mu$ l Hamilton

Tubos de ensayo 21\*32

Gradilla

Filtros Millipore 0.5 micras

Espátula cromoníquel

Membranas Millipore 0.45 micras (HA y HV)

Cronómetro

Papel parafilm

**REACTIVOS :**

Reactivo de Karl Fisher

Fosfato de Sodio Monobásico

Metanol

Cloroformo

Acetato de etilo

Acido Fosfórico Concentrado

Hidróxido de Sodio 2N

Acido Acético

Fase móvil utilizada para la validación y cuantificación del CK: Buffer de fosfatos pH 4.4 en mezcla con metanol en una proporción 95:5.

**EQUIPO :**

Liquid Chromatograph Varian 5000. Lamp Power Module Variable Detector UV100

Integrator Varian 4270

Columna cat 50334 Lichrosorb Rp18 (10mm)

Columna cat 50332 Lichrosorb Rp8 (5m)

pH-meter E516 Titriskop Metrohm Herisau

Karl Fisher Metrohm Herisau. MultiDosimant E415. MultiBürette E485.

## PARTE EXPERIMENTAL

La cuantificación del ácido clavulánico se realizó por cromatografía de líquidos; se utilizó la técnica utilizada por los Laboratorios Fermic S.A. y es la descrita en la U.S.P. XXII.

Se utilizó como fase móvil una mezcla de buffer de fosfatos pH 4.4 con metanol 95/5.

Columna, RP18; flujo 1.5 ml/min., velocidad de la carta 0.25; atenuación 128.

### III.1), VALIDACION

a). **Linealidad del sistema:** Se determina construyendo una curva de calibración de una misma solución patrón utilizando cuando menos cinco diluciones y realizando el análisis por duplicado para cada dilución.

El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método; para propósitos de control de calidad y de seguimiento de la estabilidad de un fármaco deberá estar incluido el 100% de la dosis; que en este caso corresponde a 270.0µg/ml.

### CRITERIO

$$b \sim 0 \quad r > 0.99 \quad r^2 > 0.98$$

b). **Precisión:** Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema.

**CRITERIO:**

CV. < 1.5%

c). **Repetibilidad:** Se determina por el análisis sextuplicado de una solución estándar correspondiente al 100%; se analiza en dos días diferentes por el mismo analista determinando la desviación estándar y el coeficiente de variación de los datos obtenidos.

**CRITERIO:**

C.V < 1.5%

d). **Reproducibilidad:** Se debe llevar a cabo cuando menos por dos analistas en dos días diferentes y por triplicado cada muestra. Trabajar de manera independiente partiendo de una muestra del producto cercana al 100% de la concentración teórica.<sup>(4)</sup>

**CRITERIO**

El CV total debe cumplir con los fines para los cuales el método será utilizado.

<b>METODO</b>	<b>CV</b>
Cromatográficos	< 2%
Químicos y espectrofotométrico	< 3%
Microbiológicos	< 5%

En nuestro caso se utilizó el método cromatográfico por lo que el C.V debe ser menor a 2%.

e). **Límite de detección:** Se determina la relación del ruido comparando estos resultados con muestras del analito en concentraciones conocidas y con muestras blanco estableciendo el nivel mínimo al cual el analito puede ser detectado confiablemente. La relación señal del ruido de 2:1 o 3:1 es generalmente aceptable. Este límite es subsecuentemente validado con el análisis de un número conveniente de muestras conocidas preparadas cerca del límite de detección.

f). **Límite de cuantificación:** Se mide la magnitud de la respuesta analizando un número de muestra blanco y calculando la desviación estándar de esta respuesta. La desviación estándar multiplicada por el factor usualmente 10, proporciona una estimación del límite de cuantificación. Este límite es subsecuentemente validado por el análisis de un número conveniente de muestras conocidas preparadas cerca del límite de cuantificación.

g). **Especificidad:** La especificidad del método analítico se determina comparando los resultados del análisis de muestras que contengan impurezas, productos de degradación o ingredientes de placebo, con los resultados obtenidos del análisis de muestras puras. El grado o concordancia de estos resultados es una medida de la selectividad.

h). **Tolerancia:** La tolerancia del método analítico es determinada por el análisis de alicuotas de lotes homogéneos en diferentes laboratorios por diferentes analistas usando condiciones de operación que difieran de los parámetros específicos para el ensayo. El grado de reproducibilidad de estos resultados se determina entonces en función de las variables del ensayo.<sup>(12)</sup>

### **III.2 ESTABILIDAD:**

El objetivo principal de los estudios de estabilidad acelerada para el clavulanato de potasio es determinar su fecha de caducidad en el contenedor final que el laboratorio ha determinado para su venta y distribución.<sup>(5)</sup>

El contenedor consta de una bolsa de plástico donde se dosifica el principio activo bajo atmósfera de nitrógeno y un empaque externo de aluminio que lo protege de la luz, dentro de este empaque se coloca sílica desecante para evitar que el producto absorba la humedad del medio.

El producto se envasa en dosis unitarias de 5 Kg; para el estudio de estabilidad se tomaron muestras de 2g; se utilizaron tres lotes diferentes y el análisis se realizó por duplicado. Las temperaturas a las cuales se expusieron las muestras fue de 5, 25, 34 y 50 grados centígrados.

## **CAPITULO IV**



## RESULTADOS

### IV.- VALIDACION

Tomando en cuenta que el Clavulanato de Potasio (C.K) es un principio activo que es manejado como materia prima por los laboratorios Fermic, se realizaron las siguientes determinaciones para la validación del método analítico para su cuantificación:

**Determinación de la Linearidad del Sistema:** Se determinó manejando cinco diluciones: 50% correspondiente a  $135\mu\text{g/ml}$  de Clavulanato de potasio (C.K); 80% equivalente a  $216\mu\text{g/ml}$  de Clavulanato de Potasio; 100% con  $270\mu\text{g/ml}$  de Clavulanato de Potasio; 120% de  $324\mu\text{g/ml}$  de Clavulanato de Potasio y finalmente 150% con una concentración de  $405\mu\text{g/ml}$  de Clavulanato de Potasio.

Se determinaron estas concentraciones ya que se degradó una muestra del producto puro para demostrar la especificidad, en la cual se observó que en un mes se degrada el 10% del producto a  $50^{\circ}\text{C}$ , y puesto que el estudio de estabilidad se llevaría a cabo durante tres meses, se determinó que la concentración mínima para la validación del método fuera del 50%.

Una vez determinadas las concentraciones a las cuales se realizaría la validación del método, se procedió a su análisis preparando las muestras por triplicado, obteniéndose las áreas correspondientes y tomando un estándar de referencia se determinó la concentración final de Clavulanato de Potasio.

Una vez obtenidos estos datos se procedió a graficar la concentración adicionada de Clavulanato de Potasio (Conc. inicial) vs. la concentración recuperada de Clavulanato de Potasio (Conc. final), obteniéndose una línea recta, de la cual pueden determinarse los parámetros estadísticos de regresión lineal: pendiente (m), ordenada al origen (b), coeficiente de correlación (r). (Tabla 1, Gráfica 1, Fig. A)

**Determinación de la Precisión:** Se realizaron análisis por duplicado de 6 muestras correspondientes al 100% de la concentración del Clavulanato de Potasio ( $270\mu\text{g/ml}$ ), obteniéndose las áreas y determinando de éstas el coeficiente de variación que no debe ser mayor al 1.5% por el método utilizado de acuerdo a las especificaciones de la U.S.P XXII. (Tabla 2, Fig. B)

**Determinación de la Repetibilidad:** Se analizaron 6 muestras por duplicado correspondientes al 100% de la concentración del Clavulanato de Potasio ( $270\mu\text{g/ml}$ ). Las áreas obtenidas de la repetibilidad se analizan con las obtenidas en la precisión, ya que éstas se llevaron a cabo en dos días diferentes, determinándose el coeficiente de variación de todos los datos, el cual debe ser menor a 1.5% de acuerdo a la especificación de la U.S.P XXII. (Tabla 3, Fig. C)

**Determinación de la Reproducibilidad:** Se analizaron 6 muestras por duplicado correspondientes al 100% de la concentración de Clavulanato de Potasio ( $270\mu\text{g/ml}$ ); esta prueba la realizó otro analista en otro día diferente al cual se llevó a cabo la precisión del método. A los datos obtenidos en la reproducibilidad y los de precisión se les determinó el coeficiente de variación que no debe ser mayor al 2% por especificación de la U.S.P XXII. (Tabla 4, fig. D).

**Determinación del Límite de Detección:** De acuerdo a la U.S.P XXII este límite debe ser 3 veces la señal del ruido; éste se obtiene analizando muestras blanco determinando el tamaño del pico que producen, y tres veces esta señal debe corresponder al límite de detección. En nuestro caso no se obtuvo de esta manera, ya que al determinar la precisión se determinó un coeficiente de variación muy elevado; se llevaron a cabo pruebas de ensayo y error hasta obtener un coeficiente de variación aceptable; encontrándose que con una concentración de  $8\mu\text{g/ml}$  de Clavulanato de Potasio, se obtiene un coeficiente de variación de 1.78%. (Tabla 5, Fig. E y H)

**Determinación del límite de cuantificación:** Una vez obtenido el límite de detección, se procedió a elevar la concentración hasta encontrar aquella en la cual el coeficiente de variación (C.V) fuera menor a 1.5%, determinándose que con  $16.428\mu\text{g/ml}$  de Clavulanato de Potasio se obtiene un C.V de 1.043%. (Tabla 6, Fig. F).

**Determinación de la Especificidad:** El objetivo principal de esta prueba es demostrar que el método es capaz de separar a los productos de degradación de nuestra molécula intacta, lo cual fue demostrado al poder observar en los cromatogramas obtenidos la separación de nuestros picos. (Figuras G, H, I, J, K, L, M)

Para poder observar las señales de nuestro interés, se modificaron las condiciones habituales de trabajo que son velocidad de la carta de 0.25, atenuación de 128, flujo de 1.5 ml/min; utilizando una velocidad de la carta de 0.75, atenuación de 8 y flujo de 0.5 ml/min.

**Determinación de la Tolerancia:** Se demostró la tolerancia del método cambiando las condiciones habituales de trabajo, como el tipo de la columna, la polaridad de la fase, demostrando que el método es capaz de separar nuestra molécula de interés de los productos de degradación, además de ser reproducible, aún modificando estas condiciones. (Fig. L,M,N,P)

**TABLA 1**

a). **Determinación de la Linearidad:** Se utilizaron 5 concentraciones diferentes de Clavulanato de Potasio para determinar la linealidad, las cuales son del 50 al 150% de la conc.; de los datos obtenidos se construye una gráfica para determinar si el método es lineal; determinándose la pendiente (m) y el coeficiente de correlación (r).

Concentración Clavulanato de Potasio Inicial ( $\mu\text{g/ml}$ )	A R E A	Concentración Clavulanato de Potasio ( $\mu\text{g/ml}$ )
135.0	2093662.0	138.15
135.0	2066709.5	136.37
135.1	2030440.5	133.97
215.9	3279463.5	216.39
216.0	3261325.5	215.19
215.8	3284758.5	216.73
269.8	4108907.0	271.11
269.9	4104178.0	270.80
269.8	4102575.5	270.68
324.0	4978694.5	328.51
324.1	4909005.5	323.91
324.0	4962072.5	327.40
404.9	6075737.0	400.89
404.9	6088467.5	401.73
405.1	6188040.5	408.29

$$m = 0.99963$$

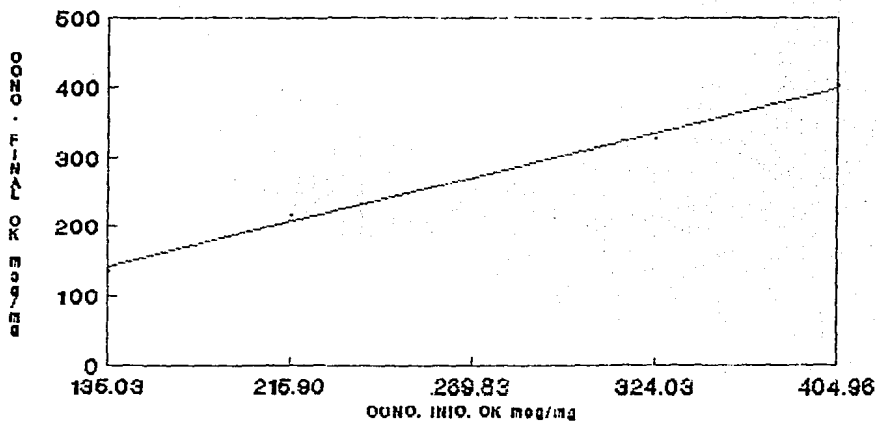
$$b = 1.923$$

$$r = 0.999637$$

$$r^2 = 0.999275$$

# LINEARIDAD

## GRAFICA No.1



Series 1

Fig A) - Determinaciones para establecer la linealidad del sistema en la validación del método para la cuantificación del Clavulánico de Potasio por Cromatografía de Líquidos; utilizándose las siguientes concentraciones:

(1) Conc. del estándar: 270µg/ml; (2) Clavulánico de Potasio en una concentración de 135µg/ml (50%); (3) Clav. de Potasio en conc. de 270µg/ml (100%); (4) Clav. de Potasio en conc. de 270µg/ml (100%); (5) Clav. de Potasio en conc. de 124µg/ml (46%); (6) Clav. de Potasio en conc. de 405µg/ml (150%).

CHANNEL #	INJECT	29/12/92	11:27:45	CH= "A"	PS= 1.
RZ 1					
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 9	INDEX 9		
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC		
1	0.041	1.71	1780 01		
2	99.959	2.03	4104882 01		
TOTAL	100.		4106572		
CHANNEL # INJECT 29/12/92 11:33:02					
RZ 1					
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 10	INDEX 10		
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC		
1	0.073	1.71	1555 01		
2	99.927	2.02	2116440 01		
TOTAL	100.		2117995		
CHANNEL # INJECT 29/12/92 12:18:30					
RZ 1					
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 18	INDEX 18		
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC		
1	0.35	1.67	2541 02		
2	0.067	2.04	2202 03		
3	99.582	2.01	3181008 01		
TOTAL	100.		3182657		
CHANNEL # INJECT 29/12/92 12:56:36					
RZ 1					
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 24	INDEX 24		
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC		
1	0.009	1.51	245 02		
2	0.06	1.65	2454 02		
3	0.038	2.	1565 03		
4	99.894	2.88	4107142 01		
TOTAL	100.		4111506		
CHANNEL # INJECT 29/12/92 13:01:03					
RZ 1					
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 25	INDEX 25		
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC		
1	0.011	1.66	1523 03		
2	99.989	2.67	4959789 01		
TOTAL	100.		4962222		
CHANNEL # INJECT 29/12/92 13:02:21					
RZ 1					
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 24	INDEX 24		
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC		
1	0.006	1.5	497 02		
2	0.036	1.65	2213 02		
3	0.009	1.81	566 02		
4	0.051	1.98	3117 03		
5	99.898	2.78	6038861 01		
TOTAL	100.		6039254		

**TABLA 2**

b).- Determinación de la precisión: Se analizaron 6 muestras por duplicado al 100% de la concentración (270 $\mu$ g/ml), obteniéndose las siguientes áreas y su coeficiente de variación (C.V).

MUESTRA	AREA
1	4099495 4102880
2	4013122 4008256
3	4060909 4087894
4	4106324 4050030
5	4125631 4087681
6	4048455 4060292
7	4060395 3989603
8	4007520 4036419
9	4048054 4012186
10	4089621 4095058
11	4085144 4094750
12	4036781 4127225

$$\bar{X} = 4063905.208$$

$$DE = 39473.89506$$

$$CV = 0.97$$

Fig B) - Determinación de la precisión del sistema en la validación del Clavimato de Potasio por Cromatografía de Líquidos donde la concentración del estándar es de 270µg/ml (100%).

FILE	1.	METHOD	0.	RUN	23	INDEX	23
PEAK#		AREA%		RT		AREA	BC
1		0.015		1.5		580	01
2		0.006		1.63		2835	01
3		99.915		2.79		2932223	01
TOTAL		100.				3935292	

FILE	1.	METHOD	0.	RUN	24	INDEX	24
PEAK#		AREA%		RT		AREA	BC
1		0.019		1.49		750	02
2		0.09		1.62		2654	03
3		99.891		2.78		4048054	01
TOTAL		100.				4052458	

FILE	1.	METHOD	0.	RUN	25	INDEX	25
PEAK#		AREA%		RT		AREA	BC
1		0.013		1.5		523	01
2		0.051		1.65		2656	01
3		99.936		2.78		4012106	01
TOTAL		100.				4014765	



**TABLA 3**

c).- Prueba de Repetibilidad: Se analizaron 6 muestras por duplicado al 100% de la concentración (270µg/ml). De las áreas obtenidas en precisión y repetibilidad se determinó el coeficiente de variación (C.V).

	DIA 1	DIA 2
A	4099495	4008510
	4102880	4068264
	4013122	4038164
	4008256	4046115
R	4060909	4090226
	4087894	4022121
	4006324	4100664
	4050030	4033558
E	4125631	4002637
	4087681	3983847
	4048455	3994313
	4060292	4025691
A	4060395	3958173
	3989603	4001440
	4007520	4008215
	4036419	3985924
A	4048054	4027426
	4012186	4069457
	4089621	3978475
	4095058	3971827
A	4085144	4036386
	4094750	4054651
A	4036781	3937717
	4127225	3915105

$$\bar{X} = 4039429.813$$

$$DE = 48441.967$$

$$CV = 1.2$$

Fig. G) - Determinación de la repetibilidad en la validación del método de Potasio (K), utilizando una concentración de 270µg/ml (100%).

CHANNEL A INJECT 06/01/93 09:36:22				
<del>FILE 1</del> A2 1				
06/01/93 09:36:22 CH= "A" PS= 1.				
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 3	INDEX 3	
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC	
1	0.07	1.61	2545 02	
2	99.93	2.88	4844021 01	
TOTAL	100.		4847466	
CHANNEL A INJECT 06/01/93 09:41:02				
<del>FILE 1</del> A2 1				
06/01/93 09:41:02 CH= "A" PS= 1.				
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 10	INDEX 10	
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC	
1	0.031	1.63	2574 02	
2	0.052	2.1	2044 01	
3	0.016	2.41	120 02	
4	99.891	2.88	3920707 01	
TOTAL	100.		3926945	
CHANNEL A INJECT 06/01/93 09:45:59				
<del>FILE 1</del> A2 1				
06/01/93 09:45:59 CH= "A" PS= 1.				
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 11	INDEX 11	
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC	
1	0.064	1.63	2541 03	
2	99.936	2.87	3974499 01	
TOTAL	100.		3977040	

**TABLA 4**

d).- Prueba de Reproducibilidad: Se analizaron 6 muestras al 100% de la concentración (270µg/ml). De las áreas obtenidas en reproducibilidad y en precisión se determinó su coeficiente de variación (C.V).

	ANALISTA 1	ANALISTA 2
A	4099495	4036403
	4102880	4064725
	4013122	4085732
	4008256	4101619
	4060909	4094345
	4087894	4045125
R	4106324	3988118
	4050030	4044621
	4125631	3920707
	4087681	3974499
	4048455	4014300
	4060292	4065300
E	4060395	4033362
	3989603	4006915
	4007520	3922120
	4036419	3963928
	4048050	4040838
	4012186	4050132
A	4089621	3985993
	4095058	4043339
	4085144	4000369
	4094750	3991482
	4036781	4051202
	4127225	4050376

$\bar{X}$  = 4043943.229  
 DE = 47619.20568  
 CV = 1.18

CHANNEL A INJECT 04/01/93 11:57:53				
AZ 1				
2.82				
04/01/93 11:57:53 CH= "A" PS= 1.				
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 13	INDEX 13	
PEAK#	AREAX	RT	AREA BC	
1	0.047	1.61	1930 01	
2	99.953	2.82	4100664 01	
TOTAL	100.	4102594		
CHANNEL A INJECT 04/01/93 12:01:57				
AZ 1				
2.82				
04/01/93 12:01:57 CH= "A" PS= 1.				
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 14	INDEX 14	
PEAK#	AREAX	RT	AREA BC	
1	100.	2.82	4033559 01	
TOTAL	100.	4033556		
CHANNEL A INJECT 04/01/93 12:06:16				
AZ 1				
2.81				
04/01/93 12:06:16 CH= "A" PS= 1.				
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 15	INDEX 15	
PEAK#	AREAX	RT	AREA BC	
1	100.	2.81	4002637 01	
TOTAL	100.	4002637		

FIG D). - Determinación de la reproducibilidad en la validación del Clavulánico de Potasio (CK); utilizándose el estándar de Clavulánico en una concentración de 270µg/ml (100%).

**TABLA 5**

e).- **Determinación del Límite de Detección:** Se analizaron 12 muestras diferentes con una concentración de 8µg/ml de Clavulanato de Potasio, de las áreas obtenidas se determinó el coeficiente de variación (C.V), el cual da un valor de 1.78%.

MUESTRA	AREA
1	148714 147772
2	141687 142058
3	144874 144812
4	144592 142876
5	141070 147359
6	137618 140554
7	141193 139752
8	142375 145460
9	141921 138804
10	143755 143615
11	144967 143382
12	142286 145310

$\bar{X}$  = 143033.5833  
DE = 2549.431718  
CV = 1.78

Fig 8). - Determinación del límite de detección para la validación del Cloranfanto de Potasio (CP): utilizando el estándar de CP a una concentración de 8µg/ml; observándose una buena reproducibilidad en los datos obtenidos.

CHANNEL A INJECT 06/06/93 11:46:07				
AZ 1				
2.77				
06/06/93 11:46:07 CH= "A" PS= 1.				
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 17	INDEX 17	
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC	
1	100.	2.77	139752 01	
TOTAL	100.	139752		
CHANNEL A INJECT 06/06/93 11:50:02				
AZ 1				
2.77				
06/06/93 11:50:02 CH= "A" PS= 1.				
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 18	INDEX 18	
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC	
1	100.	2.77	142375 01	
TOTAL	100.	142375		
CHANNEL A INJECT 06/06/93 11:55:07				
AZ 1				
2.77				
06/06/93 11:55:07 CH= "A" PS= 1.				
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 19	INDEX 19	
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC	
1	100.	2.77	145460 01	
TOTAL	100.	145460		

**TABLA 6**

f).- **Determinación del Límite de Cuantificación:** Se analizaron 12 muestras de Clavulanato de Potasio con una concentración de 16.428µg/ml; a las áreas obtenidas se les determinó el coeficiente de variación (C.V), el cual tiene un valor de 1.043%.

MUESTRA	ÁREA
1	244279 240942
2	241253 240562
3	243918 243594
4	244969 242743
5	241505 243663
6	243678 240585
7	241193 242030
8	240832 248900
9	240619 248786
10	239902 243785
11	243570 246232
12	240518 239005

$$\bar{X} = 242794.2917$$

$$DE = 2532.495229$$

$$CV = 1.043$$

CHANNEL A INJECT 06/06/93 12:53:57				
AZ 1				
2.75				
06/06/93 12:53:57 CH= "A" PS= 1.				
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 33	INDEX 33	
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC	
1	100.	2.75	235024 01	
TOTAL	100.		235024	
CHANNEL A INJECT 06/06/93 12:57:37				
AZ 1				
2.74				
06/06/93 12:57:37 CH= "A" PS= 1.				
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 34	INDEX 34	
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC	
1	100.	2.74	238164 01	
TOTAL	100.		238164	
CHANNEL A INJECT 06/06/93 13:01:52				
AZ 1				
2.72				
06/06/93 13:01:52 CH= "A" PS= 1.				
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 35	INDEX 35	
PEAK#	AREA%	RT	AREA BC	
1	100.	2.72	239464 01	
TOTAL	100.		239464	

Fig P) - Determinación del límite de cuantificación para la validación del Clavulansato de Potasio (CV) utilizando el estándar a una concentración de 16µg/ml; obteniéndose una buena reproducibilidad en los datos obtenidos.



**g). - Especificidad:**

Para determinar la especificidad, primero se degradó una muestra del producto a 50°C por tres meses, de esta manera logramos que en el cromatograma aparecieran tres picos, uno correspondiente al agua (ya que el producto está disuelto en agua), otro correspondiente a nuestro producto intacto de interés; y un tercero correspondiente al producto de degradación. (Fig. G).

Se dice que existe un pico debido al agua, ya que al inyectar el blanco (en este caso agua porque es donde se tiene disuelta la muestra) da el pico que se observa en los cromatogramas obtenidos en la especificidad. (Fig H).

Posteriormente se procedió a cambiar la polaridad de la fase móvil para corroborar de esta manera que sólo se tenía un producto de degradación, la muestra se dejó correr por 60 min., para corroborar que no aparecían más señales. (Fig I, J). Todos estos análisis se llevaron a cabo utilizando una columna para fase inversa C<sub>18</sub>. Una vez que se comprobó que con las distintas fases móviles no aparecían más señales en la columna utilizada, se procedió a cambiar a otra columna (para fase inversa C<sub>8</sub>). (Fig. K, L y M ). Para comprobar la especificidad se realizó otro tipo de cromatografía, la cromatografía en capa fina; se utilizaron dos tipos de fases móviles:

- (1) Acetato de etilo- Metanol- Agua- Acido acético 60:30:9:1
- (2) Metanol- Cloroformo- Acido acético 50:50:1. ( Fig. P).

A continuación se dan las composiciones de las fases móviles utilizadas y se anexan los cromatogramas obtenidos.

Fases móviles utilizadas:

- Buffer de fosfato de sodio monobásico / MeOH 95/5
- Buffer de fosfato de sodio monobásico / MeOH 90/10
- Buffer de fosfato de sodio monobásico / MeOH 85/15
- Buffer de fosfato de sodio monobásico / MeOH 80/20
- Buffer de fosfato de sodio monobásico.
- Buffer de fosfato de sodio monobásico / Agua 95/5.
- Buffer de fosfato de sodio monobásico / Agua 90/10.
- Buffer de fosfato de sodio monobásico / Agua 80/20.
- Buffer de fosfato de sodio monobásico / Agua 70/30.
- Buffer de fosfato de sodio monobásico / Agua 50/50.

Todos los buffer se prepararon con un pH inicial de  $4.4 \pm 0.05$ ; la mezcla con la cual se observó una mejor separación de los picos fue con la del buffer/agua 80:20. (Fig. K).

COLUMNAS UTILIZADAS:

Columna cat 50334 Lichrosorb RP-18 ( 10  $\mu$ m)

Columna cat 50332 Lichrosorb Rp-8 ( 5  $\mu$ m)

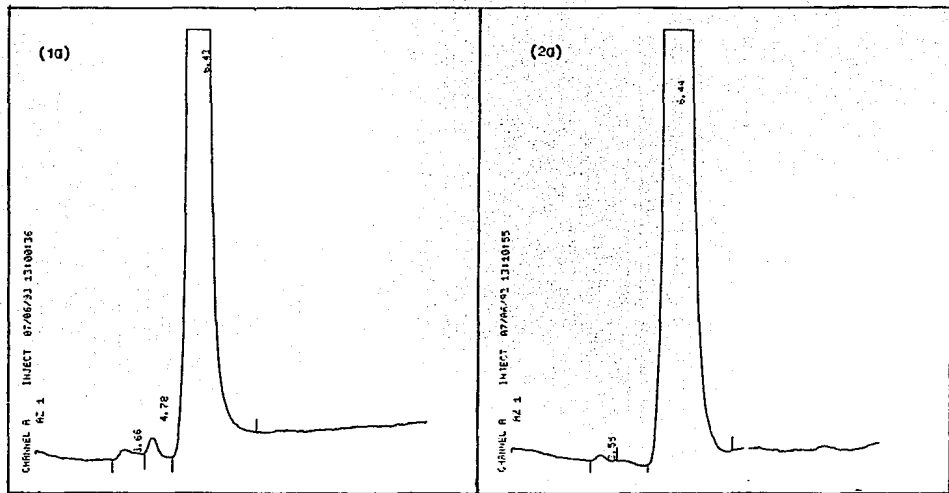


Fig 0).- Determinación de la especificidad utilizándose como fase móvil una mezcla de buffer de fosfatos pH 4.4 con metanol en una proporción 95/5, atenuación de 8; velocidad de la carta de 0.75 y flujo de 0.5ml/min. (10) Estándar; (20) Muestra degradada a 50 grados centígrados.

(1) respuesta debida al agua.  
 (2) respuesta correspondiente a la molécula de interés (CK)  
 (3) respuesta debida al producto de degradación.

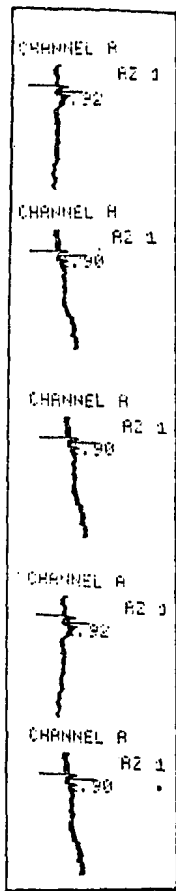


FIG H). - En los siguientes cromatogramas se observa la respuesta debido al agua, que es nuestro blanco, puesto que es el disolvente del Cloruro de Potasio.

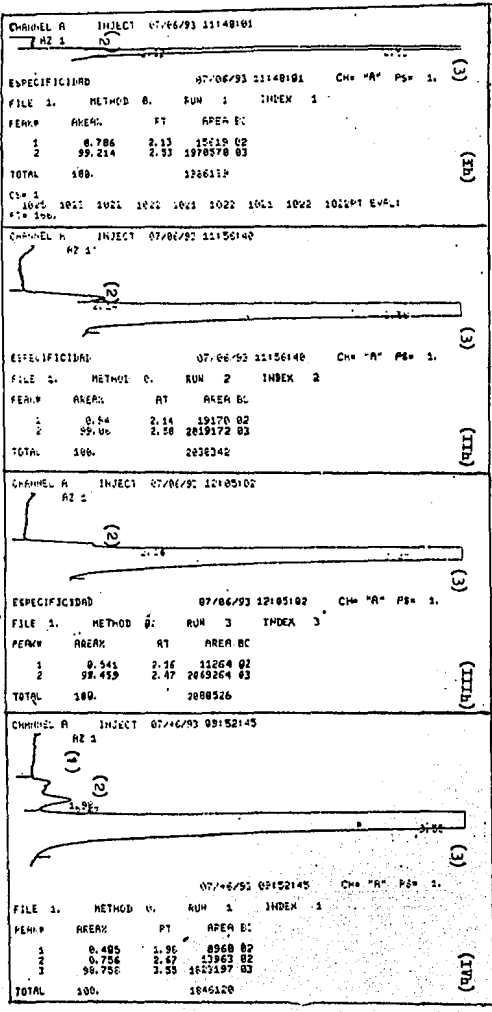


Fig. 1.- Determinación de la especificidad, utilizando como fase móvil una mezcla de buffer pH 4.4 con metanol en las siguientes proporciones: (I) 80/20; (II) 90/10; (III) 70/30; (IV) buffer sin metanol, en las condiciones descritas en la fig. 0.

- (1) Respuesta debida al agua.
- (2) Respuesta del producto de degradación.
- (3) Respuesta debida al Glavulimato.

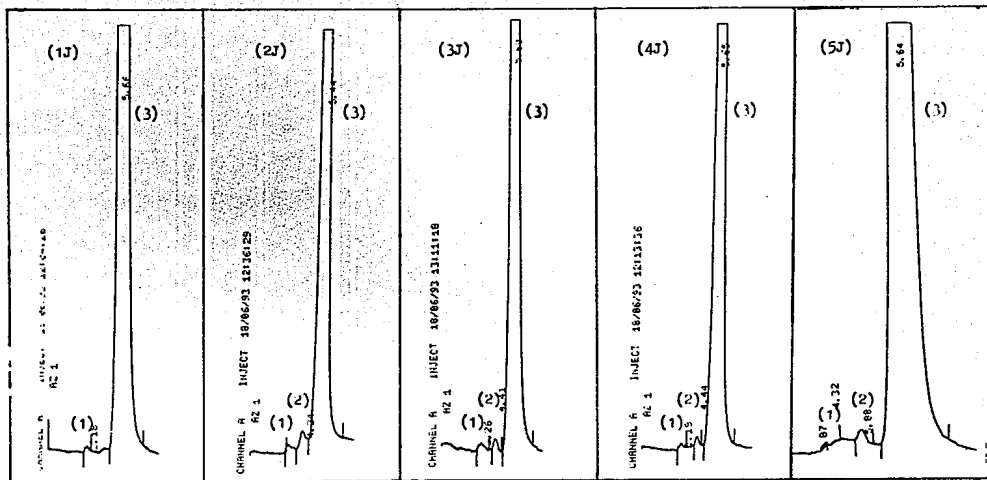


Fig J.- Determinación de la especificidad utilizando como fase móvil una mezcla de buffer pH 4.4/agua en las siguientes proporciones: (1J) 90/10 ( estándar de K); (2J) 90/10; (3J) 80/20; (4J) 70/30; (5) 50/50.

- (1) respuesta debido al agua.
- (2) respuesta debido al producto de degradación.
- (3) respuesta debida al Clavulanato de Potasio.

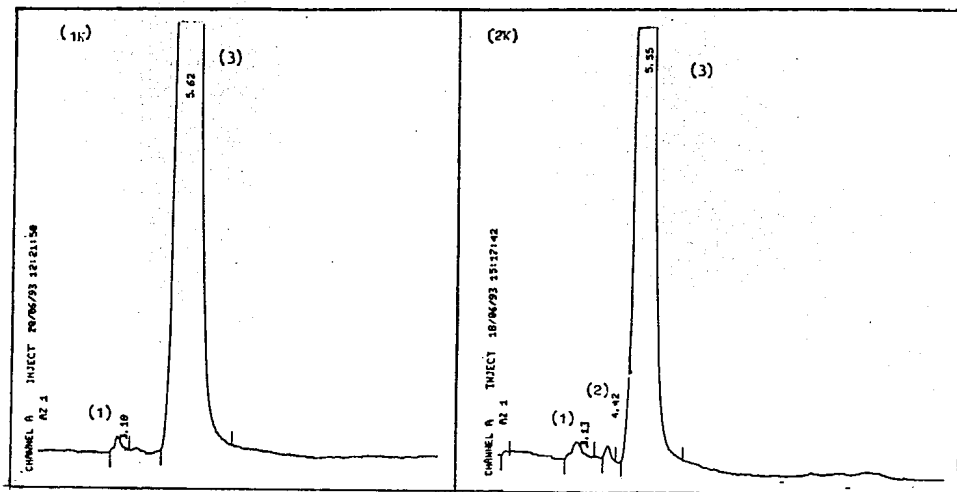


Fig K).-- Determinación de la especificidad utilizando como fase móvil una mezcla de buffer pH 4.4/ agua en una proporción 60/20, dejando correr las muestras cerca de 60 min. (1K) estándar; (2K) muestra degradada a 50 grados centígrados.

- (1) respuesta: debida al agua.
- (2) respuesta debido al producto de degradación.
- (3) respuesta debida al Clavulanato de Potasio.

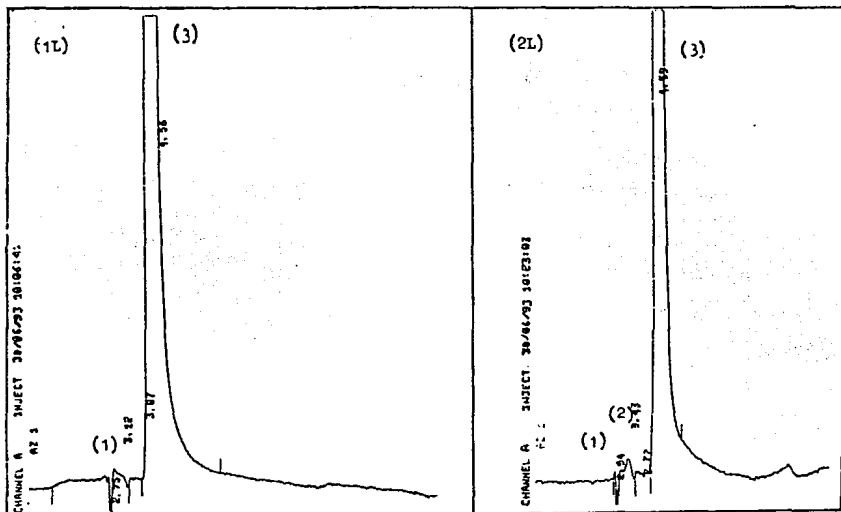


Fig 1).- Determinación de la especificidad para la validación del Clavulánico de Potasio, utilizando como fase móvil una mezcla de buffer de fosfatos pH 4.4, utilizando una columna  $C_{18}$ , observándose el mismo número de señales (3) que en la columna  $C_{18}$ .

- (1) respuesta debida al agua.
  - (2) respuest. debida al producto de degradación.
  - (3) respuesta debida al Clavulánico de Potasio.
- (1L) estándar; (2L) muestra degradada.



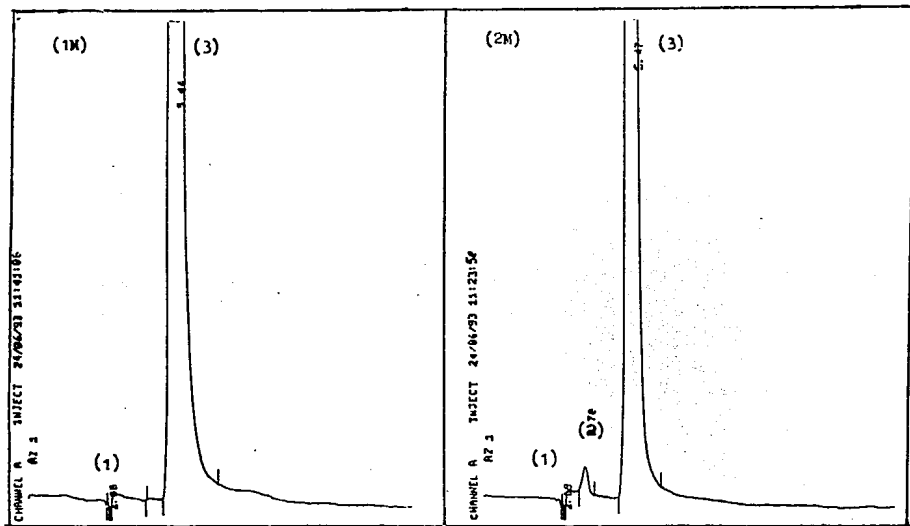


Fig M).-Determinación de la especificidad utilizando como fase móvil una mezcla de buffer pH 4.4 con agua en una proporción 80/20, columna  $C_8$ ; observándose también la tolerancia del método a los cambios de polaridad de la fase móvil y al cambio de columna. (1M) estándar; (2M) muestra degradada.

- (1) respuesta debida al agua.
- (2) respuesta debido al producto de degradación.
- (3) respuesta debida al Clavulanato de Potasio.

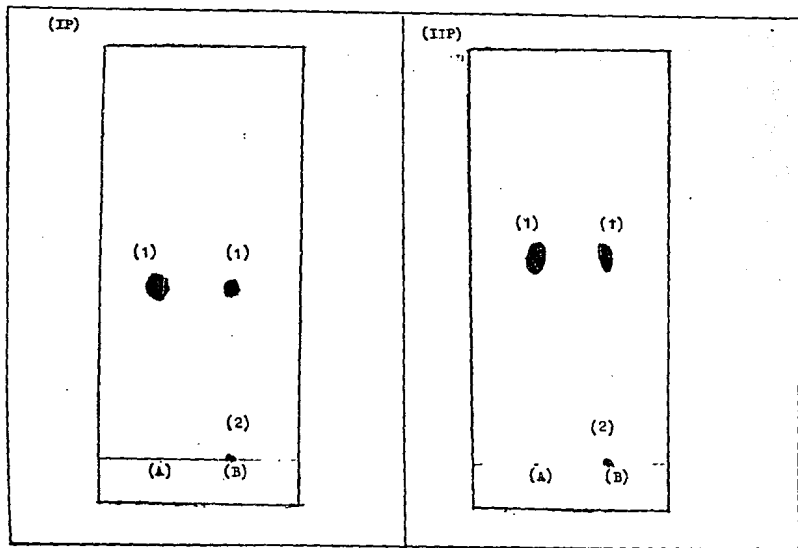


Fig.F).- Cromatografía en capa fina utilizando dos distintas fases móviles:  
 (IP) Acetato de etilo- metanol- agua- ácido acético. 60:30:9:1.  
 (IIP) Metanol- cloroformo- ácido acético. 50:50:1.  
 (1) Clavulanato  
 (2) Producto de degradación  
 (A) Estándar; (B) Muestra degradada a 50 grados.

#### h).- Tolerancia:

La tolerancia fue demostrada cambiando la polaridad de la fase móvil, utilizando aquella en la que se observó una mejor separación de los picos, que fue la mezcla del buffer de fosfatos pH 4.4 con agua en una proporción 80:20, además de utilizar la mencionada en la U.S.P.XXII; que consiste en una mezcla del buffer de fosfatos con metanol en una proporción 95:5, utilizada normalmente para cuantificar al clavulanato de potasio; estas fases se emplearon en el uso de otra columna, ya que para la cuantificación del CK se utiliza una RP<sub>18</sub>, y se utiliza una columna RP<sub>8</sub> para demostrar que solo aparecen los picos de interés, es decir, uno correspondiente al clavulanato y otro al producto de degradación; demostrando de esta manera que el método es tolerable y reproducible (esto se comprobó al observar que no cambiaban las áreas al inyectar repetidamente estándares) a los cambios de operación realizados. (Fig. L, M, N).

FIG N).- Determinación de la tolerancia en la validación del Clavulánico-  
to de Potasio utilizando una columna C<sub>8</sub> como fase móvil una mezcla de  
buffer KH 4.4 con metanol en proporción 95/5; atenuación 128, velocidad  
de la carta de 0.25, flujo 1.5 ml/minj obteniéndose una buena reproducibi-  
lidad en los datos.

CHANNEL A INJECT 30/06/93 10:58:09				
A2 1				
30/06/93 10:58:09 CH= "A" PS= 1.				
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 8	INDEX 8	
PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.05	1.0	2210	02
2	0.329	1.93	14532	03
3	0.051	2.31	2238	02
4	99.571	2.78	4400363	03
TOTAL	100.		4419341	
CHANNEL A INJECT 30/06/93 11:03:20				
A2 1				
30/06/93 11:03:20 CH= "A" PS= 1.				
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 9	INDEX 9	
PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.1	1.79	2470	02
2	0.708	2.08	17547	02
3	99.193	2.78	4459694	01
TOTAL	100.		4479701	
CHANNEL A INJECT 30/06/93 11:07:42				
A2 1				
30/06/93 11:07:42 CH= "A" PS= 1.				
FILE 1.	METHOD 0.	RUN 10	INDEX 10	
PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.178	1.23	4469	02
2	0.077	1.71	1944	02
3	0.444	2.03	11136	02
4	99.301	2.75	4492525	03

EJEMPLO DE LOS CALCULOS REALIZADOS, UTILIZANDO LOS DATOS  
OBTENIDOS EN LA DETERMINACION DE PRECISION.

X = Cada valor individual.

n = Número total de datos = 12

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

$$\bar{X} = \frac{4099495+4102880+4013122+\dots+4094750+4036781+4127225}{24}$$

$$\bar{X} = 4063905.208$$

$$DE = \frac{(4099495-4063905.208)^2+(4102880-4063905.208)^2+\dots+(4036781-4063905.208)^2+(4127225-4063905.208)^2}{23}$$

$$DE = 39473.89$$

$$CV = \frac{39473.89}{4063905.208} \cdot 100$$

$$CV = 0.97$$

## IV.2 ESTABILIDAD

De los datos obtenidos, se procedió a determinar el orden de reacción graficando la concentración contra el tiempo para los tres órdenes de reacción más estudiados: cero, primero y segundo orden.

De donde se obtuvieron las mejores líneas rectas a las diferentes temperaturas y el valor de los contrastes obtenidos más homogéneos, se deduce el orden de reacción que lleva a cabo nuestro producto en estudio.

A continuación se presenta un ejemplo de los datos obtenidos para determinar el orden de reacción, utilizando las siguientes fórmulas:

Orden Cero

$$C = C_0 - Kt$$

Primer Orden

$$\log c = \log C_0 - Kt$$

Segundo Orden

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + \frac{1}{Kt}$$

Y utilizando los valores de un solo lote a las diferentes temperaturas, para observar en cual orden de reacción se obtienen las mejores rectas.

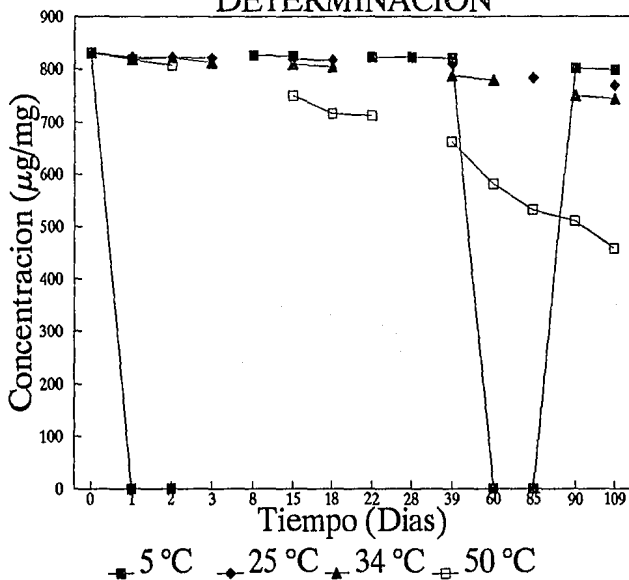
### DETERMINACION DE LA CINETICA DE DEGRADACION

Ejemplo del análisis realizado para determinar el orden de reacción que lleva a cabo nuestro producto en su degradación utilizando los datos de concentración obtenidos del lote 1 a las diferentes temperaturas.

#### CERO ORDEN

TIEMPO (DIAS)	CONCENTRACION ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )			
	5 °C	25 °C	34 °C	50 °C
0	831	831	831	831
1		822	817.5	818
2		822	822	808.5
3			812	
8	824			
15	824	818	809	749.5
18		818.5	804	718
22	822			712
28	822			
39	820	809	788	861
60			778.5	881
85		802	782	831.5
90			780.5	810.5
109	799	788	743	857.5

### CINETICA DE DEGRADACION DETERMINACION



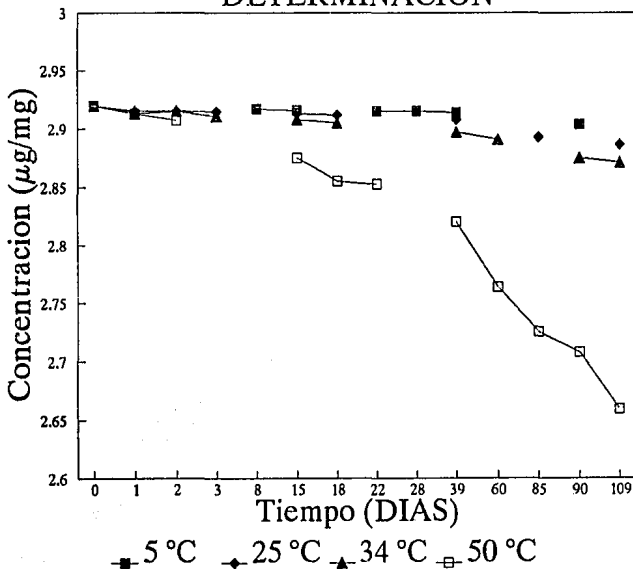
### DETERMINACION DE LA CINETICA DE DEGRADACION

Ejemplo del análisis realizado para determinar el orden de reacción que lleva a cabo nuestro producto en su degradación utilizando los datos de concentración obtenidos del lote 1 a las diferentes temperaturas.

#### PRIMER ORDEN

TIEMPO (DIAS)	CONCENTRACION ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )			
	5 °C	25 °C	34 °C	50 °C
0	2.92	2.92	2.92	2.92
1		2.915	2.913	2.913
2		2.915	2.915	2.907
3		2.914	2.91	
8		2.917		
15		2.916		
18		2.913		2.875
22		2.912		2.855
28		2.908		2.852
39		2.904		2.82
60		2.893		2.764
85		2.893		2.726
90		2.893		2.708
109		2.866		2.66

### CINETICA DE DEGRADACION DETERMINACION





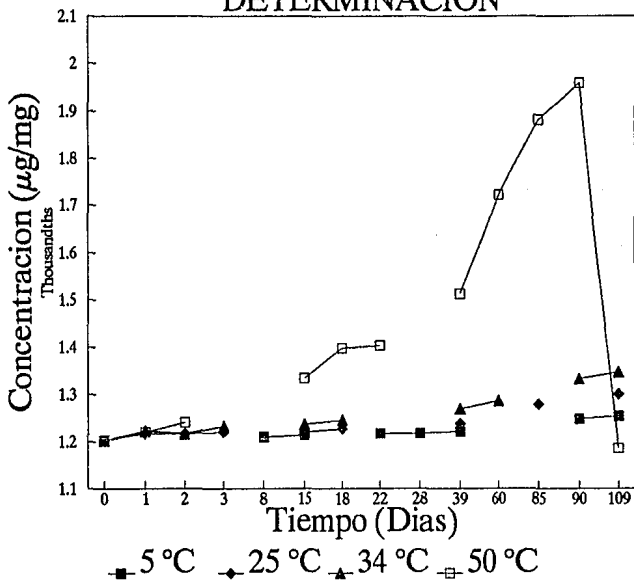
## DETERMINACION DE LA CINETICA DE DEGRADACION

Ejemplo del análisis realizado para determinar el orden de reacción que lleva a cabo nuestro producto en su degradación utilizando los datos de concentración obtenidos del lote 1a las diferentes temperaturas.

### SEGUNDO ORDEN

TIEMPO (DIAS)	CONCENTRACION ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )			
	5 °C	25 °C	34 °C	50 °C
0		0.001203	0.001203	0.001203
1		0.001203	0.001217	0.001223
2			0.001217	0.001217
3			0.00122	0.001232
8	0.00121			
15	0.001214	0.00122	0.001235	0.001234
18		0.001225	0.001244	0.001267
22	0.001217			0.001404
28	0.001217			
39	0.00122	0.001238	0.001268	0.001513
60			0.001288	0.001721
85		0.001278		0.001851
90	0.001247		0.001322	0.001925
109	0.001223	0.0013	0.001348	0.001155

## CINETICA DE DEGRADACION DETERMINACION



Después de realizar un análisis preliminar para determinar el orden de reacción se obtuvo que la cinética que se lleva a cabo es de primer orden, por lo tanto, para determinar el valor de la constante se utilizó la misma fórmula para procesar los datos y obtener el valor de la constante; que al ser graficados nos dan los siguientes valores:

$$\log C = \log C_0 - Kt$$

$$m = \frac{Kt}{2.303}$$

$$b = \log C_0$$

por lo tanto :  $K = -2.303 * m$

Para determinar la fecha de caducidad y la energía de activación se graficaron los valores promedios de las constantes contra el inverso de las temperaturas, de donde se obtiene:

$$\log K = \log A - \frac{E_a}{RT}$$

$$\log K$$

$$1/T$$

$$m = - \frac{E_a}{2.303 * R} \text{ por lo tanto}$$

$$E_a = -2.303 * R * m$$

$$b = \log A$$

Una vez obtenidos estos valores se puede obtener, directamente de la gráfica o sustituyendo valores en la ecuación general, el valor de la constante a cero y cinco grados.

Con la ecuación de  $t_{90}$  correspondiente a una cinética de primer orden, se puede determinar la fecha de caducidad a la temperatura de almacenaje del producto.

$$t_{90} = \frac{0.106}{K}$$

## RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE ESTABILIDAD

Una vez terminado el estudio de estabilidad acelerada para el Clavulanato de Potasio, se procedió a realizar un análisis de los resultados obtenidos para determinar su cinética de degradación para lo cual se utilizaron las fórmulas de cinética química; se graficaron los datos obtenidos relacionando la concentración con el tiempo para cada temperatura, obteniéndose el valor de las constantes de equilibrio (K); posteriormente se procedió a determinar la fecha de caducidad del producto (Clavulanato de Potasio) relacionando las constantes obtenidas con la temperatura de acuerdo a la ecuación de Arrhenius (descrita más adelante).

De los datos obtenidos, algunos fueron descartados puesto que no eran congruentes a los demás, con esto se quiere decir que no se ajustaban dentro de las gráficas obtenidas, para justificar el no haberse tomado en cuenta se procedió a realizar un análisis estadístico descrito más adelante.

ESTABILIDAD DE CLAVULANATO 5 °C

$\log C = \log C_0 - Kt$   
 $y = b - mx$   
 $m = K / 2.303$

LOTE 1				
TIEMPO (DIAS)	CONCENTRACION ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	LOG. CONC ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	pH	%HUMEDAD
0	811	2.92	6.7	0.1
8	826	2.917	6.7	0.12
15	824	2.916	6.7	0.28
22	822	2.915	6.65	0.31
28	822	2.915	6.65	0.4
36	820	2.914	6.65	0.58
90	802	2.904	6.8	0.62
109	798	2.902	6.85	

Salida de Regresión:	
Constante	2.9190397
Err Std de Y Est	0.0007594
R al Cuadrado	0.9878528
N: de Observaciones	8
Grados de Libertad	6
Coficiente(s) $\lambda$	-0.00016
Err Std de Coef.	7.2E-06

$m = -2E-04$   
 $K = 0.0004$

LOTE 2				
TIEMPO (DIAS)	CONCENTRACION ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	LOG. CONC ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	pH	%HUMEDAD
0	814	2.911	6.75	0.2
8	813	2.91	6.8	0.28
15	811	2.909	6.75	0.49
22	813	2.91	6.7	0.6
28	811	2.909	6.7	0.87
36	809	2.908	6.7	1.05
90	802	2.904	6.75	1.22
109	800	2.903	6.7	1.35

Salida de Regres	
Constante	2.9108131
Err Std de Y Est	0.0004829
R al Cuadrado	0.9766825
N: de Observaciones	8
Grados de Libertad	6
Coficiente(s) $\lambda$	-7.3E-05
Err Std de Coef.	4.6E-06

$m = -7E-05$   
 $K = 0.0002$   
 $r = 0.9894$

LOTE 3				
TIEMPO (DIAS)	CONCENTRACION ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	LOG. CONC ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	pH	%HUMEDAD
0	822	2.915	8.9	0.5
8	820	2.914	7.5	0.41
15	818	2.913	7.05	0.5
22	818	2.913	7	0.5
28	815	2.911	7.05	0.5
36	816.5	2.912	7.25	0.58
90	802	2.904	7.35	0.68
109	800	2.903	7.3	0.74

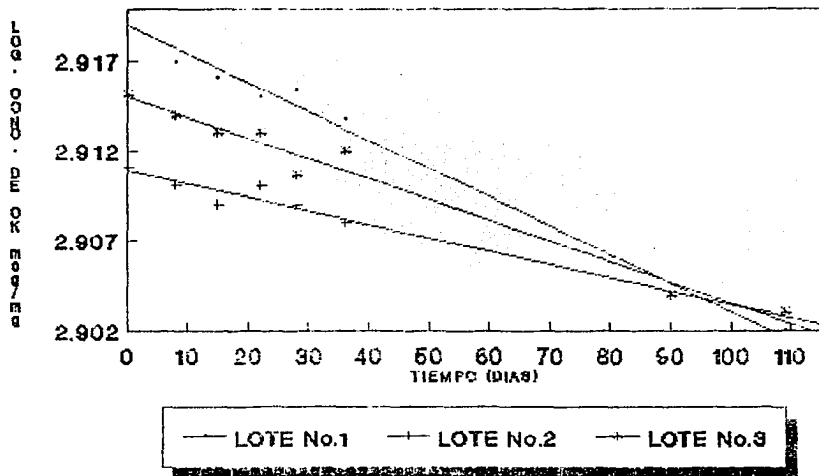
Salida de Regresión:	
Constante	2.9150183
Err Std de Y Est	0.0007011
R al Cuadrado	0.9797844
N: de Observaciones	8
Grados de Libertad	6
Coficiente(s) $\lambda$	-0.00011
Err Std de Coef.	6.7E-06

$m = -1E-04$   
 $K = 0.0003$   
 $r = 0.9898$

Promedio de las K's a 5 °C = 2.6330E-4

ESTABILIDAD DEL CLAVULANATO  
TEMPERATURA 5C

GRAFICA No. 2



ESTABILIDAD DEL CLAVULANATO 25 °C

LOTE 1				
TIEMPO (DIAS)	CONCENTRACION ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	LOG.CONC. ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	pH	%Humedad
0	831	2.92	6.7	0.1
1	822	2.915	6.9	0.1
2	822	2.915	6.95	0.25
3	820	2.914	6.9	0.6
15	818	2.913	6.9	0.6
18	816.5	2.912	7.05	0.81
39	809	2.908	7.1	0.84
85	782	2.893	7.1	0.96
109	769	2.886	7.05	1.5

Salida de Regresión:	
Constante	2.916852
Err Std de Y Est	0.001796
R al Cuadrado	0.978002
N: de Observaciones	9
Grados de Libertad	7
Coeficiente(s) :-0.00028	
Err Std de Coef.0.000016	
m = -3E-04	
K = 0.0006	
r = 0.9889	

LOTE 2				
TIEMPO (DIAS)	CONCENTRACION ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	LOG.CONC. ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	pH	%Humedad
0	814	2.911	6.75	0.2
1	807	2.907	6.65	0.18
2	811	2.909	6.7	0.48
15	802	2.904	6.85	0.6
18	802	2.904	6.95	0.8
32	798	2.902	6.9	0.97
39	794	2.9	6.95	1.18
49	785	2.895	7.05	1.28
70	780	2.892	7.1	1.35
109	764	2.883	7.05	1.6

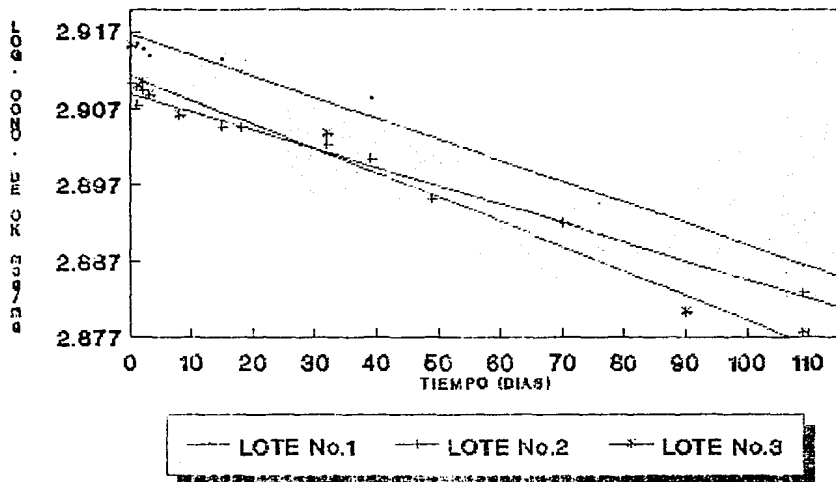
Salida de Regresión:	
Constante	2.908793
Err Std de Y Est	0.001357
R al Cuadrado	0.977697
N: de Observaciones	10
Grados de Libertad	8
Coeficiente(s) :-0.00024	
Err Std de Coef.0.000013	
m = 0.0002	
K = 0.0006	
r = 0.9888	

LOTE 3				
TIEMPO (DIAS)	CONCENTRACION ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	LOG.CONC. ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	pH	%Humedad
0	822	2.915	6.9	0.5
8	813	2.91	7	0.51
2	813	2.91	7.1	0.56
3	811	2.909	7.1	0.54
8	805	2.906	7.05	0.9
32	802	2.904	7.2	1.1
90	758.5	2.88	7.3	1.2
109	755	2.878	7.3	1.1

Salida de Regresión:	
Constante	2.911271
Err Std de Y Est	0.002638
R al Cuadrado	0.970669
N: de Observaciones	8
Grados de Libertad	6
Coeficiente(s) :-0.00032	
Err Std de Coef.0.000023	
m = -3E-04	
K = 0.0007	
r = 0.9852	

Promedio de las K's a 25 °C = 6.448E-4

ESTABILIDAD DEL CLAVULANATO  
TEMPERATURA 25C  
GRAFICA No.3





ESTABILIDAD DEL CLAVULANATO 34 °C

LOTE 1				
TIEMPO (DI)	CONCENTRACION ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	LOG CONC ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	pH	% Húmedad
0	831	2.9196	6.7	0.1
1	817.5	2.9125	6.85	0.12
2	822	2.9149	6.8	0.21
3	812	2.9098	6.95	0.54
15	809	2.9082	6.9	0.6
18	804	2.9053	6.95	0.74
39	788	2.8968	7.05	0.97
60	778.5	2.8913	7.1	1.1
90	750.5	2.8754	7.05	1.36
109	743	2.871	7.1	1.5

Salida de Regresión:	
Constante	2.91436092
Err Std de Y Est	0.00264762
R al Cuadrado	0.97742009
N: de Observaciones	10
Grados de Libertad	8
Coficiente(s) X	-0.0004119
Err Std de Coef.	0.00002213
m =	0.00041
K =	0.0009442
r =	0.9886

LOTE 2				
TIEMPO (DI)	CONCENTRACION ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	LOG CONC ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	pH	% Húmedad
0	814	2.9104	6.75	0.2
1	808	2.9074	6.65	0.6
2	809	2.9079	6.8	0.66
3	798.5	2.9023	6.95	1.17
18	773	2.8882	6.95	1.22
39	753.5	2.8771	7	1.35
60	731	2.8642	7	1.34
85	716	2.8552	7.1	1.6
90	707	2.8497	7.05	1.8
109	701	2.846	7.1	1.86

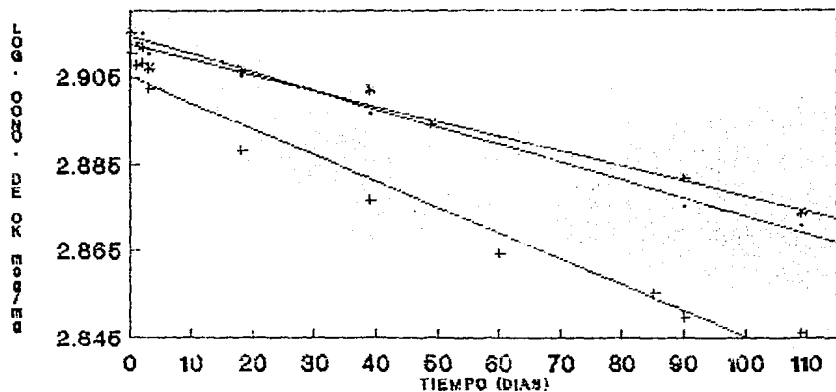
Salida de Regresión:	
Constante	2.90522517
Err Std de Y Est	0.00472324
R al Cuadrado	0.97004487
N: de Observaciones	10
Grados de Libertad	8
Coficiente(s) X	-0.0005991
Err Std de Coef.	0.00003722
m =	-0.006
K =	0.001382
r =	0.9849

LOTE 3				
TIEMPO (DI)	CONCENTRACION ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	LOG CONC ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	pH	% Húmedad
0	822	2.915	6.9	0.5
2	816	2.912	6.9	0.4
3	807	2.907	7.05	0.84
18	805	2.906	7	0.83
39	798	2.902	7.1	0.9
49	784.5	2.895	7.1	0.97
90	761.5	2.882	7.35	1.16
109	748	2.874	7.3	1.17

Salida de Regresión:	
Constante	2.91242486
Err Std de Y Est	0.00246499
R al Cuadrado	0.97531474
N: de Observaciones	8
Grados de Libertad	6
Coficiente(s) X	-0.0003432
Err Std de Coef.	0.00002229
m =	-0.00034
K =	0.000783
r =	9

Promedio de las K's a 34 °C = 1.036E-3

ESTABILIDAD DEL CLAVULANATO  
TEMPERATURA 34C  
GRAFICA No.4



— LOTE No.1    + LOTE No.2    x LOTE No.3

### ESTABILIDAD DEL CLAVULANATO 50 °C

LOTE 1				
TIEMPO (DIAS)	CONCENTRACION ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	LOG.CONC. ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	pH	% Húmedad
0	831	2.92	6.7	0.1
1	818	2.913	6.7	0.5
2	806.5	2.907	6.8	0.9
14	749.5	2.875	7.05	1.13
17	716	2.855	7.1	1.53
21	712	2.852	7.05	1.86
35	663	2.822	7.45	2.37
42	673	2.828	7.45	2.22
52	661	2.82	7.65	2.95
69	581	2.764	8.4	3
84	531.5	2.726	8.5	3.7
90	510.5	2.708	8.55	4.25
108	457.5	2.66	8.55	4.44

Salida de Regresión:	
Constante	2.910749
Err Std de Y Est	0.012114
R al Cuadrado	0.980233
N: de Observaciones	13
Grados de Libertad	11
Coefficiente(s) X	-0.00222
Err Std de Coef.	0.000095

$m = 0.00222$   
 $K = 0.005113$   
 $r = 0.9901$

LOTE 2				
TIEMPO (DIAS)	CONCENTRACION ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	LOG.CONC. ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	pH	% Húmedad
0	814	2.911	6.75	0.2
1	796.5	2.901	6.8	0.7
2	746	2.873	6.95	0.87
14	686	2.837	7	1.35
17	671	2.827	7.05	1.6
21	662.5	2.821	7.15	2.08
35	622	2.794	7.5	2.3
42	625	2.796	7.65	2.3
52	598	2.777	7.5	2.84
69	561	2.749	8.2	2.96
84	471	2.673	8.4	3.49
90	496	2.696	8.5	4.5
108	424	2.627	8.65	5.01

Salida de Regresión:	
Constante	2.88571
Err Std de Y Est	0.017843
R al Cuadrado	0.960817
N: de Observaciones	13
Grados de Libertad	11
Coefficiente(s) X	-0.0023
Err Std de Coef.	0.00014

$m = 0.0023$   
 $K = 0.005296$   
 $r = 0.9802$

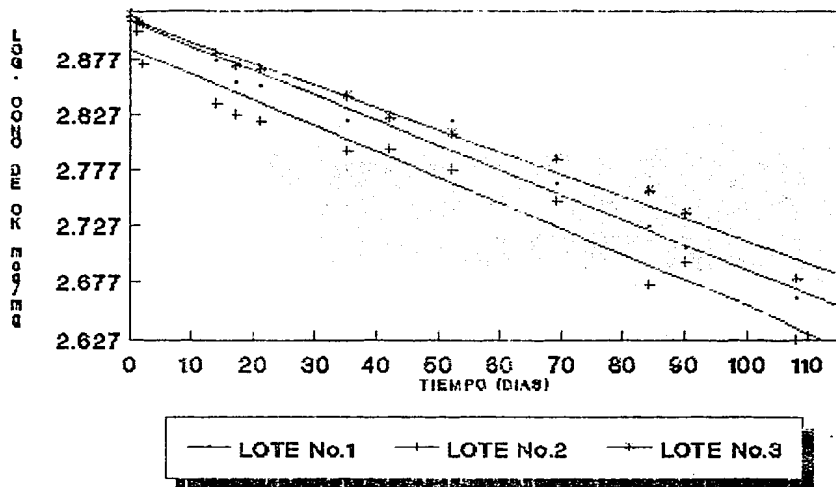
LOTE 3				
TIEMPO (DIAS)	CONCENTRACION ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	LOG.CONC. ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	pH	% Húmedad
0	822	2.915	6.9	0.5
1	814	2.911	6.9	0.5
2	807	2.907	7.05	0.6
14	762	2.882	7.05	0.9
17	743	2.871	7.1	1
21	737	2.868	7.3	1.03
35	695.5	2.842	7.55	1.3
42	667	2.824	7.55	1.4
52	645.5	2.81	7.8	1.8
69	611	2.786	8.1	2.41
84	573	2.758	8.3	3.34
90	547	2.738	8.4	3.76
108	477.5	2.679	8.55	4.45

Salida de Regresión:	
Constante	2.911754
Err Std de Y Est	0.008242
R al Cuadrado	0.988416
N: de Observaciones	13
Grados de Libertad	11
Coefficiente(s) X	-0.00198
Err Std de Coef.	0.000065

$m = 0.00198$   
 $K = 0.004559$   
 $r = 0.9942$

Promedio de las K's a 50 °C = 4.99E-3

ESTABILIDAD DEL CLAVULANATO  
TEMPERTATURA 50C  
GRAFICA No.5



## ESTUDIO DE ESTABILIDAD DEL CLAVULANATO

### Ecuación de Arrhenius

Con esta ecuación se pueden relacionar los valores obtenidos de las constantes con las temperaturas y obtener de esta manera la fecha de caducidad del Clavulanato de Potasio.

$$\log K = \log A - (E_a/R)(1/T)$$

$$y = b - mx$$

$$m = -E_a/2.303(R)$$

T (°K)	1/T (°K)	K	
		(PROMEDIO)	(PROMEDIO)
278	0.003597	0.000263	-8.23
298	0.003356	0.000645	-7.36
307	0.003257	0.001036	-6.88
323	0.003096	0.004989	-5.30

Salida de Regresión	
Pendiente	11.794751
Error estandar	0.4156952
R al cuadrado	0.9237693
Núm. de observaciones	4
Grados de libertad	2
Coficiente(s) en X	-5.632722
Error Std. de coeficiente	1.1441591

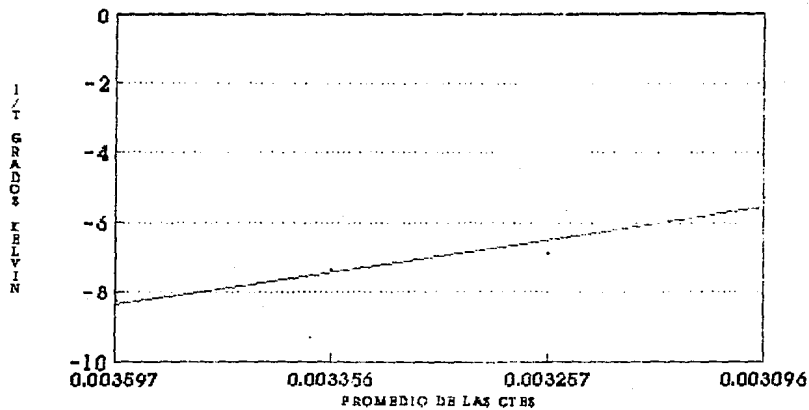
$$m = -5632.72$$

$$E_a = 2834.5$$

$$K \text{ a } 0^\circ\text{C} = 1.451\text{E-}4$$

$$T_{90} \text{ a } 0^\circ\text{C} = 1.98 \text{ AÑOS}$$

DET. FECHA DE CAD. DEL CK.  
GRAFICA No.6



— Series 1

## ANALISIS ESTADISTICO

De los datos obtenidos en el estudio de estabilidad acelerada del Clavulanato de Potasio (CK); existen valores que no se ajustan al modelo matemático desarrollado; que en este caso se trata de una línea recta con pendiente negativa, por lo cual estos valores tuvieron que descartarse; para tal efecto se realizó un análisis estadístico con el cual se puedan estudiar varias variables o poblaciones; por lo que se utilizó un análisis de varianza que es una técnica mediante la cual la variación total presente en un conjunto de datos se divide en varios componentes, cada una de las cuales tiene asociada una fuente de variación específica, de manera que en el análisis es posible conocer la magnitud de las contribuciones de cada fuente de variación a la variación total.

En este análisis estadístico tendremos que determinar el valor de una  $F_o$  (F Calculada) que se determina con los valores obtenidos en nuestro estudio; y comparándola con la  $F_T$  (F Teórica), la cual se obtiene directamente de tablas conociendo el valor de nuestros grados de libertad (g.l.) entre tratamientos y los g.l. de error residual.

Se plantearán una Hipótesis nula ( $H_o$ ) y una alternativa ( $H_1$ ); las cuales analizaremos de acuerdo al siguiente criterio de aceptación:

Si  $F_o < F_t$  se acepta  $H_o$

Si  $F_o > F_t$  se rechaza  $H_o$  y se acepta  $H_1$ .

A continuación se describen las fórmulas utilizadas:

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de Variación	Grados de libertad g. l.	Suma de cuadrados ( S C )	Varianza o cuadrados medios ( C M )	F Calc.	F Teórica
entre tratamientos	K - 1	$\sum_{j=1}^k \frac{k^2 \cdot j}{n_j} - \frac{x^2}{N} = SC_{trat}$	$M_{trat} = \frac{SC_{trat}}{k - 1}$	$F_{Calc} = \frac{CM_{trat}}{CM_{error}}$	$F_{teor} = F_{1-\alpha, k-j, N-K}$
del error	N - K	$\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} X^2_{ij} - \sum_{j=1}^k \frac{x^2 \cdot j}{n_j} = SC_{error}$	$CM_{error} = \frac{SC_{error}}{N - K}$		



## TABLA DE ANALISIS ESTADISTICO

TEMPERATURA : 5 grados

Ho = El modelo se ajusta adecuadamente a los datos  
 H1 = El modelo no se ajusta adecuadamente a los datos.

Criterio de aceptación :

Si  $F_o > F_t$  se acepta Ho.

VALORES DE Y DATOS TOMADOS			
Estadística de datos	L-1	L-2	L-3
	2.92	2.911	2.915
	2.917	2.91	2.914
	2.916	2.909	2.913
	2.915	2.91	2.913
	2.915	2.909	2.911
	2.914	2.908	2.912
	2.904	2.904	2.904
	2.902	2.903	2.903
N =	8	8	8
Suma =	23.303	23.264	23.285
Promed =	2.913	2.908	2.911

N =	24
Suma	69.852
Promed	2.911

Como  $F_o < F_t$  se acepta Ho

Grados de libertad g.l	Suma de cuadrados (SC)	Varianza ó cuadrados medios (CM)	F calc. (Fo)	Ft
3-1=2	203.30434-203.30425 = $9 \cdot 10^{-5}$	$9 \cdot 10^{-5} / 2 =$ $= 4.5 \cdot 10^{-5}$	0.16	3.47
24-3=21	203.31066-203.30434 = $= 6.32 \cdot 10^{-3}$	$6.32 \cdot 10^{-3} / 21 =$ $3.009 \cdot 10^{-4}$		

VALORES DE Y DATOS OBTENIDOS			
Estadística de datos	L-1	L-2	L-3
	2.92	2.911	2.915
	2.917	2.91	2.914
	2.916	2.909	2.913
	2.915	2.91	2.913
	2.915	2.909	2.911
	2.914	2.908	2.912
	2.915	2.911	2.917
	2.914	2.913	2.912
	2.906	2.898	2.905
	2.904	2.904	2.904
	2.902	2.903	2.903
N =	11	11	11
Suma =	32.038	31.986	32.019
Promed =	2.913	2.908	2.911

N =	33
Suma	96.043
Promed	2.91

Como  $F_o < F_t$  se acepta Ho

Grados de libertad g.l	Suma de cuadrados (SC)	Varianza ó cuadrados medios (CM)	F calc. (Fo)	Ft
2	$1.2 \cdot 10^{-4}$	$6 \cdot 10^{-5}$	2.56	3.32
32	$7.5 \cdot 10^{-4}$	$2.34 \cdot 10^{-5}$		

## TABLA DE ANALISIS ESTADISTICO

TEMPERATURA : 25 grados

Ho = El modelo se ajusta adecuadamente a los datos

H1 = El modelo no se ajusta adecuadamente a los datos.

Criterio de aceptación :

Si  $F_o < F_t$  se acepta Ho.

VALORES DE Y DATOS TOMADOS			
Estadís. de datos	L-1	L-2	L-3
	2.92	2.911	2.915
	2.915	2.907	2.91
	2.915	2.909	2.91
	2.914	2.904	2.909
	2.913	2.904	2.906
	2.912	2.902	2.904
	2.908	2.9	2.9
	2.893	2.895	2.88
	2.886	2.892	2.87
		2.883	
N =	9	10	9
Suma =	26.176	29.007	26.104
Promed =	3.739	3.626	3.263

N =	28
Suma	81.287
Promed	3.543

Como  $F_o < F_t$  se acepta Ho

Grados de libertad q.l	Suma de cuadrados (SC)	Varianza ó cuadrados medios (CM)	F calc. (Fo)	Ft
2	$3.8 \cdot 10^{-5}$	$1.925 \cdot 10^{-5}$	0.15	3.34
27	$3.54 \cdot 10^{-4}$	$1.31 \cdot 10^{-4}$		

VALORES DE Y DATOS OBTENIDOS			
Estadís. de datos	L-1	L-2	L-3
	2.92	2.911	2.915
	2.915	2.907	2.91
	2.915	2.909	2.91
	2.914	2.904	2.909
	2.913	2.904	2.91
	2.913	2.902	2.904
	2.908	2.9	2.908
	2.908	2.895	2.91
	2.904	2.892	2.9
	2.893	2.881	2.892
	2.886	2.88	2.88
	2.886	2.883	2.878
N =	12	12	12
Suma =	34.885	34.768	34.826
Promed =	2.907	2.897	2.902

N =	36
Suma	104.48
Promed	2.902

Grados de libertad q.l	Suma de cuadrados (SC)	Varianza ó cuadrados medios (CM)	F calc. (Fo)	Ft
2	$5.7 \cdot 10^{-4}$	$2.85 \cdot 10^{-4}$	2.38	3.23
35	$4.21 \cdot 10^{-3}$	$1.20 \cdot 10^{-4}$		

Como  $F_o < F_t$  se acepta Ho

## TABLA DE ANALISIS ESTADISTICO

TEMPERATURA : 34 grados

Ho = El modelo se ajusta adecuadamente a los datos

H1 = El modelo no se ajusta adecuadamente a los datos.

Criterio de aceptación :

Si  $F_o < F_t$  se acepta Ho.

VALORES DE Y DATOS TOMADOS			
Estadís. de datos	L-1	L-2	L-3
	2.92	2.91	2.915
	2.913	2.907	2.912
	2.915	2.908	2.907
	2.91	2.902	2.906
	2.908	2.898	2.902
	2.905	2.877	2.895
	2.897	2.864	2.882
	2.891	2.855	2.874
	2.875	2.85	
	2.871	2.846	
N =	10	10	8
Suma =	29.005	28.807	23.193
Promed =	2.9005	2.8807	2.8991

N =	28
Suma	81.005
Promed	2.8934

Grados de libertad g!	Suma de cuadrados (SC)	Varianza ó cuadrados medios (CM)	F calc. (Fo)	Ft
2	2.37*10 <sup>-3</sup>	1.185*10 <sup>-3</sup>	3.23	3.34
27	9.92*10 <sup>-3</sup>	3.67*10 <sup>-4</sup>		

Como  $F_o < F_t$  se acepta Ho

VALORES DE Y DATOS OBTENIDOS			
Estadís. de datos	L-1	L-2	L-3
	2.92	2.91	2.915
	2.913	2.907	2.908
	2.915	2.908	2.912
	2.91	2.902	2.907
	2.908	2.897	2.901
	2.905	2.888	2.906
	2.897	2.877	2.902
	2.902	2.879	2.895
	2.891	2.864	2.9
	2.87	2.855	2.878
	2.875	2.85	2.882
	2.871	2.846	2.874
N =	12	12	12
Suma =	34.777	34.583	34.78
Promed =	2.898	2.882	2.898

N =	36
Suma	104.14
Promed	2.893

Grados de libertad g!	Suma de cuadrados (SC)	Varianza ó cuadrados medios (CM)	F calc. (Fo)	Ft
2	2.12*10 <sup>-3</sup>	1.06*10 <sup>-3</sup>	3.39	3.23
37	0.01155	3.12*10 <sup>-4</sup>		

Como  $F_o > F_t$  se rechaza Ho y se acepta H1

## TABLA DE ANALISIS ESTADISTICO

TEMPERATURA : 50 grados

Ho = El modelo se ajusta adecuadamente a los datos

H1 = El modelo no se ajusta adecuadamente a los datos.

Criterio de aceptación :

Si  $F_o > F_t$  se acepta Ho.

VALORES DE Y DATOS TOMADOS			
Estadis. de datos	L-1	L-2	L-3
	2.92	2.911	2.915
	2.913	2.901	2.911
	2.907	2.873	2.907
	2.875	2.837	2.882
	2.855	2.827	2.871
	2.852	2.821	2.868
	2.822	2.794	2.842
	2.828	2.796	2.824
	2.825	2.777	2.81
	2.764	2.749	2.786
	2.726	2.673	2.758
	2.708	2.696	2.738
	2.66	2.627	2.679
N =	13	13	13
Suma =	36.65	36.282	36.791
Promed =	2.819	2.791	2.83

N =	39
Suma	109.72
Promed	2.813

Como  $F_o < F_t$  se acepta Ho

VALORES DE Y DATOS OBTENIDOS			
Estadis. de datos	L-1	L-2	L-3
	2.92	2.911	2.915
	2.913	2.901	2.911
	2.907	2.873	2.907
	2.885	2.851	2.888
	2.858	2.821	2.885
	2.868	2.836	2.872
	2.875	2.837	2.882
	2.855	2.827	2.871
	2.852	2.821	2.868
	2.822	2.794	2.842
	2.828	2.796	2.824
	2.825	2.777	2.81
	2.764	2.749	2.786
	2.726	2.673	2.758
	2.708	2.696	2.738
	2.66	2.627	2.679
N =	16	16	16
Suma =	45.261	44.804	45.436
Promed =	2.829	2.8	2.84

N =	48
Suma	135.5
Promed	2.823

Grados de libertad gl	Suma de cuadrados (SC)	Varianza ó cuadrados medios (CM)	F calc. (Fo)	Ft
2	0.01063	5.315*10 <sup>-3</sup>	0.86	3.23
38	0.23555	6.199*10 <sup>-3</sup>		

Grados de libertad gl	Suma de cuadrados (SC)	Varianza ó cuadrados medios (CM)	F calc. (Fo)	Ft
2	0.01331	6.655*10 <sup>-3</sup>	1.78	3.23
47	0.17593	3.743*10 <sup>-3</sup>		

Como  $F_o < F_t$  se acepta Ho

**EJEMPLO DE LOS CALCULOS REALIZADOS EN EL ANALISIS ESTADISTICO  
CON LOS DATOS TOMADOS A UNA TEMPERATURA DE 5 GRADOS**

**Suma de Cuadrados (SC)**

$$\begin{aligned} \text{SC del error entre} &= \frac{(23.303)^2}{8} + \frac{(23.214)^2}{8} + \frac{(23.285)^2}{8} - \frac{(69.852)^2}{24} \\ \text{tratamientos} &= 203.30434 - 203.30425 \\ &= 9 \times 10^{-5} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{SC del error} &= [(2.92)^2 + (2.917)^2 + \dots + (2.904)^2 + (2.903)^2] - \left[ \frac{(23.303)^2}{8} + \right. \\ &\quad \left. + \frac{(23.214)^2}{8} + \frac{(23.285)^2}{8} \right] \\ &= 203.31066 - 203.30434 \\ &= 6.41 \times 10^{-3} \end{aligned}$$

**Varianza o Cuadrados Medios (CM)**

$$\text{SM del error entre} = \frac{90 \times 10^{-5}}{2} = 4.5 \times 10^{-5}$$

tratamientos

$$\text{SM del error} = \frac{6.32 \times 10^{-3}}{21} = 3.009 \times 10^{-4}$$

$$\text{F calc} = \frac{4.5 \times 10^{-5}}{3.009 \times 10^{-4}} = 0.150$$

## CAPITULO V

## DISCUSION

Uno de los objetivos de este trabajo fue validar el método utilizado para la cuantificación del Clavulanato de Potasio como materia prima, el cual se encuentra referido en la U.S.P. XXII.

Los puntos considerados para la validación fueron los siguientes: Precisión, repetibilidad, reproducibilidad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, tolerancia y especificidad, solo para el sistema, ya que se trataba de una validación de un antibiótico que es vendido como materia prima, por lo tanto, no se tiene placebo para realizar algunos puntos de la validación, como por ejemplo la linealidad del método.

De los parámetros analizados se obtuvieron resultados satisfactorios; ya que en aquellos en los cuales se determinó su coeficiente de variación se encontraron dentro de límites especificados por la U.S.P. XXII.

Se tiene una buena reproducibilidad en los datos obtenidos, ya que las áreas que en este caso se toman como adimensionales, concuerdan de un día a otro y entre diferentes analistas. Por lo tanto, los coeficientes de variación obtenidos son aceptables.

Para demostrar la especificidad se tuvo que variar la polaridad de la fase móvil, de donde se observa en todos los cromatogramas la aparición de tres señales, una debida al blanco, otra a nuestra molécula intacta (CK) y otra correspondiente al producto de degradación; al realizar una Cromatografía en capa fina, solo se observan dos manchas, una correspondiente al CK y otra al producto de degradación. (Fig. K, P).

Al agregar metanol al buffer pH 4.4, los picos se juntan (Fig. J), esto se debe probablemente a que el producto de degradación es más polar que la molécula intacta y esto se comprueba al observar que al diluir el buffer con agua era mejor la separación de los picos. (Fig. J).

Otro de los objetivos fue determinar la cinética de degradación y la fecha de caducidad del Clavulanato de Potasio; con respecto a los datos obtenidos en la estabilidad, el compuesto analizado sigue una cinética de degradación de primer orden. Esto pudo demostrarse al analizar tres lotes diferentes a cuatro diferentes temperaturas durante un tiempo de 109 días, analizándose las muestras por lo menos cada ocho días para observar de qué forma afectaba la temperatura en la degradación del producto.

Se realizaron las siguientes determinaciones a las muestras, a las distintas temperaturas, título cromatográfico, pH y humedad para seguir el comportamiento de nuestro producto, de donde se observó que al transcurrir el tiempo, tanto la humedad como el pH iban en aumento, mientras disminuía el título químico, esto se debe probablemente al mecanismo de degradación que se lleve a cabo, el cual es totalmente desconocido hasta ahora.

De los datos obtenidos se construyó una gráfica de la cual algunos puntos no entraban dentro de la misma, por lo tanto se tuvieron que descartar, pero realizando un análisis estadístico para demostrar que estos puntos eran erróneos. (14).

Se realizó un análisis de varianza en el cual se tuvo que realizar una comparación entre todos los datos obtenidos en el estudio de estabilidad y los que se tomaron en cuenta para realizar las gráficas correspondientes al orden de reacción y determinar la fecha de caducidad.

De este análisis se puede observar que las F calculadas en los datos tomados son menores que en los datos obtenidos, de esta manera se puede demostrar que los resultados descartados para el análisis se deben probablemente a errores experimentales.



En las gráficas realizadas para las diferentes temperaturas se obtuvieron coeficientes de determinación ( $r^2$ ) de 0.97 y 0.98.

En el análisis para determinar la fecha de caducidad, utilizando la ecuación de Arrhenius, se realizó un promedio de las K's obtenidas a las distintas temperaturas y este valor fue el que se tomó para graficar nuestros datos.

## CONCLUSIONES

Dentro de los parámetros de la validación como son las precisión, reproducibilidad, repetibilidad y límite de cuantificación, se obtuvieron coeficientes de variación menores al 1.5% establecido en la U.S.P. XXII.

Para el límite de detección se determinó un coeficiente de variación menor al 2%, establecido por los Laboratorios Femic.

Para la linealidad se obtuvo una línea recta con un coeficiente de correlación de 0.999, un coeficiente de determinación mayor a 0.98 y una pendiente muy cercana a 1.

Para la especificidad y tolerancia se procedió a cambiar la polaridad de la fase móvil y tipo de columna, demostrando de esta manera que el método es específico y tolerable.

En el estudio de estabilidad se encontró que el Clavulanato de Potasio sigue una cinética de degradación de primer orden y una fecha de caducidad de un año con once meses a 5 grados centígrados en las condiciones en las cuales el producto es distribuido y almacenado hasta su uso.

## APENDICE

INTERCEPTO (b) =  $Y - mX$

$$\text{DESVIACION ESTANDAR (DE)} = \frac{\Sigma(X-\bar{X})^2}{n-1}$$

$$\text{MEDIA ARITMETICA } (\bar{X}) = \frac{\Sigma X_i}{n}$$

$$\text{COEFICIENTE DE VARIACION (CV)} = \frac{\text{DE}}{\bar{X}} \cdot 100$$

COEFICIENTE DE CORRELACION (r)

$$r = \frac{n\Sigma XY - \Sigma X \Sigma Y}{\{[n\Sigma X^2 - (\Sigma X)^2] [n\Sigma Y^2 - (\Sigma Y)^2]\}^{1/2}}$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION ( $r^2$ )

$$r^2 = \frac{(n\Sigma XY - \Sigma X \Sigma Y)^2}{[n\Sigma X^2 - (\Sigma X)^2] [n\Sigma Y^2 - (\Sigma Y)^2]}$$

$$\text{PENDIENTE (m)} = \frac{n\Sigma XY - \Sigma X \Sigma Y}{n\Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}$$

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- CISNEROS, R.M; "ESTUDIOS DE UN METODO ANALITICO PARA EVALUAR LA ESTABILIDAD DEL SALBUTAMOL, JARABE"; UNAM, 1984 (TESIS).
- 2.- CASTILLO, M.E; "ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE ACIDO d-2 (6-METOXI-2-NAFTIL) PROPIONICO EN TABLETAS"; UNAM, (TESIS).
- 3.- GUERRA, R.D; "DESARROLLO Y ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE DOS FORMULACIONES DE SALES DE REHIDRATACION ORAL EN DOS TIPOS DE MATERIAL DE EMPAQUE"; UNAM, 1987 (TESIS).
- 4.- VALIDACION DE METODOS ANALITICOS; COMITE DE ELABORACION DE GUIAS OFICIALES DE VALIDACION DE LA DIRECCION GENERAL DE CONTROL DE INSUMOS PARA LA SALUD. SSA.
- 5.- REQUISITOS PARA EL TRAMITE DE REGISTRO SANITARIO DE MEDICAMENTOS EN MEXICO. 1990. SECRETARIA DE SALUD. CAMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA FARMACEUTICA.
- 6.- NORMA ETHEL SBARBATI DE NUDELMAN. "ESTABILIDAD DE MEDICAMENTOS". DEP. DE QUIMICA ORGANICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.
- 7.- CHANG RAYMUNDO. "FISICOQUIMICA CON APLICACIONES A SISTEMAS BIOLOGICOS" MEXICO 1986, 2a EDICION. EDITORIAL C.E.C.S.A.
- 8.- CHEM. PHARM. BULL. 29 (11) 3334-3341. (1981). "STABILITY OF CLAVULANIC ACID IN AQUEOUS SOLUTIONS". JUN HAGNAKA, TERUCHIMI NAKAHUAMA AND TOGOTO UNO.

9.- MARTINDALE. THE EXTRA PHARMACOPEIA. TWENTY-EIGHT EDITION. EDITED BY THE JAMES E.F.REYNOLDS. LONDON THE PHARMACEUTICAL PRESS. 1982.

10.- CHEM. PHARM. BULL. 33 (1) 218-224. (1985). "DEGRADATION OF CLAVULANIC ACID IN AQUEOUS ALKALINE SOLUTION: ISOLATION AND STRUCTURAL INVESTIGATION OF DEGRADATION PRODUCTS". JUN HAGINAKA, HIROYUHI YASUDA, TOYOZO UNO AND TERUMICHI NAKAGAWA.

11.- J. CHEM. SOC. PERKIN TRANS I. 1345-1349. 1984 "STUDIES ON THE HYDROLYSIS OF CLAVULANIC ACID". MALCOM J. FINN, MICHAEL A HARRIS, ERIC HUNT AND ISKANDER I. ZOMAYA.

12.- THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. UNITED STATES PHARMACEUTICAL CONVENTION, INC, 1989.

13.- H. ENGELHARDT. "PRACTICE OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY". SPRINGER-VERLAG BERLIN-HEIDELBERG, 1986. PRINTED IN GERMANY.

14.- PROBABILIDAD Y ESTADISTICA PARA CIENCIAS QUIMICO-BIOLÓGICAS. M.A. MARIA JOSE MARQUES DE CANTU. UNIVERSITY OF MARYLAND, U.S.A. PROF. DE MATEMÁTICAS I Y II Y BIOESTADÍSTICA, E.N.E.P. ZARAGOZA, UNAM. PRIMERA EDICION, MEXICO, 1988.