

93  
21



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

"DESARROLLO DE METODOS ANALITICOS PARA  
CUANTIFICAR POR CLAR, AMOXICILINA  
TRIHIDRATADA, CLAVULANATO DE POTASIO Y  
CLORHIDRATO DE AMBROXOL EN UNA  
PREFORMULACION DE UN POLVO PARA  
SUSPENSION"

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

**P R E S E N T A :**

**ARACELI SANCHEZ CONTRERAS**

MEXICO, D. F.

1997

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: Profra. Mora-Tovar Y Chávez Rosa Lorenia

Vocal: Profra. Ayala Mondragón Consuelo

Secretario: Profra. Enriquez Mendoza María Cristina

1er. Suplente: Profra. Maya Ruiz Georgina Margarita

2do. Suplente: Profr. Rodríguez Juan Manuel

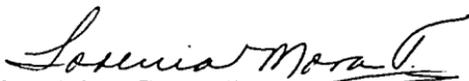
**Sitio donde se desarrollo el tema:**

Productos Científicos S.A. de C.V., Laboratorios Carnot

Nicolás San Juan 1046, Méx. D.F. C.P. 03100

Teléfono: 559 - 09 - 00

Asesor del tema:



Q.F.B. Rosa Lorenia Mora Tovar y Chávez

SUPERVISOR técnico:



Q.F.B. Maria Adriana Rendón Madrid

Sustentante:



Araceli Sánchez Contreras

Agradezco atentamente a **Productos Científicos Laboratorios Carnot S.A.**, por su colaboración permitiendo que la realización de estos estudios se llevara a cabo en sus instalaciones, en especial agradezco al **Ing. Jorge Gay Molina** por el apoyo que siempre ha brindado a nuestra Facultad. También doy las gracias a la Gerente de Garantía de Calidad la **Química Dalila Peña** y a la Subgerente de Garantía de Calidad la **Química Felicitas Gutiérrez** por su ayuda y accesibilidad.

## **A DIOS**

Gracias te doy Dios mio por haberme dado la vida, por la salud que he disfrutado, por permitirme conocer gente tan maravillosa y por haberme dado la oportunidad de ser tan feliz como lo soy.

#### **A MIS PADRES**

Gracias por todos los sacrificios que realizaron para que pudiera terminar mi carrera y por las palabras de apoyo que siempre me brindaron, ésto se los agradeceré toda la vida.

#### **A MIS HERMANOS**

Ana Karen y Oscar, les doy las gracias por su apoyo, cariño y paciencia, los quiero mucho.

#### **A LUIS**

Al amor de mi vida le agradezco por haber estado a mi lado siempre que lo necesitaba, brindándome apoyo, comprensión y amor

#### **AL DEPARTAMENTO DE CONTROL DE ANALITICO**

A las maestras Ma. Luisa, Cristy, Chelo, Gina, Isaura y Tere les agradezco infinitamente las enseñanzas, consejos y palabras de aliento que me ayudaron a superar muchos obstáculos, en especial quiero agradecer a la maestra Lorenia por dirigir esta Tesis y ser tan paciente y comprensiva conmigo. Gracias a todas por el cariño y la amistad que me han brindado.

#### **AL DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD DE CARNOT**

A mis compañeras Marta Elena, Ofé, Marta García y Paty les agradezco que me hayan aceptado y brindado su amistad, gracias por enseñarme a trabajar con dedicación. Especialmente quiero agradecerle a Adriana por todo lo que me enseñó, por la paciencia que siempre me tuvo y por la amistad incondicional que me brindó, nunca olvidaré todo esto.

### **A MIS MAESTROS**

A los profesores que de alguna forma fomentaron en mí el gusto por el estudio y por mi profesión.

### **A MIS FAMILIARES**

A aquellos que tuvieron confianza en mí, a aquellos que siempre me brindaron su apoyo y cariño, y especialmente a Vicky, quien además de todo, me ayudó muchísimo en la realización de esta Tesis, gracias por tu tiempo y cariño.

### **A MIS AMIGOS**

A todos mis amigos que siempre han estado a mi lado y me han apoyado en todo momento, las gracias les doy por ese cariño y amistad. Especialmente gracias a Jaqueline (mi mejor amiga), Moníca, Rocío, Yalim, Sandra, Diana, Iliana, Ingrid y a mis hijas Mayra, Laura y Ceci. Gracias a todas, las quiero mucho.

<b>CONTENIDO</b>	<b>PAGINA</b>
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	3
III. GENERALIDADES	
III.1 Antibioticos b-lactamicos	4
III.2 Agentes Mucoliticos y Expectorantes	8
III.3 Monografia de Amoxicilina Trihidratada	9
III.4 Monografia de Clavulanato de Potasio	15
III.5 Monografia de Clorhidrato de Ambroxol	21
III.6 Preformulacion	26
III.7 Suspensiones	31
III.8 Cromatografia de Liquidos de Alta Resolucion	35
III.9 Validacion de Metodos Analiticos	43
IV. PARTE EXPERIMENTAL	
IV.1 Desarrollo de la preformulacion	50
IV.2 Desarrollo del metodo analitico para cuantificar amoxicilina trihidratada y clavulanato de potasio	53
IV.3 Pruebas preliminares de validacion del metodo analitico para cuantificar amoxicilina trihidratada y clavulanato de potasio	57
IV.4 Desarrollo del metodo analitico para cuantificar clorhidrato de ambroxol	59
IV.5 Pruebas preliminares de validacion del metodo analitico para cuantificar clorhidrato de ambroxol	63
V. RESULTADOS	
V.1 Preformulacion	65
V.2 Metodo analitico para cuantificar amoxicilina trihidratada y clavulanato de potasio en la suspension desarrollada	69
V.3 Metodo analitico para cuantificar clorhidrato de ambroxol en la suspension desarrollada	81
VI. CONCLUSIONES	
VI.1 Respecto a la preformulacion	89
VI.2 Respecto a los metodos analiticos desarrollados	89
VII. ANEXO I	93
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	103

## I. INTRODUCCION

El problema de las bacterias resistentes a antibióticos se ha conocido por largo tiempo, pero el inapropiado uso de antibióticos en los años recientes, ha provocado un incremento significativo en la prevalencia de cepas resistentes a los antibióticos.

La combinación de Acido Clavulámico y Amoxicilina, ha sido seleccionada porque las propiedades farmacocinéticas de ambas sustancias son muy similares, permitiendo que el Acido Clavulámico inhiba a las  $\beta$ -lactamasas y así la Amoxicilina actúa efectivamente contra las bacterias.

El Control de Calidad de los medicamentos ha tomado suma importancia hoy en día, por lo que se cuenta con varias herramientas para el aseguramiento de la calidad, tales como Buenas Prácticas de Manufactura, Buenas Prácticas de Laboratorio y validaciones de los procesos y métodos analíticos.

Para la cuantificación de los principios activos en un medicamento, se debe contar con métodos analíticos que permitan la obtención de resultados confiables. La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es una de las herramientas que nos proveen este tipo de resultados.

La validación de métodos analíticos permite conocer sobre que margen de error se está trabajando y como controlar dicho error, exige un número de requisitos que se deben cumplir durante la fabricación y control y verifica, en forma documentada, que la metodología propuesta esté basada en principios científicos adecuados y que cumpla con los propósitos prácticos de medición para los cuales ha sido optimizada.

Así la validación de los métodos analíticos para la cuantificación de los principios activos en un medicamento, es indispensable para garantizar la confiabilidad del método y esta a su vez para garantizar la calidad del medicamento.

Los métodos analíticos descritos en Farmacopeas tales como la FEUM, USP, BP, NF, entre otras, requieren solamente verificar la adaptabilidad del método en las condiciones de operación del laboratorio, sin embargo se ha comprobado que los métodos comprendidos en dichas Farmacopeas no producen los mismos resultados en productos de diferentes formulaciones que contengan los mismos principios activos, por lo que indispensable la validación del método para cada producto.

En el presente trabajo se describen las pruebas preliminares realizadas para el desarrollo de la preformulación de un polvo para suspensión que contiene Amoxicilina, Clavulanato de Potasio y Clorhidrato de Ambroxol, el desarrollo de los métodos analíticos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para cuantificar dichos principios activos y la realización de algunas pruebas preliminares de evaluación de estos métodos.

La Amoxicilina es un agente antibacteriano de amplio espectro, el Ácido Clavulánico interacciona con las  $\beta$ -lactamasas permitiendo que la Amoxicilina cumpla su cometido, y el Ambroxol es un fármaco mucolítico y expectorante. El medicamento se encuentra en la forma farmacéutica de polvo para suspensión, con una dosificación de Amoxicilina trihidratada equivalente a 125 mg de Amoxicilina, Clavulanato de Potasio equivalente a 31.25 mg de Ácido Clavulánico y 15 mg de Ambroxol /5 mL de suspensión.

El desarrollo de la formulación se basó en las propiedades fisicoquímicas de los principios activos (inestabilidad e incompatibilidad entre los mismos y los excipientes), y en las necesidades del consumidor, ya que, como ya se mencionó, el uso indebido y excesivo de los antibióticos ha desarrollado cepas resistentes a estos, y se requiere en el mercado un medicamento que contenga el Ácido Clavulánico como potenciador de la Amoxicilina, y el Ambroxol para disminuir las molestias de la tos. En la preformulación desarrollada, para mejorar la estabilidad, se utilizó una sal del ácido clavulánico (clavulanato de potasio) que, dado el pH del estómago, fácilmente se transforma en el ácido.

El fundamento de la metodología seguida en el desarrollo de los métodos analíticos está basado en las propiedades fisicoquímicas de los principios activos; dado que la Amoxicilina y el Ácido Clavulánico tienen propiedades similares, en las mismas condiciones cromatográficas se pudieron obtener ambas valoraciones; sólo se trabajó en la optimización de las condiciones descritas en la U.S.P. 23 para una suspensión que contiene Amoxicilina y Ácido Clavulánico, en el caso del Ambroxol, no se tenía ninguna referencia, así que hubo que probar diversas condiciones, en las que se pudiera utilizar la misma muestra que para los otros dos principios activos.

Debido a que la estabilidad acelerada de la preformulación aun no ha sido probada, en esta tesis no se realizó la validación de los métodos analíticos desarrollados; sin embargo, se realizaron algunas pruebas preliminares de evaluación de los métodos.

## II. OBJETIVOS

- Realizar pruebas preliminares para el desarrollo de la preformulación de un medicamento (polvo para suspensión), que contenga:

<b>Principio Activo:</b>	<b>mg/Fco</b>
Amoxicilina trihidratada equivalente a de Amoxicilina base.	1500
Clavulanato de potasio equivalente a de Acido Clavulánico.	375
Clorhidrato de ambroxol	180

- Desarrollar un método analítico para cuantificar por CLAR amoxicilina trihidratada y clavulanato de potasio en la preformulación de polvo para suspensión desarrollada.
- Desarrollar un método analítico para cuantificar por CLAR clorhidrato de ambroxol en la preformulación de polvo para suspensión desarrollada.

### III. GENERALIDADES

#### III.1 Antibióticos $\beta$ -lactámicos <sup>(9)(10)(11)</sup>

##### ANTIBIOTICOS

Antibiótico es una sustancia derivada o producida por microorganismos que tienen la capacidad, a bajas concentraciones, de inhibir el desarrollo o de destruir bacterias y otros microorganismos. Los antibióticos que se producen sintéticamente, primeramente fueron producidos por microorganismos. Etimológicamente, antibiótico es algo que produce la destrucción de la vida.

Después del éxito de la penicilina, se ha tratado de aislar antibióticos de todos los microbios y se han descrito miles de sustancias activas antibacterianas, pero la inmensa mayoría no tiene importancia clínica porque son tóxicas o inactivas en el organismo; los antibióticos útiles son los que tienen acciones quimioterápicas (toxicidad selectiva).

El antibiótico ideal debe tener una acción antimicrobiana selectiva y potente sobre una amplia gama de microorganismos, debe ser bactericida, ha de ejercer su actividad antibacteriana en presencia de los líquidos del organismo y no ser destruido por las enzimas tisulares, no ha de perturbar las defensas del organismo ni dañar leucocitos o tejidos en las concentraciones necesarias, debe tener un índice quimioterápico conveniente y aún en las dosis máximas requeridas durante periodos muy prolongados no debe producir reacciones adversas de importancia y/o fenómenos de hipersensibilidad alérgica.

##### \* Mecanismos de acción

Algunas drogas son bacteriostáticas y otras son bactericidas. La bacteriostasis puede ser importante para la curación del proceso infeccioso al apoyar a las defensas del organismo para destruir los microorganismos al cesar su multiplicación; pero si las defensas son insuficientes o el tratamiento se interrumpe, la población bacteriana puede aumentar y producirse una recaída. La ventaja de emplear antibióticos bactericidas es que al destruir las bacterias, se hace fácil su eliminación con la ayuda de las defensas orgánicas.

## Son cuatro los mecanismos de acción de los antibióticos

1) Inhibición de la síntesis de la pared celular. El componente esencial de dicha pared es un mucopéptido, el peptidoglucano, cuya síntesis es impedida por el antibiótico por inhibición de los sistemas enzimáticos correspondientes; la droga se fija en la pared celular y cuando se produce la división de la bacteria, aparecen defectos en dicha pared, el microorganismo se hace osmóticamente sensible, penetra líquido en su interior, estalla y se lisa. Es así que actúan las penicilinas, cefalosporinas, bacitracina y cicloserina.

2) Lisis de la membrana celular. En esta forma se afectan importantes funciones celulares, pues en la membrana existen sistemas enzimáticos vitales, además de que rige la entrada y salida de los elementos nutritivos. La polymixina B, colistina, nistatina y anfotericina B actúan de ese modo.

3) Inhibición de la síntesis proteica. Algunos antibióticos bloquean los pasos necesarios para dicha síntesis, actuando sobre los ribosomas; en esta forma la vida de la bacteria queda afectada. Así actúan la tetraciclina, estreptomina, rifampicina, lincomicina, eritromicina y el cloranfenicol.

4) Inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos. La griseofulvina y el ácido nalidixico actúan inhibiendo la síntesis del ácido desoxirribonucleico.

### \* Resistencia microbiana a los antibióticos

La resistencia es adquirida, a diferencia de la susceptibilidad, por factores genéticos. Por métodos estadísticos y genéticos se ha demostrado que la resistencia bacteriana se debe a una mutación, es decir, un cambio genético producido por azar y generalmente transmitido por herencia y que aparece espontáneamente en una población heterogénea. El origen de la resistencia puede dar lugar a 2 tipos:

1) El tipo penicilina, que consiste en el desarrollo de resistencia gradualmente por pasos sucesivos; los pequeños grados de resistencia se deben a la mutación de un gen de baja potencia y los grados más altos se atribuyen a mutaciones adicionales de genes de igual potencia en sucesivas generaciones. Esta forma gradual o desarrollo acumulativo de resistencia la presentan las penicilinas, tetraciclinas y el cloranfenicol.

2) El tipo estreptomina, que se caracteriza por la aparición rápida de la resistencia, que puede ser intensa o no, lo que se atribuye a varios genes de potencia

variable, de manera que las mutaciones de un gen de baja potencia dan grados bajos de resistencia y los de alta potencia a una resistencia intensa. Esta forma facultativa o brusca en un solo paso es característica de la estreptomomicina e isomazida.

El material genético generador de la resistencia microbiana puede estar localizado en los cromosomas o fuera de ellos, lo que se refiere a:

a) Resistencia cromosómica: El ácido desoxirribonucleico está situado en los cromosomas bacterianos, y la mutación es una modificación espontánea de los genes, independiente del antibiótico y específica para un antibiótico o grupo de antibióticos. La transmisión del material genético se realiza por herencia y por división celular se forma una cepa resistente a la droga hasta dar lugar a un cultivo puro; así se produce la resistencia del *Mycobacterium tuberculosis* o bacilo de Koch a la estreptomomicina.

b) Resistencia extracromosómica: La resistencia a los principales antibióticos empleados en la medicina se produce generalmente, no a través de los cromosomas, sino que el ácido desoxirribonucleico responsable de la resistencia está contenido en partículas extracromosómicas, plásmidos o episomas situados en el citoplasma bacteriano. La transmisión de dicho material genético se efectúa por transducción y por transferencia por conjugación entre una bacteria y otra.

b.1) Transducción: Consiste en el pasaje de material genético de una bacteria resistente a una sensible por medio de un virus, el bacteriófago, que lo transporta de una célula a otra. Es el caso de los cocos grampositivos como el *Staphylococcus aureus*, en que la resistencia se transmite a través de un bacteriófago por un plásmido que tiene la propiedad de inducir la formación de  $\beta$ -lactamasa, enzima capaz de desdoblar e inactivar a la penicilina.

b.2) Transferencia por conjugación: Se efectúa entre 2 bacterias y consiste en el pasaje de material genético de una a la otra sin intermediario, pudiendo tratarse de microorganismos de la misma o de diferentes especies. En el caso de los bacilos gramnegativos, la transmisión se realiza a través de un plásmido denominado *Factor de resistencia* o *Factor R*, factor constituido por 2 componentes, el *Factor R determinante para la resistencia* y el *Factor de transferencia de resistencia* o *RIF* responsable de la transmisibilidad de la misma, siendo necesario la presencia de ambos para dar lugar al *Factor R*. En esta transmisión denominada también resistencia infecciosa, existe un tipo "masculino" o dador de

célula bacteriana que se conjuga con otro "femenino" o receptor y le transmite el *Factor R* a través de un puente citoplasmático, o sea, el material genético capaz de inducir la formación de enzimas que modifican antibióticos tales como gentamicina, cloranfenicol y sulfonamidas. Los plásmidos transmiten resistencia múltiple, así que es posible la transmisión de resistencia de cepas de *Shigella dysenteriae* a otras de *Escherichia coli* sensibles a dichas drogas

### III.2 Agentes Mucolíticos y Expectorantes <sup>(31, 69)</sup>

La tos es un mecanismo fisiológico útil que permite eliminar las sustancias extrañas y el exceso de secreciones de las vías respiratorias, por lo cual no debe ser suprimida en forma indiscriminada, sin embargo existen situaciones en las cuales la tos no cumple ningún propósito útil sino que solo molesta al paciente e impide su descanso. Cuando el moco está adherido y en grandes cantidades, la tos se vuelve excesivamente molesta y se requiere de una o varias sustancias medicinales que disminuyan la tos y la mucosidad.

Los agentes mucolíticos - expectorantes estimulan el transporte, reducen el estancamiento y normalizan la formación de las secreciones, disminuyendo así considerablemente la tos y la cantidad de esputo. Actúan intracelularmente promoviendo la producción de un moco normal, liberan y activan el epitelio ciliado aumentando su frecuencia vibrátil y estimulan la producción de surfactante en alvéolos y pequeños bronquiolos formando una película que recubre la pared interna de las vías respiratorias.

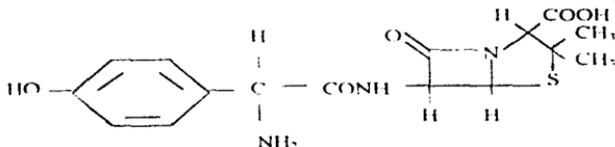
Dichos agentes se indican en procesos broncopulmonares en donde la viscosidad y adherencia del moco está aumentada, tales como bronquitis aguda o crónica, bronquitis asmática o espasmódica, asma, neumonía, broncopneumonia, rinitis, sinusitis y otitis media.

### III.3 Monografía de Amoxicilina Trihidratada

#### ESTRUCTURA QUÍMICA <sup>(22)</sup>

$C_{16}H_{19}N_3O_5 \cdot 3H_2O$

M.M. 419.46



#### NOMBRE QUÍMICO <sup>(14)</sup> <sup>(22)</sup> <sup>(23)</sup>

Trihidratado del ácido 2S-[2 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -6 $\beta$ (S\*)]] -6- [[amino(4-hidroxifenil)acetil] amino]-3, 3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3 2 0]heptano-2-carboxílico.

(6R)-6-( $\alpha$ -D-4-hidroxifenilglicilamino)ácido penicilínico trihidratado.

(2S,5R,6R)-6-[(R)-(-)-2-amino-2-(p-hidroxifenil)acetamido]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3 2 0]-heptano-2-ácido carboxílico trihidratado.

#### NOMBRE GENÉRICO

Amoxicilina trihidratada

#### NOMBRES REGISTRADOS <sup>(3)</sup>

Amoxicilina, Amoxifur, Amoxil, Amoxivet, Deniren, Hidramox, Moxicel, Penamox, Penamox T-5, Grunicina, Grunicina Distab

Amoxicilina en combinación con Clorhidrato de Ambroxol: Broxolamox, Sekretovit Amoxi

Amoxicilina en combinación con Clavulanato de Potasio: Amoksiklav, Augmentin, Clavulin

#### PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS <sup>(14)</sup> <sup>(22)</sup>

**Descripción:** Polvo cristalino blanco o casi blanco

**Solubilidad:** Soluble en soluciones diluidas de ácidos y álcalis; ligeramente soluble en agua metanol y etanol, insoluble en cloroformo, éter, tetracloruro de carbono, acetato de etilo, hexano, acetoneitrilo y benceno.

**Rotación Específica:**  $-246^{\circ}$  en una solución con concentración de 10mg/mL

**pH:** 3.5 - 6.0 (sol. al-0.2% p/v)

**Agua:** No menos de 11.5% y no más de 14.5% (Método de Karl Fisher).

## ENSAYOS DE IDENTIDAD

### A. Espectroscopía infrarroja

El espectro de absorción en la región infrarroja, de una dispersión en bromuro de potasio de la muestra previamente seca, exhibe máximos únicamente a las mismas longitudes de onda que una preparación similar de la sustancia de referencia de amoxicilina trihidratada.

### B. Cromatografía de líquidos de alta resolución

El cromatograma de la muestra obtenido en la valoración exhibe un pico principal de la amoxicilina, su tiempo de retención corresponde al exhibido en el cromatograma de la solución Patrón de Referencia obtenido en la valoración.

### C. Reacciones químicas

La solución que contenga amoxicilina (a una concentración aproximada de 2 mg/mL), exhibirá un color amarillo oscuro después de haberle adicionado 2 mL de una mezcla realizada con 2 mL de formaldehído al 34-37% p/v y 100 mL de ácido sulfúrico al 96% p/p y calentado en baño maría por 2 minutos.

## VALORACION <sup>(1) (2)</sup>

Contiene no menos del 90% y no más del 105% de amoxicilina, calculado en base anhidra.

### a) Método químico

Un método oficial se encuentra reportado en la U.S.P. 23, por cromatografía de líquidos de alta resolución fase reversa. El fundamento de esta metodología se basa en la migración diferencial que es resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil, dependiendo de la polaridad de dichos componentes, la fase inversa se usa para separar los componentes poco polares e involucra una fase estacionaria relativamente poco polar y una fase móvil muy polar, al salir de la columna, los componentes son conducidos (en el orden que emergieron) por la fase móvil hacia un detector, donde se registran sus concentraciones y sus tiempos de retención en la columna.

Las condiciones de trabajo son las siguientes: fase móvil = solución amortiguadora de fosfatos pH 5.0 - acetonitrilo (99:1), a una velocidad de flujo de 1.5 mL/min, detector UV a 230 nm, columna C18 de 4mm x 25 cm y un tamaño de poro de 3-10  $\mu$ m

### b) Método microbiológico

La valoración microbiológica se realiza por medio del método cilindro-placa. Dicho método, se basa en la difusión del antibiótico en una placa de agar adicionada de un cierto microorganismo, el cual registra una zona circular alrededor de un cilindro que contiene una solución del antibiótico.

En este método, se utiliza como microorganismo de prueba *Micrococcus luteus* ATCC 9341, se utiliza como disolvente una solución amortiguadora de fosfatos pH  $8.0 \pm 0.1$ .

## INDICACIONES TERAPEUTICAS <sup>(9,10)</sup>

La amoxicilina es una aminopenicilina semisintética con poder bactericida de amplio espectro, interfiere con la síntesis de la pared celular bacteriana originando una estructura defectuosa y osmóticamente inestable.

La amoxicilina se utiliza en el tratamiento de infecciones agudas y crónicas de las vías respiratorias superiores e inferiores (amigdalitis, faringitis, epiglotis, sinusitis, otitis media, bronquitis aguda o crónica agudizada), infecciones genitourinarias (pielonefritis, uretritis, vaginitis, gonorrea, servicitis, epididimitis, infección urinaria aguda no complicada, enfermedad inflamatoria pélvica).

infecciones entéricas, fiebre tifoidea, meningitis, infecciones de la piel y tejidos blandos, causados por bacterias Gram (+) y Gram (-) aerobios y anaerobios, como: *E. coli*, *H. influenzae*, *P. mirabilis*, *N. gonorrhoeae*, *S. aureus*, *Salmonella* spp y *Shigella* spp. Recientemente se ha comprobado su eficacia en asociación con metronidazol y sales de bismuto para úlceras pépticas o duodenales y gastritis crónica ocasionadas por *Helicobacter pylori*. En asociación con el ácido clavulánico, ha ampliado su espectro, ya que no hay degradación por  $\beta$ -lactamasas.

## FARMACOCINETICA <sup>(1)(2)</sup>

La amoxicilina se absorbe muy bien en el tracto gastrointestinal, en el orden del 98% de la dosis ingerida, por lo que se encuentra en altas concentraciones en plasma, tejidos y líquidos corporales. Dicha absorción no se altera con la ingestión de alimentos. Las mayores concentraciones tisulares guardan paralelismo con los altos niveles hemáticos. Los picos de concentración plasmática son de 2-2.5 veces mayores a los de ampicilina y se logran 1-2 horas después de la administración. Se une a proteínas plasmáticas en 17-20%. Pasa la barrera placentaria y se distribuye en la leche materna a bajas concentraciones. En su proceso de eliminación, la amoxicilina se incorpora en el círculo enterohepatohepático, logrando altas concentraciones en bilis, donde se recupera el 6.6% de la dosis administrada. Se elimina por filtración glomerular, excretándose como antibiótico activo por la orina. Después de la administración de una dosis por vía oral, se recupera en la orina de las primeras 6 horas, del 70 al 74% de la dosis administrada. La vida media es de 60-90 minutos.

## CONTRAINDICACIONES <sup>(3)</sup>

Su uso está contraindicado en pacientes con hipersensibilidad a cualquier  $\beta$ -lactámico y en pacientes con infecciones causadas por bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas.

## PRECAUCIONES <sup>(3)</sup>

Precaución si el paciente tiene historial alérgico. Los estudios realizados con altas dosis de amoxicilina, han demostrado que está libre de acción teratogénica, sin embargo, la seguridad de su uso durante el embarazo no se ha establecido. Debido a

su distribución, debe ser administrada con precaución durante la lactancia. No modifica la fertilidad

### **INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS <sup>(3)</sup>**

Con aminoglucosidos puede observarse sinergismo. El probencid aumenta la concentración plasmática y reduce la eliminación urinaria de amoxicilina. La cimetidina puede incrementar la absorción de amoxicilina, en tanto que la ranitidina no lo hace. Evítese el uso conjunto de antibióticos bacteriostáticos. No debe asociarse con el alopurinol por el riesgo de causar reacciones cutáneas. El ácido clavulánico potencia el efecto de la amoxicilina en infecciones por bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas. Junto con el ambroxol se logran mayores niveles del antibiótico en pulmones y secreción bronquial.

### **EFFECTOS SECUNDARIOS <sup>(3)</sup>**

El principal efecto tóxico de la amoxicilina es la irritación del Sistema Nervioso Central, una aplicación intratecal de altas dosis, puede incrementar los ataques epilépticos. Cuando se prolonga el tratamiento, puede producir efectos hepatotóxicos o nefrotóxicos.

Puede ocasionar reacciones alérgicas y erupciones cutáneas de diverso grado de severidad, eosinofilia, fiebre, angioedema, choque anafiláctico, elevación de las transaminasas glutámico oxaloacéticas (TGO) y de las transaminasas glutámico pirúvicas (TGP), náuseas, vómito, diarrea y colitis pseudomembranosa.

### **DOSIS Y VIA DE ADMINISTRACION <sup>(3)</sup>**

Vía de administración: Oral, Intramuscular e Intravenosa

Dosis:

- Adultos: 500 mg - 1000 mg cada 8 hrs.
- Niños: 250 mg - 500 mg cada 8 hrs.
- Ponderal: 20 - 40 mg/kg/día.

## PRESENTACIONES FARMACEUTICAS (3)

Tabletas	1000 mg
Cápsulas	500 mg
Polvo para suspensión	500 mg / 5 mL
Polvo para suspensión	250 mg / 5 mL
Polvo para suspensión	125 mg / 5 mL
Suspensión inyectable	500 mg
Suspensión inyectable	250 mg

Consérvase en un lugar fresco y seco.

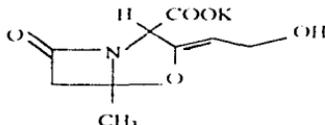
La suspensión reconstituida puede conservarse por 7 días a temperatura ambiente.

### III.4 Monografía de Clavulanato de Potasio

#### ESTRUCTURA QUÍMICA <sup>(22)</sup>

C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>KNO<sub>6</sub>

M.M. 237.25



#### NOMBRE QUÍMICO <sup>(22)</sup> <sup>(23)</sup>

4-Oxa-1-azabicyclo[3,2,0]heptano-2-ácido carboxílico-3-(2-hidroxiethylideno)-7-oxo-sal monopotásica[2R-( $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ )].

Potasio( $\alpha$ )-(2R,5R)-3-(2-hidroxiethylideno)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo[3,2,0]heptano-2-carboxilato.

#### NOMBRE GENÉRICO

Clavulanato de potasio

#### NOMBRES REGISTRADOS <sup>(3)</sup>

Clavulanato de Potasio en combinación con Amoxicilina: Amoksiklav, Augmentin, Clavulin

#### PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS <sup>(22)</sup>

**Descripción:** Polvo blanco o blanco opaco, modoro, sensible a la humedad, inestable en solución acuosa, estable a pH 6.0 - 6.3, se descompone en metanol.

**Solubilidad:** Fácilmente soluble en agua, soluble en metanol.

**pH:** 5.5 - 8.0 (sol 1 en 100).

**Agua:** No más de 1.5% (Método de Karl Fisher)

## ENSAYOS DE IDENTIDAD

### A. Cromatografía de líquidos de alta resolución

El cromatograma de la muestra obtenido en la valoración exhibe un pico principal del ácido clavulánico, su tiempo de retención corresponde al exhibido en el cromatograma de la Solución Patrón de Referencia obtenido en la valoración.

### B. Reacciones químicas

Las soluciones neutras de sales de potasio con SR de bitartrato de sodio producen un precipitado blanco cristalino, soluble en solución 6N de hidróxido de amonio y en soluciones de carbonatos y de hidróxidos alcalinos.

### VALORACION <sup>(23)</sup>

Contiene no menos de 75.5% y no más de 92% de Clavulanato de Potasio, calculado en base seca.

Un método oficial está el reportado en la U.S.P. <sup>23</sup>, por cromatografía de líquidos de alta resolución fase reversa. El fundamento de esta metodología se basa en la migración diferencial que es resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil, dependiendo de su polaridad; la fase inversa se usa para separar los componentes poco polares e involucra una fase estacionaria relativamente poco polar y fase móvil muy polar; al salir de la columna, los componentes son conducidos (en el orden que emergieron) por la fase móvil hacia un detector, donde se registran sus concentraciones y sus tiempos de retención en la columna.

Las condiciones de trabajo son las siguientes: fase móvil = solución amortiguadora de fosfatos pH 4.4 ; metanol (9:5), a una velocidad de flujo de 2mL/min; detector UV a 220 nm, columna C18 de 4mm x 30 cm y un tamaño de poro de 3-10 µm.

### INDICACIONES TERAPEUTICAS <sup>(3) (11) (15) (16)</sup>

En la preformulación de la suspensión se utilizó clavulanato de potasio, una sal del ácido clavulánico, que en el pH gástrico, se transforma en el ácido; cabe

mencionar que el ácido clavulámico es el que funciona como potenciador de la amoxicilina, por lo que nos enfocaremos en sus propiedades terapéuticas.

El ácido clavulámico es un metabolito de *Streptomyces clavuligerus*, descubierto en 1976. Aunque tiene estructura  $\beta$ -lactámica, no tiene actividad antibacteriana propia, sin embargo se utiliza como potenciador de la amoxicilina en el problema de bacterias resistentes porque actúa como un potente inhibidor competitivo irreversible de un amplio intervalo de  $\beta$ -lactamasas producidas por cepas bacterianas Gram (+) y Gram (-) aerobias y anaerobias, excepto las producidas por *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii*, *Enterobacter cloacae* y *Proteus vulgaris*.

El ácido clavulámico es altamente afín por la enzima, más que por el antibiótico coadministrado y forma un complejo estable inactivo con ella, protegiendo así a la amoxicilina de la degradación por  $\beta$ -lactamasas.

La combinación de amoxicilina-clavulanato de potasio suele emplearse en infecciones del tracto urinario (donde se ha demostrado que es superior al cotrimoxazol, ampicilina, cefalexina y amoxicilina, aun durante el embarazo y la niñez), infecciones del tracto respiratorio (bronquitis, bronquectasis, neumonía, enfisema y abscesos pulmonares, en cuyos casos resultó mejor que la penicilina y la amoxicilina), infecciones otorrinolaringológicas (incluyendo tonsilitis, otitis, faringitis, sinusitis y laringitis, donde se demostró su eficacia frente al cefalor), enfermedades e infecciones ligeras de tejido (abscesos, celulitis, furunculosis, etc.), infecciones ginecológicas y obstétricas (aborto en condiciones sépticas, endometritis, salpingitis, infecciones intrauterinas e infecciones pélvicas entre otras; y comparándose con la ampicilina, gentamicina y metronidazol, ha obtenido mejores resultados) y otras infecciones (profilaxis, infecciones postoperatorias, infecciones odontológicas y uretritis gonocócica).

Su espectro antimicrobiano en conjunto con la amoxicilina abarca: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Nocardia asteroides*, *Clostridium* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus ducreyi*, *Bordetella pertussis*, *Branhamella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides melanogogenicus*, *Campylobacter jejuni*, *Syngium* spp., *Streptococcus epidermidis*, entre otros.

## **FARMACOCINETICA (9) (11) (15) (16)**

Después de la administración oral, el ácido clavulánico es rápidamente absorbido por el tracto gastrointestinal. Sus propiedades farmacocinéticas son similares a las de la amoxicilina. La absorción de la amoxicilina no se afecta por la adición del ácido clavulánico, ni por la ingestión simultánea de alimentos. Ambos alcanzan su concentración máxima en plasma a los 45 minutos, su distribución en tejidos y órganos ha sido estudiada y se han encontrado altas concentraciones en plasma, esputo, secreciones bronquiales, efusión pleural, tejido pulmonar, próstata, fluido cerebrospinal, abscesos perianales, tejido adiposo y úlceras. Metabolitos de ácido clavulánico han sido encontrados en orina y en plasma. Su tiempo medio de eliminación es de 1 hora, la principal vía de eliminación es la urinaria y en menor proporción empieza a excretarse en las heces y aire respirado, durante las primeras 24 horas después de la administración, el 68% de la dosis de ácido clavulánico se ha eliminado en la orina, el 17% en el aire respirado y el 8% en heces. El volumen de distribución de la amoxicilina y el ácido clavulánico son independientes de la función renal, tanto en la depuración renal como en la no renal, ambos decrecen con el incremento del deterioro renal, resultando la acumulación en plasma (menos pronunciado para el ácido clavulánico).

## **CONTRAINDICACIONES (11)**

El uso del ácido clavulánico está contraindicado en pacientes con hipersensibilidad a las penicilinas, infecciones mononucleóticas o leucemia linfática.

## **PRECAUCIONES (11)**

Se debe tener precaución si el paciente tiene historial alérgico. La seguridad para su uso durante el embarazo no está bien establecida, aunque en animales no revela teratogenicidad. Durante la lactancia se pueden detectar cantidades ínfimas de amoxicilina-ácido clavulánico en la leche materna. En caso de disfunción hepática o renal, se recomienda reducir la dosis o aumentar el intervalo de tiempo de dosificación.

## **INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS<sup>(1)(1)</sup>**

El conjunto amoxicilina-acido clavulanico interfiere con los anticonceptivos en la circulación enterohepática de los estrógenos

## **EFFECTOS SECUNDARIOS<sup>(1)(1)</sup>**

En común con otros compuestos  $\beta$ -lactámicos, el clavulanato exhibe muy bajo grado de toxicidad directa. Los efectos tóxicos indirectos, incluyendo reacciones alérgicas, alteración de la flora intestinal y desarrollo de super infección, han sido reportados en casos raros. La toxicidad aguda del conjunto amoxicilina-acido clavulanico, se ha estudiado en ratas y ratones, y la DL<sub>50</sub> en estos animales (ambas especies y sexos) es mayor de 5000 mg/kg.

Los efectos adversos del conjunto amoxicilina-acido clavulanico son muy similares a los reportados para la amoxicilina. En un 6 - 14% de los pacientes, el tratamiento tiende a ser ligero y no requiere ser descontinuado.

Los efectos que más frecuentemente se reportan son las reacciones gastrointestinales (náusea, vómito y diarrea) e irritación cutánea. La incidencia de los efectos gastrointestinales parece ser que se relaciona con la dosis del ácido clavulanico, ha sido reportada con mas frecuencia cuando la mezcla amoxicilina-acido clavulanico es 2:1 que cuando es 4:1. La incidencia de la náusea puede ser disminuida si el medicamento se administra con los alimentos, sin que por ello se afecte la absorción del mismo.

## **DOSIS Y VIA DE ADMINISTRACION<sup>(1)(1)</sup>**

Via de administración: Oral e Intramuscular.

Dosis (amoxicilina - clavulanato de potasio 4:1):

- Adultos y niños mayores de 14 años: 1/2 ó 1 tableta de 125 mg de ácido clavulanico cada 8 hrs.
- Niños entre 7 y 14 años: 1 cucharadita (5 mL) de suspensión de 250 mg ó 2 cucharaditas (10 mL) de suspensión de 125 mg cada 8 hrs.
- Niños entre 1 y 7 años: 1/2 cucharadita (2.5 mL) de suspensión de 250 mg ó 1 cucharadita (5 mL) de suspensión de 125 mg cada 8 hrs.

- Niños entre 3 meses y 1 año:  $\frac{1}{2}$  cucharadita (2.5 mL) de suspensión de 125 mg ó 1.25 mL de gotas cada 8 hrs
- Niños menores de 3 meses: 0.75 mL de gotas cada 8 hrs

No se recomienda un tratamiento de mas de 14 días

## PRESENTACIONES FARMACEUTICAS <sup>(9)(11)</sup>

Medicamento: Amoxicilina - Clavulanato de Potasio (4:1)

Tabletas	500 mg amoxicilina
Polvo para suspensión	250 mg amoxicilina : 5 mL suspensión
Polvo para suspensión	125 mg amoxicilina : 5 mL suspensión
Polvo para suspensión en gotas	62.5 mg amoxicilina : mL suspensión
Suspensión inyectable	500 mg amoxicilina
Suspensión inyectable	1000 mg amoxicilina

El polvo para suspensión se envasa en frascos de vidrio ambar con tapa metálica.

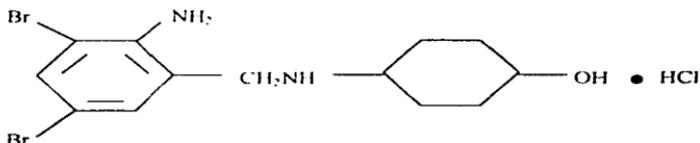
Una vez reconstituido el polvo para suspensión, es estable durante 7 días en refrigeración.

### III.5 Monografía de Clorhidrato de Ambroxol

#### ESTRUCTURA QUÍMICA <sup>(22)</sup>

$C_{14}H_{19}Br_2ClN_2O$

M.M. 414.58



#### NOMBRE QUÍMICO <sup>(22)</sup>

Clorhidrato de 4-[(2-amino-3,5-dibromofenil)-metil]amino]ciclohexanol.

N-(trans-p-hidroxociclohexil)-(2-amino-3,5-dibromobencil)amina.

#### NOMBRE GENÉRICO

Clorhidrato de Ambroxol

#### NOMBRES REGISTRADOS <sup>(3)</sup>

Ambroxol; Ambrofur, Ambrowel, Broxol, Ital Ultra, Mucosolvan, Mucosolvan Retard, Mucovibrol, Sekretovit, Tusibron.

Ambroxol en combinación con Clorhidrato de Clenbuterol: Broxol Plus, Mucoslovan Compostum, Mucovibrol C, Sekretovit Ex.

Ambroxol en combinación con Amoxicilina: Broxolamox, Sekretovit Amoxi.

#### PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS <sup>(22)</sup>

**Descripción:** Polvo blanco, inodoro. Se descompone a una temperatura mayor de 235°C.

**Solubilidad:** Soluble en dimetilformamida; ligeramente soluble en metanol, etanol y agua; insoluble en hexano, benceno y cloroformo.

**Punto de Fusión:** 233° -234.5° C (cristalizado en etanol)

**Pérdida por Secado:** No más del 0.5 %.

**Residuo de Ignición:** No más del 0.1%

## ENSAYOS DE IDENTIDAD

### A. Espectroscopia Ultravioleta

Una solución de clorhidrato de ambroxol al 0.02% en ácido sulfúrico 0.1N presenta 2 máximos, a 245 y a 310 nm. La sustancia de referencia tiene un  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  =  $66 \pm 5$  a 310 nm y un  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  =  $237 \pm 5$  a 245 nm.

### B. Espectroscopia Infrarroja

El espectro de absorción en la región infrarroja, de una dispersión en bromuro de potasio de la muestra previamente seca, exhibe máximos únicamente a las mismas longitudes de onda que una preparación similar de la sustancia de referencia de clorhidrato de ambroxol.

### C. Cromatografía en Capa Fina

En la cromatoplaaca realizada para la prueba de pureza, la mancha obtenida para la solución muestra corresponde en R<sub>F</sub>, tamaño e intensidad a la mancha obtenida de la solución de referencia.

## PUREZA

Sistema cromatográfico: soporte = gel de sílice Polygram Si1 G / UV 254 de 40 x 100 mm y 0.25 mm de espesor, fase móvil = cloroformo : metanol : ácido acético glacial (65:20:15). Preparación de las soluciones: a) Solución muestra: transvasar aproximadamente 100 mg de la muestra (pesados con exactitud) a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con metanol (concentración aproximada = 10 mg/mL); b) Solución de referencia: con la sustancia patrón de referencia preparar una solución de clorhidrato de ambroxol en metanol que tenga una concentración aproximada de 10 mg/mL. Procedimiento: en la cromatoplaaca aplicar 10 µL de ambas soluciones (en carriles separados). Interpretación: observar bajo la luz UV a 254 nm, la mancha obtenida para la solución muestra corresponde en R<sub>F</sub>, tamaño e intensidad a la mancha obtenida de la solución de referencia.

## **VALORACION <sup>(7)</sup>**

No mas del 101.0% y no menos del 99.0%, calculado en base seca

El fundamento de esta tecnica esta basado en una titulacion no acuosa con el acido perclorico (previamente valorado), determinando electrometricamente el punto final, por medio de un medidor potenciométrico o visualmente si se usa un indicador interno

Disolver aproximadamente 400 mg de Clorhidrato de Ambroxol exactamente pesados, en 50 ml. de acido acético glacial, agregar 10 ml. de acetato mercurico SR y titular con acido perclorico 0.1N, determinar el punto final potenciométricamente, usando electrodo de vidrio-calomel, o bien utilizando cristal violeta como indicador

## **INDICACIONES TERAPEUTICAS <sup>(3)</sup>**

Es un metabolito de la bromhexina Mucolitico expectorante con acción estimulante del surfactante, por lo tanto, estimula el transporte, reduce el estancamiento y normaliza la formación de las secreciones, además disminuye considerablemente la tos y la cantidad de esputo. Actúa intracelularmente promoviendo la producción de un moco normal, libera y activa el epitelio ciliado aumentando su frecuencia vibrátil y estimula la producción de surfactante en alveolos y pequeños bronquolos formando una película que recubre la pared interna de las vías respiratorias

Está indicado en procesos broncopulmonares en donde la viscosidad y adherencia del moco esta aumentada, tales como bronquitis aguda, bronquitis crónica, bronquitis asmáticoforme, bronquitis espasmódica, asma bronquial, bronquiectasia, neumonia, bronconeumonia, rinitis, sinusitis, atelectasia por obstrucción mucosa, traqueostomía, otitis media, en el pre y postoperatorio de cirugía en pacientes geriátricos

La tolerancia permite una administración a largo plazo

## **FARMACOCINETICA <sup>(3)</sup>**

El ambroxol es absorbido en gran porcentaje (biodisponibilidad del 60%, pues 1/3 de la dosis es metabolizada como efecto de primer paso en el hígado) y

rápidamente en el tracto enteral. Con la ingestión en ayunas, la concentración máxima en plasma se alcanza a las 2<sup>h</sup>: horas. La vida media es de 9-10 hrs. Los niveles en plasma con eficacia terapéutica se sitúan por encima de 30 ng/ml, y se alcanzan con seguridad tras 2 tomas de 30 mg/día. Los tiempos de reducción a la mitad de los niveles hemáticos, que presentan eliminación sanguínea, son de 22 horas. Se distribuye rápidamente en el tejido a partir de la sangre. Se fija en un 90% a las proteínas plasmáticas, se transforma en diversos productos metabólicos inactivos que se eliminan en su mayor parte como conjugados hidrosolubles (glucurónidos) por vía renal. Estudios con administración repetida de la dosis terapéutica no han revelado índice alguno de acumulación.

### **CONTRAINDICACIONES <sup>(1)</sup>**

Su uso está contraindicado en pacientes con hipersensibilidad al fármaco y en pacientes con úlcera péptica activa.

### **PRECAUCIONES <sup>(1)</sup>**

No se recomienda su empleo durante los primeros 3 meses de embarazo, a pesar de que carece de propiedades embriotóxicas. No se ha establecido hasta la fecha seguridad durante la lactancia.

### **INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS <sup>(1)</sup>**

Se puede administrar concomitante con otros medicamentos: analgésicos, antiinflamatorios, antihistamínicos, glucósidos cardíacos, diuréticos, corticosteroides y antibióticos. En solución inyectable se puede combinar en la misma jeringa con gentamicina, tobramicina, sisomicina, amikacina, kanamicina, cefoxitina, tianfenicol y carbenicilina, que por no ser alcalinas son compatibles y sin riesgo de interacciones adversas, por lo que no debe mezclarse con soluciones alcalinas como cefradina, cefazolina, cloramfenicol, ampicilina, rifampicina y fosfomicina. Puede ser administrado en venoclisis mezclado con soluciones fisiológicas ó glucosadas.

## **EFECTOS SECUNDARIOS <sup>(3)</sup>**

Cefalea y trastornos gastrointestinales leves como diarrea, vomito y nauseas. Se han informado en muy raros casos reacciones alergicas.

## **DOSIS Y VIA DE ADMINISTRACION <sup>(3)</sup>**

Via de administración: Oral, Intramuscular e Intravenosa

Dosis:

- Adultos y niños mayores de 12 años: 15 mg - 30 mg cada 8 hrs.
- Niños de 5 a 12 años: 15 mg 2 ó 3 veces al día.
- Niños de 2 a 5 años: 7.5 mg cada 8 hrs.
- Niños hasta 2 años: 7.5 mg cada 12 hrs.

## **PRESENTACIONES FARMACEUTICAS <sup>(3)</sup>**

Solución oral	15 mg/ 10 mL
Solución inyectable	15 mg
Comprimidos	30 mg
Gotas	7.5 mg/ mL
Cápsulas	75 mg

Consérvese en un lugar fresco y seco.

En caso de un tratamiento mayor de 14 días de duración, se recomienda reducir la dosis a la mitad de la indicada.

### III.6 Preformulación <sup>(5) (9) (12) (17)</sup>

Cuando un principio activo es identificado como potencial, farmacéuticamente hablando, es importante encontrar la forma farmacéutica más estable, compatible, eficaz, segura, biodisponible y económica. Se requiere que el producto sea químicamente estable, ya que la administración de productos degradados puede producir niveles sanguíneos subterapéuticos o reacciones tóxicas.

La formulación de un medicamento puede tomar años de investigación, pero el tiempo puede disminuirse si se llevan a cabo estudios de preformulación bien dirigidos.

Los estudios de preformulación en farmacia son definidos como aquellos estudios que preceden al desarrollo del producto, en los cuales se investigan las propiedades físicas y químicas, así como pruebas de eficacia en animales, todo esto se realiza con el fin de optimizar las pruebas de formulación. Están dirigidos a obtener la información que permita seleccionar y desarrollar la formulación adecuada para el nuevo medicamento, en pequeña escala. Los parámetros estudiados incluyen estabilidad química y física, solubilidad acuosa, velocidad de disolución y pK, así como el efecto de los solventes, pH y temperatura de descomposición de la droga.

Algo muy importante en estos estudios es la determinación del envase primario, el cual debe ser económico, proteger al medicamento de cualquier daño (humedad, luz, oxígeno o contaminación microbiológica), ser compatible con la formulación, ser óptimo para su uso y transporte y dar excelente presentación al producto.

Para verificar la estabilidad de la preformulación se debe realizar un estudio de estabilidad acelerada, la cual se realiza a diferentes temperaturas (temperatura ambiente, 30° y 40°C) y en diferentes condiciones de humedad, durante 30, 60, 90 y 180 días. Mediante la ecuación de Arrhenius se obtiene el comportamiento cinético del fármaco, que se puede extrapolar y obtener datos confiables de su estabilidad.

$$k = A e^{-E_a/RT}$$

Donde:

- k = Constante de velocidad
- A = Factor de frecuencia
- E<sub>a</sub> = Energía de activación
- R = Constante de los gases
- T = Temperatura

## FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD

El efecto del pH sobre la estabilidad del principio activo es importante en el desarrollo de medicamentos orales y parenterales. Los activos lábiles a los ácidos del estómago se pueden proteger con el uso de soluciones amortiguadoras, para así mantener el pH óptimo, cuidando que dicho amortiguador no incremente demasiado la fuerza iónica, ya que podría aumentar la degradación.

La solvólisis es la degradación que se presenta ante el disolvente que en el caso de tratarse de agua se le llama hidrólisis. La velocidad de hidrólisis de un anillo  $\beta$ -lactámico es muy rápida, que a 35°C en un pH = 1.5 puede ser de 1 hr.; la degradación se lleva a cabo en el miembro 4 del anillo. Una medida de prevención es la formulación de las suspensiones, en las que el principio activo este en forma de sales insolubles.

Las reacciones de oxidación son una vía de degradación muy común en los productos farmacéuticos, producidas por el oxígeno molecular o radicales libres, estas ocurren frecuentemente en vitaminas, esteroides y antibióticos. La autooxidación consiste en reacciones en cadena producidas por radicales libres. Hoy en día existen numerosos antioxidantes que previenen estas reacciones, ya que inactivan al radical libre y rompen con la cadena de reacciones, como por ejemplo las aminas y fenoles.

La adición de agentes tensoactivos puede desacelerar el proceso de degradación si protege el principio activo de la oxidación, o bien, acelerar dicho proceso si provee el modelo del principio activo para las reacciones enzimáticas, además de que puede interaccionar con ciertos grupos del principio activo.

Los fármacos pueden estabilizarse por medio de la formación de complejos, ya que los agentes quelantes protegen al fármaco de la autooxidación al formar complejos con los iones metálicos que son requeridos para iniciar dicha vía de degradación. Los agentes quelantes de mayor uso son el etilendiammotetracetato de sodio (EDTANa<sub>2</sub>), ácido cítrico y ácido tartárico, entre otros.

Las reacciones llamadas fotólisis son usualmente asociadas a las oxidativas, ya que la luz del sol o de una lámpara produce la oxidación de algunos fármacos; esta degradación se puede prevenir si el empaque (frasco, ampollita o blister) son de color ámbar y no dejan pasar la luz.

El cambio de la actividad óptica llamado racemización, disminuye la actividad biológica; el mecanismo de reacción incluye un ion carbonilo o un carbanión que es eléctricamente estabilizado por el grupo sustituyente vecino. Esta es una ruta degradativa de fármacos como la pilocarpina, tetraciclina y epinefrina.

Las interacciones químicas entre 2 o más componentes de la formulación, ya sea entre principios activos y o los aditivos, promueven la degradación o alteración del medicamento. La mayoría de las incompatibilidades son generadas por compuestos con un grupo funcional amino.

La conversión de un polimorfo a otro, en un medicamento, produce un cambio drástico en las características físicas del principio activo, como solubilidad, punto de fusión, etc.

Algunos fármacos y aditivos (como los saborizantes cetónicos, estearicos o aldehídicos y cosolventes alcohólicos) poseen altas presiones de vapor que a temperatura ambiente pueden volatilizarse, lo que produce una diferencia en la concentración. Esto se puede prevenir manteniendo el medicamento con sello hermético y en refrigeración.

En el caso de fármacos higroscópicos, la humedad puede afectar seriamente la estabilidad del medicamento, por lo cual se recomienda el uso sellos herméticos y mantener al medicamento en refrigeración.

En las suspensiones, una lenta sedimentación puede producir la formación de un "cake" que será difícil de resuspender.

## **PARAMETROS QUE PREDICEN LA BIODISPONIBILIDAD**

Las formas farmacéuticas de administración oral tienen que disolverse en los fluidos gastrointestinales, por lo que los principios activos deben tener suficiente solubilidad acuosa para una adecuada absorción y biodisponibilidad.

El valor del pK también predice la absorción en el tracto gastrointestinal, las moléculas no-ionizadas de carácter ácido se absorben preferentemente en el estómago y las de carácter básico se absorben en el intestino.

Los fármacos que tienen una velocidad de disolución menor de 1.0 mg/min\*cm<sup>2</sup> suelen presentar serios problemas de absorción y biodisponibilidad, y dado que la velocidad de disolución es proporcional a la solubilidad y al área superficial del fármaco expuesta, si el tamaño de partícula disminuye (un buen método para ello es la micronización), la velocidad de disolución y la solubilidad aumentan.

Otro método para incrementar la solubilidad de un fármaco es utilizarlo en forma de sales, sabiendo que las formas amorfas son más solubles que las formas cristalinas y que las moléculas anhidras lo son más que las moléculas hidratadas.

Dada la naturaleza lipídica de las membranas, la velocidad de absorción del fármaco está en función de su carácter lipofílico, el cual es determinado en base a su coeficiente de partición.

Para observar la absorción real se realizan técnicas *in vitro* como la prueba del intestino invertido. Estudios *in vivo* pueden dar datos preliminares sobre absorción, disposición del fármaco, unión a proteínas, efecto de primer paso, metabolismo y eliminación, lo cual da pauta a la toma de importantes decisiones sobre la reformulación.

## **ESTUDIOS DE PREFORMULACION PARA UNA SUSPENSION**

### **\* CARACTERISTICAS DEL PRINCIPIO ACTIVO**

- Color, olor, sabor y consistencia
- Formas cristalinas: isomorfismo y polimorfismo
- Solubilidad en disolventes hidrofílicos y lipofílicos, perfil solubilidad-pH en sistemas acuosos, solubilidad en jugos gástrico e intestinal artificiales.
- Punto de fusión
- Tamaño de partícula.
- Datos de pureza analítica: humedad, residuo de ignición, metales pesados, impurezas orgánicas, presencia de sales inorgánicas, calorimetría diferencial.
- Valores de pH o pK.
- Datos analíticos cualitativos: ensayos de identidad, espectros UV e IR, ensayos de pureza (cromatografía en capa delgada)
- Datos farmacocinéticos.
- Datos analíticos cuantitativos: valoración, productos de degradación, medidas farmacocinéticas, estabilidad (efectos por exposición a luz, oxígeno, temperaturas y diferentes pH's y disolventes).

- ▲ **CARACTERISTICAS DEL POLVO PARA SUSPENSION**
  - Color, olor y sabor
  - Tamaño de partícula
  - Humedad.
  - Densidad del polvo
  
- ▲ **CARACTERISTICAS DE LA SUSPENSION**
  - Color, olor, sabor y consistencia
  - Valor de pH
  - Densidad.
  - Viscosidad.
  - Velocidad de sedimentación
  - Volumen de sedimentación.
  - Grado de resuspendibilidad
  
- ▲ **PRUEBAS DE COMPATIBILIDAD**
  - Interacciones entre los principios activos.
  - Interacciones principio activo-aditivo.
  - Interacciones entre aditivos.
  - Interacciones del principio activo y/o aditivos con los envases primarios.
  
- ▲ **PRUEBAS DE ESTABILIDAD**
  - Estabilidad física: dilución y refrigeración (Mantener a 4°C durante un largo periodo).
  - Estabilidad química: efectos de luz visible y UV y calor (exposición a temperatura ambiente, 40°C y 60°C durante 30, 60, 90 y 180 días).
  - Estabilidad microbiológica: actividad bacteriostática, fungistática y esporostática en muestras mantenidas en las mismas condiciones que en la estabilidad química.

### **III.7 Suspensiones <sup>(9)</sup> (12) (17) (20)**

#### **DEFINICION Y CARACTERISTICAS**

Es un sistema disperso heterogeneo, compuesto de 2 fases, las cuales contienen el (los) principio (s) activo (s). Una de las fases, la continua o externa es generalmente un liquido o un semisolido y la fase dispersa o interna esta constituida por solidos insolubles pero dispersables (generalmente contiene al principio activo). La fase dispersa puede estar constituida por particulas aisladas o por una red formada por particulas que interaccionan el tamaño de estas debe ser mayor de 0.2  $\mu$ .

Una suspension satisfactoria sera aquella que provenga de un polvo homogéno y que, aunque se separe por reposo, debe tener baja velocidad de sedimentación y permitir que con una agitacion moderada se resuspendan los solidos, además, debe permanecer lo suficientemente homogenea por lo menos durante el periodo necesario para obtener y administrar la dosis requerida despues de agitar el recipiente; es decir, que el polvo este constituido por particulas micropulverizadas y que la suspension tenga un alto grado de flocculacion, moderada velocidad de sedimentacion y alto grado de resuspendibilidad.

Existen varias razones por las cuales se prefiere una suspension

- Principio farmacéutico inestable en solucion, pero estable en suspension.
- Baja solubilidad del principio activo
- Mal sabor u olor del principio activo (inaceptable al ser administrado)
- Facilidad para la administracion (via oral)
- Flexibilidad en la dosis

En estos casos, el principio activo puede adsorberse sobre una particula sólida inerte, asi una vez en el estomago se libera paulatinamente

Por definición, una suspension es un sistema incompatible, pero para existir requiere de cierto grado de compatibilidad y de una buena humectación del material suspendido. Cuando existe una fuerte afinidad entre liquido y sólido, el liquido fácilmente forma una película sobre la superficie del solido, cuando la afinidad no existe o es muy débil, el liquido tiene dificultad en desplazar el aire u otras sustancias que rodean al sólido, por lo que se realizan pruebas para encontrar el humectante y la cantidad ideal. Los sólidos que se humectan fácilmente por el disolvente (agua o líquidos muy polares) y tienen la capacidad de aumentar la viscosidad de las suspensiones, se les llama hidrofílicos, los solidos hidrofóbicos son poco humectables en agua, pero pueden ser humectados por líquidos no polares,

éstos normalmente requieren el uso de agentes humectantes para incorporarse a la suspensión

La viscosidad de la suspensión puede ser determinada por medio de un viscosímetro como el de Brookfield.

## **AGENTES TENSOACTIVOS**

Para modificar las características de humectación se involucra el uso de agentes tensoactivos. Estos pueden clasificarse en 4 grupos:

- Aniónicos: Contienen iones carboxilato, sulfonato y sulfato. Son los conocidos como jabones, que se preparan por saponificación de glicéridos naturales de ácidos grasos en solución alcalina.

- Catiónicos: Contienen iones sodio, potasio, amonio y trietanolamina, asociados a cadenas largas de ácidos grasos (palmitico, laurico, succinico, esteárico). Su grado de hidrosolubilidad depende del largo de la cadena hidrofóbica y de las dobles ligaduras.

- Anfotéricos: Estas moléculas tienen entre sus grupos aniónicos principales al carboxilato y entre sus grupos catiónicos principales al amonio. Los grupos aniónicos están representados por polipeptidos, proteínas y alquilo betainas, y los grupos catiónicos consisten en fosfolípidos naturales (lecitinas y cefalinas).

- No iónicos: Son los más usados en los sistemas farmacéuticos por sus grandes ventajas de compatibilidad, estabilidad y baja toxicidad. Incluyen ácidos grasos de cadena larga y derivados insolubles, alcoholes grasos (estearílico, laurílico), ésteres de glicerilo, ésteres de alcoholes grasos (propilenglicol, dietilenglicol, sorbitol); para aumentar la hidrosolubilidad de estos compuestos se añaden grupos polioxietileno (Tween, Span).

Otros materiales que pueden ayudar a la dispersión de los sólidos hidrofóbicos, son polímeros hidrofílicos como la Carboximetilcelulosa de sodio, así como ciertos materiales hidrofílicos insolubles en agua como la bentonita y silicatos, ya que éstos aumentan la viscosidad, dependiendo de su tipo específico y de su concentración, sin embargo, a altas concentraciones producen geles indeseables.

La combinación de varios tipos de agentes suspensores, puede ser usada para lograr las propiedades reológicas deseadas

## TIPOS DE AGREGADOS

Debido a la interacción de las partículas sólidas y a sus propiedades en interfase, el tipo de agregación se clasifica según las características finales del agregado

- Forma Floculada: A semeja redes abiertas agregadas. Estructura rígida que se asienta con rapidez, pero fácilmente se redispersa, y dado que están como agregados abiertos, lejos el uno del otro, no promueven apelmazamiento

- Forma de Red Cerrada: Agregado caracterizado por el empaquetado característico producido por la unión de las películas superficiales de las partículas, se asienta lentamente en sedimentos de poco espesor y no se redispersa con facilidad

- Forma Dispersa: No forma agregados, en ella, las partículas se presentan como entidades individuales, por lo que se asientan lentamente y forman un sedimento compacto y apelmazado de poca altura que es difícil de redispersar, pudiendo llegar a la cristalización

El Potencial  $\zeta$  ( $\zeta$ ) es una indicación medible del potencial existente en la superficie de una partícula. Cuando dicho potencial es relativamente alto, las fuerzas de repulsión entre 2 partículas son mayores a las de atracción, lo que produce que las partículas se dispersen y se dice que están floculadas. La absorción de un ión, cuya carga sea de signo contrario a la carga de la partícula, reduce el Potencial  $\zeta$ , y así las fuerzas de repulsión disminuyen tanto que las partículas empiezan a agregarse formando floculos y entonces se dice que el sistema está floculado

Algunos sistemas suspendidos usados por vía parenteral, oral u oftálmica, presentan grumos aunque tienen agregados de red abierta y produce un mal drenado del frasco o vial, esto se puede corregir con el uso de coloides protectores (Silica Gel, Aerosil), los cuales difieren de los tensoactivos en que no disminuyen la tensión superficial, no afectan la viscosidad y se usan en altas concentraciones (10%).

## LEY DE STOCKES

La Ley de Stokes evalúa la estabilidad de la suspensión, indica que la velocidad de sedimentación depende directamente de la densidad de la partícula, de la densidad del líquido y del radio de la partícula y es inversamente proporcional a la viscosidad:

$$V = d^2 (r_1 - r_2) g / 18 \eta$$

Donde:

- V = velocidad de sedimentación (cm/s)
- d = diámetro de la partícula (cm)
- r<sub>1</sub> = densidad de la partícula (g/mL)
- r<sub>2</sub> = densidad del líquido (g/mL)
- η = viscosidad (g/cm\*s)
- g = aceleración de la gravedad (cm/s<sup>2</sup>)

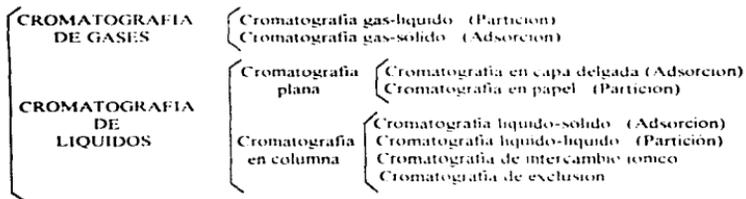
Dicha ecuación se deriva de una situación ideal, en la cual, las partículas son uniformes y perfectamente esféricas, y se encuentran en una suspensión diluida sin ningún efecto de turbulencia, donde no hay colisión entre las partículas al moverse y no hay atracción física o química entre las mismas.

## POLVOS PARA SUSPENSION

Numerosos preparados farmacéuticos consisten en una mezcla de polvos o granulados, los cuales están listos para reconstituirse en agua u otro vehículo para su administración oral. La mayoría de dichos preparados son antibióticos, debido a su inestabilidad en el vehículo; entre ellos amoxicilina, ampicilina, dicloxacilina, eritromicina y penicilina.

### III.8 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución <sup>(41)(7)</sup>

La cromatografía es una técnica desarrollada a principios del siglo, que permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla. El nombre de cromatografía se debe a que las primeras separaciones se llevaron a cabo con pigmentos de plantas, los cuales se observan como bandas coloridas. En general, la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil (gas o líquido) y retenidos selectivamente por una fase estacionaria (líquido o sólido). De acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas y a los mecanismos de separación, la cromatografía se divide en:



Los mecanismos o procesos de separación que dan como resultado la retención de las moléculas de una muestra por parte de la fase estacionaria, dan lugar a los diferentes métodos de cromatografía líquida, estos es:

- Líquido-líquido o de partición: consta de una fase estacionaria líquida, de composición diferente a la de la fase móvil e inmiscibles, aquí el grado de separación de un compuesto está regido por su coeficiente de distribución entre las dos fases líquidas.
- Líquido-sólido o de adsorción: incluye partículas de gran área superficial y dependiendo de la afinidad de las moléculas con la fase estacionaria y con la fase móvil, éstas son atraídas y retenidas.
- De intercambio iónico: en este tipo de cromatografía, la fase sólida contiene un material cambiador de iones, generalmente llamado resina de intercambio iónico; contiene grupos iónicos fijos que junto con iones de carga opuesta que están

presentes en la fase móvil en forma de sales, logran que las moléculas de muestras iónicas sean retenidas en la columna por el intercambio iónico

d) De exclusión molecular su empaque es de un material poroso donde el tamaño del poro está bien definido, de manera que las moléculas demasiado grandes para el poro salen rápidamente de la columna mientras que las que son pequeñas penetran en los poros prolongando su tiempo de elución

Existen 2 tipos de cromatografía dependiendo de la polaridad de las fases

1) Cromatografía fase normal involucra una fase estacionaria polar y una fase móvil poco polar, donde los compuestos van eluyendo de menor a mayor polaridad.

2) Cromatografía de fase inversa, la fase estacionaria es poco polar (cadenas de hidrocarburos de 8 a 18 carbonos) y se utilizan fases móviles polares, aquí el orden de elución es contrario, los compuestos eluyen de mayor a menor polaridad

## **CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION**

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, también llamada Cromatografía de Líquidos de Alta Presión, se basa en la migración diferencial resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil, dichos componentes se separan en la columna y al salir de ésta, son conducidos por la fase móvil (en el orden en que emergieron) hasta un detector donde se registran sus concentraciones y sus tiempos de retención en la columna.

El cromatograma resultante muestra cada compuesto que sale de la columna en forma de picos simétricos con un tiempo de retención característico, por lo que éste puede emplearse para identificar el compuesto. Dicho tiempo de retención se mide desde el momento de la inyección de la muestra hasta el momento en que aparece el máximo del pico en el cromatograma.

Para esta técnica se requieren disolventes especiales, ya que tienen que ser grado HPLC, o sea, con un alto grado de pureza, además se deben filtrar por membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  y degasificar. Los solventes más usados son agua, metanol, acetonitrilo, acetona y hexano.

## PARAMETROS

Los parámetros que hay que considerar para que se lleve a cabo una buena separación son:

### \* Factor de Coleo (T)

Nos indica la simetría del pico. El pico ideal tiene un  $T = 1$ . Se determina:

$$T = W_{0.05} / 2f$$

Donde:

$W_{0.05}$  = Ancho del pico al 5% de su altura

$f$  = Distancia, del máximo del pico hacia el lado izquierdo, al 5% de altura.

### \* Factor de Capacidad (K)

Nos indica la retención de la sustancia en la columna. Se puede variar con cambios en la fuerza del disolvente. Se determina mediante la ecuación:

$$K = (t_2 - t_a) - 1$$

Donde:  $t_2$  = Tiempo de retención de la sustancia

$t_a$  = Tiempo de retención del aire

### \* Número de Platos teóricos (N)

Nos indica la eficiencia de la columna, en cuanto a la capacidad de separación. El valor de N es dependiente de la sustancia que esta siendo analizada y de las condiciones de operación, tales como la velocidad de flujo del disolvente, la temperatura, la cantidad de empaque de la columna y la uniformidad de esta. Dependiendo del método utilizado para medir el ancho del pico y la altura, es el valor de la constante en la fórmula para determinar el número de platos teóricos:

$$N = 5.54 \left( \frac{t_r}{W} \right)^2$$

Donde:  $t$  = Tiempo de retención de la sustancia

Método	cte	W
5 sigma	25	Ancho del pico al 4.4% de su altura
Tangentes	16	Ancho de la base del pico

#### \* Factor de Selectividad ( $\alpha$ )

Indica los valores de retención relativos, de la muestra con respecto a la sustancia de referencia. Se determina por la siguiente relación:

$$\alpha = (t_2 - t_a) / (t_1 - t_a)$$

Donde:  $t_2$  = Tiempo de retención de la sustancia en estudio  
 $t_1$  = Tiempo de retención de la sustancia de referencia  
 $t_a$  = Tiempo de retención del aire

#### \* Resolución (R)

Es la habilidad del sistema para separar las sustancias, indica la separación entre dos picos adyacentes en un cromatograma. Se requiere un  $R > 1.5$ . Este parámetro se varía modificando la composición de la fase móvil y/o la fase estacionaria. La fórmula para determinar la resolución es:

$$R = 2 (t_2 - t_1) / (W_2 + W_1)$$

Donde:  $W_1$  y  $W_2$  = Ancho de la base de los picos  
 $t_1$  y  $t_2$  = Tiempos de retención de las sustancias

Para controlar o mejorar una separación, pueden relacionarse los parámetros mediante la siguiente ecuación:

$$R = (1/4) (\alpha - 1) N^{1/2} [K / (1 + K)]$$

## EQUIPO

Un Cromatografo de Liquidos de Alta Resolucion consta de las siguientes partes:

### a) Sistema de Bombeo

Tiene por objeto impulsar la fase movil a traves de la columna y debe cumplir ciertas especificaciones como reproducibilidad y precision, manteniendo el flujo constante

Existen dos tipos de bombeo, que son:

- Bombas de flujo constante mantienen constante la velocidad de flujo de la fase movil. Entre estas se cuentan las bombas reciprocantes que funcionan a base de pistones que impulsan al disolvente para que entre en camaras con una capacidad de volumen pequena. en estas bombas se generan pulsaciones de la fase movil que producen perturbaciones en la linea base, las cuales se corrigen mediante dispositivos especiales. Tambien se incluyen las bombas de desplazamiento positivo que pueden tener 2 formas: la primera es parecida a una jeringa cuyo embolo actúa mediante una espiral que empuja al disolvente, la segunda amplifica la presion del disolvente mediante un sistema hidraulico, este tipo de bombas reduce las pulsaciones del disolvente

- Bombas de presion constante que tienen la desventaja de que es necesario mantener la viscosidad del disolvente, la temperatura de la columna y la presion constante, la ventaja es que si estos parametros se mantienen, se controlan totalmente las pulsaciones. La forma más sencilla de estas bombas emplea un gas inerte para presurizar el disolvente, el problema es que parte del gas se disuelve en el disolvente y esto forma burbujas en el sistema. Otro sistema para estas bombas emplea un amplificador neumático que reduce el efecto del gas utilizando un pistón, reduciendo de esta manera el contacto con el disolvente. Estos normalmente son sistemas isocráticos, es decir, que mantienen constante la proporción de los disolventes en la fase móvil, sin embargo, estos sistemas generalmente no son aplicables a separaciones en mezclas de solutos con valores muy variables de  $K'$ , en donde es necesario utilizar sistemas de elucion con gradientes. Los sistemas de elucion con gradiente utilizan 2 bombas que son programables para modificar, en forma lineal o exponencial, las proporciones iniciales de los disolventes, en estos casos los disolventes que componen la fase móvil se encuentran separados y alimentado cada uno a su respectiva bomba, así los disolventes se mezclan en la proporción deseada en una cámara que se encuentra antes de la columna.

## b) Sistema de Inyección

Un factor muy importante para obtener una buena resolución en la separación, es la adecuada introducción de la muestra en el sistema. La manera ideal de introducir o inyectar la muestra, es en forma de "paquete" pequeño, ya que esto ayuda a la obtención de picos simétricos y angostos.

Existen varios mecanismos de inyección el más sencillo consiste en introducir la muestra mediante una jeringa, la cual tiene que soportar la presión del sistema; aunque hay dispositivos que desvían el flujo del disolvente mientras se introduce la muestra, reanudándolo posteriormente a través del inyector mediante un sistema de válvulas. Un sistema que minimiza errores en la introducción de la muestra consiste en un inyector automático, este dispositivo ayuda a mantener la reproducibilidad entre inyecciones y elimina el error en la medición del volumen por inyectar.

## c) Columna

Se considera a la columna como parte fundamental de la cromatografía, ya que en ésta, es donde se lleva a cabo la separación.

El material de empaque y las dimensiones de la columna dependerán de la separación que se desee realizar. Si el objeto de la separación es aislar y recuperar sustancias de una mezcla, se emplean columnas preparativas en las que las partículas de empaque son de dimensiones mayores que en las columnas analíticas y tanto la longitud como el diámetro interno son mayores, ya que deben tener la capacidad de contener cantidades elevadas de la muestra. Las columnas más comunes son las de acero inoxidable, aunque también las hay de vidrio. La longitud de las columnas analíticas va de 10 - 30 cm, con un diámetro interno de 4 - 10 mm y el tamaño de partícula va de 3.5 - 10  $\mu\text{m}$ . Al aumentar la longitud, aumenta el número de platos teóricos, y por lo tanto, se obtiene una mayor resolución.

La eficiencia de las columnas se ha elevado con dispositivos y técnicas de empaque que mejoran el contacto del soluto con la fase estacionaria en su paso en la fase móvil; uno de estos sistemas consiste en la compresión radial de una columna hecha de un material flexible disminuyendo así los espacios vacíos que quedan entre la pared de la columna y las partículas. Actualmente se emplean materiales de empaque con partículas muy pequeñas que elevan el área superficial total, pudiendo así reducir las dimensiones de la columna. Otra manera de mejorar la eficiencia y resolución, es el empleo de hornos que mantienen una temperatura constante a lo

**largo de la columna. Cuando se tienen valores de K muy semejantes, es conveniente el empleo de temperatura para lograr buenas separaciones**

**A continuación se presenta una lista de los empaques empleados**

- \* L1. Octadecil-silano enlazado químicamente a sílica microporosa o a micropartículas de cerámica de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro**
- \* L2. Octadecil-silano enlazado químicamente a gel de sílice con una superficie de porosidad controlada y que a su vez ha sido unida a un núcleo sólido esférico de 30 - 50  $\mu\text{m}$  de diámetro.**
- \* L3. Partículas de sílica porosa de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro**
- \* L4. Gel de sílice con una superficie de porosidad controlada unida a un núcleo sólido esférico de 30 - 50  $\mu\text{m}$  de diámetro**
- \* L5. Alúmina con una superficie de porosidad controlada unida a un núcleo sólido esférico de 30 - 50  $\mu\text{m}$  de diámetro**
- \* L6. Empaque de intercambio catiónico fuerte, polímero de fluorocarbón sulfonado cubriendo un núcleo sólido esférico de 30 - 50  $\mu\text{m}$  de diámetro**
- \* L7. Octilsilano enlazado químicamente a partículas de sílica totalmente porosa de 5 - 10  $\mu\text{m}$  de diámetro**
- \* L8. Capa monomolecular de aminopropilsilano enlazada químicamente a un soporte de gel de sílice porosa de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.**
- \* L9. Gel de sílice totalmente porosa e irregular de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro con una cubierta enlazada químicamente de un intercambiador catiónico fuertemente ácido.**
- \* L10. Grupos nitrilo químicamente enlazados a partículas de sílica porosa de 5 - 10  $\mu\text{m}$  de diámetro**
- \* L11. Grupos fenilo químicamente enlazados a partículas de sílica porosa de 5 - 10  $\mu\text{m}$  de diámetro**
- \* L12. Empaque de intercambio aniónico fuertemente formado por una amina cuaternaria enlazada químicamente a un núcleo esférico de sílica de 30 - 50  $\mu\text{m}$  de diámetro.**
- \* L13. Trimetilsilano enlazado químicamente a partículas de sílica porosa de 5 - 10  $\mu\text{m}$  de diámetro**
- \* L14. Gel de sílice de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro con un recubrimiento enlazado químicamente de un intercambiador aniónico de amonio cuaternario fuertemente básico.**
- \* L15. Hexilsilano químicamente enlazado a sílica totalmente porosa de 3 - 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.**

#### d) Detector

Puede ser de 2 tipos: aquellos que miden alguna propiedad del soluto y de la fase móvil, por ejemplo, índice de refracción, y aquellos que miden solo la propiedad del soluto, como absorción al ultravioleta o fluorescencia.

La selección del detector está basada en las propiedades del o los solutos que se deseen analizar. Los detectores más empleados son: Detector UV, Detector de Índice de Refracción, Detector Electroquímico, Detector de Infrarrojo, Detector de Fluorescencia y Detector de Radioactividad.

#### e) Registrador de Señales

Al emerger un compuesto ya separado en la columna y pasar por el detector, la señal que provoca en éste, debe ser registrada por un graficador o un integrador.

En el caso del graficador es necesario calcular manualmente el área obtenida para cada pico. El método más sencillo de medición es mediante la altura de los picos desde la línea base al máximo del pico, aunque es deseable tener una línea base estable para obtener la máxima precisión. Otros métodos de medición involucran el cálculo del área bajo el pico, la cual puede calcularse de muy diversas maneras: si el pico es simétrico puede medirse el área por triangulación prolongando los lados del pico hasta la línea base, otra forma es utilizando un planímetro, o bien, recortando y pesando el área obtenida, una manera muy común es midiendo la altura del pico y multiplicarla por el ancho del pico medido a la altura media.

El uso de integradores electrónicos evita los errores en la medición de las áreas. Estos integradores registran las señales e imprimen el área de los picos en forma numérica.

### III.9 Validación de Métodos Analíticos <sup>(2) (18) (21) (24)</sup>

La validación de un método analítico constituye una pequeña parte del Sistema de Calidad, el cual incluye la validación de proveedores, procesos, personal, áreas, sistemas y todos aquellos factores que de alguna manera se involucran en la elaboración de productos, todo ello para cumplir con los objetivos de la Política de Calidad.

En cuanto a la calidad de los medicamentos, es de suma importancia verificar la metodología empleada para el control de procesos y productos, así como el análisis rutinario de las formas farmacéuticas, lo cual se logra con el proceso de Validación.

La U.S.P. y la Ley General de Salud, han servido como base regulatoria; en esta última se menciona que el control aplicado a cualquier producto farmacéutico deberá comprobarse y validar cualquier técnica empleada para este fin; por lo cual, las autoridades sanitarias del Sector Salud, exigen la validación de métodos analíticos.

La Validación de Métodos Analíticos se define como la evidencia documentada por estudios de laboratorio, de que las características del comportamiento del método, satisfacen los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

La información que se requiere para la validación de un método analítico depende de la aplicación deseada y con base a ésta, los procedimientos de ensayo se han clasificado en 3 categorías.

**Categoría I:** Métodos analíticos para la cuantificación de los principales componentes de un medicamento (principios activos), incluyendo conservadores.

**Categoría II:** Métodos analíticos para la determinación de impurezas o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados, incluyendo ensayos cuantitativos y pruebas límites.

**Categoría III:** Métodos analíticos para la determinación de las características del comportamiento del producto (pruebas de disolución, liberación de fármacos, etc.).

En la tabla A se presentan los parámetros necesarios para la validación de métodos analíticos, dado que para cada una de las categorías mencionadas, los requisitos de validación son diferentes.

**TABLA A**

**Parámetros necesarios para la Validación de Métodos Analíticos**

PARAMETRO	CATEGORIA			
	I	II		III
		Cuantitativa	Prueba Limite	
Precisión	Si	Si	No	Si
Exactitud	Si	Si	*	*
Límite de detección	No	No	Si	*
Límite de cuantificación	No	Si	No	*
Especificidad	Si	Si	Si	*
Intervalo	Si	Si	*	*
Linealidad	Si	Si	No	*
Tolerancia	Si	Si	Si	Si

\* Puede no requerirse, dependiendo de la naturaleza del análisis particular.

La validación de un método analítico incluye efectuar pruebas para

- 1) Sistema: se evalúa la Linealidad y Precisión (evaluada como repetibilidad), mediante una solución patrón de la sustancia por analizar.
- 2) Método: se evalúa la Especificidad, Linealidad, Exactitud, Precisión (evaluada como reproducibilidad y repetibilidad) y Estabilidad de la muestra analítica, mediante placebos adicionados.

Los parámetros de validación se pueden clasificar dependiendo de las características que evalúan el comportamiento del método:

1. Parámetros que evalúan la adecuabilidad del sistema: Especificidad y Linealidad.
2. Parámetros que evalúan la efectividad del proceso de preparación de la muestra: Exactitud.
3. Parámetros que incluyen aspectos relacionados con el sistema, con el proceso de preparación de la muestra y con el analista: Precisión.

A continuación se presentan las definiciones, la forma de evaluar y los criterios de los parámetros de validación, enfocados a la validación de métodos analíticos por cromatografía de líquidos de alta resolución.

#### **\* ESPECIFICIDAD<sup>4</sup>**

##### **\* Para métodos indicadores de control de calidad.**

###### **Definición:**

Es la capacidad de un método para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra presentes en la formulación.

###### **Determinación:** (Con el método propuesto)

- Analizar placebos del producto que contengan todos los componentes de la formulación excepto el principio activo que se analiza.
- Identificar la respuesta del principio activo y si procede de los excipientes o componentes del vehículo.
- Hacer una corrida de la fase móvil antes de iniciar el análisis.

##### **\* Para métodos indicadores de estabilidad.**

###### **Definición:**

Es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta exclusiva de la sustancia de interés y no a la de sustancias relacionadas o productos de degradación.

###### **Determinación:**

- Realizar un análisis inicial de los lotes del activo, del placebo y del producto terminado que se van a someter a degradación. Todo análisis se realiza por triplicado y cada uno de ellos se analiza 2 veces.

<sup>4</sup> Los cálculos y criterios de aceptación se presentan en el anexo I

- Si es posible, conseguir productos de degradación del activo, sustancias relacionadas o precursores y analizarlos de acuerdo a las condiciones del método y en presencia del activo de interés. De no ser posible, someter el principio activo y los excipientes por separado y en conjunto a condiciones severas de degradación, tales como: calentamiento elevado (70-120°C o 20° menos del punto de fusión), acidez (pH 1-2 con HCl 1N), alcalinidad (pH 10-12 con NaOH 1N), oxidación (con peróxido de hidrogeno) y luz ultravioleta o solar.

- El producto deberá someterse a condiciones extremas en su empaque original.

#### \* LINEALIDAD\*

##### **Definición:**

Es la capacidad de un método que permite asegurar que los resultados analíticos obtenidos directamente, o bien, mediante una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo.

##### **Determinación:**

Cuando se trabaja con el sistema se analizan soluciones que contiene únicamente al analito, y en el caso de trabajar con el método, se utilizan placebos adicionados.

Se determina construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta medida), utilizando un mínimo de 5 concentraciones diferentes, que abarque desde 50% al 150% incluyendo el 100% del principio activo, haciendo el análisis por triplicado para cada dilución y cada análisis se inyecta por duplicado.

La linealidad se expresa generalmente en términos de la varianza alrededor de la pendiente de la recta ajustada (línea de regresión), calculada a través del método de mínimos cuadrados. La relación matemática que describe la ecuación de la recta es la siguiente:

$$y = m x + b$$

α Los cálculos y criterios de aceptación se presentan en el anexo I

Donde:

- y = respuesta medida
- m = pendiente de la recta
- x = concentración
- b = ordenada al origen

**Calcular:**

- Pendiente de la recta (m).
- Ordenada al origen (b)
- Coeficiente de correlación (r).
- Coeficiente de determinación ( $r^2$ ).

Para conocer si los valores de pendiente y ordenada al origen obtenidas experimentalmente, son estadísticamente diferentes a los valores teóricos, se aplica la prueba de *t de Student* y se establecen los límites de confianza para *m* y *b*. Los datos de la curva de calibración se sujetan a un *análisis de varianza* y las *F* resultantes de la distribución y del tratamiento de datos son los parámetros de evaluación.

#### • PRECISION<sup>α</sup>

**Definición:**

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el método se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea de un producto. Se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación. Es una medida del grado de repetibilidad y reproducibilidad del método analítico bajo condiciones normales de operación. La precisión se evalúa como:

##### a) REPETIBILIDAD<sup>α</sup>

**Definición:**

Evalúa la precisión y se expresa como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes de una misma preparación, realizadas bajo las mismas condiciones experimentales (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.).

<sup>α</sup> Los cálculos y criterios de aceptación se presentan en el anexo I

**Determinación:**

El análisis se realiza por sextuplicado de una misma preparación (soluciones del analito en "sistema" y placebo adicionado en "método"), correspondientes al 100% del principio activo

**Calcular:**

- Coeficiente de variación total (CV).

**b) REPRODUCIBILIDAD<sup>11</sup>****Definición:**

Evalúa la precisión del método analítico y manifiesta la concordancia entre determinaciones independientes de una muestra homogénea analizada bajo diferentes condiciones experimentales (analista y tiempo).

**Determinación:**

Se realizan determinaciones en placebos adicionados al 100% del principio activo en forma independiente y por triplicado para cada analista y en cada día, cada muestra se inyecta por duplicado.

**Calcular:**

- Coeficiente de variación total (cv).

Los resultados de reproducibilidad se someten a un arreglo factorial de dos factores o dos niveles y a un tratamiento de *análisis de varianza*, donde se generan las *F'* correspondientes a cada fuente de variación (analistas y días).

**\* EXACTITUD<sup>11</sup>****Definición:**

Se define como la concordancia entre el valor promedio obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras al 100% del principio activo.

<sup>11</sup> Los cálculos y criterios de aceptación se presentan en el anexo I

**Determinación:**

El análisis se realiza en 6 placebos adicionados de manera independiente, al 100% del principio activo, en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista. Cada análisis se inyecta por duplicado

**Calcular:**

La exactitud se evalúa por medio del modelo probabilístico *t de student* y el cálculo del intervalo de confianza para la media y del coeficiente de variación para el por ciento de recobro

**\* ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA\*****Definición:**

Mediante este análisis, se pretende conocer las condiciones en las cuales el proceso de análisis, mantiene constante su propiedad medible en condiciones y tiempos determinados. De ésta manera se tiene una mayor confiabilidad en los resultados, pues se comprueba que no presentan degradación, antes de medir su respuesta para ser cuantificada.

**Determinación:**

El estudio de estabilidad de las soluciones analíticas se realiza en la forma siguiente: las soluciones analizadas previamente, se almacenan en diferentes condiciones, por ejemplo, en refrigeración, en la oscuridad, a temperatura ambiente y en presencia de luz blanca. Posteriormente se vuelven a analizar en determinados tiempos establecidos.

**Calcular:**

Los resultados obtenidos se tabulan con base en el formato del anexo 1.

α Los cálculos y criterios de aceptación se presentan en el anexo 1

#### IV. PARTE EXPERIMENTAL.

##### IV.1 Desarrollo de la preformulación

Para el desarrollo de esta preformulación se tomó como base la formulación de un medicamento ya aprobado por la Secretaría de Salud, una suspensión que contiene amoxicilina trihidratada y clorhidrato de ambroxol. Se suponía que no existiría mucha diferencia con la formulación aprobada, dado que el clavulanato de potasio tiene propiedades fisicoquímicas similares a la amoxicilina.

La primera formulación que se propuso de polvo para suspensión, para reconstituir en 60 mL fue:

ACTIVOS	CANTIDAD
Amoxicilina trihidratada equivalente a de amoxicilina	1 500 mg
Clavulanato de potasio equivalente a de ácido clavulánico	375 mg
Clorhidrato de ambroxol	180 mg

EXCIPIENTES	CANTIDAD
Lactosa monohidratada	2824 mg
Sacarina sódica	14 mg
Pectina cítrica	5 mg
Azúcar glass	2086 mg
Carboximetilcelulosa sódica 70, baja viscosidad	5 mg
Edulcorante sabor naranja	162 mg
Metilparabeno	12 mg
Propilparabeno	3 mg

Debido a que no se obtuvieron características satisfactorias para la textura, cuerpo y estabilidad, se realizaron varias pruebas para desarrollar una nueva formulación. Primeramente, para mejorar la estabilidad, se cambió la lactosa monohidratada por la lactosa anhidra; también se cambió la carboximetilcelulosa

sódica 70 de baja viscosidad por la de alta viscosidad, con el objeto de que la suspensión adquiriera mejor consistencia; también se aumentó la cantidad de carboximetilcelulosa sódica 40 alta viscosidad y la cantidad de pectina cítrica. Otra prueba realizada fue el intentar mejorar el cuerpo de la suspensión con la sustitución de la pectina cítrica por goma de tragacanto.

A pesar de todos los experimentos realizados, la estabilidad no se mejoró en forma considerable, por lo que se analizó la interacción o incompatibilidad de cada uno de los excipientes con la mezcla amoxicilina-clavulanato de potasio. Para corroborar los resultados obtenidos, se determinó la calorimetría de cada excipiente con estos dos principios activos.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se encontró que, tanto la lactosa como el azúcar glass, son incompatibles con la amoxicilina y el clavulanato de potasio; por lo que se intentó incluir manitol o dextrosa, pero fue necesario omitir el uso de cualquiera de estos azúcares en la preformulación, dado que también resultaron incompatibles.

Después de una minuciosa investigación, se encontró que el aerosil es un estabilizante del clavulanato de potasio, por lo que se incluyó en la preformulación. Se realizaron pruebas para determinar la cantidad ideal del aerosil, la carboximetilcelulosa y la pectina.

Debido al mal sabor de la suspensión, se manufacturaron placebos con diferentes saborizantes (naranja y durazno) y marcas, además, se incrementó la cantidad de éstos en la formulación.

Se encontró también que, al aumentar el pH de la suspensión, su estabilidad disminuía; por lo que se decidió el uso de amortiguadores que estabilizaran el pH; para ello se realizaron pruebas con diferentes sales (ácido cítrico, citrato de sodio, fosfato monobásico de sodio y fosfato dibásico de sodio).

Con el fin de dar una mejor presentación a la suspensión, se propuso agregar colorante a la preformulación.

Finalmente, se realizaron varias pruebas en cuanto al envase, con tapa metálica o con tapa plástica, y a la técnica de envasado, normal o con atmósfera de nitrógeno.

Dado que el principal objetivo era encontrar una suspensión que al ser reconstituída, fuera estable durante un mínimo de 7 días en refrigeración, todas las

formulaciones propuestas se analizaron diariamente durante 7 días, manteniéndolas en refrigeración; de esta manera, los resultados de la emética de degradación, serían confiables. Como parametro de refereneta, se analizaban a la par, una muestra de un producto comercial que contiene amoxicilina trihidratada y clavulanato de potasio.

Con el objeto de simular las condiciones de dosificación del medicamento, la preformulación definitiva además de analizarla durante 7 días, cada 8 horas se puso a temperatura ambiente.

La preformulación propuesta del polvo para suspensión es:

**Polvo para suspensión**  
125 mg amoxicilina/5 mL

<b>ACTIVOS</b>	<b>CANTIDAD</b>
Amoxicilina trihidratada equivalente a de amoxicilina	1500 mg
Clavulanato de potasio equivalente a de ácido clavulánico	375 mg
Clorhidrato de ambroxol	180 mg
<b>EXCIPIENTES</b>	<b>CANTIDAD</b>
Sacarina sodica	72 mg
Pectina citrica	90 mg
Carboximetilcelulosa sódica 40 alta	500 mg
Edulcorante sabor durazno	311 mg
Metilparabeno	60 mg
Propilparabeno	12 mg
Aerosil	600 mg
Fosfato monobásico de sodio	100 mg

Se reconstituye con agua hasta un volumen de 60 mL.

Se envasa en condiciones anhidras y en una atmósfera de nitrógeno.

Su envase primario consiste en un frasco de vidrio ámbar con tapa metálica.

Una vez reconstituida la suspensión es estable durante 7 días en refrigeración.

## IV.2 Desarrollo del método analítico para cuantificar amoxicilina trihidratada y clavulanato de potasio

Inicialmente, se probó el método reportado en la USP 23, para cuantificar amoxicilina y clavulanato de potasio en una suspensión (no contiene clorhidrato de ambroxol) Con el fin de obtener una mejor resolución y menor factor de coe, además de afinar el cromatograma, se realizaron pruebas con diferentes columnas, longitudes de onda, fase móvil, volúmenes de muestra inyectados, velocidad de flujo de la fase móvil, concentración de la muestra, sensibilidad, atenuación y rechazo de área.

A continuación se describe el método analítico desarrollado para cuantificar Amoxicilina Trihidratada y Clavulanato de Potasio contenidos en un polvo para suspensión oral, con la preformulación desarrollada:

Amoxicilina trihidratada equivalente a	1500 mg
de amoxicilina	
Clavulanato de potasio equivalente a	375 mg
de ácido clavulánico	
Clorhidrato de ambroxol	180 mg
Excipiente c.b.p.	4500 mg

### LIMITES PROPUESTOS (basados en los límites farmacopeicos):

- Contiene no menos del 90% y no más del 120% de la cantidad indicada en el marbete de Amoxicilina, calculada en base seca.
- Contiene no menos del 90% y no más del 125% de la cantidad indicada en el marbete de Ácido Clavulánico, calculado en base seca.

#### a) Material

- Matraces volumétricos ámbar de 25, 50 y 500 mL.
- Matraz volumétrico de 2000 mL.
- Pipetas volumétricas de 4 y 20 mL.
- Tubos de ensayo.
- Embudos de filtración.
- Kitazato de 1000 mL.
- Equipo de filtración Millipore.

- \*Papel Wattman No. 4.
- \*Membranas de filtración de 0.22 y 0.45  $\mu$ .
- \*Jeringas de plástico
- \*Agitadores magnéticos.

#### **b) Reactivos**

- \*Fosfato monobásico de sodio R.A.
- \*Excipientes de la preformulación propuesta para la suspensión.
- \*Metanol HPLC.
- \*Agua HPLC.
- \*Ácido fosfórico R.A.
- \*Agua destilada.

#### **c) Sustancias de Referencia**

- \*Sustancia de referencia de amoxicilina trihidratada.
- \*Sustancia de referencia de clavulanato de litio
- \*Sustancia de referencia de amoxicilina trihidratada-clavulanato de potasio (4:1).
- \*Sustancia de referencia de clorhidrato de ambróxol.

#### **d) Equipos e Instrumentos**

- \*Balanza analítica.
- \*Potenciómetro.
- \*Ultrasonido.
- \*Tanque de Helio.
- \*Tanque de Nitrógeno.
- \*Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (Waters)
  - Controlador (Distribuidor de multisolventes).
  - Unidad de flujo.
  - Automuestreador.
  - Detector.
  - Módulo de datos.

#### **e) Preparación de la Solución de Referencia**

Pesar exactamente sustancia de referencia de amoxicilina trihidratada - clavulanato de potasio (4:1), equivalente a 25 mg de amoxicilina anhidra y a 6.5 mg

de ácido clavulánico, transferirlos a un matraz volumétrico ámbar de 50 mL, adicionar aproximadamente 35 mL de agua HPLC y sonicar durante 15 minutos, llevar al aforo y mezclar. Filtrar esta solución a través de una membrana de 0.45  $\mu$ . Concentración aproximada 500  $\mu$ g de amoxicilina/mL y 125  $\mu$ g de ácido clavulánico/mL. Utilizar esta solución durante 6 hrs

#### **f) Preparación de la Solución de la muestra problema**

Transferir el equivalente al contenido de un frasco a un matraz volumétrico ámbar de 500 mL con ayuda de 400 mL de agua destilada, homogeneizar la muestra en un baño ultrasonido durante 60 minutos, llevar al volumen con agua destilada y agitar magnéticamente durante 10 min. Con agitación constante, tomar una alícuota de 4 mL, transferir a un matraz volumétrico ámbar de 25 mL, llevar al volumen con agua HPLC y mezclar, filtrar a través de papel Whatman No. 4 y después a través de una membrana de 0.45  $\mu$ . Utilizar esta solución durante 6 hrs

#### **h) Preparación de la fase móvil**

Disolver 15.6 g de fosfato monobásico de sodio RA en 1900 mL de agua HPLC en un matraz volumétrico de 2000 mL, ajustar con ácido fosfórico a un pH de  $4.4 \pm 0.1$ , llevar al aforo y mezclar. Eliminar 20.0 mL de la solución anterior con pipeta volumétrica y agregarle 20.0 mL de metanol HPLC con pipeta volumétrica, mezclar y filtrar a través de membrana de 0.22  $\mu$  con ayuda de vacío. Degasificar durante 10 min.

#### **h) Condiciones del Cromatógrafo**

- Columna de acero inoxidable  $\mu$ Bondapak C18 de 3.9 mm de diámetro interno y 30 cm de longitud, con partículas de 10  $\mu$  de diámetro.
- Detector UV a una longitud de onda de 220 nm
- Sensibilidad = 0.05 AUFS.
- Velocidad de flujo = 2 mL/min.
- Margen de ruido = 200
- Atenuación de carta = 512
- Velocidad de carta = 0.25 cm/min.
- Rechazo de área = 500 000.
- Fin de corrimiento = 15 min

## **i) Procedimiento**

inyectar al cromatgrafo por sextuplicado, volúmenes iguales (10 µL) de la Solución de Referencia y calcular el coeficiente de variación de las áreas obtenidas de los cromatogramas, el cual no debe ser mayor de 2%. Una vez ajustado este parámetro, inyectar por separado, volúmenes iguales (10 µL) de la Solución de Referencia y de la solución muestra, obtener sus correspondientes cromatogramas y el área bajo los picos

## **k) Cálculos**

Calcular la cantidad, en mg, de amoxicilina / ml, de suspensión oral reconstituida:

$$\text{mg Amoxicilina/mL} = (C) (P) (L/1000 \cdot D) (R_M/R_S)$$

Donde:

C = Concentración (mg/ml.) de amoxicilina en la Solución de Referencia.

P = Pureza (µg/mL) de amoxicilina Sustancia de Referencia.

L = Cantidad (mg/mL) de amoxicilina en la suspensión oral reconstituida, según marbete.

D = Concentración (mg/ml.) de amoxicilina en la solución muestra en base a la cantidad indicada en el marbete y al factor de dilución.

R<sub>M</sub> = Respuesta del pico de amoxicilina de la solución muestra.

R<sub>S</sub> = Respuesta del pico de amoxicilina de la Solución de Referencia.

Calcular la cantidad, en mg, de ácido clavulánico / ml, de suspensión oral reconstituida:

$$\text{mg Acido Clavulánico/mL} = (C) (L/1000 \cdot D) (R_M/R_S)$$

Donde:

C = Concentración (mg/mL) de ácido clavulánico en la Solución de Referencia, considerando pureza.

L = Cantidad (mg/mL) de ácido clavulánico en la suspensión oral reconstituida, según marbete.

D = Concentración (mg/mL) de ác. clavulánico en la solución muestra en base a la cantidad indicada en el marbete y al factor de dilución.

R<sub>M</sub> = Respuesta del pico de ác. clavulánico de la solución muestra.

R<sub>S</sub> = Respuesta del pico de ác. clavulánico de la Solución de Referencia.

### **IV.3 Pruebas preliminares de evaluación del método analítico para cuantificar amoxicilina trihidratada y clavulanato de potasio.**

Las pruebas preliminares de la evaluación del método, fueron las siguientes:

#### **a. Especificidad<sup>12</sup>**

Para comprobar que el método es específico, se analizaron muestras por triplicado del placebo y del placebo adicionado al 100% de las cantidades de los principios activos expresadas en el marbete. Cada muestra se inyectó por duplicado.

Para comprobar la especificidad del método en cuanto a los productos de degradación, se analizaron muestras por triplicado de amoxicilina, clavulanato de litio, placebo y placebo adicionado degradados. Cada muestra se inyectó por duplicado.

#### **b. Linealidad del Sistema<sup>12</sup>**

Se preparó una solución patrón de amoxicilina trihidratada y clavulanato de potasio, sustancias de referencia, y a partir de ella se realizaron las diluciones (por triplicado) correspondientes al 50, 75, 100, 125 y 150% de las cantidades de estos principios activos expresadas en el marbete de la suspensión oral que se analiza. Cada muestra se analizó por duplicado.

#### **c. Precisión del Sistema<sup>12</sup>**

La precisión del sistema se evaluó como repetibilidad, analizando, por sextuplicado y en las mismas condiciones, una solución preparada con amoxicilina y clavulanato de potasio, en una concentración del 100% de las cantidades expresadas en el marbete de la suspensión.

#### **d. Exactitud del Método<sup>12</sup>**

Se realizaron 6 análisis de muestras de placebos adicionados al 100% de las cantidades de los principios activos expresadas en el marbete, preparados de manera independiente. Se inyectó por duplicado cada muestra, alternando inyecciones de la solución de referencia.

<sup>12</sup> Los cálculos y criterios de aceptación se presentan en el anexo I

#### **e. Repetibilidad del Método<sup>α</sup>**

Se analizaron, en las mismas condiciones, seis muestras de diferentes placebos adicionados al 100% de las cantidades expresadas en el marbete de los principios activos, preparados de manera independiente. Cada muestra se inyectó por duplicado.

#### **f. Estabilidad de la muestra analítica<sup>α</sup>**

Para evaluar este parámetro, se analizaron 3 muestras de un placebo adicionado al 100% de las cantidades de los principios activos expresadas en el marbete, preparadas como se indica en el método, pero mantenidas en diferentes condiciones (luz, oscuridad, temperatura ambiente y refrigeración). Las muestras se analizaron recién preparadas y 3, 6 y 24 horas después.

<sup>α</sup> Los cálculos y criterios de aceptación se presentan en el anexo I.

#### IV.4 Desarrollo del método analítico para cuantificar clorhidrato de ambroxol

A continuación se describe el método analítico para cuantificar Clorhidrato de Ambroxol, contenido en un polvo para suspensión oral, con la preformulación desarrollada.

Amoxicilina trihidratada equivalente a amoxicilina	1500 mg
de amoxicilina	
Clavulanato de potasio equivalente a ácido clavulánico	375 mg
de ácido clavulánico	
Clorhidrato de ambroxol	180 mg
Excipiente c b p	4500 mg

#### LIMITES PROPUESTOS:

- \* Contiene no menos del 90% y no más del 110% de la cantidad indicada en el marbete de Clorhidrato de Ambroxol.

#### a) Material

- Matraces volumétricos ámbar de 25 y 500 mL.
- Matraces volumétricos de 50, 1000 y 2000 mL.
- Pipetas volumétricas de 4 y 5 mL.
- Tubos de ensaye
- Embudos de filtración.
- Kitazato de 1000 mL.
- Equipo de filtración Millipore.
- Papel Wattman No. 4.
- Membranas de filtración de 0.22 y 0.45  $\mu$ .
- Jeringas de plástico.
- Agitadores magnéticos.

#### b) Reactivos

- Fosfato monobásico de potasio R.A.
- Excipientes de la preformulación propuesta para la suspensión.
- Acetonitrilo HPLC.
- Agua HPLC.
- Solución de hidróxido de potasio al 45% p/v.
- Agua destilada.

#### **c) Sustancias de Referencia**

- Sustancia de referencia de clorhidrato de ambroxol.
- Sustancia de referencia de amoxicilina trihidratada-clavulanato de potasio (4:1).

#### **d) Equipos e Instrumentos**

- Balanza analítica
- Potenciómetro
- Ultrasonido.
- Tanque de Helio.
- Tanque de Nitrógeno.
- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (Waters)
  - Controlador (Distribuidor de multisolventes).
  - Unidad de flujo.
  - Automuestreador.
  - Detector.
  - Módulo de datos.

#### **e) Preparación de la Solución de Referencia**

Pesar exactamente alrededor de 30 mg de clorhidrato de ambroxol, sustancia de referencia; transferirlos a un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar aproximadamente 35 mL de agua destilada, disolver, llevar a volumen y mezclar. Transferir una alícuota de 5 mL a un matraz volumétrico de 50 mL, aforar con agua HPLC y mezclar. Filtrar esta solución a través de una membrana de 0.45  $\mu$ . Concentración aproximada de 60  $\mu$ g/mL.

#### **f) Preparación de la Solución de la muestra problema**

Transferir el contenido total de un frasco a un matraz volumétrico ámbar de 500 mL con ayuda de 400 mL de agua destilada; homogeneizar la muestra en un baño ultrasonido durante 60 minutos, llevar al volumen con agua destilada y agitar magnéticamente durante 10 min. Con agitación constante, tomar una alícuota de 4 mL y transferir a un matraz volumétrico ámbar de 25 mL, llevar al volumen con agua HPLC. Filtrar a través de papel Watman No. 4 y después a través de una membrana de 0.45  $\mu$ .

### g) Preparación de la fase móvil

Disolver 6.8 g de fosfato monobásico de potasio R.A. en 900 mL de agua HPLC en un matraz volumétrico de 1000 mL., ajustar con solución de hidróxido de potasio al 45% p/v a un pH de 3.0 ± 0.1, llevar al volumen y mezclar. Mezclar 50 partes del amortiguador pH 3 y 50 partes de acetonitrilo HPLC, mezclar y filtrar a través de membrana de 0.22 µ con ayuda de vacío. Degasificar durante 10 min.

### h) Condiciones del Cromatógrafo

- \* Columna de acero inoxidable Resolve C18 de 3.9 mm de diámetro interno y 15 cm de longitud, con partículas de 5 µ de diámetro
- \* Detector UV a una longitud de onda de 248 nm.
- \* Sensibilidad = 0.05 AUFS
- \* Velocidad de flujo = 1 mL/min.
- \* Margen de ruido = 200
- \* Atenuación de carta = 128
- \* Velocidad de carta = 0.5 cm/min.
- \* Rechazo de área = 100 000
- \* Fin de corrimiento = 10 min

### j) Procedimiento

Injectar al cromatógrafo por sextuplicado, volúmenes iguales (20 µL) de la Solución de Referencia y calcular el coeficiente de variación de las áreas obtenidas de los cromatogramas; el cual no debe ser mayor de 2%. Una vez ajustado este parámetro, inyectar por separado, volúmenes iguales (20 µL) de la Solución de Referencia y de la solución muestra, obtener sus correspondientes cromatogramas y el área bajo los picos.

### k) Cálculos

Calcular la cantidad, en mg, de ambroxol / mL de suspensión oral reconstituida:

$$\text{mg Ambroxol/mL} = (C) (P) (L/1000 * D) (R_{\text{ref}}/R_{\text{m}})$$

**Donde:**

**C** = Concentración (mg/ml.) de ambroxol en la Solucion de Referencia.

**P** = Pureza ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ .) de ambroxol Sustancia de Referencia

**L** = Cantidad (mg/ml.) de ambroxol en la suspension oral reconstituida, según marbete.

**D** = Concentración (mg/mL.) de ambroxol en la solución muestra en base a la cantidad indicada en el marbete y al factor de dilucion

**R<sub>M</sub>** = Respuesta del pico de ambroxol de la solución muestra

**R<sub>S</sub>** = Respuesta del pico de ambroxol de la Solución de Referencia.

#### **IV.5 Pruebas preliminares de evaluación del método analítico para cuantificar clorhidrato de ambroxol**

Las pruebas preliminares de evaluación del método fueron las siguientes:

##### **a. Especificidad<sup>ii</sup>**

Para comprobar que el método es específico, se analizaron muestras por triplicado del placebo y del placebo adicionado al 100% de la cantidad de clorhidrato de ambroxol expresada en el marbete. Cada muestra se inyectó por duplicado.

Para comprobar la especificidad del método en cuanto a los productos de degradación, se analizaron muestras por triplicado de clorhidrato de ambroxol degradado, placebo degradado, placebo adicionado degradado. Cada muestra se inyectó por duplicado.

##### **b. Linealidad del Sistema<sup>ii</sup>**

Se preparó una solución patrón de clorhidrato de ambroxol, sustancia de referencia, y a partir de ella se realizaron las diluciones correspondientes al 50, 75, 100, 125 y 150% de la cantidad del principio activo en estudio, expresada en el marbete de la suspensión. Cada una de las concentraciones se preparó por triplicado y cada muestra se analizó por duplicado.

##### **c. Precisión del Sistema<sup>ii</sup>**

La precisión del sistema se evaluó como repetibilidad, analizando, por sextuplicado y en las mismas condiciones, una solución preparada con clorhidrato de ambroxol, en una concentración del 100% de la cantidad expresada en el marbete de la suspensión.

##### **d. Exactitud del Método<sup>ii</sup>**

Se realizaron 6 análisis de muestras de placebos adicionados al 100% de la cantidad del clorhidrato de ambroxol expresada en el marbete, preparados de manera independiente. Se inyectó por duplicado cada muestra, alternando inyecciones de la solución de referencia.

<sup>ii</sup> Los cálculos y criterios de aceptación se presentan en el anexo I

### **e. Repetibilidad del Método"**

Se analizaron, en las mismas condiciones, seis muestras de diferentes placebos adicionados al 100% de la cantidad expresada en el marbete del clorhidrato de ambroxol, preparados de manera independiente

### **f. Estabilidad de la muestra analítica"**

Para evaluar este parámetro, se analizaron 3 muestras de un placebo adicionado al 100% de la cantidad expresada en el marbete de clorhidrato de ambroxol, preparadas como se indica en el método pero mantenidas en diferentes condiciones (luz, oscuridad, temperatura ambiente y refrigeración). Las muestras se analizaron recién preparadas y 3, 6 y 24 horas después.

**a Los cálculos y criterios de aceptación se presentan en el anexo I.**

## V. RESULTADOS

### V. 1 Preformulación

La primera preformulación realizada estuvo basada en la formulación de un medicamento que contiene amoxicilina trihidratada y clorhidrato de ambroxol, los resultados no fueron los esperados, por el contrario, las propiedades reológicas de la suspensión no fueron satisfactorias, además que la inestabilidad del clavulanato de potasio en el polvo para suspensión y en la suspensión fue evidente (se produjo un cambio de color de blanco a amarillo rojizo)

Ante la inestabilidad del clavulanato de potasio en el polvo para suspensión se realizó el cambio de la lactosa monohidratada por la lactosa anhidra, ya que al clavulanato de potasio es higroscópico. De esta manera, el cambio de color en el polvo para suspensión fue más lento.

En cuanto al mejoramiento de las propiedades reológicas de la suspensión, se decidió cambiar la carboximetilcelulosa sódica 70 baja viscosidad por la carboximetilcelulosa sódica 40 alta viscosidad, con lo cual se mejoró la consistencia de la suspensión; por esta razón, se diseñó una matriz de pruebas para encontrar la cantidad mínima necesaria de carboximetilcelulosa sódica 40 alta viscosidad que proporcionara una adecuada suspensión del sólido en el vehículo, los resultados mostraron que si la carboximetilcelulosa sódica 40 alta viscosidad se encuentra en un 11% de la cantidad total de polvo para suspensión, se obtiene una suspensión de lenta sedimentación y de fácil resuspensión. Con este mismo propósito, se diseñó una matriz de pruebas para decidir si se debería usar goma de tragacanto en sustitución de pectina cítrica; los resultados de estas pruebas mostraron que era preferible el uso de pectina cítrica que de goma de tragacanto, puesto que la goma de tragacanto abatió la viscosidad de la suspensión. De acuerdo con estos resultados, se diseñó una matriz de pruebas para encontrar la cantidad mínima necesaria de pectina cítrica; se observó que la pectina cítrica al 2% de la cantidad total de polvo para suspensión, proporciona a la suspensión una viscosidad tal que permite una lenta sedimentación y una fácil resuspensión.

Para mejorar la estabilidad de la suspensión, se determinó la interacción o incompatibilidad de cada uno de los excipientes con la mezcla amoxicilina trihidratada- clavulanato de potasio (4:1), analizando diariamente las muestras, durante 7 días y manteniéndolas durante ese periodo en refrigeración; además, los resultados se corroboraron con los resultados de calorimetría. Los datos obtenidos

por ambos métodos coincidieron; estos mostraron que el clavulanato de potasio es incompatible con la lactosa anhidra y con el azúcar glass, ya que cada uno de ellos induce la degradación del clavulanato. Debido a estas incompatibilidades, se realizaron pruebas con manitol y dextrosa, pero se encontró que ambos azúcares aumentan la velocidad de degradación. Todo esto propicio probar el aumento de sacarina (dentro de los límites permitidos), y para ello se diseñó una matriz de pruebas que mostró que, se requiere que la sacarina se encuentre al 1.6% de la cantidad total de polvo para suspensión, para endulzar dicha suspensión sin amargarla.

En la revisión bibliográfica se encontró que el aerosil actúa como estabilizante del clavulanato de potasio, por lo que se decidió incluirlo en la preformulación y se diseñó una matriz de pruebas para encontrar la cantidad mínima necesaria de aerosil. Se encontró que el aerosil al 13% de la cantidad total de polvo para suspensión estabiliza a la suspensión durante 7 días, manteniendo las muestras en refrigeración.

Debido al desagradable sabor característico de la amoxicilina, se realizaron pruebas con diferentes saborizantes y se encontró que el saborizante de durazno fue el que enmascara mejor el sabor, por lo cual se diseñó una matriz de pruebas con el propósito de encontrar la cantidad mínima necesaria de dicho saborizante; se obtuvieron resultados que demostraron que este saborizante en un 7% de la cantidad total de polvo para suspensión enmascara de manera eficiente el sabor del antibiótico. De acuerdo con el saborizante elegido y para dar una mejor presentación a la suspensión, se realizaron pruebas con colorantes (amarillo No. 6 y rojo No. 3), pero se encontró que ambos son incompatibles con el clavulanato de potasio.

Durante las pruebas se observó que, al aumentar el pH de la suspensión, su estabilidad disminuye, por lo que se decidió el uso de amortiguadores, para ello se realizaron matrices de pruebas para encontrar el amortiguador ideal y la cantidad mínima necesaria del mismo; los resultados mostraron que el fosfato monobásico de sodio en un 2.2% de la cantidad total de polvo para suspensión permite que el pH de la suspensión no sea mayor de 6.0.

Debido a que el clavulanato de potasio es sensible a la luz, el envase primario tenía que ser un frasco de vidrio ámbar, y para decidir el material de la tapa (plástico o metal), se realizaron un par de pruebas que demostraron que la tapa plástica interacciona con la suspensión, de manera que se optó por usar tapa metálica. También se realizaron pruebas para determinar la técnica de envasado y se encontró que se requieren condiciones anhidras y una atmósfera de nitrógeno.

Mediante estas pruebas se obtuvo la preformulación definitiva del polvo para suspensión, la cual consiste en:

<b>ACTIVOS</b>	<b>CANTIDAD</b>
Amoxicilina trihidratada equivalente a de amoxicilina	1500 mg
Clavulanato de potasio equivalente a de ácido clavulánico	375 mg
Clorhidrato de ambroxol	180 mg

<b>EXCIPIENTES</b>	<b>CANTIDAD</b>
Sacarina sódica	72 mg
Pectina citrica	90 mg
Carboximetilcelulosa sódica 40 alta viscosidad	500 mg
Eedulcorante sabor durazno	311 mg
Metilparabeno	60 mg
Propilparabeno	12 mg
Aerosil	600 mg
Fosfato monobásico de sodio	100 mg

Se envasa en condiciones anhidras y en una atmósfera de nitrógeno.

Su envase primario consiste en un frasco de vidrio ámbar con tapa metálica.

Se reconstituye con agua hervida a un volumen de 60 mL.

Una vez reconstituida la suspensión, es estable durante 7 días en refrigeración.

Esta preformulación se sometió a análisis diario, durante 7 días, en 2 condiciones:

- 1) Manteniendo las muestras en refrigeración todo el tiempo.
- 2) Manteniendo las muestras en refrigeración, pero poniéndolas a temperatura ambiente cada 8 horas, simulando dosificación.

Los resultados iniciales y al 7º día de la reconstitución fueron:

**\* Para amoxicilina**

Condición	Tiempo (días)	Cantidad Adicionada (µg/mL)	Area Bajo la Curva	Cantidad Encontrada (µg/mL)	% de Recobro	Promedio % de Recobro
1	0	553 796929	16875698 16825793	561 670579 560 009593	101 42 101 12	101 27
	7	553 796929	16754631 16786514	543 032603 541 065959	98 05 98 24	98 15
2	0	553 796929	16875698 16825793	561 670579 560 009593	101 42 101 12	101 27
	7	553 796929	16624431 16680322	538 812704 540 624182	97 29 97 62	97 46

**\* Para Acido Clavulánico**

Condición	Tiempo (días)	Cantidad Adicionada (µg/mL)	Area Bajo la Curva	Cantidad Encontrada (µg/mL)	% de Recobro	Promedio % de Recobro
1	0	132 035758	3760366 3680076	134 655262 131 780150	101 98 99 81	100 90
	7	132 035758	3532726 3501987	129 724429 128 505682	98 23 97 91	97 82
2	0	132 035758	3760366 3680076	134 655262 131 780150	101 98 99 81	100 90
	7	132 035758	3461097 3391043	127 694161 124 521703	96 26 94 31	95 28

**\* Para amroxol**

Condición	Tiempo (días)	Cantidad Adicionada (µg/mL)	Area Bajo la Curva	Cantidad Encontrada (µg/mL)	% de Recobro	Promedio % de Recobro
1	0	57 696000	2706866 2682205	57 653643 57 128374	99 93 99 02	99 47
	7	57 696000	2676117 2676850	56 998712 57 014332	98 79 98 82	98 81
2	0	57 696000	2706866 2682205	57 653643 57 128374	99 93 99 02	99 47
	7	57 696000	2675461 2676403	56 984756 57 004813	98 77 98 80	98 79

Con ésto, se comprobó que la suspensión al ser reconstituida es estable durante 7 días en refrigeración, aún con la manipulación al dosificar.

**V. 2 Método analítico para cuantificar amoxicilina trihidratada y clavulanato de potasio en la suspensión desarrollada**

**V.2.1. ESPECIFICIDAD**

En las tablas No. 1 y 2 se presentan los resultados de las muestras analizadas para evaluar este parámetro

**TABLA No. 1  
(Amoxicilina)**

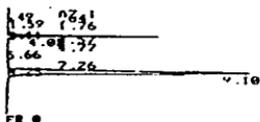
	Cantidad Adicionada (µg/ml.)	Area Bajo la Curva	Cantidad Encontrada (µg/ml.)	% de Recobro	Tiempo de Retención (min)
Amoxicilina trihidratada Clavulanato de Potasio (S Ref)	540 038660	7877077	539 794657	99.96	9.10
Placebo (Clorhidrato de Am-broxol y vehículo)	-----	-----	-----	-----	-----
Placebo Adicionado con Amoxicilina trihidratada y Clavulanato de Potasio	539 564510	7876077	539 252254	99.94	9.04
Amoxicilina trihidratada Clavulanato de Potasio (S Ref. Degradada con H <sub>2</sub> O.)	520 538120	-----	-----	-----	-----
Placebo (Degradado con H <sub>2</sub> O.)	-----	-----	-----	-----	-----
Placebo Adicionado con Amoxicilina trihidratada y Clavulanato de Potasio (Deg. con H <sub>2</sub> O.)	539 014310	-----	-----	-----	-----

**TABLA No. 2  
(Clavulanato de Potasio)**

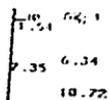
	Cantidad Adicionada (µg/ml.)	Area Bajo la Curva	Cantidad Encontrada (µg/ml.)	% de Recobro	Tiempo de Retención (min)
Amoxicilina trihidratada Clavulanato de Potasio (S Ref)	124 085310	1871877	124 158725	100.06	4.02
Placebo (Clorhidrato de Am-broxol y vehículo)	-----	-----	-----	-----	-----
Placebo Adicionado con Amoxicilina trihidratada y Clavulanato de Potasio	127 071089	1933025	128 214577	100.90	4.01
Amoxicilina trihidratada Clavulanato de Potasio (S Ref. Degradada con H <sub>2</sub> O.)	125 883230	2481	0 164561	0.13	4.01
Placebo (Degradado con H <sub>2</sub> O.)	-----	-----	-----	-----	-----
Placebo Adicionado con Amoxicilina trihidratada y Clavulanato de Potasio (Deg. con H <sub>2</sub> O.)	126 984320	2337	0 155009	0.12	4.00

A continuación se presentan los cromatogramas correspondientes a:

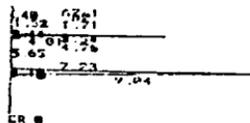
- Cromatograma No. 1: Amoxicilina Trihidratada - Clavulanato de Potasio, sustancia de referencia
- Cromatograma No. 2: Placebo (Clorhidrato de Ambroxol y vehículo)
- Cromatograma No. 3: Placebo Adicionado con Amoxicilina trihidratada y Clavulanato de Potasio.
- Cromatograma No. 4: Amoxicilina Trihidratada - Clavulanato de Potasio, S. Ref., degradada con  $H_2O_2$ .
- Cromatograma No. 5: Placebo (Clorhidrato de Ambroxol y vehículo), degradado con  $H_2O_2$ .
- Cromatograma No. 6: Placebo Adicionado con Amoxicilina trihidratada y clavulanato de Potasio, degradado con  $H_2O_2$ .



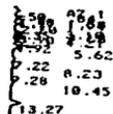
**Cromatograma No. 1**



**Cromatograma No. 2**



**Cromatograma No. 3**



**Cromatograma No. 4**

1.53	0.741
1.22	3.14
1.56	0.71
CR 0	14.44

Cromatograma No. 5

1.47	0.291
1.19	3.74
1.55	5.82
1.68	4.84
1.22	7.50
1.98	9.18
1.3.10	11.02
CR 0	

Cromatograma No. 6

Analizando los datos de las tablas No. 1 y 2, y los cromatogramas No. 1, 2, 3, 4, 5 y 6, se plantea lo siguiente:

- La semejanza entre los tiempos de retención de los cromatogramas No. 1 y 3, sustancia de referencia y placebo adicionado, respectivamente, y los datos para estas muestras, de las tablas No. 1 y 2 de % de recobro, cercanos a 100%, indican que la respuesta obtenida del placebo adicionado se debe únicamente a la amoxicilina y al ácido clavulánico.
- Se observa claramente en las tablas No. 1 y 2 y en el cromatograma No. 2 que el placebo no presenta ninguna respuesta en el tiempo de retención en el que la amoxicilina y el ácido clavulánico presentan su respuesta, lo que nos indica que ni el vehículo de la suspensión ni el clorhidrato de ambroxol, interfieren en la determinación de amoxicilina y ácido clavulánico para el método propuesto.
- La ausencia de respuesta, en los tiempos de retención en que se presentan respuesta el ácido clavulánico y la amoxicilina, en los cromatogramas No. 4, 5 y 6 y los datos de las tablas No. 1 y 2, indican que los productos de degradación del placebo y de los principios activos, no interfieren con la respuesta obtenida de la amoxicilina y del ácido clavulánico. Se considera ausencia de respuesta si, el % Recuperado es menor al 1.0%.
- Se concluye que el método propuesto para la determinación de amoxicilina trihidratada y clavulanato de potasio en suspensión oral propuesta, es Específico.

## V.2.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA

### a) Para Amoxicilina

En la tabla No. 3 se presentan los resultados obtenidos para la Linealidad del Sistema y en la gráfica No. 1 se observa la tendencia lineal de los datos. En la tabla No. 4 se muestran los resultados de los cálculos del análisis de varianza

**TABLA No. 3**

Concentración %	Cantidad Adicionada (µg/mL)	Area Bajo la Curva	Cantidad Encontrada (µg/mL)	Promedio de la Cantidad Encontrada (µg/mL)
50	270 019330	3,645,105	272 142230	272 017650
		3,647,121	272 292750	
		3,638,083	271 617970	
75	405 028990	5,417,142	404 441880	406 163783
		5,453,189	407 133140	
		5,450,285	406 916330	
100	540 038660	7,215,118	545 840660	541 192913
		7,220,241	539 060610	
		7,311,045	538 678130	
125	675 048320	9,095,900	679 096640	676 467823
		9,022,334	673 604230	
		9,063,834	676 702600	
150	810 057900	10,849,181	809 995970	809 611997
		10,864,192	811 116690	
		10,818,741	807 723330	

#### Regresión Lineal

$m = 0.996590$
$b = 2.893688$
$r = 0.999943$
$r^2 = 0.999886$

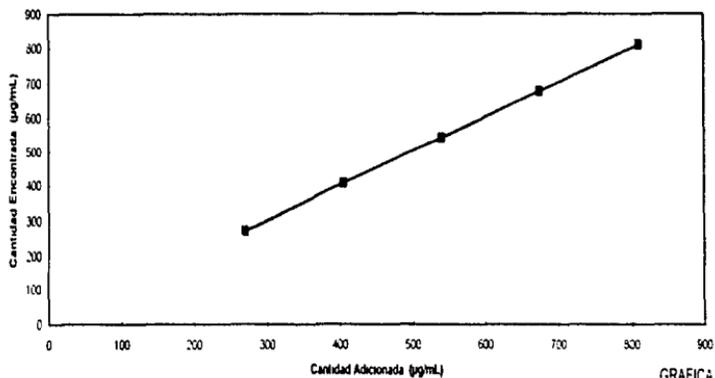
#### Pendiente

$t_{cal} = 0.012336$
$t_{tab}(0.975, 2) = 2.16$
$IC = 0.996590 + 0.597067$
$LS = 1.593658$
$LI = 0.399523$

#### Ordenada al Origen

$t_{cal} = 0.018276$
$t_{tab}(0.975, 2) = 2.16$
$IC = 2.893688 + 341.998695$
$LS = 344.892383$
$LI = -339.105007$

LINEALIDAD DEL SISTEMA  
Amoxicilina



GRAFICA No 1

**TABLA No. 4**

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F <sub>cal</sub>	F <sub>tab</sub>
Regresión	1	543105 2089	543105 2089	114154 522	9 07
Error de Regresión	15 - 2 = 13	61 84920527	4 7576311 75		
Falta de Ajuste	(15 - 2) - (15) (3 - 1) = 3	-3289842 422	-1096614 141	-3 333270669	3 71
Error Puro	(5) (3 - 1) = 10	3289904 271	328990 4271		

Analizando los resultados se puede observar que el sistema de medición es lineal, ya que **b**, **m** y **r** cumplen con los criterios de aceptación, tal como se muestra a continuación:

- Pendiente (m):

Como  $|t_{cal}| < t_{tab}(13, 0.975)$  y los límites de confianza incluyen al 1, entonces se acepta  $H_0$  y se concluye que el valor de la pendiente obtenida experimentalmente, no es significativamente diferente de 1.

- Ordenada al Origen (b):

Como  $|t_{cal}| < t_{tab}(13, 0.975)$  y los límites de confianza incluyen al 0, entonces se acepta  $H_0$  y se concluye que el valor de la ordenada al origen obtenida experimentalmente, no es significativamente diferente de 0.

- Coeficiente de Correlación (r):

Cumple con el criterio de aceptación, ya que éste debe ser  $r \geq 0.99$  y el resultado obtenido fue 0.999943.

- Coeficiente de Determinación ( $r^2$ ):

Cumple con el criterio de aceptación, ya que éste debe ser  $r^2 \geq 0.98$  y el resultado obtenido fue 0.999886.

- Análisis de Varianza:

Como  $F_{Rcal} \geq F_{Rtab}(1, 13, 0.01)$  y  $F_{Fcal} < F_{Ftab}(13, 10, 0.05)$ , el modelo lineal es correcto para describir la relación entre la cantidad adicionada y la cantidad encontrada.

**b) Para Acido Clavulánico**

En la tabla No. 5 se presentan los resultados obtenidos para la Linealidad del Sistema y en la gráfica No. 2 se observa la tendencia lineal de los datos. En la tabla No. 6 se muestran los resultados de los cálculos del análisis de varianza.

**TABLA No. 5**

Concentración %	Cantidad Adicionada (µg/mL)	Area Bajo la Curva	Cantidad Encontrada (µg/mL)	Promedio de la Cantidad Encontrada (µg/mL)
50	62 042660	821,673	61 999545	61 600563
		812,971	61 342933	
		814,512	61 450210	
75	93 063980	1,218,451	91 938529	92 258962
		1,219,209	91 995724	
		1,230,433	92 842634	
100	124 085310	1,634,126	123 303390	123 663287
		1,649,857	124 490380	
		1,632,704	123 196090	
125	155 106640	2,063,522	155 703580	155 306630
		2,047,550	154 498400	
		2,063,712	155 717910	
150	186 127970	2,464,953	185 993650	185 99365
		2,470,322	186 398770	
		2,465,648	186 046100	

**Regresión Lineal**

$m = 1.006207$
$b = -1.060431$
$r = 0.999937$
$r^2 = 0.999874$

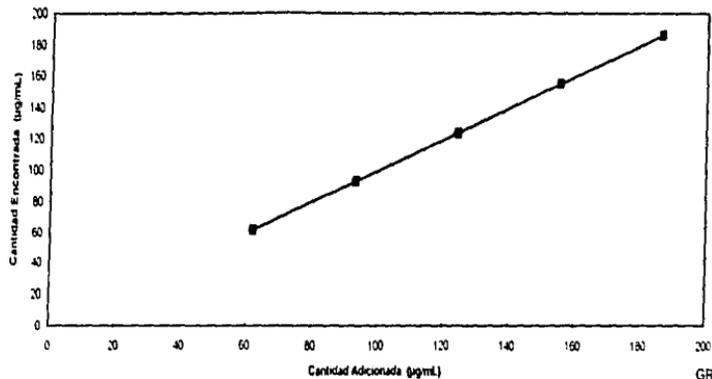
**Pendiente**

$t_{cal} = 0.022242$
$t_{tab}(13; 0.975) = 2.16$
$IC = 1.006207 \pm 0.602833$
$LS = 1.609040$
$LI = 0.403375$

**Ordenada al Origen**

$t_{cal} = -0.028870$
$t_{tab}(13; 0.975) = 2.16$
$IC = -1.060431 \pm 79.340242$
$LS = 78.279811$
$LI = -80.400673$

LINEALIDAD DEL SISTEMA  
Acido Clavulánico



GRAFICA N° 2

**TABLA No. 6**

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F cal	F tab
Regresión	1	29229 20581	29229 20581	10.3328 702	9.07
Error de Regresión	15 - 2 = 13	3 677387483	0 28287596		
Falta de Ajuste	$(15 - 2) \div (5 - 3 - 1) = 3$	-172737 2362	-57579 07873	-3 333262371	3.71
Error Puro	$(5) (3 - 1) = 10$	172740 9136	17274 09136		

Analizando los resultados se puede observar que el sistema de medición es lineal, ya que **b**, **m** y **r** cumplen con los criterios de aceptación, tal como se muestra a continuación:

- Pendiente (m):

Como  $|t_{cal}| < t_{tab}(13; 0.975)$ , y los límites de confianza incluyen al 1, entonces se acepta  $H_0$  y se concluye que el valor de la pendiente obtenida experimentalmente, no es significativamente diferente de 1

- Ordenada al Origen (b):

Como  $|t_{cal}| < t_{tab}(13; 0.975)$ , y los límites de confianza incluyen al 0, entonces se acepta  $H_0$  y se concluye que el valor de la ordenada al origen obtenida experimentalmente, no es significativamente diferente de 0

- Coeficiente de Correlación (r):

Cumple con el criterio de aceptación, ya que éste debe ser  $r \geq 0.99$  y el resultado obtenido fue 0.99937.

- Coeficiente de Determinación ( $r^2$ ):

Cumple con el criterio de aceptación, ya que éste debe ser  $r^2 \geq 0.98$  y el resultado obtenido fue 0.999874.

- Análisis de Varianza:

Como  $F_{R cal} \leq F_{R tab}(1; 13; 1\%)$  y  $F_{A cal} \leq F_{A tab}(3; 10; 1\%)$ , el modelo lineal es correcto para describir la relación entre la cantidad adicionada y la cantidad encontrada.

### V.2.3. REPETIBILIDAD DEL SISTEMA

#### a) Para Amoxicilina

La tabla No. 7 presenta los resultados obtenidos para evaluar este parámetro.

**TABLA No. 7**

Cantidad Adicionada (µg/mL)	Area Bajo la Curva	Cantidad Encontrada (µg/mL)	% Recuperado
540 03866	7451446	541 336793	100 24
540 03866	7445940	540 936790	100 17
540 03866	7456483	541 702724	100 31
540 03866	7422804	539 255993	99 86
540 03866	7428613	539 678008	99 93
540 03866	7396178	537 321653	99 50

#### Desviación Estándar

n	= 6
$\bar{x}$	= 100.03%
Sx	= 0.302977
C.V.	= 0.30%

El sistema de medición es repetible, ya que el % Recuperado (100.03%) se encuentra dentro del intervalo para métodos cromatográficos que es del 98.0 - 102.0% y el Coeficiente de Variación obtenido en forma experimental (0.30%) es menor del 1.5%.

#### b) Para Acido Clavulánico

La tabla No. 8 presenta los resultados obtenidos para evaluar este parámetro.

**TABLA No. 8**

Cantidad Adicionada (µg/mL)	Area Bajo la Curva	Cantidad Encontrada (µg/mL)	% Recuperado
124 085310	1691311	124 656628	100 46
124 085310	1687818	124 399179	100 25
124 085310	1683919	124 111807	100 02
124 085310	1683265	124 063604	99 98
124 085310	1688685	124 463081	100 30
124 085310	1666359	122 817562	98 98

Desviación Estándar	
n	= 6
$\bar{x}$	= 99.98%
Sx	= 0.531664
C V	= 0.53%

El sistema de medición es repetible, ya que el % Recuperado (99.98%) se encuentra dentro del intervalo para métodos cromatográficos que es del 98.0 - 102.0% y el Coeficiente de Variación obtenido en forma experimental (0.53%) es menor del 1.5%.

## V.2.4. REPETIBILIDAD Y EXACTITUD DEL METODO

### a) Para Amoxicilina

En la tabla No. 9 se presentan los datos obtenidos, necesarios para evaluar este parámetro.

TABLA No. 9

Cantidad Adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Area Bajo la Curva	Cantidad Encontrada ( $\mu\text{g/mL}$ )	% de Recobro
478.048	18507233	479.242047	100.25
478.464	18523926	479.674310	100.25
476.896	18436395	477.407708	100.11
478.016	18453088	477.839971	99.96
475.264	18383174	476.029558	100.16
478.112	18444612	477.6204858	99.90

Desviación Estándar	
n	= 6
$\bar{x}$	= 100.11%
Sx	= 0.147850
C V	= 0.15%

Como el Coeficiente de Variación obtenido (0.15%) es menor que el valor límite para métodos cromatográficos que es del 2.0%, entonces el método de medición es repetible.

$t_{cal} = 1.743680$
$t_{tab}(1-\alpha/2), n = 2.16$
$IC = -1.060433 \pm 0.155160$
$LS = 100.260407$
$LI = 99.950088$

Como  $|t_{cal}| < t_{tab(1-\alpha/2)}$  y los límites de confianza incluyen al 100%, entonces se acepta  $H_0$  y se concluye que el valor de la media obtenida experimentalmente, no es significativamente diferente de 100%, por lo tanto el método propuesto es exacto.

#### b) Para Acido Clavulánico

En la tabla No. 10 se presentan los datos obtenidos, necesarios para evaluar este parámetro.

**TABLA No. 10**

Cantidad Adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Area Bajo la Curva	Cantidad Encontrada ( $\mu\text{g/mL}$ )	% de Recobro
116.9238	4521535	117.081176	100.14
117.0256	4490941	116.288971	99.37
116.6420	4531461	117.338201	100.60
116.9160	4521179	117.071958	100.13
116.1823	4503849	116.623213	100.38
116.9395	4512435	116.845540	99.92

#### Desviación Estándar

$n$	$= 6$
$\bar{X}$	$= 100.09\%$
$S_x$	$= 0.422193$
$CV$	$= 0.42\%$

Como el Coeficiente de Variación obtenido (0.42%) es menor que el valor límite para métodos cromatográficos que es del 2.0%, entonces el método de medición es repetible.

$t_{cal} = 0.516895$
$t_{tab}(1-\alpha/2), n = 2.16$
$IC = -1.060433 \pm 0.443068$
$LS = 100.532160$
$LI = 99.646024$

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Como el intervalo de confianza incluye al 100%, entonces se acepta  $H_0$  y se concluye que el valor de la media obtenida experimentalmente, no es significativamente diferente de 100%, por lo tanto el método propuesto es exacto.

#### V.2.5. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA DURANTE EL ANALISIS

Las tablas No. 11 y 12 presentan los resultados obtenidos durante la determinación de Amoxicilina y Acido Clavulánico, después de mantener las muestras bajo las condiciones indicadas.

##### a) Para Amoxicilina

TABLA No. 11

Condición Tiempo (h)	% ENCONTRADO		
	Luz Blanca	Oscuridad	Refrigeración
0	100.31	99.98	100.02
3	99.23	99.31	99.77
6	97.51	98.81	99.23
24	87.41	96.31	98.95

##### b) Para Acido Clavulánico

TABLA No. 12

Condición Tiempo (h)	% ENCONTRADO		
	Luz Blanca	Oscuridad	Refrigeración
0	100.12	99.98	99.95
3	98.93	99.00	99.14
6	96.38	98.16	98.88
24	83.13	92.41	98.14

Calculando el Factor I obtenemos:

a) Para Amoxicilina

TABLA No. 13

Condición Tiempo (h)	% ENCONTRADO		
	Luz Blanca	Oscuridad	Refrigeración
3	98.92	99.33	99.74
6	97.21	98.83	99.20
24	87.14	96.33	98.92

b) Para Acido Clavulánico

TABLA No. 14

Condición Tiempo (h)	% ENCONTRADO		
	Luz Blanca	Oscuridad	Refrigeración
3	98.81	99.02	99.18
6	96.26	98.18	98.92
24	83.03	92.44	98.18

\* Nota: la muestra sometida a refrigeración, se encontraba en su envase primario (frasco de vidrio ámbar con tapa metálica).

Como se observa en las tablas 13 y 14, bajo las condiciones de refrigeración, la muestra es estable durante las 24 horas, porque para ambos principios activos, el factor calculado se encuentra en el intervalo de aceptación (102.0 - 98.0%). pero bajo las condiciones de oscuridad la muestra es estable solamente las 6 primeras horas, en que el factor calculado para ambos principios activos se encuentra en el intervalo de aceptación, por lo que se recomienda analizar la muestra dentro de las 6 primeras horas de su reconstitución, usando material de vidrio ámbar; en cambio, las muestras sometidas a la luz blanca sólo son estables durante las 3 primeras horas, ya que después de este tiempo, el factor calculado no entra en el intervalo de aceptación.

**V. 3 Método analítico para cuantificar clorhidrato de ambroxol en la suspensión desarrollada**

**V.3.1 ESPECIFICIDAD**

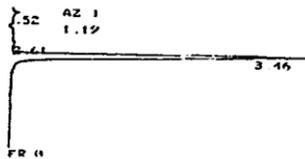
En la tabla No. 15 se presentan los resultados de las muestras analizadas para evaluar este parámetro

**TABLA No. 15**

	Cantidad Adicionada (µg/ml.)	Area Bajo la Curva	Cantidad Encontrada (µg/ml.)	% de Recobro	Tiempo de Retención (min)
Clorhidrato de Ambroxol (Sustancia de Referencia)	50 034351	1756784	60 177464	100.41	3.46
Placebo (Amoxicilina trihidratada Clavulanato de Potasio y vehículo)	-----	-----	-----	-----	-----
Placebo Adicionado con Clorhidrato de Ambroxol	60 024838	1771413	60 363658	100.57	3.41
Clorhidrato de Ambroxol (S Ref., Deg. con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	60 085423	12304	0.421465	0.70	3.50
Placebo (Degradado con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	-----	-----	-----	-----	-----
Placebo Adicionado con Clorhidrato de Ambroxol (Degradado con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	1 055149	16338	0 528156	0.87	3.47

A continuación se presentan los cromatogramas correspondientes a:

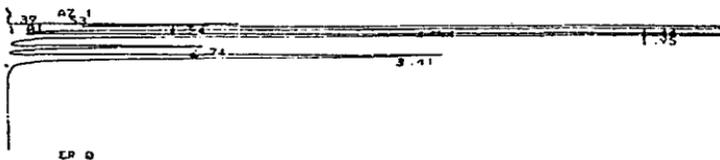
- Cromatograma No. 7: Clorhidrato de Ambroxol, sustancia de referencia.
- Cromatograma No. 8: Placebo (Clavulanato de Potasio - Amoxicilina Trihidratada y vehículo).
- Cromatograma No. 9: Placebo Adicionado con Clorhidrato de Ambroxol.
- Cromatograma No. 10: Clorhidrato de Ambroxol, S Ref., degradada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Cromatograma No. 11: Placebo (Clavulanato de Potasio-Amoxicilina Trihidratada y vehículo), degradado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Cromatograma No. 12: Placebo Adicionado con Clorhidrato de Ambroxol, degradado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



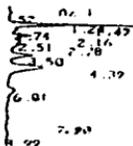
Cromatograma No. 7



Cromatograma No. 8



Cromatograma No. 9



Cromatograma No. 10



Cromatograma No. 11



Cromatograma No. 12

Analizando los datos de la tabla No. 15, y los cromatogramas No. 7, 8, 9, 10, 11 y 12, se plantea lo siguiente:

- La semejanza entre los tiempos de retención de los cromatogramas No. 7 y 9, sustancia de referencia y placebo adicionado, respectivamente, y los datos para estas muestras, de la tabla No. 13 de % de Recobro cercano a 100%, indican que la respuesta obtenida del placebo adicionado se debe únicamente al clorhidrato de ambroxol.
- Se observa claramente en la tabla No. 13 y en el cromatograma No. 8 que el placebo no presenta ninguna respuesta en el tiempo de retención en el que el clorhidrato de ambroxol presenta su respuesta, lo que nos indica que ni el vehículo de la suspensión ni la amoxicilina ni el ácido clavulánico interfieren en la determinación de clorhidrato de ambroxol para el método propuesto.
- La ausencia de respuesta, en los tiempos de retención en que presenta respuesta el clorhidrato de ambroxol, en los cromatogramas No. 4, 5 y 6 y los datos de la tabla No. 13, indican que los productos de degradación del placebo y de los principios activos, no interfieren con la respuesta obtenida del clorhidrato de ambroxol. Se considera ausencia de respuesta, si el % Recuperado es menor al 1%.
- Se concluye que el método propuesto para la determinación del clorhidrato de ambroxol en suspensión oral propuesta, es específico.

### **V.3.2. LINEALIDAD DEL SISTEMA**

En la tabla No. 16 se presentan los resultados obtenidos para la Linealidad del Sistema y en la gráfica No. 3 se observa la tendencia lineal de los datos. En la tabla No. 17 se muestran los resultados de los cálculos del análisis de varianza.

**TABLA No. 16**

Concentración %	Cantidad Adicionada (µg/mL)	Area Bajo la Curva	Cantidad Encontrada (µg/mL)	Promedio de la Cantidad Encontrada (µg/mL)
50	29 9566	1613713	29 496779	29 563406
		1616272	29 543555	
		1622089	29 649883	
75	44 9350	2466088	45 077194	44 996308
		2464554	45 049154	
		2449423	44 772577	
100	59 9133	3263554	59 653936	60 037001
		3287626	60 093944	
		3302353	60 363136	
125	74 8916	4104033	75 016905	74 715512
		4051940	74 064706	
		4106660	75 064924	
150	89 8700	4898459	89 538080	89 600697
		4859901	88 833285	
		4947294	90 430726	

**Regresión Lineal**

$m = 1.000270$
$b = -0.152870$
$r = 0.999793$
$r^2 = 0.999587$

**Pendiente**

$t_{cal} = 0.000972$
$t_{tab(11,0.05)} = 2.16$
$IC = 1.000270 \pm 0.599362$
$LS = 1.599631$
$LI = 0.400908$

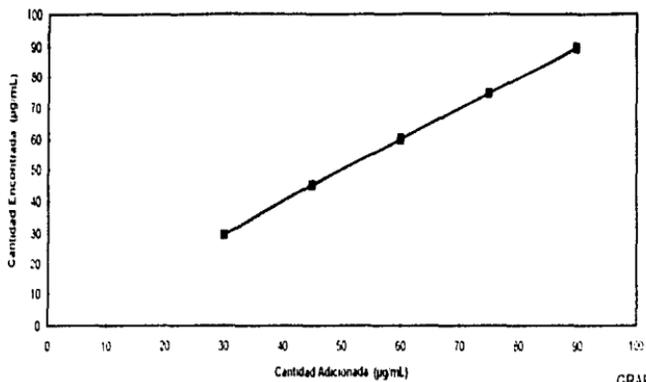
**Ordenada al Origen**

$t_{cal} = -0.008669$
$t_{tab(11,0.05)} = 2.16$
$IC = -0.152870 \pm 38.088032$
$LS = 37.935162$
$LI = -38.240901$

**TABLA No. 17**

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F cal	F tab
<b>Regresión</b>	1	6734.150165	6734.150165	31422.70232	9.07
<b>Error de Regresión</b>	15 - 2 = 13	2.786009657	0.214308435		
<b>Falta de Ajuste</b>	$(15 - 2) - (5) = (3 - 1) = 2$	40229.90641	13406.9688	3333378054	3.71
<b>Error Puro</b>	$(5) - (3 - 1) = 10$	40223.69242	4022.369242		

LINEALIDAD DEL SISTEMA  
Clorhidrato de Ambroxol



GRAFICA No. 3

Analizando los resultados se puede observar que el sistema de medición es lineal, ya que  $b$ ,  $m$  y  $r$  cumplen con los criterios de aceptación, tal como se muestra a continuación:

- Pendiente ( $m$ ):

Como  $|t_{cal}| < t_{tab}(1-\alpha/2)$ , y los límites de confianza incluyen al 1, entonces se acepta  $H_0$  y se concluye que el valor de la pendiente obtenida experimentalmente, no es significativamente diferente de 1.

- Ordenada al Origen ( $b$ ):

Como  $|t_{cal}| < t_{tab}(1-\alpha/2)$ , y los límites de confianza incluyen al 0, entonces se acepta  $H_0$  y se concluye que el valor de la ordenada al origen obtenida experimentalmente, no es significativamente diferente de 0.

- Coeficiente de Correlación ( $r$ ):

Cumple con el criterio de aceptación, ya que este debe ser  $r \geq 0.99$  y el resultado obtenido fue 0.999793.

- Coeficiente de Determinación ( $r^2$ ):

Cumple con el criterio de aceptación, ya que éste debe ser  $r^2 \geq 0.98$  y el resultado obtenido fue 0.999587.

- Análisis de Varianza

Como  $F_{Rcal} \leq F_{Rtab}(1-\alpha)$  y  $F_{Ecal} \leq F_{Etab}(1-\alpha)$  y  $F_{Acal} \leq F_{Atab}(1-\alpha)$ , el modelo lineal es correcto para describir la relación entre la cantidad adicionada y la cantidad encontrada.

### V.3.3. REPETIBILIDAD DEL SISTEMA

La tabla No. 18 presenta los resultados obtenidos para evaluar este parámetro.

**TABLA No. 18**

Cantidad Adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Area Bajo la Curva	Cantidad Encontrada ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Recuperado
59.9133	3280783	59.968862	100.09
59.9133	3288105	60.102699	100.32
59.9133	3251121	59.426675	99.19
59.9133	3283950	60.026751	100.19
59.9133	3297149	60.268013	100.59
59.9133	3294339	60.216649	100.51

Desviación Estándar	
n	= 6
$\bar{x}$	= 100.15%
Sx	= 0.506084
C V	= 0.51%

El sistema de medición es repetible, ya que el % Encontrado (100.15%) se encuentra dentro del intervalo para métodos cromatográficos que es del 98.0 - 102.0% y el Coeficiente de Variación obtenido en forma experimental (0.51%) es menor del 1.5%.

### V.3.4. REPETIBILIDAD Y EXACTITUD DEL METODO

En la tabla No. 19 se presentan los datos obtenidos, necesarios para evaluar este parámetro.

TABLA No. 19

Cantidad Adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Area Bajo la Curva	Cantidad Encontrada ( $\mu\text{g/mL}$ )	% de Recobro
60.1641	3277971	59.917462	99.59
59.9135	3249137	59.390410	99.13
59.9983	3287626	60.093944	100.16
61.6341	3364186	61.493334	99.77
60.0012	3321249	60.708533	101.18
59.8324	3302353	60.363136	100.89

Desviación Estándar	
n	= 6
$\bar{x}$	= 100.12%
Sx	= 0.787337
C V	= 0.79%

Como el Coeficiente de Variación obtenido (0.79%) es menor que el valor límite para métodos cromatográficos que es del 2.0%, entonces el método de medición es repetible.

$t_{\text{cal}} = 0.370172$
$t_{\text{tab}}(3, 0.975) = 2.16$
IC = 100.12 + 0.826266
LS = 100.945250
LI = 99.292718

Como  $|t_{cal}| < t_{tab}(n, \alpha)$  y los límites de confianza incluyen al 100%, entonces se acepta  $H_0$  y se concluye que el valor de la media obtenida experimentalmente, no es significativamente diferente de 100%, por lo tanto el método propuesto es exacto.

### V.3.5. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA DURANTE EL ANALISIS

La tabla No. 20 presenta los resultados obtenidos durante la determinación de Clorhidrato de Ambroxol, después de mantener las muestras bajo las condiciones indicadas.

**TABLA No. 20**

Condición Tiempo (h)	% ENCONTRADO		
	Luz Blanca	Oscuridad	Refrigeración
0	99.71	100.03	99.50
3	99.53	100.05	99.42
6	99.62	99.98	99.24
24	99.58	99.97	99.40

Calculando el Factor I obtenemos:

**TABLA No. 21**

Condición Tiempo (h)	% ENCONTRADO		
	Luz Blanca	Oscuridad	Refrigeración
3	99.82	100.02	99.92
6	99.90	99.95	99.73
24	99.87	99.94	99.90

Como se observa en la tabla No. 21, la muestra de clorhidrato de ambroxol es estable durante 24 horas, bajo cualquier condición, dado que el valor del factor I, se encuentra en el intervalo de aceptación (102.0 - 98.0%).

## VI. CONCLUSIONES

### VI.1. Respecto a la preformulación.

Basándose en los resultados obtenidos en el desarrollo de la preformulación de un polvo para suspensión que contiene Amoxicilina Trihidratada equivalente a 1500 mg de Amoxicilina, Clavulanato de Potasio equivalente a 375 mg de Acido Clavulánico y 180 mg de Clorhidrato de Ambroxol, se plantea lo siguiente:

- La preformulación desarrollada de polvo para suspensión, una vez reconstituida, es estable durante 7 días en condiciones de refrigeración y oscuridad.
- Una vez reconstituida la suspensión, se debe analizar dentro de las 6 primeras horas, para evitar obtener resultados erróneos por la degradación del Clavulanato de Potasio y de la Amoxicilina Trihidratada
- El polvo para suspensión se debe envasar en condiciones anhidras y en una atmósfera de nitrógeno, el envase primario debe ser un frasco de vidrio ámbar con tapa metálica; todo ello es para evitar la degradación de los principios activos.

### VI.2. Respecto a los métodos analíticos desarrollados.

De acuerdo con los resultados obtenidos al efectuar el procedimiento del método analítico propuesto para determinar Amoxicilina Trihidratada y Clavulanato de Potasio en la suspensión oral desarrollada, se plantean las siguientes conclusiones:

- El método propuesto para la valoración de Amoxicilina Trihidratada y Clavulanato de Potasio en la suspensión oral desarrollada es *Específico*; ya que, el vehículo (incluyendo al Clorhidrato de Ambroxol) no presenta respuesta en los tiempos de retención en que la Amoxicilina y el Acido Clavulánico presentan su respuesta, indicando así la ausencia de alguna posible interferencia en las respuestas de la solución problema obtenidas en el cromatograma; además se demostró que los productos de degradación de cada uno de los principios activos y del vehículo, no presentan respuesta en los mismos tiempos de retención que la Amoxicilina y el Acido Clavulánico, determinando la ausencia de otra posible interferencia, por lo que el método es *Indicador de Estabilidad*, por otra parte, los tiempos de retención de la solución de referencia y de la suspensión desarrollada son los mismos, lo cual

corroborar que las respuestas obtenidas en la muestra problema, corresponden únicamente a la Amoxicilina y al Acido Clavulánico

- El sistema para el método propuesto para valorar Amoxicilina Trihidratada y Clavulanato de potasio en la suspensión oral desarrollada es **Lineal**, ya que en las gráficas No. 1 y 2 se muestra la linealidad del sistema para ambos principios activos, sustancia de referencia, en un intervalo de concentraciones de 50%, 75%, 100%, 125% y 150%. El planteamiento de la aceptación se puede comprobar al analizar las pruebas de *t de student*, donde los valores obtenidos de la ordenada al origen y de la pendiente, para ambos principios activos, no son significativamente diferentes de 0 y de 1 respectivamente, además, el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación, para ambos principios activos, obtenidos en ambos casos, son mayores de 0.99 y 0.98 respectivamente, también, se puede observar que en el análisis de varianza la  $F_{R,cal}$  es mayor que la  $F_{R,tab}$  y la  $F_{A,cal}$  es menor que la  $F_{A,tab}$ , para ambos principios activos, por lo que podemos concluir que existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad encontrada
- El sistema del método propuesto es **Repetible**, ya que en las pruebas efectuadas con la sustancia de referencia (Amoxicilina Trihidratada - Clavulanato de potasio), el coeficiente de variación obtenido, para ambos principios activos, fue menor del 1.5%.
- El método propuesto es **Repetible**, ya que, el coeficiente de variación obtenido en las determinaciones de Amoxicilina y Acido Clavulánico en la suspensión oral desarrollada, fue menor del 2.0%
- El método propuesto es **Exacto**, ya que, los resultados de las pruebas de *t de student* aplicadas, demuestran que el valor de la media experimental no es significativamente diferente del 100% de la cantidad de Amoxicilina Trihidratada y Clavulanato de Potasio expresada en el marbete del producto desarrollado, y el coeficiente de variación obtenido en las determinaciones de Amoxicilina y ácido Clavulánico en la suspensión oral desarrollada, fue menor del 2.0%
- La solución de la muestra problema es **Estable** en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente únicamente las primeras 6 horas después de su preparación, y 24 horas si la muestra se encuentra en condiciones de refrigeración y oscuridad, ya que, expuesta a la luz blanca o a la oscuridad a temperatura ambiente más de 6 horas, el Acido Clavulánico y la Amoxicilina sufren degradación, pues el porcentaje de recuperación disminuye de manera que queda fuera del intervalo de aceptación (102.0 - 98.0%).

Respecto a los resultados obtenidos al realizar el procedimiento del método analítico para cuantificar Clorhidrato de Ambroxol en la suspensión oral desarrollada, se plantean las conclusiones siguientes.

- El método propuesto para la valoración del Clorhidrato de Ambroxol en la suspensión oral desarrollada es **Específico**, ya que, el vehículo (incluyendo al Clavulanato de Potasio y a la Amoxicilina Trihidratada) no presenta respuesta en el tiempo de retención en que el Clorhidrato de Ambroxol presenta su respuesta, indicando así la ausencia de alguna posible interferencia en la respuesta de la solución problema obtenida en el cromatograma; además se demostró que los productos de degradación del principio activo y del vehículo, no presentan respuesta en el mismo tiempo de retención que el Clorhidrato de Ambroxol, determinando la ausencia de otra posible interferencia, por lo que el método es **Indicador de Estabilidad**, por otra parte, los tiempos de retención de la solución de referencia y de la suspensión desarrollada son los mismos, lo cual corrobora que las respuestas obtenidas en la muestra problema, corresponden únicamente al Clorhidrato de Ambroxol.

- El sistema para el método propuesto para valorar Clorhidrato de Ambroxol en la suspensión oral desarrollada es **Lineal**, ya que en la gráfica No. 3 se muestra la linealidad del sistema para Clorhidrato de Ambroxol, sustancia de referencia, en un intervalo de concentraciones de 50%, 75%, 100%, 125% y 150%. El planteamiento de la aceptación se puede comprobar al analizar las pruebas de *t de student*, donde los valores obtenidos de la ordenada al origen y de la pendiente, no son significativamente diferentes de 0 y de 1 respectivamente, además, el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación, obtenidos en ambos casos, son mayores de 0.99 y 0.98 respectivamente; también, se puede observar que en el análisis de varianza la  $F_{R,cal}$  es mayor que la  $F_{R,tab}$  y la  $F_{FA,cal}$  es menor que la  $F_{FA,tab}$ ; por lo que podemos concluir que existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad encontrada.

- El sistema del método propuesto es **Repetible**, ya que en las pruebas efectuadas con la sustancia de referencia (Clorhidrato de Ambroxol), el coeficiente de variación obtenido, fue menor del 1.5%.

- El método propuesto es **Repetible**, ya que, el coeficiente de variación obtenido en las determinaciones de Clorhidrato de Ambroxol en la suspensión oral desarrollada, fue menor del 2.0%

- El método propuesto es *Exacto*, ya que, el resultado de la prueba de *t de student* aplicada, demuestran que el valor de la media experimental no es significativamente diferente del 100% de la cantidad de Clorhidrato de Ambroxol expresada en el marbete del producto desarrollado, y el coeficiente de variación obtenido en las determinaciones de Clorhidrato de Ambroxol en la suspensión oral desarrollada, fue menor del 2.0%.
- La solución de la muestra problema es *Estable* en cualquiera de las condiciones (luz blanca, oscuridad y refrigeración) durante 24 horas, ya que el porcentaje de recuperación no queda fuera del intervalo de aceptación (102.0 - 98.0%)

### **Conclusión Final:**

Los resultados de las pruebas de preformulación muestran que la suspensión desarrollada es estable durante 7 días en refrigeración, según las Normas de la Secretaría de Salud, lo que indica que esta preformulación puede ser sometida posteriormente a estudios de estabilidad acelerada para demostrar si puede ser la formulación definitiva.

Los resultados obtenidos en las pruebas preliminares de evaluación de los métodos analíticos, muestran que los parámetros evaluados cumplen satisfactoriamente con los criterios de aceptación establecidos; esto indica que, una vez que la preformulación sea aprobada, se puede concluir la validación de los métodos analíticos; sin embargo, cabe aclarar que si la preformulación requiriera algún cambio, sería necesario realizar nuevamente la validación completa de los métodos analíticos.

## VII. ANEXO I

### GLOSARIO

$b$	= Ordenada al origen o intercepto experimental
$\beta$	= Valor teórico de la ordenada al origen
$r$	= Coeficiente de correlación
$r^2$	= Coeficiente de determinación
CV	= Coeficiente de variación
IC	= Intervalo de Confianza
$\Sigma$	= Sumatoria
$m$	= Pendiente experimental
$\alpha$	= Valor teórico de la pendiente
$N$	= Número de réplicas de cada concentración
$t$	= Número de concentraciones
$\frac{t}{x}$	= Media de las cantidades adicionadas
$\frac{t}{y}$	= Media de las cantidades recuperadas
$n$	= Número total de determinaciones
$S_x$	= Desviación estándar de las cantidades adicionadas
$x$	= Cantidad adicionada
$y$	= Propiedad medida o Cantidad recuperada
% R	= Porcentaje de recobro
$\mu$	= Valor teórico del porcentaje de recobro
$t$	= Valor de la distribución t de Student
F	= Valor de la distribución F de Fisher
gl	= Grados de libertad
SCr	= Suma de cuadrados de regresión
SCer	= Suma de cuadrados del error de regresión
SCep	= Suma de cuadrados del error puro
SCfa	= Suma de cuadrados de la falta de ajuste

## \* ESPECIFICIDAD

### \* Para métodos indicadores de control de calidad

#### Criterios de aceptación:

- Confirmar que el método desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de los demás componentes de la formulación.
- Resolución hasta la línea base
- Respuestas relativas equiparables a la de la sustancia de referencia.

### \* Para métodos indicadores de estabilidad

#### Criterios de aceptación:

- Demostrar que la respuesta sólo se debe a la sustancia de interés y que las sustancias relacionadas o productos de degradación, que pudieran estar presentes, no interfieren o influyen en el resultado analítico
- Resolución hasta la línea base.

## \* LINEALIDAD DEL SISTEMA Y DEL METODO

Ecuaciones matemáticas para determinar la linealidad del sistema y del método:

(1) Cálculo de la pendiente de la línea de regresión.

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

(2) Cálculo del intercepto de la línea de regresión.

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

Para saber si los valores obtenidos experimentalmente son estadísticamente diferentes a los considerados como teóricos, se aplican pruebas de *t de Student* y se establecen los límites de confianza para  $m$  y  $b$ .

a) Prueba de *t de Student* para la pendiente:

$$H_0: m = \alpha$$

$$H_1: m \neq \alpha$$

$$\text{Donde: } \alpha = 1$$

$$t_m = \frac{(m - \alpha) (S_x) (n - 1)^{1/2}}{S_{y/x}}$$

b) Prueba de *t de Student* para la ordenada al origen:

$$H_0: b = \beta$$

$$H_1: b \neq \beta$$

$$\text{Donde: } \beta = 0$$

$$t_b = \frac{b - \beta}{S_{y/x} \left( \frac{\sum x^2}{(n) \sum (x - \bar{x})^2} \right)^{1/2}}$$

• Error Estándar de Estimación:

$$S_{y/x} = \left( \frac{\sum (y - \bar{y})^2}{(n - 2)} \right)^{1/2}$$

c) Intervalos de confianza:

- Desviación Estándar para la ordenada al origen

$$S_b = S_{y/x} \left[ \frac{\sum x^2}{(n) \sum (x - \bar{x})^2} \right]^{1/2}$$

- Intervalo de confianza para la ordenada al origen

$$IC_b = b \pm [ t_{tab(n-2, 0.975)} ] [S_b]$$

- Desviación Estándar para la pendiente

$$S_m = \left[ \frac{S_{y/x}}{[ \sum (x - \bar{x})^2 ]^{1/2}} \right]$$

- Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC_m = m \pm [ t_{tab(n-2, 0.975)} ] [S_m]$$

(3) Cálculo del coeficiente de determinación.

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

(4) Cálculo del coeficiente de correlación.

$$r = (r^2)^{1/2}$$

Los datos de la curva de calibración se sujetan a un *análisis de varianza*, en donde los parámetros de evaluación son las F resultantes de la distribución y tratamiento de datos. Por lo tanto, se tienen F de regresión y F de falta de ajuste a la relación lineal simple

(5) Construcción de la Tabla de Análisis de Varianza

- a) SCr =  $[(m)(\sum xy)] - [(b)(\sum y)] - (\sum y)^2 / n$
- b) SCer =  $(\sum y^2) - [(m)(\sum xy)] - [(b)(\sum y)]$
- c) SCep =  $[(\sum y^2) - (\sum y)^2] / N$
- d) SCfa = SCer - SCep

**TABLA 1**

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F <sub>exp</sub>	F <sub>tab</sub>
Regresión	1	SCr	SCr	Fr = MCr	Fr = (p1r, g1r, 0.01)
Error de Regresión	n - 2	SCer	SCer g1er	MCer	
Falta de Ajuste	(n - 2) - [t(r - 1)]	SCfa	SCfa g1fa	Ffa = MCfa	Ffa = (g1fa, g1ep, 0.05)
Error Puro	t(r - 1)	SCep	SCep g1ep	MCep	

t = número de concentraciones      r = número de repeticiones      n = número de pares ordenados

**Criterios de aceptación:**

- Coeficiente de correlación (r) > 0.99.
- Coeficiente de determinación (r<sup>2</sup>) > 0.98.
- Pendiente de la línea de regresión (m) = 1 (estadísticamente). Si |t<sub>calc</sub>| < t<sub>tab</sub> (n=2, 0.975) y los límites de confianza incluyen al 1, entonces se acepta H<sub>0</sub> y se concluye que el valor de la pendiente que se obtiene en forma experimental, no es significativamente diferente de 1.
- Ordenada al origen de la línea de regresión (b) = 0 (estadísticamente). Si |t<sub>calc</sub>| < t<sub>tab</sub> (n=2, 0.975) y los límites de confianza incluyen al 0, entonces se acepta H<sub>0</sub> y se concluye que el valor de la ordenada al origen que se obtiene experimentalmente, no es significativamente diferente de 0.

- Si  $F_1 \geq F_{(p1), (p1), (n)}$ , entonces existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la respuesta medida
- Si  $F_{1a} < F_{(p1)a, (p1), (n)}$ , entonces no existe falta de ajuste a la relación lineal simple, cantidad adicionada - respuesta medida

#### • REPETIBILIDAD

Ecuaciones matemáticas para la evaluación de la repetibilidad:

- (1) Determinación de la media de los resultados.

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

- (2) Determinación de la desviación estándar de los resultados.

$$S_y = \left[ \frac{(n)(\sum y^2) - (\sum y)^2}{(n)(n-1)} \right]^{1/2}$$

- (3) Determinación del coeficiente de variación.

$$CV = \frac{S_y}{\bar{y}} \times 100$$

#### Criterio de aceptación:

- Coeficiente de variación (cv)  $\leq$  1.5% en sistema
- Coeficiente de variación (cv)  $\leq$  2.0% en método.

**\* EXACTITUD AL 100%**

Ecuaciones matemáticas para la evaluación de la exactitud.

- (1) Cálculo del porcentaje de recobro en cada una de las muestras
- (2) Cálculo de la media aritmética del porcentaje de recobro.

$$\bar{R} = \frac{S_R}{N}$$

- (3) Cálculo de la desviación estándar del porcentaje de recobro.

$$S_R = \left[ \frac{(n)(\Sigma R^2) - (\Sigma R)^2}{(n)(n-1)} \right]^{1/2}$$

- (4) Cálculo del coeficiente de variación.

$$CV = \frac{S_R}{\bar{R}} \times 100$$

- (5) Prueba de *t* de Student para la media.

$$H_0: \bar{R} = m$$

$$H_1: \bar{R} \neq m$$

Donde:  $m = 100\%$

$$t_R = \frac{\bar{R} - m}{\sigma_y}$$

Donde:  $\sigma_y = S_R / (n)^{1/2}$

- \* Intervalo de confianza del porcentaje de recobro encontrado.**

$$IC_R = \bar{R} \pm |t_{tab(n-2, 0.975)}| |\sigma_y|$$

### Criterios de aceptación:

- Si el  $t_{\text{calc}} > t_{\text{tab}}(0.05)$ , y los límites de confianza incluyen al 100%, se acepta  $H_0$  y se concluye que el valor de la media que se obtiene en forma experimental, no es significativamente diferente del 100%.
- Coeficiente de variación (cv)  $< 2.0\%$  (para el por ciento de recobro).

### REPRODUCIBILIDAD DEL METODO

Los resultados obtenidos se tabulan de acuerdo con la tabla II, para evaluar la reproducibilidad mediante el análisis de varianza representado en la tabla III. Este análisis permite conocer las interacciones entre analistas, días

TABLA II

ANALISTA (i) \ DIA (j)		% ENCONTRADO	
		1	2
1	$Y_{111}$	$Y_{211}$	
	$Y_{112}$	$Y_{212}$	
	$Y_{113}$	$Y_{213}$	
2	$Y_{121}$	$Y_{221}$	
	$Y_{122}$	$Y_{222}$	
	$Y_{123}$	$Y_{223}$	

Donde "Y" es el resultado de cada analista (primer subíndice), en cada día (segundo subíndice) y para cada repetición (tercer subíndice).

Calcular las siguientes sumatorias:

$$1) \sum Y_{ijk} = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + \dots + Y_{223})$$

$$2) \sum Y_i^2 = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123})^2 + (Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223})^2$$

$$3) \Sigma Y_j^2 = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{211} + Y_{212} + Y_{213})^2 + (Y_{121} + Y_{122} + Y_{123} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223})^2$$

$$4) \Sigma Y_{ij}^2 = (Y_{111} + Y_{112} + Y_{113})^2 + (Y_{121} + Y_{122} + Y_{123})^2 + (Y_{211} + Y_{212} + Y_{213})^2 + (Y_{221} + Y_{222} + Y_{223})^2$$

$$5) \Sigma Y_{ijk}^2 = [(Y_{111})^2 + (Y_{112})^2 + (Y_{113})^2 + (Y_{121})^2 + (Y_{122})^2 + (Y_{123})^2 + (Y_{211})^2 + (Y_{212})^2 + (Y_{213})^2 + (Y_{221})^2 + (Y_{222})^2 + (Y_{223})^2]$$

Proceder conforme a la siguiente tabla de análisis de varianza:

**TABLA III**

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Medida de Cuadrados	F cal	F tab
Analista (a)	(a - 1)	$\Sigma Y_i^2 - (\Sigma Y_{ij})^2 / (j)(k)$	SCa	Fa	MCa
Día (d)	(j - 1)	$\Sigma Y_j^2 - \Sigma Y_i^2 / (i)(k)$	SCd	Fd	MCd
Analista / Día (a/d)	(a - 1)(j - 1)	$\Sigma Y_{ij}^2 - \Sigma Y_i^2 / (j)(k) - \Sigma Y_j^2 / (i)(k)$	SCad		
Error Experimental (e)	(i)(j)(k - 1)	$\Sigma Y_{ijk}^2 - \Sigma Y_{ij}^2 / k$	SCe		

i = número de analistas

j = número de días

k = número de repeticiones

### Criterios de aceptación:

- Coeficiente de variación total (cv) < 2.0%
- Si  $F_{analista} < F_{tab}(g.l.a., g.l.d., 0.95)$ , el método es reproducible por analistas.
- Si  $F_{dia} < F_{tab}(g.l.d., g.l.a/d., 0.95)$ , el método es reproducible en distintos días por un mismo analista.

### \* ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA

Los resultados obtenidos se tabulan con base en el formato de la tabla IV, para calcular el coeficiente de variación.

**TABLA IV**

		% ENCONTRADO		
Condición Tiempo (h)	Luz Blanca	Oscuridad	Refrigeración	
	0	Y <sub>A</sub>	Y <sub>D</sub>	Y <sub>G</sub>
Y <sub>B</sub>		Y <sub>E</sub>	Y <sub>H</sub>	
Y <sub>C</sub>		Y <sub>F</sub>	Y <sub>I</sub>	
3	Y <sub>A3</sub>	Y <sub>D3</sub>	Y <sub>G3</sub>	
	Y <sub>B3</sub>	Y <sub>E3</sub>	Y <sub>H3</sub>	
	Y <sub>C3</sub>	Y <sub>F3</sub>	Y <sub>I3</sub>	
6	Y <sub>A2</sub>	Y <sub>D2</sub>	Y <sub>G2</sub>	
	Y <sub>B2</sub>	Y <sub>E2</sub>	Y <sub>H2</sub>	
	Y <sub>C2</sub>	Y <sub>F2</sub>	Y <sub>I2</sub>	
24	Y <sub>A24</sub>	Y <sub>D24</sub>	Y <sub>G24</sub>	
	Y <sub>B24</sub>	Y <sub>E24</sub>	Y <sub>H24</sub>	
	Y <sub>C24</sub>	Y <sub>F24</sub>	Y <sub>I24</sub>	

**(1) Cálculo del coeficiente de variación**

- Para cada condición / tiempo / muestra, calcular el factor (I) con la siguiente fórmula:

$$I = \frac{(\text{análisis muestra} / \text{condición} / \text{tiempo})}{(\text{análisis inicial})} \times 100$$

- Para cada condición / tiempo, calcular la media del factor (I) con la siguiente fórmula:

$$I = \frac{\Sigma (\text{condición} / \text{tiempo})}{N}$$

Donde: N = número de muestras para cada condición / tiempo.

**Criterio de aceptación:**

- La media del factor (I) para cada condición/tiempo, se debe encontrar entre los límites de contenido establecidos en la monografía del fármaco.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. British Pharmacopoeia. Impreso en United Kindom. Vol I y II. 1993. pp 43 - 44, 230.
2. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación. Requisitos mínimos para la Validación de un Método Analítico. Colegio Nacional de Q.F.B. Secretaría de Salud México. (1991)
3. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. 42 edición. Ediciones PLM. México (1996) pp 380 - 381, 565, 1544
4. Douglas A. Skoog. Principles of Instrumental Analysis. 4th edition. International Edition. U.S.A. (1992). pp 628 - 667
5. Drug Formulation. I. Racz C. British Library Catalogung (1989). pp 1 - 12, 163, 335.
6. Eguituz, Zenon. Desarrollo y Validación de un Método Analítico para determinar Acetato de Prednisolona, en una suspensión oftálmica, que también contiene Cloramfenicol. Tesis Licenciatura. Facultad de Química. U.N.A.M. México, (1996).
7. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaria de Salud. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 6ª edición. México (1994). pp 180, 892 - 893.
8. Goodman & Gilman A. y cols. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 8ª edición. Edit. Médica Panamericana. México (1993). pp 490, 496, 508 - 509, 1035 - 1053.
9. Introduction to Pharmaceutical Dosage Form. Howard C. Ansel. 4th edition. Lea & Febiger. U.S.A. (1985). pp 55 - 57, 207 - 222.
10. Katzung, B. Farmacología Básica y Clínica. 5ª edición. Edit. Manual Moderno. México (1994) pp 783 - 795.
11. Kaplar - Vucevac, M. Clavulanic Acid Potentiated Amoxycillin. Translated by: Duric, D. Lek Pharmaceutical and Chemical Company d.d. Slovenia.

12. Lachman, Liberman, Kanig. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy. 3th edition. Edit. Lea and Febiger. U.S.A. (1986). pp 1 - 182, 680 - 691.
13. Litter, M. Farmacología Experimental y Clínica. 6ª edición. Edit. El Ateneo. Argentina (1980). pp 1502 - 1547.
14. Madrigal, Arturo. Anteproyecto Monográfico de Amoxicilina para la F.E.U.M. Facultad de Química. U.N.A.M. México (1978).
15. Metha, A., Hart - Davies, S., Payno, J., Lacey, W. Stability of Amoxycillin and Potassium Clavulanate in Co - amoxiclav oral suspension. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics (1994) 19, 313 - 315.
16. Miyazaki, K.; Iseki, K.; Ishizawa, T.; Arita, F.; Sakai, S.; Kumamoto, Y. Effect of Clavulanic Acid on Inactivated Amoxicillin Excretion in Urinary Tract Infection. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics (1985) 37, 508 - 511.
17. Modern Pharmaceutics. Gilbert S. Banker. Marcel Dekker, Inc. U.S.A. (1979). pp 211 - 259, 329 - 350, 627 - 635.
18. Pharma News. Actualización en Tecnología Farmacéutica. Componentes para un Programa de Validación de Métodos Analíticos. Mayo 1993 Vol. 4 No. 5; Julio 1993 Vol. 4 No. 7; Sep 1993 Vol. 4 No. 9; Oct 1993 Vol. 4 No. 10.
19. Pharmaceutical Analysis. Higuchi, Takaru. Interscience Publishers. U.S.A. (1976). pp 593 - 611.
20. Remington's Pharmaceutical Sciences. 18th edition. Edit. Mack Publishing Company. U.S.A. (1990). pp 1176 - 1179, 1191 - 1194.
21. Seminario de Validación en la Industria Farmacéutica. Asociación Farmacéutica Mexicana. Mayo, (1994). Facultad de Química. U.N.A.M.
22. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemical, Drugs and Biologicals. Susan Budavari. 11 edition. Merck & Co., Inc., U.S.A. (1989). pp 62 - 63, 91.
23. The Pharmacopeia of the United States of America. 23. United States Pharmacopeial Convention. Inc. U.S.A. (1996). pp 100 - 104, 384 - 385.

24. Walpole, Rohald E. Probabilidad y Estadística para Ingenieros. 2ª edición. Edit. Mc. Graw-Hill. México, (1989).