

69
2eq.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

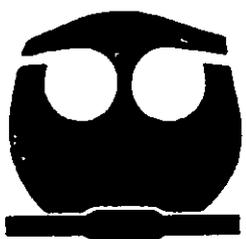
FACULTAD DE QUIMICA

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

VALIDACION DE METODOS CROMATOGRAFICOS
(HPLC) PARA CUANTIFICAR CLORHIDRATO DE
AMBROXOL Y AMOXICILINA TRIHIDRATADA EN
DOS FORMAS FARMACEUTICAS: CAPSULAS Y
SUSPENSION.

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
LUCRECIA LOZANO CRUZ

ASESOR DEL TEMA: PROF. ISaura LUISA CARRERA GARCIA



MEXICO, D. F.

FEBRERO DE 1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

258403



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

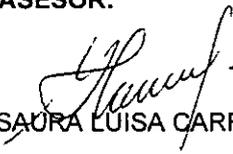
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

JURADO ASIGNADO:

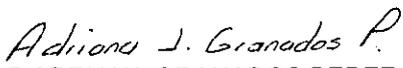
Presidente: PROF. ISAURA LUISA CARRERA GARCIA.
Vocal: PROF. ROSA LORENIA MORA-TOVAR Y CHAVEZ.
Secretario: PROF. MARIA TERESA BUENTELLO.
1er. Suplente: PROF. NORMA TRINIDAD GONZALES MONZON.
2do Suplente: PROF. GEORGINA MARGARITA MAYA RUIZ.

El tema se desarrolló en los laboratorios Promeco S.A de C.V.

ASESOR:


PROF. ISAURA LUISA CARRERA GARCIA.

SUPERVISOR TECNICO:


Q.F.B ADRIANA GRANADOS PEREZ.

SUSTENTANTE:


LUCRECIA LOZANO CRUZ

Gracias dios por estar conmigo en todos los momentos, gracias dios por permitirme concluir con este trabajo.

El presente trabajo se los dedico a mis Padres Ma.Cristina Cruz de Lozano y Julio Lozano Pérez , a mi esposo Fernando Morales V, quienes con su apoyo y comprensión me han ayudado a lograr una de mis metas.

Quiero agradecer a mi compañera de trabajo Elvira Ríos S. el haber invertido tiempo en ayudarme en aprender lo referente a HPLC.

Especialmente quiero ugradecer a mi asesora Prof.Isaura Luisa Carrera.G por su tiempo y sus consejos. que fueron la base para que yo pudiera terminar con mi tesis.

Tambien quiero agradecer a mis hermanos, compañeros de trabajo y a mi jefe Homero Flores por alentarme a terminar mi Tesis.

ÍNDICE

	Pág
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO	3
CAPÍTULOS	
I) GENERALIDADES DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS	
1.0 Amoxicilina trihidratada.	4
2.0 Ambroxol clorhidrato.	7
II) CROMATOGRAFÍA	
1.0 Tipos de cromatografías.	9
2.0 CLAR, generalidades.	13
3.0 Descripción general de un sistema HPLC.	18
3.1 Descripción del equipo utilizado.	19
III) PROTOCOLO DE VALIDACIÓN	
1.0 Definición	22
2.0 Alcance	23
3.0 Parámetros de validación:	24
3.1 Linearidad del sistema: definición, procedimiento, cálculos, criterios de aceptación.	25
3.2 Precisión del sistema: definición, procedimiento, cálculos, criterios de aceptación.	27
3.3 Linearidad del método: definición, procedimiento, cálculos, criterios de aceptación.	28
3.4 Exactitud del método: definición, procedimiento, cálculos, criterios de aceptación.	34
3.5 Precisión del método: definición.	34
3.5.1 Repetibilidad al 100%: definición, procedimiento, cálculos, criterios de aceptación.	36
3.5.2 Reproducibilidad: definición, procedimiento, cálculos, criterios de aceptación.	38
3.6 Especificidad.	40
3.7 Estabilidad de la muestra: cálculos, criterios de aceptación.	41

IV)	MÉTODOS ANALÍTICOS	
1.0	Método analítico para cuantificar el contenido de amoxicilina trihidratada en cápsulas.	43
1.1	Método analítico para cuantificar el contenido de amoxicilina trihidratada en suspensión.	43
2.0	Método analítico para cuantificar el contenido de ambroxol clorhidrato en cápsulas.	48
2.1	Método analítico para cuantificar el contenido de ambroxol clorhidrato en suspensión.	48
V)	INFORME DE VALIDACIÓN	52
1.0	Linearidad del sistema:	
1.1	Linearidad del sistema de amoxicilina trihidratada.	53
1.2	Linearidad del sistema de ambroxol clorhidrato.	55
2.0	Precisión del sistema:	
2.1	Precisión del sistema de amoxicilina trihidratada.	57
2.2	Precisión del sistema de ambroxol clorhidrato.	58
3.0	Linearidad del método:	
3.1	Linearidad del método analítico de amoxicilina trihidratada cápsulas.	59
3.2	Linearidad del método analítico de amoxicilina trihidratada suspensión.	61
3.3	Linearidad del método analítico de ambroxol clorhidrato cápsulas.	63
3.4	Linearidad del método analítico de ambroxol clorhidrato suspensión.	65
4.0	Exactitud del método:	
4.1	Exactitud del método analítico de amoxicilina trihidratada cápsulas.	67
4.2	Exactitud del método analítico de amoxicilina trihidratada suspensión.	68
4.3	Exactitud del método analítico de ambroxol clorhidrato cápsulas.	69
4.4	Exactitud del método analítico de ambroxol clorhidrato suspensión.	70
5.0	Precisión del método:	
5.1	Repetibilidad al 100 %:	
5.1.1	Repetibilidad al 100 % del método analítico de amoxicilina trihidratada cápsulas.	71
5.1.2	Repetibilidad al 100 % del método analítico de amoxicilina trihidratada suspensión.	72

5.1.3	Repetibilidad al 100 % del método analítico de ambroxol clorhidrato cápsulas.	73
5.1.4	Repetibilidad al 100 % del método analítico de ambroxol clorhidrato suspensión.	74
5.2	Reproducibilidad :	
5.2.1	Reproducibilidad del método analítico de amoxicilina trihidratada cápsulas.	75
5.2.2	Reproducibilidad del método analítico de amoxicilina trihidratada suspensión.	76
5.2.3	Reproducibilidad del método analítico de ambroxol clorhidrato cápsulas.	77
5.2.4	Reproducibilidad del método analítico de ambroxol clorhidrato suspensión.	78
6.0	Especificidad del método:	
6.1	Especificidad del método analítico de amoxicilina trihidratada cápsulas.	79
6.2	Especificidad del método analítico de amoxicilina trihidratada suspensión.	79
6.3	Especificidad del método analítico de ambroxol clorhidrato cápsulas.	87
6.4	Especificidad del método analítico de ambroxol clorhidrato suspensión.	87
7.0	Tolerancia del método:	
7.1	Estabilidad de la muestra analítica para el método analítico de amoxicilina trihidratada cápsulas.	95
7.2	Estabilidad de la muestra analítica para el método analítico de amoxicilina trihidratada suspensión.	96
7.3	Estabilidad de la muestra analítica para el método analítico de ambroxol clorhidrato cápsulas.	97
7.4	Estabilidad de la muestra analítica para el método analítico de ambroxol clorhidrato suspensión.	98
	CONCLUSIONES	99
	ANEXOS	
1.0	Tabla de solubilidades.	106
2.0	Prueba de las columnas utilizadas en las validaciones de los métodos amoxicilina trihidratada y clorhidrato de ambroxol en cápsulas y suspensión.	107

I N T R O D U C C I Ó N

VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Es extraordinaria la evolución tan rápida de la validación de métodos analíticos que se ha dado en la última década.

En los 40's se dieron los lineamientos para poder realizar una validación de métodos analíticos y en los 60's se introdujo este concepto en nuestro país.

La validación de métodos analíticos se ha vuelto una necesidad en la industria Farmacéutica, dado el incremento de nuevos productos para la salud y con ello el requerimiento de métodos de análisis apropiados (1,2).

Con la participación de México en el " Tratado de Libre Comercio ", para poder ampliar nuestro mercado, es necesario cumplir con la reglamentación de otros países para alcanzar una " Calidad Mundial para Nuestros Productos ".

La validación de métodos analíticos se basa en principios científicos adecuados, que han sido optimizados para propósitos prácticos de medición. Es un proceso mediante el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas, dando como resultado datos analíticos útiles y confiables (2,3,4,5).

La capacidad del método se expresa en términos de parámetros analíticos como son (3):

Precisión.

Linearidad.

Exactitud.

Especificidad.

Límite de Detección.

Límite de Cuantificación.

Estabilidad de la Muestra.

Para realizar una validación se debe de contar con (6):

- 1) Un método de análisis apropiado, en el cual se establecen todas las condiciones de análisis por ejemplo: pH, tiempo de agitación, sustancia de referencia, etc.
- 2) Un protocolo de validación en donde se resumen procedimientos y criterios para los trabajos de laboratorio. Estos criterios y procedimientos serán uniformes con respecto a los empleados en las demás validaciones de métodos dentro de la organización, y éstos a su vez de acuerdo a los parámetros establecidos por organizaciones como Secretaría de Salud de México o la FDA en EUA.
- 3) Al finalizar la validación deberá elaborarse el informe de validación, con información útil y clara, para los usuarios y autoridades. Dejando por escrito todo lo referente a la validación.

Aún cuando se trate de industrias transnacionales , es necesario la validación de métodos analíticos que se desarrollen en laboratorios instalados en otros países, ya que se debe comprobar que con las condiciones locales como por ejemplo: disolventes, columnas, analistas, equipos, etc, los métodos son confiables dentro del intervalo determinado

O B J E T I V O

El objetivo de esta tesis es validar los métodos analíticos siguientes:

- Método para análisis de contenido de amoxicilina trihidratada en suspensión que también contiene clorhidrato de ambroxol.
- Método para análisis de contenido de amoxicilina trihidratada en cápsulas que también contienen clorhidrato de ambroxol.
- Método para análisis de contenido de clorhidrato de ambroxol en suspensión que también contiene amoxicilina trihidratada.
- Método para análisis de contenido de clorhidrato de ambroxol en cápsulas que también contienen amoxicilina trihidratada.

En los métodos propuestos se utiliza la técnica de HPLC (High Pressure Liquid Chromatography).

Se pretende establecer que la capacidad de los métodos mencionados, cumplan los requisitos para ser utilizados como métodos de rutina en el laboratorio de análisis químicos de los Laboratorios Promeco S.A de C.V.

CAPÍTULO I

GENERALIDADES DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS

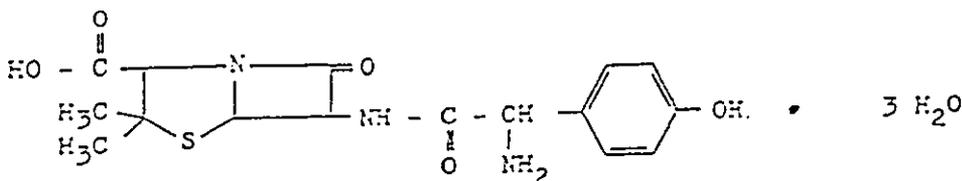
1.0 AMOXICILINA TRIHIDRATADA. (3,9,10,22,23)

Nombre químico: ácido 6-[D(-)-amino- α -p-hidroxifenilacetamido]-penicilánico. 4-tia-1-azabicyclo-[3.2.0]heptano-2-ácido carboxílico, 6-[[amino-(4-hidroxifenil)acetil amino]-3,3-dimetil-7-oxo, trihidrato] (2S, 5, 6) (2S*).

Fórmula condensada: $C_{16}H_{19}N_3O_5S \cdot 3H_2O$

Masa Molecular: 419.49 (amoxicilina trihidratada).
365.41 (amoxicilina anhidra).

Fórmula desarrollada:



Aspecto: Polvo de color blanco o casi blanco, microcristalino.

Olor: Sustancia casi inodora o inodora.

Solubilidad: Ligeramente soluble en agua y metanol.
Prácticamente insoluble en cloroformo,
acetonitrilo, benceno, éter. Soluble en
soluciones alcalinas diluídas.

Identificación: 1. Cromatografía de capa fina (C.C.F), sistema: butanol-
ácido acético glacial-agua (50.0:1.5:10.0), Rf
aproximado 0.25.
2. Reacción colorida con ácido cromotrópico.
3. Reacción colorida con iones de
Cobre. (reacción de Fehling).
4. Reacción colorida con anilina y nitrito de
sodio.

pH: 3.5 - 5.5 (disolución acuosa al 2 %)

Contenido de agua: 11.5 - 14.0 % determinada por el método de Karl Fisher.

Farmacología: (12,13) Este fármaco es una penicilina semisintética.
Se sintetizó varios años después de la
ampicilina. En 1971 Neu y Winsell, publicaron
que la amoxicilina y la ampicilina tienen
espectro antibacterial semejante. Otras
publicaciones (14), reportaron que la
amoxicilina es mejor absorbida, produce
mayores niveles en sangre y su efecto es más
prolongado que con la ampicilina. La amoxicilina
se utiliza en infecciones de vías

respiratorias altas provocadas por:
Staphylococcus aureus beta-hemolítico y
Streptococcus pneumoniae, contra infecciones
causadas por especies de
Neisseria, Haemophilus influenzae,
N.gonorrhoeae, S.marcescens. La amoxicilina
es más estable en jugo gástrico que la
ampicilina (15).

Es efectiva en tratamientos de sinusitis,
otitis media. También en el tratamiento de
infecciones del tracto urinario, infecciones
no complicadas causadas por microorganismos
de la familia Enterobacteriaceae de las
cuales Escherichia coli es la especie más
común.

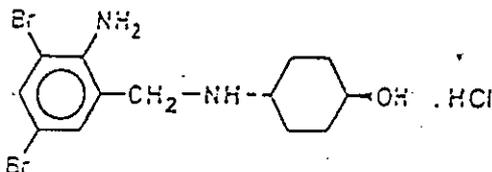
2.0 CLORHIDRATO DE AMBROXOL. (9,11,23,24,25)

Nombre químico: Clorhidrato de trans-4-[(2-amino-3,5-dibromobencil)amino]-ciclohexanol.

Fórmula condensada: $C_{13}H_{18}Br_2N_2O \cdot HCl$.

Masa Molecular: 414.6.

Fórmula Desarrollada:



Aspecto: Sustancia cristalina, de color blanco o casi blanco.

Olor: Sustancia prácticamente inodora.

Identidad:

- 1.- Espectroscopía U.V en HCl 0.01N
A (1%, 1cm)(244 nm) aprox
240 .
- 2.- Temperatura de fusión: 235° - 240 °C
(con descomposición).
- 3.- C.C.F, sistema tolueno-isopropanol-
hidróxido de amonio (80:20:0.2). Rf
aproximado de 0.5

4.-Identificación del cloruro con nitrato de plata.

Solubilidad:

Soluble en metanol;
poco soluble en etanol y agua;
ligeramente soluble en ácido acético
glacial;
prácticamente insoluble en cloroformo.

pH:

4.5 - 6.0 (solución al 1%).

Contenido de agua:

Como máximo 1.0 %, determinada por el método de Karl Fisher.

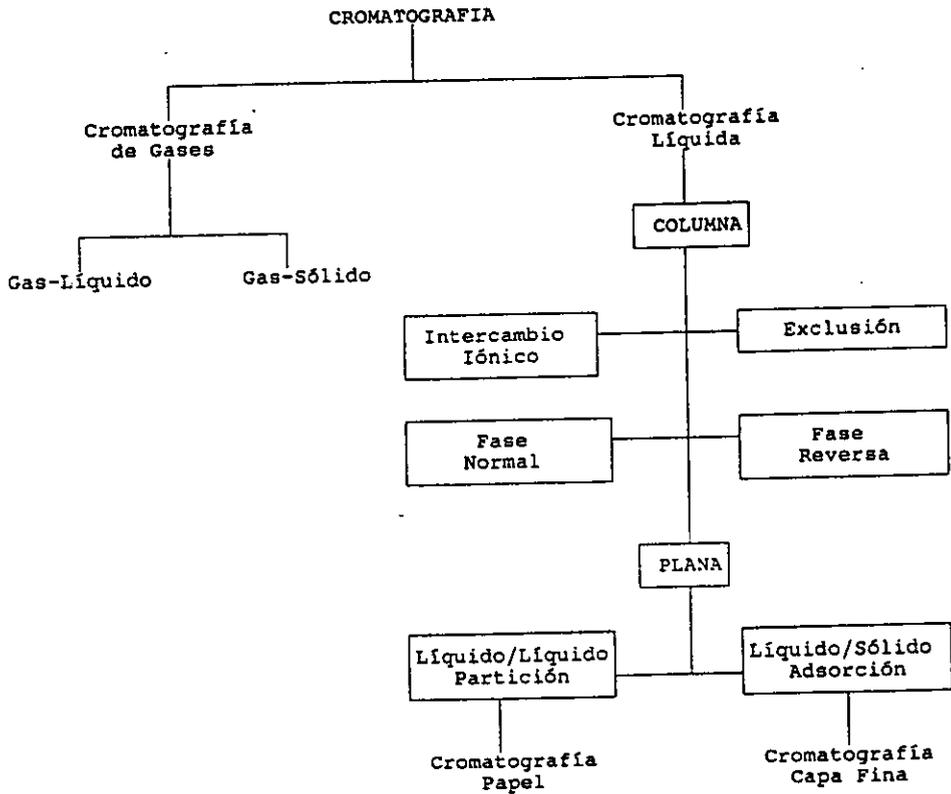
Farmacología:

La asociación de ambroxol clorhidrato y amoxicilina trihidratada es efectiva en afecciones de las vías respiratorias. El ambroxol es un mucorregulador fluidificante de las secreciones bronquiales. Favorece el incremento de fluidos del tracto respiratorio, fluidificando la secreción bronquial y estimulando la producción de surfactante bronquial.

CAPÍTULO II

CROMATOGRAFÍA

1.0 Tipos De Cromatografia:



1.1 Cromatografía de Gases:(1,7)

1.1.1 Cromatografía Gas/Líquido:

Esta técnica se fundamenta en el coeficiente de partición de los compuestos afines a la fase móvil y a la fase estacionaria.

La fase estacionaria está compuesta por un soporte inerte como por ejemplo: tierras de sílice cubierta por una fase líquida. La fase móvil es un gas inerte, puro de bajo costo como por ejemplo: N_2 , He y sirve para transportar la mezcla de compuestos a separar.

1.1.2 Cromatografía Gas/Sólido:

Esta técnica se basa en la adsorción entre los compuestos acarreados por la fase móvil que es un gas y una fase estacionaria que es un sólido.

1.2 Cromatografía de Líquidos:(1,7)

1.2.1 Cromatografía Intercambio Iónico:

Esta técnica se basa en la interacción entre los iones de la mezcla a separar que se encuentran en la fase móvil y los sitios iónicos del empaque de la fase estacionaria, la cual se compone de resinas catiónicas que son resinas unidas a ácido sulfanílico, o resinas aniónicas unidas a aminas cuaternarias.

Esta técnica es ampliamente utilizada en la separación de aminoácidos.

1.2.2 Cromatografía de Exclusión:

Se basa en el masa molecular del soluto. La fase

estacionaria es un gel con una superficie inerte porosa. Las moléculas pequeñas entran en los poros de la fase estacionaria quedando retenidas. Las moléculas grandes no pueden ser retenidas y pasan libremente a través de la columna, las moléculas pequeñas son retenidas y las moléculas medianas interaccionan con la columna. La técnica se ha desarrollado principalmente en el análisis para polímeros y materiales biológicos.

1.2.3 Cromatografía Fase Normal:

Esta técnica se fundamenta en la partición del soluto entre dos disolventes inmiscibles. La fase móvil esta compuesta por un disolvente no polar como por ejemplo: hexano, cloroformo, cloruro de metilo. La fase estacionaria son columnas polares. La técnica es particularmente útil en la separación de compuestos débilmente polares, especialmente isómeros. El orden de interacción de los compuestos con la columna depende de la polaridad de ellos, los no polares no interaccionan, los débilmente polares interaccionan y los polares quedan retenidos en la columna.

1.2.4 Cromatografía Fase Reversa:

Esta técnica se fundamenta en la partición del soluto entre dos disolventes inmiscibles. A diferencia de la fase normal la fase móvil es polar como por ejemplo: agua, metanol, etanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano y la fase estacionaria es no polar, la mas comunmente utilizada es octadecil sílica ($R=(CH_2)_{17}CH_3$).

El orden de interacción de los compuestos con la columna depende de la polaridad de éstos. Los polares no interaccionan con la columna, los débilmente polares interaccionan y los no polares se retienen en la columna. La fase estacionaria no polar, hace que el sistema sea muy útil para la separación de compuestos orgánicos. En una mezcla de compuestos orgánicos que tengan pequeñas diferencias en sus estructuras o sus sitios de unión, el grado de interacción con la columna es diferente para cada uno. Existen además opciones para escoger el disolvente adecuado para la muestra. La selectividad y el tiempo de retención de los componentes de la mezcla pueden ajustarse, alterando el grupo unido a la sílica del empaque de la columna. (16)

1.2.5 Cromatografía Papel:

Esta técnica se basa en el coeficiente de partición de las sustancias a separar entre la fase estacionaria que es un papel humedecido con disolvente y la fase móvil que se encuentra en una cámara que es saturada previamente. Hay varios tipos, según la forma de correr de la muestra: ascendente, descendente, dos direcciones, radial.

1.2.6 Cromatografía Capa Fina:

Esta técnica se basa en el fenómeno de adsorción de los compuestos de una mezcla, entre la fase estacionaria que es la sílica gel sobre un soporte que puede ser vidrio, aluminio o papel, y la fase móvil que es un disolvente o mezcla de

disolventes con la que ha sido previamente saturada la cámara. Se utiliza regularmente como prueba de identidad, colocando junto con la muestra a identificar, la sustancia de referencia y calculando el R_f de ambas.

2.0 Cromatografía De Líquidos De Alta Resolución (CLAR o HPLC):

Se basa principalmente en la instrumentación, y las distintas propiedades de los líquidos como por ejemplo: valores de difusión, viscosidad, polaridad, acidez.

Parámetros importantes en la técnica de HPLC:

- El equipo para HPLC, cromatógrafo de líquidos, se ilustra en la figura 3.
- Sistemas de Gradientes: 1)Isocrático: durante todo el tiempo que se lleva a cabo la cromatografía, la composición de la fase móvil es constante. 2)Gradiente de elusión: cuando la relación de volúmenes de la fase móvil sufre cambios, el efecto neto del gradiente de elusión es disminución en el tiempo de retención de compuestos fuertemente retenidos en la columna.(1,16)
- La Fase Móvil:
Su composición es una de las variantes que influyen en la separación. La fase móvil deberá:
 - (a) Ser pura; libre de contaminantes.
 - (b) No reaccionar con el empaque de la columna.
 - (c) Ser compatible con el detector.
 - (d) Disolver la muestra.
 - (e) Tener una baja viscosidad.
 - (f) Ser comercialmente disponible.

Preparación de la Fase Móvil:

Precauciones: Todos los trabajos de preparación de la fase móvil deben realizarse bajo campana de extracción, ya que algunos disolventes son sumamente tóxicos por ejemplo: metanol y acetonitrilo. (16)

Recomendaciones: (1,16)

- (a) Utilizar disolventes HPLC.
- (b) Medir con exactitud todos los volúmenes, ya que mínimas modificaciones en la composición, provocan cambios en el comportamiento de la separación.
- (c) Utilizar recipientes de vidrio para la preparación y almacenamiento.
- (d) Filtrar la fase móvil, a través de una membrana de 0.45 micras, para quitar posibles partículas suspendidas, las cuales causan línea base ruidosa y tapan las columnas.
- (e) Para evitar la disolución de gases atmosféricos como O₂, CO₂, que pueden reaccionar con el analito, o interferir en la detección, desgasificar la fase móvil, utilizando un baño de ultrasonido por 5 min, para eliminación de microburbujas.
- (f) No dejarla envejecer.
- (g) Controlar el pH cuando sea necesario.
- (h) Utilizar agua de alta pureza, destilada, libre de partículas, sin contaminantes orgánicos, sin contaminación microbiológica. Las impurezas pueden causar picos fantasmas

Columnas: (1,3,16,17)

Estructura:

La pared interior de la columna debe ser lisa y químicamente neutra. Se emplean tubos de acero, empacados con partículas de tamaño de 4-10 micras. Las partículas son silicagel modificado, ya sea con numerosos grupos hidroxilos, o también con alquil silanos de 18, 8 y 2 átomos de carbono, RP18, RP8 y RP2 respectivamente.



R= C₁₈, C₈, C₂.

Las columnas tienen un diámetro interior y longitud variable. Modificando el pH de reacción durante la preparación de la silicagel para las columnas, se obtienen partículas de diferentes formas: con una reacción a un pH de 7.0 a 8.1, se obtienen partículas irregulares, quebradas, de reacción neutral a ligeramente ácida, por ejemplo LiChrosorb. Con una reacción a un pH de 3.0 a 6.6 y de 8.1 a 9.9, se obtienen partículas esféricas, LiChrospher, de reacción levemente ácida por ejemplo: nucleosil; o básica hipersil.

Recomendaciones: (16,17)

- (a) Es conveniente contar con una columna para cada producto y con otra de reserva, ya que cambiar continuamente la composición de la fase móvil y su pH acorta sensiblemente el tiempo de vida de la columna.
- (b) Acondicionar la columna, para obtener cromatogramas reproducibles. Como mínimo debe pasarse durante 30 min fase móvil a través de la columna. Se han obtenido buenos resultados condicionando la columna durante toda la noche a

una velocidad de flujo de 0.1 ml/min.

- (c) Es importante lavar las columnas después de cada análisis. Utilizar una mezcla de agua y disolvente 1:1; el disolvente puede ser metanol o acetonitrilo, según el disolvente utilizado en la fase móvil.
- (d) Almacenar las columnas en un lugar libre de vibraciones y cerrado.
- (e) Documentar su uso, número de inyecciones y fase móvil utilizada en la columna.
- (f) Determinar el tiempo de vida de la columna; ésto es el número total de inyecciones que se pueden realizar en la columna, obteniendo datos confiables y reproducibles.

El objetivo de la cromatografía es la separación de los componentes de una mezcla dentro de un tiempo razonable, a través de una columna, dando como resultado bandas o picos a diferentes tiempos. La resolución entre estos picos puede calcularse con la siguiente ecuación: (1,3)

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_2 + W_1}$$

Donde: t_R = tiempo de retención del pico 1 y 2 respectivamente.
 W = el ancho del pico (ver fig 1).

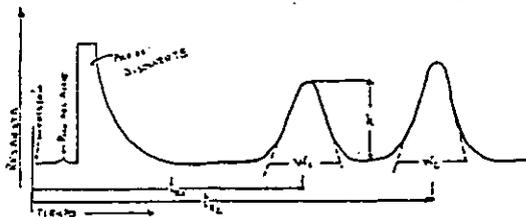


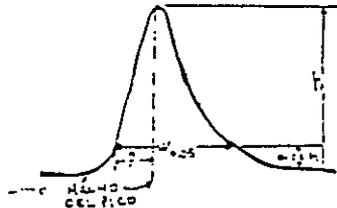
Figura 1.

Si la resolución es 0.4 ó menor, la forma del pico no es clara y probablemente existan dos o más componentes. Con valores de resolución arriba de 0.5 se obtendrán picos capaces de identificar el número de componentes, pero éstos probablemente no estén bien separados. Se necesita un valor de resolución cercano a 1.0 para obtener picos claramente separados y puedan ser cuantificados los componentes de una mezcla.

Cálculo del factor de asimetría:

$$t = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

Donde: t = factor de asimetría.
 f = distancia del frente del pico hasta el máximo en 5% de la altura del pico.
 ver figura 2.



Pico simétrico
 Figura 2.

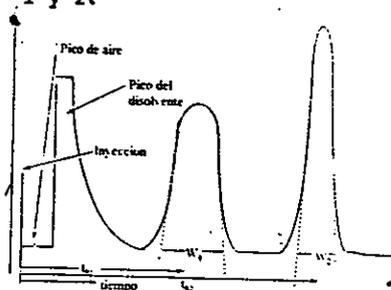
El valor de "t" no debe exceder a 2.5, en caso de tener un valor arriba de 2.5 el cálculo del área del pico puede ser inexacto porque el punto donde el pico vuelve a alcanzar la línea básica es difícil de integrar; si el valor de "t" es muy cercano a 1.0 se obtienen picos simétricos y fácil de ser integrados.

- (c) Es importante lavar las columnas después de cada análisis. Utilizar una mezcla de agua y disolvente 1:1; el disolvente puede ser metanol o acetonitrilo, según el disolvente utilizado en la fase móvil.
- (d) Almacenar las columnas en un lugar libre de vibraciones y cerrado.
- (e) Documentar su uso, número de inyecciones y fase móvil utilizada en la columna.
- (f) Determinar el tiempo de vida de la columna; esto es el número total de inyecciones que se pueden realizar en la columna y obtener datos confiables y reproducibles.

El objetivo de la cromatografía es la separación de los componentes de una mezcla dentro de un tiempo razonable, a través de una columna dando como resultado bandas o picos a diferentes tiempos. La resolución entre estos picos puede calcularse con la siguiente ecuación: (1,3)

$$R = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{w_2 + w_1}$$

Donde: R =resolución
 t_R =tiempo de retención de los picos 1 y 2.
 W =amplitud de la base de los picos de los componentes 1 y 2.

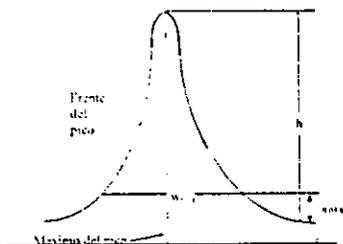


Si la resolución es 0.4 ó menor, la forma del pico no es clara y probablemente existan dos o más componentes. Con valores de resolución arriba de 0.5 se obtendrán picos capaces de identificar el número de componentes, pero estos probablemente no estén bien separados. Se necesita un valor de resolución cercano a 1.0 para obtener picos claramente separados y puedan ser cuantificados los componentes de una mezcla.

Cálculo del factor de asimetría:

$$t = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

Donde: t = factor de asimetría.
 f = anchura del pico medida entre el máximo y el frente del pico para la misma altura del pico ver figura 2.
 $W_{0.05}$ = anchura del pico para un 5% de altura.



Pico simétrico
 Figura 2.

El valor de "t" no debe exceder a 2.5, en caso de tener un valor arriba de 2.5 el cálculo del área del pico puede ser inexacto porque el punto donde el pico vuelve a alcanzar la línea básica es difícil de integrar, si el valor de "t" es muy cercano a 1.0 se obtienen picos simétricos y fácil de ser integrados.

La eficiencia de la columna está en función de parámetros como por ejemplo: disolvente, velocidad de flujo, tamaño de partícula del empaque de la columna, la viscosidad del disolvente. La eficiencia de la columna se describe por el número de platos teóricos "N".

Calculo de N:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 = 5.5 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$

Donde: N = número de platos teóricos.
 t_R = tiempo de retención.
 W = ancho del pico.
 (ver figura 1).

Como el número de platos teóricos es proporcional a la longitud de la columna, es preferible tener una medida de la eficiencia que sea independiente a la longitud de la columna como es "H" ó "HETP" (height equivalent to theoretical plate), se relaciona con el "N" como se muestra en la ecuación:

$$H = HETP = \frac{L}{N}$$

Donde L = longitud de la columna en mm.
 N = número de platos teóricos.

3.0 Equipo Utilizado

Componentes básicos de un sistema HPLC: (3,8,13,)



Componentes generales de un sistema HPLC.

Función de los componentes:

- a) Bomba: Proporciona un flujo constante de fase móvil durante un rango amplio de tiempo.
- b) Inyector: Sistema para introducir la muestra la columna.
- c) Columna: Es donde se lleva a cabo la separación.
- d) Detector: Para medir la cantidad de cada componente de la muestra que eluye de la columna.

Los cromatografos pueden contar con otros componentes como por ejemplo:

- e) Automuestreador: sirve para facilitar la operación de los análisis múltiples.
- f) Bombas múltiples: son para trabajar con gradiente de elusión.
- g) Horno para columna: es donde se puede mantener constante a diferentes temperaturas

Equipo: Cromatografo de líquidos Beckman (figura 3). (18)
SISTEMA GOLD
Automuestreador Beckman 507
Modulo de bombas programables Beckman 126
Detector programable Beckman 166

Descripción del Sistema:

El sistema Gold maneja tres niveles de interacción y de control:

- Primero. El Sistema Gold es usado como controlador para el equipo de HPLC, coordina la operación de cada módulo, bomba, automuestreador y detector, el sistema es compatible con otros hardware.

- Segundo: Se usa para reunir los datos de la muestra que se está corriendo y para reportarlos. En la memoria se almacenan las condiciones de diferentes análisis.
- Tercero: El Sistema Gold es un útil procesador de muestras, porque cada cromatograma o reporte puede ser almacenado en un disco.

Consiste en módulos individuales: automuestreador, bombas, detector.

Toda la operación de los parámetros están bajo el control de un procesador central. El Sistema Gold utiliza una simple Computadora personal para el control y adquisición de datos, reporte, etc.

Computadora personal IB AT, PS/2 series, las partes importantes de la computadora son:

- a) La unidad del sistema, conteniendo el procesador, memoria, y drives
- b) El monitor, el cual despliega los cromatogramas, programas e información
- c) El teclado para introducir datos de la muestra o ejecutar acciones.
- d) Interfase serial Beckman, la cual provee de información entre la computadora y los módulos
- e) El mouse, para una fácil operación
- f) La impresora, utilizada para el reporte de cromatogramas y resultados

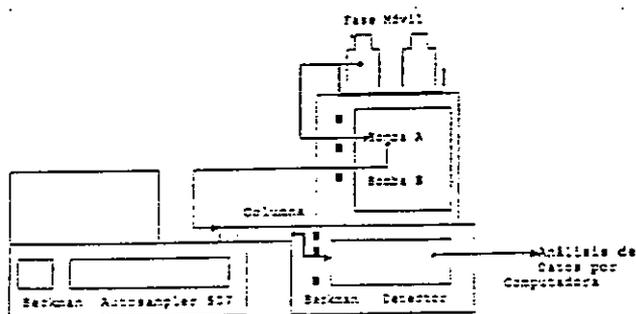
Los problemas más comunes causados por los componentes de un cromatógrafo son: (1,16,17)

- a) Bomba: tiempos de retención erróneos, línea base ruidosa, picos extraños. Cromatogramas defectuosos por fugas en las conexiones. Las fugas se pueden detectar por formación de cristales en las conexiones. Es recomendable realizar mantenimiento preventivo.
- b) Inyector: fugas, capilares tapados, sellos gastados, inyector no reproducibles, loops semilleros provocan alturas de pico variables, picos divididos y picos anchos.
- c) Columna:
 - c.1) El deterioro de la columna causa problemas en los análisis dando formas de pico indefinida; picos divididos, hombros, pérdida de resolución, disminución de los tiempos de retención y alta contrapresión. El deterioro puede ser por que se han acumulado contaminantes en el filtro poroso de acero sintetizado (frit) a la entrada de la columna, o porque se forman huecos, canales o depresiones en la cama de la columna.
 - c.2) Las columnas empacadas con tamaños de partículas diferentes o de poro grande provocan ensanchamiento de picos o una elusión retardada.
 - c.3) Una columna que en la entrada tiene los espacios activos ocupados (recargada) forma picos más anchos en la rama ascendente que en la descendente.

- c.4) Columnas con entrada (frit) obstruida o con un canal en la entrada, da picos dobles en todas las sustancias mostradas en el cromatograma.,
- c.5) Frits obstruidos, provocan una presión alta en el sistema
- c.6) Frit defectuoso a la salida de la columna, provoca que el material de relleno sea arrastrado de forma continua a través de él.
- d) Detector: de dos tipos mecánicos y eléctricos. Los mecánicos, en este caso ópticos, se localizan generalmente en la celda de flujo y son: fugas, burbujas y contaminación. Estos producen picos extraños o ruido en la línea base del cromatograma.

Funcionamiento en forma general de un equipo HPLC:

La muestra ya disuelta, se introduce ayudándose de un inyector, en la parte superior de la columna. La muestra interacciona dentro de la columna siendo acarreada por la fase móvil que es impulsada por una bomba. Los componentes que tienen más afinidad por la columna tardan más en salir. El detector da una señal por cada componente separado, esta señal se visualiza en el monitor y puede mandarse a imprimir.



Cromatógrafo de líquidos Beckman
Figura 1.

CAPÍTULO III

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

1.0 Definición: (2,3,19,20)

Se debe establecer un protocolo de validación que es la guía para realizar la validación de el o los métodos analíticos, en él se describen las pruebas necesarias para validar un método analítico, los parámetros estadísticos a considerar y los criterios de aceptación que se establecen.

La validación de métodos analíticos, es el proceso mediante el cual se establece que el método validado es adecuado para las aplicaciones analíticas deseadas.

2.0 Alcance:

Los métodos a validar son:

- Validación del método de cuantificación de amoxicilina trihidratada en suspensión.
- Validación del método de cuantificación de amoxicilina trihidratada en cápsulas.
- Validación del método de cuantificación de clorhidrato de ambroxol en suspensión.
- Validación del método de cuantificación de clorhidrato de ambroxol en cápsulas.

La descripción detallada de los Métodos a validar se encuentra en el Capítulo IV.

3.0 Parámetros de la validación: (2,3,5,6,19,20)

Los parámetros de validación en una técnica se aplican según la categoría de los métodos. La tabla I relaciona la categoría de los métodos con los parámetros de validación.

Categorías de métodos y parámetros a efectuarse:

Categoría I Métodos para:

- 1.) Ensayos de materias primas: principios activos, preservativos, antioxidantes, estabilizadores, etc.

Categoría II:

- 1.) Impurezas en las materias primas.
- 2.) Impurezas en el producto final, por ejemplo: productos de descomposición, productos de biosíntesis, componentes volátiles, componentes extractables, etc.

Categoría IIa:

Si el método se utiliza para cuantificar cualquiera de la categoría II.

Categoría IIb:

Si el método se utiliza como prueba límite de cualquiera de los mencionados en la categoría II.

Categoría III:

Métodos adicionales cuantitativos para la caracterización fisicoquímica del producto final, por ejemplo: disolución.

TABLA I

Relación entre categoría de métodos y parámetros a realizar.

PARÁMETROS	CATEGORÍA			
	I	Ia	IIB	III
Selectividad/Especificidad	Si	Si	Si	DCC
Exactitud	Si	Si	No	DCC
Repetibilidad	Si	No	No	DCC
Reproducibilidad	Si	No	No	DCC
Linealidad	Si	Si	No	DCC
Límite de Detección	No	Si	No	DCC
Límite de Cuantificación	No	Si	No	DCC
Rudeza	Si	DCC	DCC	DCC
Especificidad	Si	Si	Si	DCC

DCC = Dependiendo del caso. Si el método lo requiere.

El criterio a seguir para el establecimiento de los parámetros de validación es según el laboratorio y el tipo de método que se va a validar.

Los métodos analíticos a validar en el presente trabajo se encuentran dentro de la categoría I

Por lo tanto, los parámetros y el orden en el que van a efectuarse, es el siguiente:

3.1 Linealidad del sistema: (6,19,20,21,22)

Definición: La linealidad de un Sistema es la comprobación de que los resultados analíticos son proporcionales a la concentración de la sustancia a medir, dentro de un intervalo determinado.

Dando una relación lineal que se puede expresar como:

$$y = mx + b.$$

Procedimiento:

- Construir una curva de calibración de concentración contra respuesta medida con el principio activo que ha sido previamente analizado y aprobado.
- Construir la curva cuando menos con cinco diferentes concentraciones: 50, 80, 100, 120 y 150 %. Considerando el 100% la concentración del principio activo en la solución final a analizar, que proporciona una respuesta adecuada dependiendo del método a cuantificar.
- Realizar el análisis para cada punto por triplicado.
- Preparar las muestras siguiendo el método de análisis.
- Tabular como valor de "x" las concentraciones del analito y como valor de "y" la propiedad medida.
- Graficar los valores tabulados.

Cálculos:

- Calcular: Σx , Σy , Σx^2 , Σy^2 , Σxy .
- Calcular el coeficiente de determinación:

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

- Calcular el coeficiente de regresión:

$$r = \sqrt{r^2}$$

- Calcular para cada una de las muestra de los puntos de la curva el factor F:

$$F = \frac{(y)}{(x)}$$

Donde: y= propiedad medida.
 x= concentración de la dilución de la solución patrón.

- Calcular: ΣF y ΣF^2 .
- Calcular la media del factor F:

$$\bar{F} = \frac{F}{N}$$

- Calcular la Desviación estándar del factor F:

$$DE = \frac{\sqrt{N(\Sigma F^2) - (\Sigma F)^2}}{N(N-1)}$$

- Calcular el coeficiente de variación:

$$CV = \frac{DE}{\bar{F}} \times 100$$

Criterio de Aceptación:

- CV \leq 1.5 %.
- r \geq 0.99
- r² \geq 0.98

3.2 Precisión del sistema: (6,19,20,21)

Definición: Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales que presentan una dispersión típica tras una repetida aplicación de solamente el analito.

Procedimiento:

- Preparar seis muestras al 100 % con el principio activo que ha sido previamente aprobado.
Considerando el 100 % el punto medio de la linealidad.
- Tabular como valor de "x" las concentraciones del analito y como valor de "y" propiedad medida.

Cálculos:

- Calcular: Σy , Σy^2 .
- Calcular la media de "y":

$$\bar{y} = \frac{\Sigma y}{N}$$

- Calcular la desviación estándar:

$$DE = \sqrt{\frac{N(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{N(N-1)}}$$

- Calcular el coeficiente de variación:

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

Criterios de aceptación:

- CV \leq 1.5 %

3.3 Linealidad del método: (26,19,20,21)

Definición:

La linealidad de un método analítico es la capacidad para asegurar que los resultados analíticos son proporcionales a la

concentración de la sustancia a medir, dentro de un intervalo determinado. Dando una relación lineal que se puede expresar como:

$$y = mx + b.$$

Procedimiento:

- Determinar la linealidad del método con placebos, adicionandoles concentraciones conocidas del principio activo de interés, cuando menos a cinco concentraciones diferentes.
- Utilizar las siguientes concentraciones para la determinación: 50, 80, 100, 120 y 150 %.
- Se considera el 100 % a la concentración de la solución final de la muestra a analizar que proporciona una respuesta adecuada, de acuerdo a lo descrito en el método de análisis respectivo.
- Realizar el análisis para cada concentración por triplicado.
- Preparar las muestras siguiendo el método de análisis respectivo.
- Tabular las concentraciones de la cantidad adicionada "x" y como valor de "y" el % recuperado .
- Graficar los valores tabulados.

Cálculos:

- Calcular: Σx , Σy , Σx^2 , Σy^2 , Σxy .
- Calcular la pendiente "m":

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

- Calcular la ordenada al origen "b" :

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

- Calcular el error estándar de regresión " S y/x " :

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \bar{y})^2}{n-2}}$$

Donde: Y = valor calculado de y de acuerdo a la ecuación $y=mx+b$.

- Calcular el coeficiente de determinación :

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

- Calcular el coeficiente de regresión:

$$r = \sqrt{r^2}$$

Para calcular los límites de confianza para la pendiente con una probabilidad de error como máximo de 5 %, realizar los siguientes cálculos, utilizando el modelo matemático "t" de Student.

- Calcular el error estándar "SM" para "m".

$$SM = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Donde: \bar{x} = media de x.

- Determinar en la tabla de la distribución de "t" de Student el valor para t para el nivel de confianza deseado y (n-2) grados de libertad.
- Calcular el intervalo de confianza para "m" con la siguiente ecuación:

$$ICM = m \pm t_{(s=0.05, g, l=n-2)} (SM)$$

Para calcular los límites de confianza para "b" con un nivel de confianza del 95 % realizar los siguientes cálculos, utilizando el modelo matemático de "t" de Student.

- Calcular la desviación estándar "SB" de la ordenada "b".

$$SB = S_y / x \sqrt{\frac{\sum x^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

- Determinar el valor de "t" en la tabla de distribución de "t" de Student, para el nivel de confianza deseado con (n-2) grados de libertad.
- Calcular el intervalo de confianza para "b" con la siguiente ecuación:

$$ICB = b \pm t_{(s=0.05, g, l=n-2)} (SB)$$

- Intercepto relativo "IR".

$$IR = \frac{b}{y}$$

Para el cálculo del CV realizar las siguientes operaciones:

- Calcular el porcentaje recuperado para cada punto.

$$R = \left(\frac{Y}{X}\right) 100$$

- Calcular: ΣR , ΣR^2 .
- Calcular el promedio de R.

$$\bar{R} = \frac{(\Sigma R)}{N}$$

- Calcular la DE de R.

$$DE = \sqrt{\frac{N(\Sigma R^2) - (\Sigma R)^2}{N(N-1)}}$$

- Calcular el CV para R.

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

Criterios de Aceptación:

- Estableciendo pruebas de "t" de Student para la pendiente "m".

$H_0: m = \mu$ donde $\mu=1$ hipótesis nula.

$H_1: m \neq \mu$ hipótesis alterna.

- Calcular la "t" experimental.

$$t_{\text{calc}} = \frac{(m-\mu)(D.E)\sqrt{n-1}}{S_{y/x}}$$

Donde: μ = pendiente teórica = 1

Relación crítica bilateral con un nivel de significancia $\alpha=0.05$ para "m":

$$t_{\alpha/2} < t_{\text{calc}} < t_{1-\alpha/2} \text{ (con } n-2 \text{ grados de libertad).}$$

Si $t_{\text{calc}} < t$ tablas, y cumple con lo establecido en la región crítica bilateral, la hipótesis de nulidad no se rechaza.

- Estableciendo prueba de "t" Student para la ordenada al origen "b".

$H_0: b = \beta$ donde $\beta=0$ hipótesis nula.

$H_1: b \neq \beta$ hipótesis alterna.

Calcular la "t" experimental.

$$t_{\text{calc}} = \frac{b-\beta}{S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X^2}{n \sum (X-\bar{X})^2}}}$$

Donde: β = ordenada teórica = 0

Región crítica bilateral con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ para "b".

$$t_{\alpha/2} < t_{\text{calc}} < t_{1-\alpha/2} \text{ (con } n-2 \text{ grados de libertad)}$$

Si $t_{\text{calc}} < t$ tablas, y cumple con lo establecido en la región crítica bilateral la hipótesis de nulidad no se rechaza.

- $r^2 \geq 0.98$.

- $r \geq 0.99$.
- Promedio de recuperación está entre 98 - 102 %.
- $CV \leq 2.0$ %

3.4 Exactitud del método: (26,19,20,21,22)

Definición: La exactitud de un método analítico es el grado de concordancia entre los valores obtenidos experimentalmente respecto al valor de un estándar de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido en las muestras analizadas.

Procedimiento:

- Utilizar los datos obtenidos en las muestras de 80, 100 y 120 % de la prueba de linealidad.

Cálculos:

- Calcular los porcentajes recuperados, en base a la cantidad adicionada de cada punto.

$$R = \left(\frac{Y}{X}\right) 100$$

- Tabular los porcentajes recuperados (X).
- Calcular: ΣX , ΣX^2 .
- Calcular el promedio de X.

$$\bar{X} = \frac{(\Sigma X)}{N}$$

- Calcular la desviación estándar (DE) de X.

$$DE = \sqrt{\frac{N(\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2}{N(N-1)}}$$

- Calcular el coeficiente de variación(CV) para X.

$$CV = \frac{DE \times 100}{\bar{X}}$$

- Calcular el intervalo de confianza para una región de aceptación o de rechazo del 95 %, con una significancia del 0.05, con la siguiente ecuación:

$$IC = \bar{X} \pm t_{(\alpha=0.95, g. l = n-1)} \left[\frac{DE}{\sqrt{n}} \right]$$

- Buscar el valor de $t_{0.95}$ en las tablas de la de "t" de Student para $n-1$ grados de libertad, y $\alpha=0.05$.

Criterios de Aceptación:

- La media del porcentaje recuperado se encuentra entre 98-102 %.
- Hacer la prueba de hipótesis para la media:

$$H_0: \bar{X} = \mu$$

donde $\mu = 100$ % media teórica poblacional.

$$H_1: \bar{X} \neq \mu$$

Calcular la "t" experimental, con la siguiente ecuación:

$$t_{exp} = \frac{\bar{X} - \mu}{DE/\sqrt{n}}$$

Buscar el valor de "t" teórica en las tablas para $n-1$ grados de libertad y un nivel de significancia $\alpha=0.05$. Comparar el valor de t_{exp} y t_{tab} .

$$\text{Si } t_{0.025} < t_{exp} < t_{0.975}.$$

No se rechaza H_0 y el método se puede considerar exacto con un $\alpha=0.050$.

- El valor de CV \leq 2.0 %.

3.5 Precisión del método: (26,19,20,21,22)

Definición: La precisión de un método es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el método es aplicado repetidamente a una muestra homogénea del producto. Se expresa usualmente en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones de operación descritas en él

3.5.1 Repetibilidad al 100 %:

Definición: Es la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones de trabajo: analista, laboratorio, equipo, tiempo, etc.

Procedimiento:

- Realizar las determinaciones con placebos cargados.
- Preparar por sextuplicado lo correspondiente al 100 %, siguiendo el método correspondiente.
- Tomar como 100 % la concentración de la muestra final a analizar.
- Realizar el análisis bajo las mismas condiciones de trabajo y un solo analista.

Cálculos:

- Calcular los porcentos recobrados, en base a la cantidad adicionada de cada punto.

$$R = \left(\frac{Y}{X} \right) 100$$

- Tabular los porcentos recobrados (X).
- Calcular: ΣX , ΣX^2 .
- Calcular el promedio de X.

$$\bar{X} = \frac{(\Sigma X)}{N}$$

- Calcular la DE de X.

$$DE = \sqrt{\frac{N(\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2}{N(N-1)}}$$

- Calcular el CV para X.

$$CV = \frac{DE \times 100}{\bar{X}}$$

- Calcular el intervalo de confianza para una región de aceptación o de rechazo del 95 %, con una significancia del 0.05, con la siguiente ecuación:

$$IC = \bar{X} \pm t_{\alpha, n-1} \left[\frac{DE}{\sqrt{n}} \right]$$

- Buscar el valor de $t_{\alpha, n-1}$ en las tablas de la de "t" de Student para n-1 grados de libertad, y $\alpha=0.05$.

Criterios de Aceptación:

- La media del porcentaje recuperado se encuentra entre 98-102 %.
- Hacer la prueba de hipótesis para la media:

$$H_0: \bar{X} = \mu$$

donde $\mu = 100$ % media teórica poblacional.

$$H_1: \bar{X} \neq \mu$$

Calcular la "t" experimental, con la siguiente ecuación:

$$t_{\text{exp}} = \frac{\bar{X} - \mu}{DE/\sqrt{n}}$$

Buscar el valor de "t" teórica en las tablas para n-1 grados de libertad y un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. Comparar el valor de t_{exp} y t_{tab} .

$$\text{Si } t_{0.025} < t_{\text{exp}} < t_{0.975}.$$

No se rechaza H_0 y el método se puede considerar exacto con un

$$\alpha = 0.050.$$

- El valor de CV $\leq 2.0\%$.

3.5.2 Reproducibilidad:

Definición: Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia encontrada entre determinaciones independientes, realizadas bajo diferentes condiciones de trabajo: diferente analista, diferente día, mismo y/o diferente equipo, etc.

Procedimiento: Realizar las determinaciones con placebos cargados

- Preparar seis soluciones con el 100 % de acuerdo a lo indicado en el método de análisis, con la formulación del producto.
- Realizar el ensayo por dos analistas .
- Tabular los porcentajes recuperados de los dos analistas; analista 1 (X1), analista 2 (X2).

Cálculos:

- Calcular las siguientes sumatorias:
 ΣX ($\Sigma X_1 + \Sigma X_2$), ΣX_1 , ΣX_2 .
- Calcular ΣX^2 , Media de X, y la D.E:
- Calcular el C.V:
- Reproducibilidad interanalista:
Calcular: La suma de cuadrados del analista:

$$\Sigma X_A^2 = (\Sigma X_1)^2 + (\Sigma X_2)^2$$

Calcular la Varianza debida al Analista:

$$S_A^2 = \frac{\Sigma X_A^2}{6} - \frac{\Sigma X^2}{12}$$

Donde: 6 es el No. de replicaciones.

12 es el No. de analistas por el No. de réplicas.

- Calcular la Varianza debida al Método:

$$S_M^2 = \frac{\Sigma X^2 - (\Sigma X_A^2 / 6)}{10}$$

Donde 6 es el No. de réplicas.

10 = (No. de replicas - 1) No. de analistas.

- Calcular F_0 :

$$F_0 = \frac{S_A^2}{S_M^2}$$

Criterios de Aceptación:

- El C.V \leq 2.0 %.
- Hacer Prueba de Hipótesis :
 - H_0 : No debe modificarse el porcentaje de Recuperación, cuando el método analítico es realizado por el analista (1) o el analista (2).
 - H_1 : Se modifica el porcentaje de Recuperación, cuando el método analítico es realizado por el analista (1) o el analista (2).

Rechazar la H_0 si :

$$F_0 > F_{\text{tab}} (\alpha= 0.05, g.l= 1, g.l= 10)$$

- Si la Hipótesis nula (H_0) se acepta y el C.V está dentro del valor esperado , el método es reproducible.

3.6 Especificidad del método:(6,19,20)

Definición: Es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés, en presencia de las demás sustancias de la formulación.

Procedimiento:(Método indicador de control de calidad)

- Preparar soluciones, siguiendo el método analítico correspondiente al principio activo de interés de las siguientes muestras:
 - 1.-Sustancia de referencia.
 - 2.- Placebo.
 - 3.- Formulación completa del producto.

Criterios de Aceptación:

- Si el método analítico es capaz de separar la sustancia de

interés, sin la interferencia de otras sustancias presentes en la formulación, el método es específico.

3.7 Estabilidad de la muestra analítica:(6,19,20)

Definición: Es la propiedad de una muestra en proceso de análisis de conservar constante la propiedad medible, después de un tiempo de ser almacenada en determinadas condiciones.

Procedimiento:

- Preparar por triplicado muestras según indique el método analítico.
- Cuantificar las muestras.
- Almacenar las muestras en refrigeración, aproximadamente a $6 \pm 1^\circ$ C. durante 3 días. Condiciones necesarias en el laboratorio de control químico.
- Reanalizarlas siguiendo el método analítico, pero utilizar una solución de referencia recientemente preparada.
- Efectuar el análisis un solo analista.
- Tabular los resultados iniciales y los finales de las muestras analizadas.

Cálculos:

- Calcular la Media inicial M_0 y la media final M_1 .
- Calcular la Varianza inicial S_0 y la final S_1 .
- Calcular la Varianza Ponderada siguiendo la ecuación:

$$S_p^2 = \frac{2S_0^2 + 2S_1^2}{2(c+1)}$$

Donde c= número de comparaciones

- Calcular el Intervalo de Confianza:

$$I.C. = (\bar{M}_1) \pm t_{tab} \cdot \sqrt{S_{p1}^2 \left[\frac{2}{3} \right]}$$

Donde:

t_{tab} = valor de t de Dunnet con c comparaciones y $2(c+1)$ grados de libertad y una probabilidad acumulada del 0.975.

- Para el C.V calcular el Factor I para cada muestra con la siguiente ecuación:

$$I = \frac{A_{cl}}{A_{no}} \cdot 100$$

Donde:

A_{cl} = Análisis final de la muestra analítica % n a determinada condición.

A_o = Análisis inicial de la muestra analítica n.

n = No. respectivo de la muestra analítica por ejemplo 1, 2 y 3.

Calcular la Media del Factor I:

$$\bar{I} = \frac{\sum I}{N}$$

Donde:

N = No. Total de muestras analíticas cuantificadas = 3

Criterio de Aceptación:

- La muestra analítica es estable si:
 - * En el intervalo de confianza incluye el valor de cero.
 - * El valor de la Media para el Factor I se encuentra dentro del intervalo de $100 \pm 2\%$.

CAPÍTULO IV

MÉTODOS ANALÍTICOS

1.0 Método Analítico para Cuantificar el Contenido de Amoxicilina Trihidratada en Cápsulas y en Suspensión.

CÁPSULAS

Fórmula:

Cada cápsula contiene:

Amoxicilina trihidratada equivalente a.....500 mg de amoxicilina anhidra

Clorhidrato de ambroxol.....30 mg

Excipiente c.b.p.....1 cápsula

SUSPENSIÓN

Polvo para resuspender

Fórmula:

Cada frasco contiene:

Amoxicilina trihidratada equivalente a.....4.5 g de amoxicilina anhidra

Clorhidrato de ambroxol.....0.270 g

Excipiente c.b.p.....36 g

MÉTODO:

Cromatografía líquida de alta resolución.

REACTIVOS:

Fosfato monobásico de potasio, R.A. NaH_2PO_4 .

Agua destilada (*).

(*) Previamente filtrada por filtro de 0.45 micras.

SOLUCIONES:

Solución de referencia:

La solución de referencia para cápsulas y suspensión se prepara de la misma manera.

- Pesar 40.0 mg de una sustancia de referencia de amoxicilina trihidratada.
- Transferir en un matraz volumétrico de 100 ml.
- Agregar 50 ml de fase móvil, agitar ligeramente.
- Sonicar durante 10 min.
- Llevar a volumen con fase móvil. Mezclar.
- Filtrar con una jeringa, una unidad de filtración que se adapte a la jeringa y un filtro para soluciones acuosas de 12 mm de diámetro del tipo HV de 0.45 micras (Millipore No. de catalogo HVLP01300).

Solución Muestra:

La solución muestra para cápsulas se prepara de la siguiente manera:

- Triturar el contenido de 20 cápsulas , en un mortero.
- Pesar aproximadamente 44 mg (el equivalente a 40 mg de amoxicilina trihidratada), del polvo triturado.
- Transferir en un matraz volumétrico de 100 ml.
- Agregar 50 ml de la fase móvil. Mezclar.
- Sonicar durante 10 minutos.
- Llevar a volumen con fase móvil. Mezclar.
- Si es necesario filtrar por papel Wattman # 1.

- Filtrar de la misma manera que la solución estándar.

La solución muestra para la suspensión se prepara de la siguiente manera:

- Triturar el contenido de los frascos, en un mortero.
- Pesar aproximadamente 280 mg (el equivalente a 40 mg de amoxicilina trihidratada), del polvo triturado.
- Transferir en un matraz volumétrico de 100 ml.
- Agregar 50 ml de la fase móvil. Mezclar.
- Sonicar durante 10 minutos.
- Llevar a volumen con fase móvil. Mezclar.
- Si es necesario filtrar por papel Wattman # 1.
- Filtrar de la misma manera que la solución de referencia.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS:

Para cápsulas y suspensión son las mismas condiciones cromatográficas:

Columna:

Material: Acero inoxidable 316.

Longitud: 12.5 cm.

Diámetro interno: 0.4 cm.

Fase estacionaria: Lichrosorb RP-18.5 micras (Merck).

Fase móvil:

- Fosfato monobásico de potasio 9.1 g/l

pH = 4.5. Ajustar si es necesario con HCl 0.1 N ó NaOH 0.1 N.

Temperatura:

- Ambiente

Caudal:

- 2.0 ml/minuto.

Detector:

- Longitud de onda 220 nm.
- Sensibilidad 250 mAUPS

Volumen de inyección:

- 10 microlitros.

ADECUABILIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO:

Determinar la adecuabilidad del sistema cromatográfico :

- El factor de simetría debe ser menor de 2.5.
- El tiempo de retención debe ser aproximadamente de 3.9 min.

Ver el cromatograma No. 2, en especificidad del método.

- Inyectar primero la fase móvil (blanco); después la solución de referencia por triplicado y determinar el coeficiente de variación, el cual no debe ser mayor a 1.0%, inyectar entonces las soluciones muestra por duplicado, al final inyectar nuevamente la solución de referencia por triplicado.

CALCULOS:

Obtener el resultado utilizando las siguientes fórmulas:

Para cápsulas:

$$C = \frac{AM \times PT \times PP}{AT \times PM} \times \frac{POT}{100}$$

Donde :

- C = miligramos de amoxicilina en base seca por cápsula.
AM = área media del pico de amoxiciclina trihidratada de la solución muestra.
AT = área media del pico de amoxicilina trihidratada de la solución de referencia.
PT = peso de la solución de referencia de amoxicilina trihidratada en mg.
PM = peso de la muestra en mg.
POT= potencia de la sustancia de referencia base seca.
PP= peso promedio en miligramos del contenido de 20 cápsula.

Para suspensión:

$$S = \frac{AM \times PT \times PPT}{AT \times PM} \times \frac{POT}{100}$$

Donde :

- S = g de amoxicilina en base seca por frasco.
AM = área media del pico de amoxiciclina trihidratada de la solución muestra.
AT = área media del pico de amoxicilina trihidratada de la solución de referencia.
PT = peso de la sustancia de referencia de amoxicilina trihidratada en g.
PM = peso de la muestra en g.
POT= potencia de la sustancia de referencia.
ppt = peso promedio en g del contenido de los frascos.

2.0 Método Analítico para Cuantificar el Contenido de ambroxol Clorhidrato en Cápsulas y en Suspensión.

MÉTODO:

Cromatografía líquida de alta resolución.

REACTIVOS:

Fosfato de amonio monoácido, R.A. $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$.

Acido fosfórico, R.A. H_3PO_4 .

Agua destilada (*).

Acetonitrilo, calidad HPLC.

Metanol HPLC.

(*) Previamente filtrada por filtro de 0.45 micras.

SOLUCIONES:

Solución de referencia:

Para cápsulas y suspensión, la solución de referencia se prepara de la misma forma:

- Pesar 15.0 mg de una sustancia de referencia de clorhidrato de ambroxol.
- Transferir a un matraz volumétrico de 100 ml.
- Agregar 5 ml de fase móvil, agitar ligeramente.
- Sonicar durante 5 min.
- Llevar a volumen con metanol. Mezclar.
- Filtrar con una unidad de filtración adaptándola a una jeringa con un filtro de 12 mm de diámetro del tipo FG para soluciones orgánicas de 0.22 micras (Millipore, No. de catálogo FGLP01300).

Solución Muestra:

Para cápsulas:

- Triturar el contenido de 20 cápsulas en un mortero.

- Pesar el equivalente a 15 mg de ambroxol clorhidrato (315 mg).
- Transferir a un matraz volumétrico de 100 ml.
- Agregar 5 ml de fase móvil, agitar ligeramente.
- Sonicar durante 5 min.
- Llevar a volumen con metanol. Mezclar.
- Si es necesario, filtrar por papel Wattman # 1.
- Filtrar de la misma manera que la solución de referencia.

Para la suspensión:

- Triturar el contenido de los frascos en un mortero.
- Pesar el equivalente a 15 mg de ambroxol clorhidrato (2 g).
- Transferir a un matraz volumétrico de 100 ml.
- Agregar 5 ml de fase móvil, agitar ligeramente.
- Sonicar durante 5 min.
- Llevar a volumen con metanol. Mezclar.
- Si es necesario, filtrar por papel Wattman # 1.
- Filtrar de la misma manera que la solución de referencia.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS:

Para cápsulas y suspensión son las mismas condiciones cromatográficas.

Columna:

Material: Acero inoxidable 316.

Longitud: 12.5 cm.

Diámetro interno: 0.4 cm.

Fase estacionaria: Lichrosorb RP-18.5 micras (Merck).

Fase móvil:

- Transferir 1g de fosfato de amonio monoácido a un matraz

volumétrico de 1000 ml. Disolver con agua destilada , ajustar el pH a 7.5 con ácido ortofosfórico diluido (6.9 ml de ác. ortofosfórico en 100 ml de agua destilada) y llevar a volumen con agua destilada.

- Mezclar 500 ml de la solución anterior con 500 ml de acetonitrilo HPLC. Desgasificar.

Temperatura:

- Ambiente

Caudal:

- 2.0 ml/minuto.

Detector:

- Longitud de onda 250 nm.

- Sensibilidad 128 mAUFS

Volumen de inyección:

- 20 microlitros.

ADECUABILIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO:

Determinar la adecuabilidad del sistema cromatográfico :

- El factor de simetría debe ser menor de 2.5.

- El tiempo de retención debe ser aproximadamente de 3.6 min.

Ver el cromatograma No. 8, en especificidad del método.

-Inyectar siguiendo el mismo procedimiento que se indicó en la página 46.

CÁLCULOS:

Obtener el resultado utilizando las siguientes fórmulas:

Para cápsulas:

$$A = \frac{AM \times PT \times PPC}{AT \times PM} \times \frac{PUR}{100}$$

Donde :

A = miligramos de ambroxol clorhidrato por cápsula.

AM = área media del pico de ambroxol clorhidrato de la solución muestra.

AT = área media del pico de ambroxol clorhidrato de la solución de referencia.

PT = peso de la sustancia de referencia de ambroxol clorhidrato en mg.

PM = peso de la muestra en mg.

PUR= pureza de la sustancia de referencia en base seca.

PPC= peso promedio en miligramos del contenido de 20 cápsulas.

Para suspensión:

$$B = \frac{AM \times PT \times PES}{AT \times PM} \times \frac{PUR}{100}$$

Donde :

B = gramos de ambroxol clorhidrato por frasco.

AM = área media del pico de ambroxol clorhidrato de la solución muestra.

AT = área media del pico de ambroxol clorhidrato de la solución de referencia.

PT = peso de la sustancia de referencia de ambroxol clorhidrato en g.

PM = peso de la muestra en g.

PUR= pureza de la sustancia de referencia en base seca.

PPS = peso promedio en g del contenido de los frascos.

CAPÍTULO V

INFORME DE VALIDACIÓN

**LINEARIDAD DEL SISTEMA PARA AMOXICILINA
TRIHIDRATADA.**

Se construyó la curva de calibración en el intervalo de 50 a 150 % .

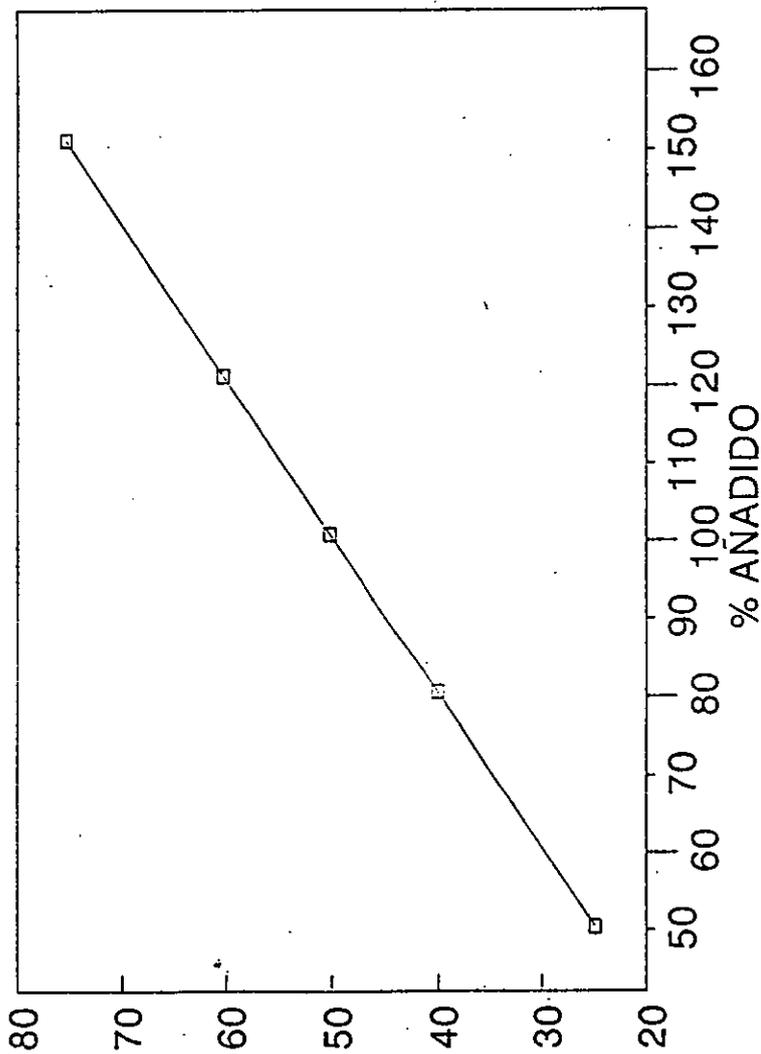
Considerando el 100% la concentración del principio activo en la solución final a analizar.

NIVEL%	ÁREA	%AÑADIDO	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS
50	25.0541	50.6	Media=24.9232
	24.9023	50.1	n=3
	24.8131	50.1	
80	39.9752	80.6	Media=40.0413
	39.9793	80.4	n=3
	40.1694	80.6	
100	50.1154	100.6	Media=50.2515
	50.1287	100.8	n=3
	50.5104	101.3	
120	60.2935	121.5	Media=60.3323
	60.2910	121.2	n=3
	60.4124	121.0	
150	75.4326	151.4	Media=75.3823
	75.4220	151.2	n=3
	75.2922	151.0	

Cuadro de comparación de resultados contra los parámetros estadísticos.

	RESULTADO	CRITERIO
Coefficiente de determinación	1.07	≥0.99
Coefficiente de correlación	1.03	≥0.98
Coefficiente de variación	0.3%	≤1.5%

LINEARIDAD DEL SISTEMA PARA AMOXICILINA TRIHIDRATADA



ÁREA

LINEARIDAD DEL SISTEMA PARA AMBROXOL CLORHIDRATO.

Se construyó la curva de calibración en el intervalo de 50 a 150 % .

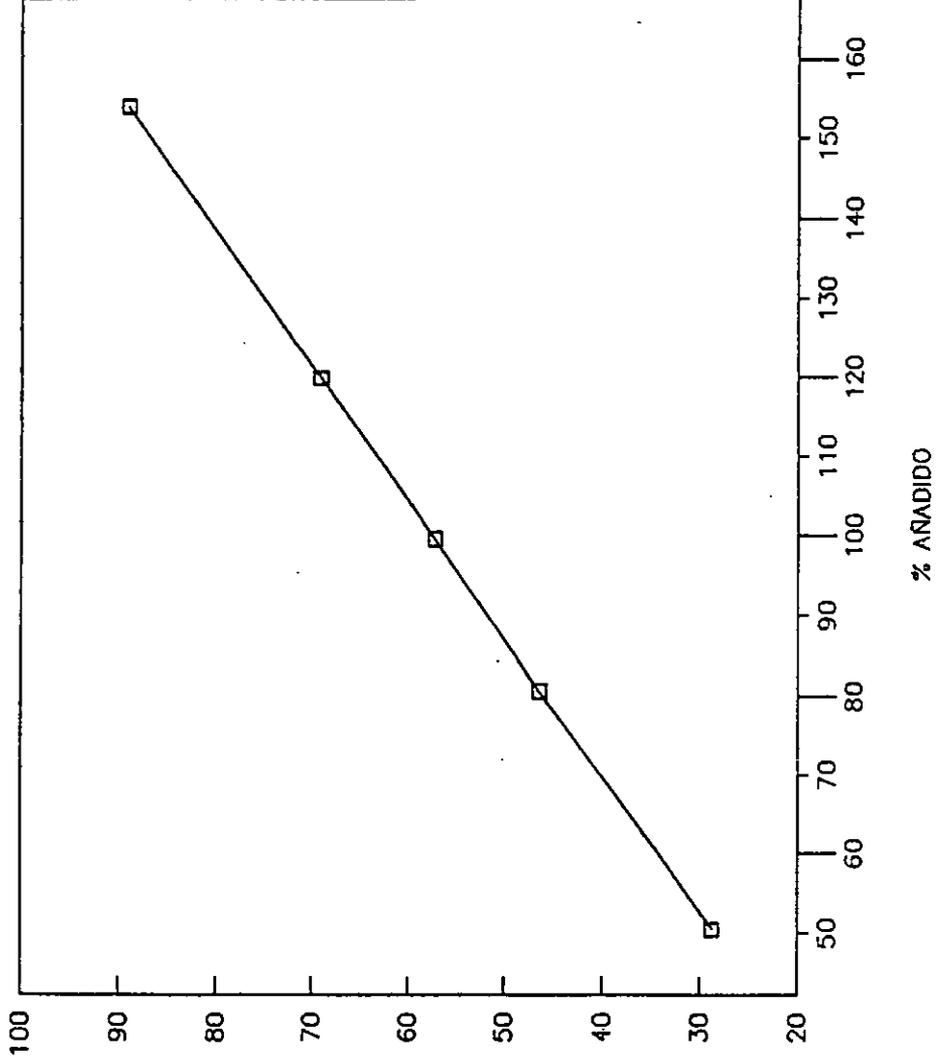
Considerando el 100% la concentración del principio activo en la solución final a analizar.

NIVEL%	ÁREA	%AÑADIDO	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS
50	29.13527	50.9	Media=28.7643
	29.17894	50.9	n=3
	27.97856	49.6	
80	46.68298	80.7	Media=46.3761
	46.50132	80.7	n=3
	45.94408	80.7	
100	58.23668	100.5	Media=57.1755
	57.60752	99.9	n=3
	55.68229	98.5	
120	68.41192	119.0	Media=69.0917
	70.12897	121.0	n=3
	68.73415	119.7	
150	89.76025	154.7	Media=89.1549
	88.61568	153.4	n=3
	89.08865	154.1	

Cuadro de comparación de resultados contra los parámetros estadísticos.

	RESULTADO	CRITERIO
Coefficiente de determinación	1.07	≥0.99
Coefficiente de correlación	1.03	≥0.98
Coefficiente de variación	0.9%	≤1.5%

LINEARIDAD DEL SISTEMA PARA AMBROXOL CLORHIDRATO



AREA

PRECISIÓN DEL SISTEMA PARA AMOXICILINA
TRIHIDRATADA.

ÁREA	% AÑADIDO	%RECOBRO
90.29674	101.5	101.6
89.02708	101.8	100.7
88.41920	101.3	99.7
87.65015	100.8	98.9
88.37394	101.8	100.2
88.69462	101.0	99.6

Cuadro de comparación de resultados contra
parámetros estadísticos.

Parámetros estadísticos	Resultado	Criterio
Coefficiente de variación	1.0%	≤1.5%

PRECISIÓN DEL SISTEMA PARA AMBROXOL
CLORHIDRATO.

ÁREA	% AÑADIDO	%RECOBRO
19.22634	99.7	101.4
19.38393	101.0	100.8
19.21054	100.3	100.6
19.37107	100.3	101.5
19.35210	101.0	100.7
19.47875	101.7	100.7

Cuadro de comparación de resultados contra
parámetros estadísticos.

Parámetros estadísticos	Resultado	Criterio
Coefficiente de variación	0.5%	≤1.5%

**LINEARIDAD DEL MÉTODO PARA AMOXICILINA
TRIHIDRATADA EN CÁPSULAS.**

NIVEL%	%AÑADIDO	%RECUPERADO	%RECOBRO	PROMEDIO%
50	50.7	50.2	98.9	99.2
	51.0	50.0	98.1	
	51.0	51.2	100.5	
80	81.5	81.1	99.6	99.3
	81.5	81.1	99.6	
	80.5	81.1	100.7	
100	101.8	100.6	98.8	99.3
	101.5	100.7	99.1	
	102.2	102.0	99.8	
120	121.6	121.5	99.9	99.8
	121.4	121.7	99.9	
	122.1	121.7	99.0	
150	153.0	151.4	98.9	98.7
	152.3	150.6	98.9	
	153.0	150.4	98.3	

La línea de regresión obtenida es la siguiente:

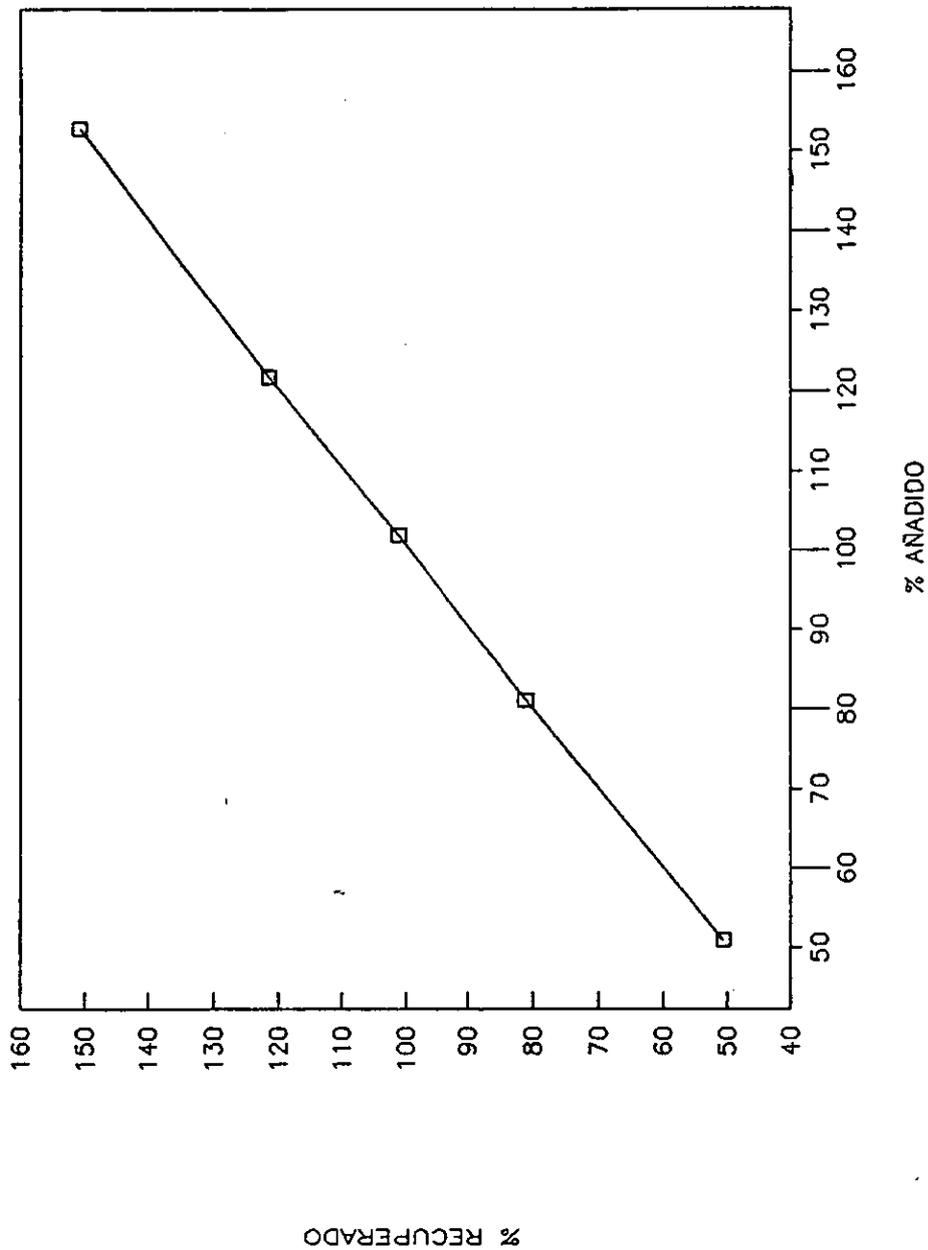
$$y = 0.992x + 0.035.$$

Cuadro de comparación entre resultados contra parámetros estadísticos.

	Resultado	Criterio
Hipótesis de nulidad para la pendiente.	$t_{0.05}=1.771$ $t_{\text{experimental}}=-0.45$	$t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$
Hipótesis de nulidad para la ordenada.	$t_{0.05}=1.771$ $t_{\text{exp}}=0.000012$	$t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$
Coefficiente de determinación.	0.999	≥ 0.98
Coefficiente de regresión.	0.999	≥ 0.99
Promedio de recuperación.	99.4%	98 a 102%
Coefficiente de variación.	0.5%	$\leq 2.0\%$

La hipótesis de nulidad para la ordenada al origen y la pendiente se aceptan.

LINEARIDAD DEL MÉTODO PARA CÁPSULAS AMOXICILINA TRIHIDRATADA



**LINEARIDAD DEL MÉTODO PARA AMOXICILINA
TRIHIDRATADA EN SUSPENSIÓN.**

NIVEL%	%AÑADIDO	%RECUPERADO	%RECOBRO	PROMEDIO%
50	50.8	51.7	101.7	101.6
	50.8	51.6	101.3	
	50.8	51.7	101.7	
80	81.3	81.1	99.7	99.7
	81.3	80.8	99.4	
	81.3	81.1	99.8	
100	101.7	102.6	100.9	99.7
	101.5	100.7	99.1	
	101.6	100.8	99.2	
120	122.0	124.2	101.8	101.3
	121.8	122.5	100.5	
	121.9	123.6	101.4	
150	152.4	151.7	99.5	99.5
	152.4	151.2	99.2	
	152.4	152.0	99.8	

La línea de regresión obtenida es la siguiente:

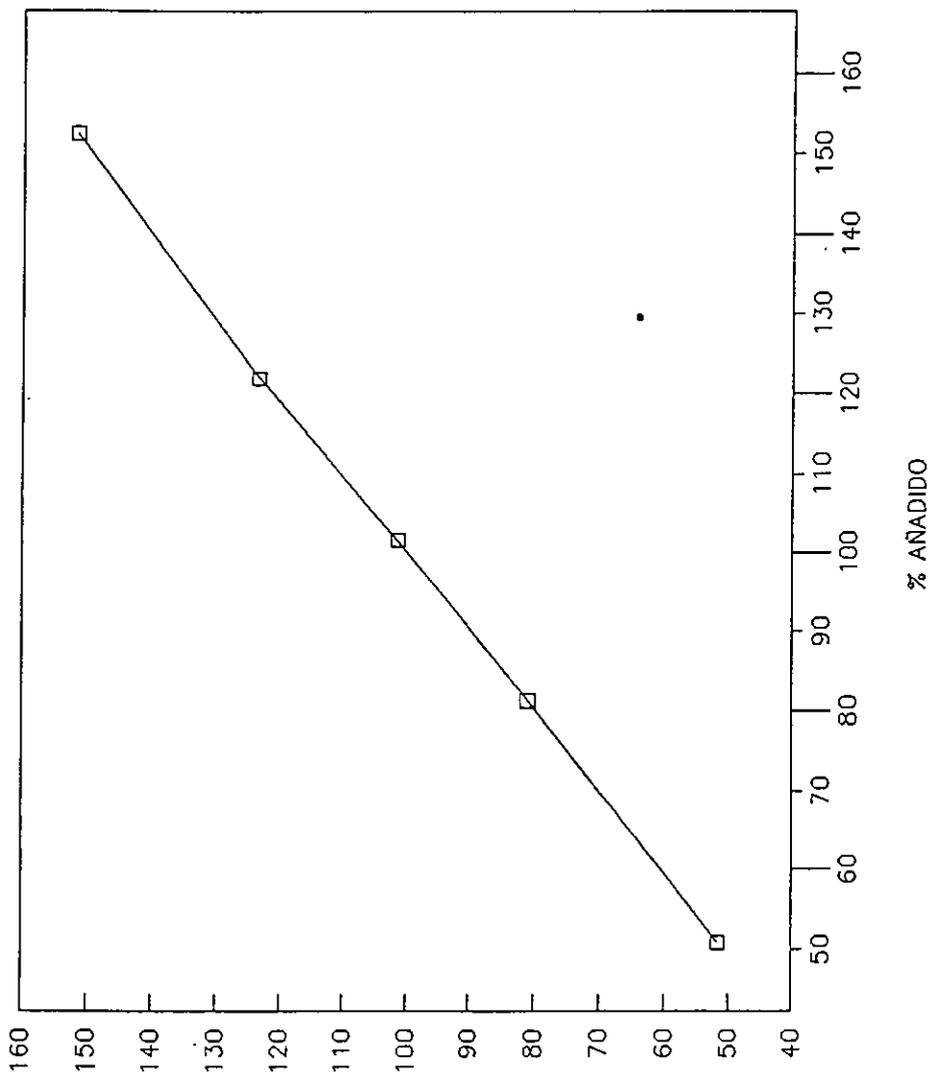
$$y = 1.000x + 0.047.$$

Cuadro de comparación entre resultados contra parámetros estadísticos.

	Resultado	Criterio
Hipótesis de nulidad para la pendiente.	$t_{0.05}=1.771$ $t_{\text{experimental}}=0.000$	$t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$
Hipótesis de nulidad para la ordenada.	$t_{0.05}=1.771$ $t_{\text{exp}}=0.000007$	$t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$
Coefficiente de determinación.	0.999	≥ 0.98
Coefficiente de regresión.	0.999	≥ 0.99
Promedio de recuperación.	100.3%	98 a 102%
Coefficiente de variación.	1.0%	$\leq 2.0\%$

La hipótesis de nulidad para la ordenada al origen y la pendiente se aceptan.

LINEARIDAD DEL MÉTODO PARA SUSPENSIÓN AMOXICILINA TRIHIDRATADA



% RECUPERADO

LINEARIDAD DEL MÉTODO PARA AMBROXOL
CLORHIDRATO EN CÁPSULAS.

NIVEL%	%AÑADIDO	%RECUPERADO	%RECOBRO	PROMEDIO%
50	49.9	50.0	100.3	100.3
	48.8	49.1	100.5	
	50.4	50.4	100.0	
80	78.4	77.3	98.6	99.3
	79.9	79.7	99.8	
	79.9	79.7	99.6	
100	103.9	104.2	100.4	99.7
	99.3	99.2	99.9	
	102.1	100.8	98.8	
120	119.1	119.1	100.0	100.1
	123.2	123.7	100.3	
	123.8	123.7	99.9	
150	149.4	149.8	100.2	100.0
	152.3	152.1	99.9	
	150.3	150.3	100.0	

La línea de regresión obtenida es la siguiente:

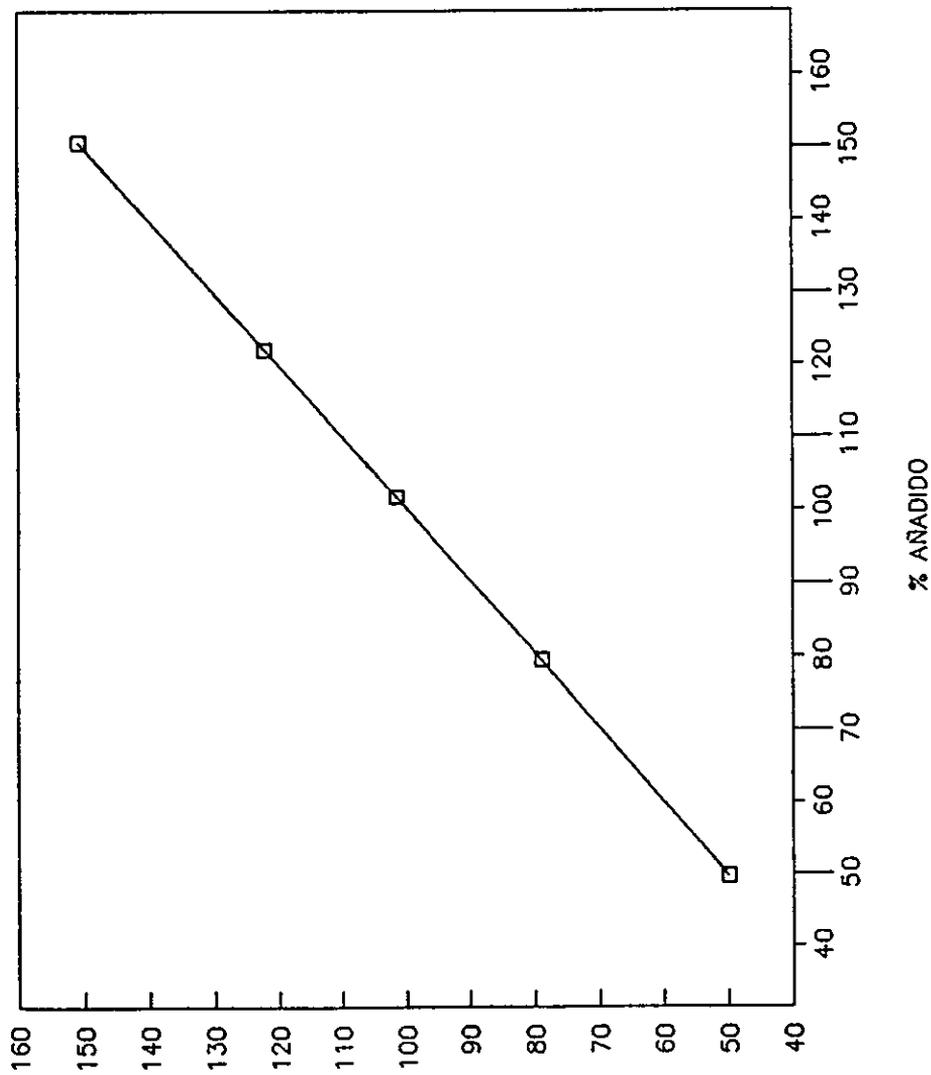
$$y = 0.999x - 0.013.$$

Cuadro de comparación entre resultados contra parámetros estadísticos.

	Resultado	Criterio
Hipótesis de nulidad para la pendiente.	$t_{0.05}=1.771$ $t_{\text{experimental}}=-0.003$	$t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$
Hipótesis de nulidad para la ordenada.	$t_{0.05}=1.771$ $t_{\text{exp}}=-0.000003$	$t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$
Coefficiente de determinación.	1.000	≥ 0.98
Coefficiente de regresión.	1.000	≥ 0.99
Promedio de recuperación.	99.9%	98 a 102%
Coefficiente de variación.	0.4%	$\leq 2.0\%$

La hipótesis de nulidad para la ordenada al origen y la pendiente se aceptan.

LINEARIDAD DEL MÉTODO PARA CÁPSULAS AMBROXOL CLORHIDRATO



**LINEARIDAD DEL MÉTODO PARA AMBROXOL
CLORHIDRATO EN SUSPENSIÓN.**

NIVEL%	%ANADIDO	%RECUPERADO	%RECOBRO	PROMEDIO%
50	49.7	50.2	101.0	101.1
	49.7	50.4	101.4	
	49.7	50.1	100.8	
80	79.5	79.3	99.7	100.0
	79.5	79.8	100.4	
	79.5	79.4	99.8	
100	99.4	100.9	101.5	100.6
	100.4	100.5	100.1	
	100.4	100.5	100.1	
120	119.2	120.5	101.0	100.4
	119.2	119.2	100.0	
	119.2	119.5	100.2	
150	149.1	151.9	101.9	101.0
	150.6	151.6	100.7	
	151.3	152.2	100.6	

La línea de regresión obtenida es la siguiente:

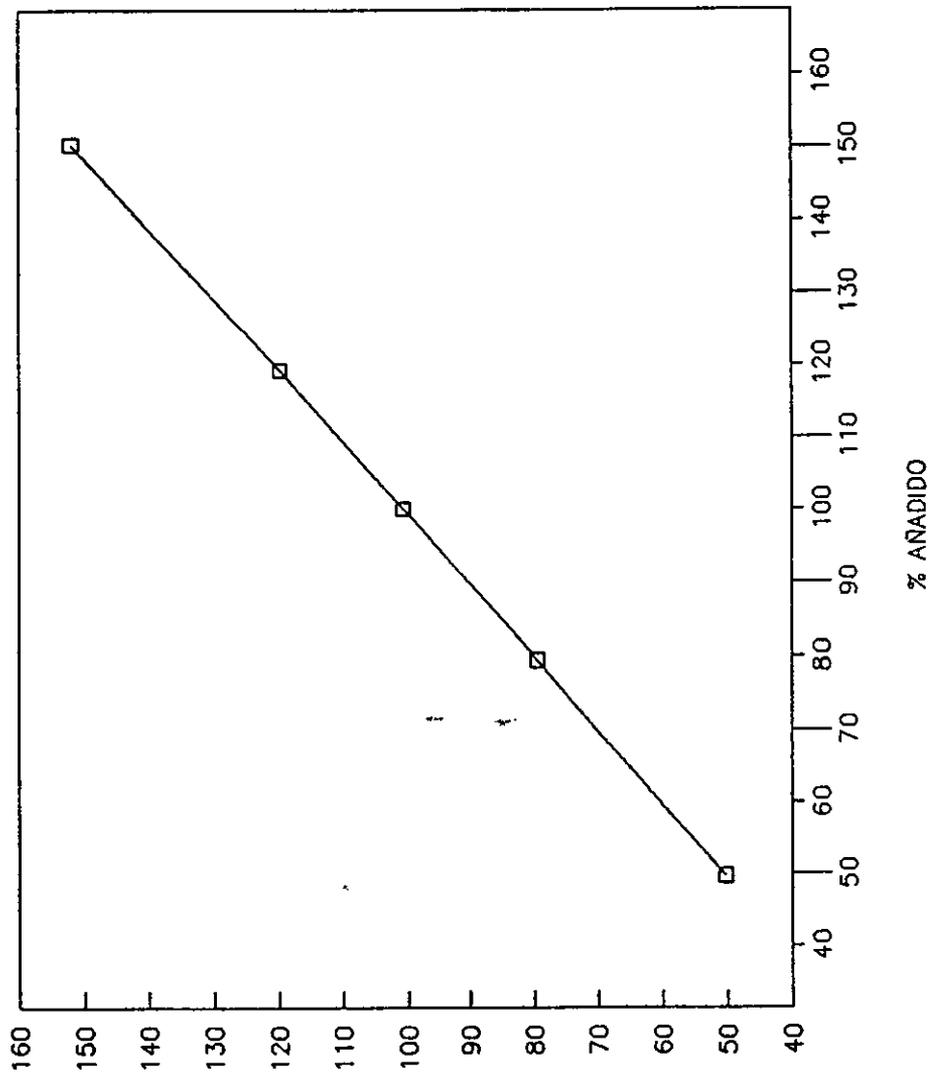
$$y = 1.007x - 0.023.$$

Cuadro de comparación entre resultados contra parámetros estadísticos.

	Resultado	Criterio
Hipótesis de nulidad para la pendiente.	$t_{0.05}=1.771$ $t_{\text{experimental}}=0.012$	$t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$
Hipótesis de nulidad para la ordenada.	$t_{0.05}=1.771$ $t_{\text{exp}}=-0.000003$	$t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$
Coefficiente de determinación.	1.000	≥ 0.98
Coefficiente de regresión.	1.000	≥ 0.99
Promedio de recuperación.	100.6%	98 a 102%
Coefficiente de variación.	0.5%	$\leq 2.0\%$

La hipótesis de nulidad para la ordenada al origen y la pendiente se aceptan.

LINEARIDAD DEL MÉTODO PARA SUSPENSIÓN AMBROXOL CLORHIDRATO



**EXACTITUD DEL MÉTODO PARA AMOXICILINA
TRIHIDRATADA EN CÁPSULAS.**

NIVEL%	%AÑADIDO	%RECUPERADO	%RECOBRO	PROMEDIO%
80	84.5	81.1	99.6	99.9
	81.5	81.1	99.6	
	80.5	81.1	100.7	
100	101.8	100.6	98.8	99.3
	101.5	100.7	99.1	
	102.2	102.0	99.8	
120	121.6	121.6	99.9	99.8
	121.4	121.3	99.9	
	122.1	121.7	99.7	

Intervalo de confianza:

Para $\alpha=0.05$ y $g.l=8$. El valor de $t=1.860$.

$$99.68 \pm 0.33$$

Dentro del intervalo de confianza se encuentra el 100% de recuperación.

	RESULTADO	CRITERIO
Media del %recuperado	99.7%	98 a 102%
Prueba de hipótesis para la media.	$t_{\text{experimental}} = -1.799$	$t_{0.025} < t_{\text{exp}} < t_{0.975}$
Coefficiente de variación	0.5 %	$\leq 2.0\%$

La $t_{0.025} = -2.262$ y $t_{0.975} = 2.262$ por lo tanto la hipótesis nula se acepta.

**EXACTITUD DEL MÉTODO PARA AMOXICILINA
TRIHIDRATADA EN SUSPENSIÓN.**

NIVEL%	%AÑADIDO	%RECUPERADO	%RECOBRO	PROMEDIO%
80	81.3	81.1	99.7	99.7
	81.3	80.8	99.4	
	81.3	81.1	99.8	
100	101.7	102.6	100.9	99.7
	101.5	100.7	99.1	
	101.6	100.8	99.2	
120	122.0	124.2	101.8	101.3
	121.8	122.5	100.5	
	121.9	123.6	101.4	

Intervalo de confianza:

Para $\alpha=0.05$ y $g.l=8$. El valor de $t=1.860$.

$$100.22 \pm 0.62$$

Dentro del intervalo de confianza se encuentra el 100% de recuperación.

	RESULTADO	CRITERIO
Media del %recuperado	100.2%	98 a 102%
Prueba de hipótesis para la media.	$t_{\text{experimental}}=0.665$	$t_{0.025} < t_{\text{exp}} < t_{0.975}$
Coefficiente de variación	1.0%	$\leq 2.0\%$

La $t_{0.025}=-2.262$ y $t_{0.975}=2.262$ por lo tanto la hipótesis nula se acepta.

**EXACTITUD DEL MÉTODO PARA AMBROXOL
CLORHIDRATO EN CÁPSULAS.**

NIVEL%	%AÑADIDO	%RECUPERADO	% RECOBRO	PROMEDIO%
80	78.4	77.3	98.6	99.3
	79.9	79.7	99.8	
	79.9	79.7	99.6	
100	103.9	104.3	100.4	99.7
	99.3	99.2	99.9	
	102.1	100.8	98.8	
120	119.1	119.1	100.1	100.1
	123.2	123.6	100.3	
	123.8	123.7	99.9	

Intervalo de confianza:

Para $\alpha=0.05$ y $g.l=8$. El valor de $t=1.860$.

$$99.71 \pm 0.39$$

Dentro del intervalo de confianza se encuentra el 100% de recuperación.

	RESULTADO	CRITERIO
Media del %recuperado	99.7%	98 a 102%
Prueba de hipótesis para la media.	$t_{\text{experimental}}=-1.394$	$t_{0.025} < t_{\text{exp}} < t_{0.975}$
Coefficiente de variación	0.6 %	$\leq 2.0\%$

La $t_{0.025}=-2.2622$ y $t_{0.975}=2.262$ por lo tanto la hipótesis nula se acepta.

EXACTITUD DEL MÉTODO PARA AMBROXOL
CLORHIDRATO EN SUSPENSIÓN.

NIVEL%	%AÑADIDO	%RECUPERADO	% RECOBRO	PROMEDIO%
80	79.5	79.3	99.7	100.0
	79.5	79.8	100.4	
	79.5	79.4	99.8	
100	99.4	100.9	101.5	100.6
	100.4	100.5	100.1	
	100.4	100.5	100.1	
120	119.2	120.5	101.0	100.4
	119.2	119.2	100.0	
	119.2	119.5	100.2	

Intervalo de confianza:

Para $\alpha=0.05$ y $g.l=8$. El valor de $t=1.860$.

$$100.32 \pm 0.36$$

Dentro del intervalo de confianza se encuentra el 100% de recuperación.

	RESULTADO	CRITERIO
Media del %recuperado	100.3%	98 a 102%
Prueba de hipótesis para la media.	$t_{\text{experimental}}=1.648$	$t_{0.025} < t_{\text{exp}} < t_{0.975}$
Coefficiente de variación	0.6%	$\leq 2.0\%$

La $t_{0.025}=-2.262$ y $t_{0.975}=2.262$ por lo tanto la hipótesis nula se acepta.

REPETIBILIDAD AL 100% DEL MÉTODO PARA
AMOXICILINA TRIHIDRATADA EN CÁPSULAS.

No.DE MUESTRA	%AÑADIDO	%RECUPERADO	%RECOBRO
1	102.2	101.0	98.8
2	101.3	101.2	99.8
3	101.8	99.8	98.1
4	101.5	100.7	99.2
5	101.3	101.3	100.0
6	101.5	101.9	100.3

Intervalo de confianza: para $\alpha=0.05$ y $g.l=5$.
El valor de t es de 2.015.

$$99.36 \pm 0.70$$

Dentro del intervalo de confianza se encuentra el 100% de recuperación.

	RESULTADO	CRITERIO
Media del %recuperado	99.4%	98 a 102%
Prueba de hipótesis para la media.	$t_{\text{experimental}} = -1.843$	$t_{0.025} < t_{\text{exp}} < t_{0.975}$
Coefficiente de variación	0.9%	$\leq 2.0\%$

La $t_{0.025} = -2.571$ y $t_{0.975} = 2.571$ por lo tanto la hipótesis nula se acepta.

REPETIBILIDAD AL 100% DEL MÉTODO PARA
AMOXICILINA TRIHIDRATADA EN SUSPENSIÓN.

No. DE MUESTRA	%AÑADIDO	%RECUPERADO	%RECOBRO
1	101.7	102.1	100.3
2	101.5	102.0	100.4
3	101.7	99.7	98.1
4	101.6	99.7	98.1
5	101.7	101.9	100.1
6	101.5	100.6	99.1

Intervalo de confianza: para $\alpha=0.05$ y $g.l=5$.
El valor de t es de 2.015.

$$99.38 \pm 0.88$$

Dentro del intervalo de confianza se encuentra el 100% de recuperación.

	RESULTADO	CRITERIO
Media del %recuperado	99.4%	98 a 102%
Prueba de hipótesis para la media.	$t_{\text{experimental}} = -1.417$	$t_{0.025} < t_{\text{exp}} < t_{0.975}$
Coefficiente de variación	1.1%	$\leq 2.0\%$

La $t_{0.025} = -2.571$ y $t_{0.975} = 2.571$ por lo tanto la hipótesis nula se acepta.

REPETIBILIDAD AL 100% DEL MÉTODO PARA
AMBROXOL CLORHIDRATO EN CÁPSULAS.

No. DE MUESTRA	%AÑADIDO	%RECUPERADO	%RECOBRO
1	101.2	100.4	99.3
2	101.8	100.5	98.7
3	99.8	101.7	101.9
4	100.1	100.1	100.0
5	99.4	101.3	101.9
6	99.7	101.7	101.9

Intervalo de confianza: para $\alpha=0.05$ y $g.l=5$.
El valor de t es de 2.015.

$$100.63 \pm 1.21$$

Dentro del intervalo de confianza se encuentra el 100% de recuperación.

	RESULTADO	CRITERIO
Media del %recuperado	100.6%	98 a 102%
Prueba de hipótesis para la media.	$t_{\text{experimental}}=1.049$	$t_{0.025} < t_{\text{exp}} < t_{0.975}$
Coficiente de variación	1.5%	$\leq 2.0\%$

La $t_{0.025}=-2.571$ y $t_{0.975}=2.571$ por lo tanto la hipótesis nula se acepta.

REPETIBILIDAD AL 100% DEL MÉTODO PARA
AMBROXOL CLORHIDRATO EN SUSPENSIÓN.

No. DE MUESTRA	%AÑADIDO	%RECUPERADO	%RECOBRO
1	99.4	100.4	101.1
2	99.4	100.4	101.1
3	100.7	100.3	99.6
4	99.4	101.0	101.6
5	100.4	100.5	100.1
6	100.4	100.7	100.3

Intervalo de confianza: para $\alpha=0.05$ y $g.l=5$.
El valor de t es de 2.015.

$$100.63 \pm 0.61$$

Dentro del intervalo de confianza se encuentra el
100% de recuperación.

	RESULTADO	CRITERIO
Media del %recuperado	100.6 %	98 a 102%
Prueba de hipótesis para la media.	$t_{\text{experimental}}=2.015$	$t_{0.025} < t_{\text{exp}} < t_{0.975}$
Coefficiente de variación	0.7 %	$\leq 2.0\%$

La $t_{0.025}=-2.571$ y $t_{0.975}=2.571$ por lo tanto la hipótesis nula se acepta.

REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA VALORACIÓN DE AMOXICILINA TRIHIDRATADA EN CÁPSULAS.

ANALISTA	1	2
%RECUPERADO	100.7	100.3
	99.9	101.2
	99.5	101.5
	100.4	100.2
	101.0	99.7
	101.6	99.6
No. DE MUESTRAS	6	6

Cuadro de comparación de resultados contra parámetros estadísticos.

	RESULTADO	CRITERIO
Coefficiente de variación	0.5%	2.0%
Prueba para la hipótesis nula.	0.007	$F_o < F_{tab}$

La F_{tab} es de 4.960. Por lo tanto la hipótesis nula se acepta.

REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA VALORACIÓN DE AMOXICILINA TRIHIDRATADA EN SUSPENSIÓN.

ANALISTA	1	2
%RECUPERADO	100.3	100.3
	100.4	101.6
	98.1	101.9
	98.1	100.5
	100.1	98.2
	99.1	99.2
No. DE MUESTRAS	6	6

Cuadro de comparación de resultados contra parámetros estadísticos.

	RESULTADO	CRITERIO
Coefficiente de variación	1.7 %	2.0%
Prueba para la hipótesis nula.	0.278	$F_o < F_{tab}$

La F_{tab} es de 4.960. Por lo tanto la hipótesis nula se acepta.

REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA VALORACIÓN DE AMBROXOL CLORHIDRATO EN CÁPSULAS.

ANALISTA	1	2
%RECUPERADO	99.1	98.8
	99.1	98.3
	100.9	101.0
	102.0	98.0
	99.5	98.7
	100.5	98.7
No. DE MUESTRAS	6	6

Cuadro de comparación de resultados contra parámetros estadísticos.

	RESULTADO	CRITERIO
Coefficiente de variación	1.6%	2.0%
Prueba para la hipótesis nula.	0.647	$F_o < F_{tab}$

La F_{tab} es de 4.960. Por lo tanto la hipótesis nula se acepta.

REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA VALORACIÓN DE AMBROXOL CLORHIDRATO EN SUSPENSIÓN.

ANALISTA	1	2
%RECUPERADO	99.7	101.2
	101.2	100.9
	100.1	101.5
	99.1	101.5
	101.1	101.8
	100.5	101.5
No. DE MUESTRAS	6	6

Cuadro de comparación de resultados contra parámetros estadísticos.

	RESULTADO	CRITERIO
Coefficiente de variación	0.7%	2.0%
Prueba para la hipótesis nula.	1.762	$F_o < F_{tab}$

La F_{tab} es de 4.960. Por lo tanto la hipótesis nula se acepta.

6.0 ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO PARA VALORACIÓN AMOXICILINA TRIHIDRATADA EN CÁPSULAS.

RESULTADOS:

- 1.- El cromatograma No.1 corresponde a la inyección de la fase móvil que se utilizó como blanco.
No se observa ningún pico en 5 minutos de desarrollo del cromatograma.
- 2.- El cromatograma No.2 corresponde a la inyección de la solución de amoxicilina trihidratada, sustancia de referencia preparada, como se indica en el método analítico.
Se observa un pico con tiempo de retención (Tr) de 3.95 minutos correspondiente a amoxicilina trihidratada.
Factor de simetría: 1.0
- 3.- El cromatograma No.3 corresponde al placebo de cápsulas. No se obtuvo ningún pico que interfiriera en la determinación de amoxicilina trihidratada.
- 4.- El cromatograma No.4 corresponde a la muestra analítica de cápsulas. El pico con Tr= 3.95 minutos es el correspondiente a amoxicilina trihidratada.

ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO PARA VALORACIÓN AMOXICILINA TRIHIDRATADA EN SUSPENSIÓN.

- 1.- Los cromatogramas de la solución de amoxicilina trihidratada, sustancia de referencia y del blanco corresponden al No.1 y No.2 respectivamente.
- 2.- El cromatograma No.5 corresponde al placebo de suspensión. No se obtuvo ningún pico que interfiriera en la determinación de la amoxicilina trihidratada.
- 3.- El cromatograma No.6 corresponde a la muestra analítica para suspensión. Se observa un pico con $T_r = 3.95$ minutos correspondiente a amoxicilina trihidratada.

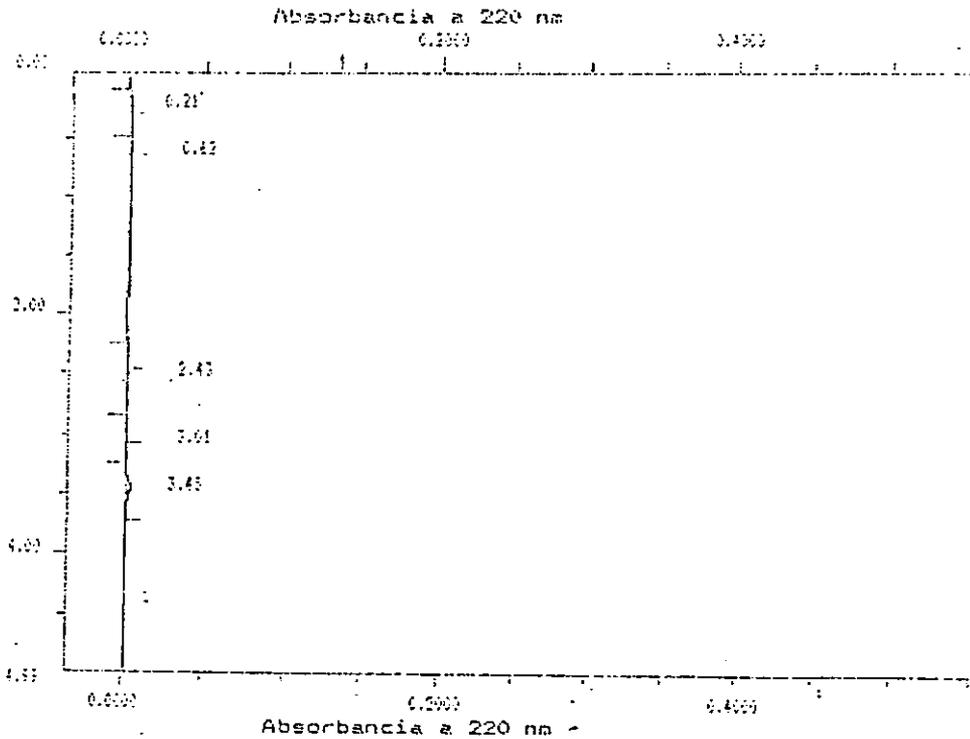
ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO
PARA AMOXICILINA TRIHIDRATADA

CROMATOGRAMA No. 1

USP:

Type	Sample Name	Sample Amount	Int Std Amount	Scale Factor	Nr. Inj	Vial Nr.	Inject Vol. μ l
Una	EDC			1.00000	1 / 1	1	10 (Hras File)

Peak Number	Retention Time	Component Name	Peak Area	Peak Height	Area Percent	Base Code	Ret. Time
1	0.21						
2	0.42						
3	2.43						
4	3.61						
5	3.43						



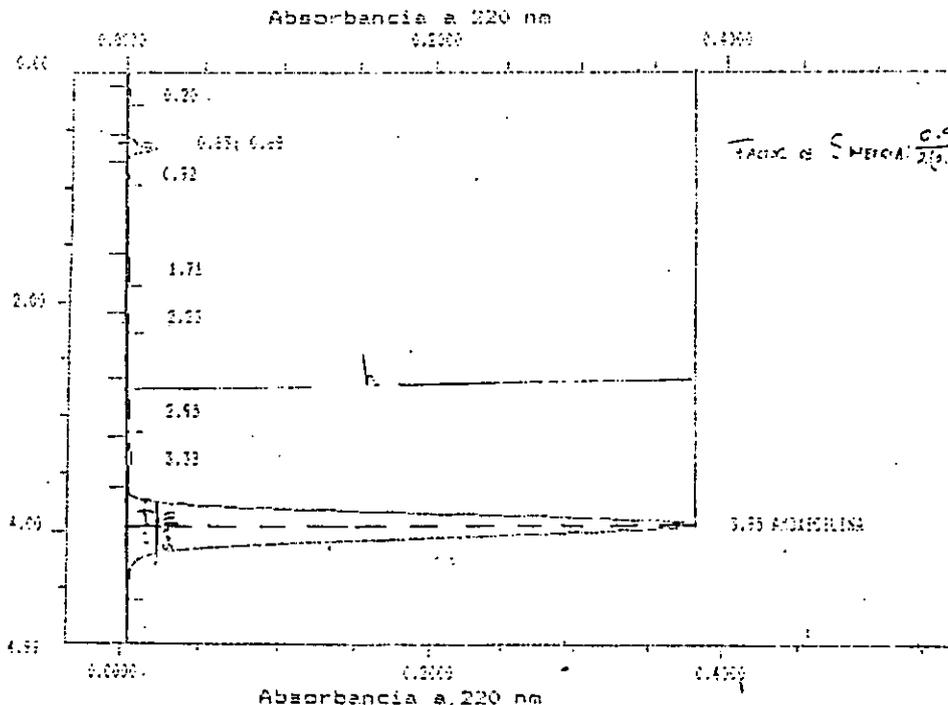
ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO
PARA AMOXICILINA TRIHIDRATADA

CROMATOGRAMA No. 2

COND:

Type	Sample Name	Sample Amount	Int STD Amount	Scale Factor	Nr. Inj	Vial Nr.	Inject Vol ul
Std	STD3		1.00000	1 / 1	10	10	(Hras Fila)

Peak Number	Retention Time	Component Name	Peak Area	Peak Height	Area Percent	Base Code	Ret. Time
1	0.920	AMOXICILINA	97.80590	0.77947	97.072	N10	0.600
TOTAL			97.80590	0.77947	97.072		



ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO

PARA AMOXICILINA TRIHIDRATADA CÁPSULAS

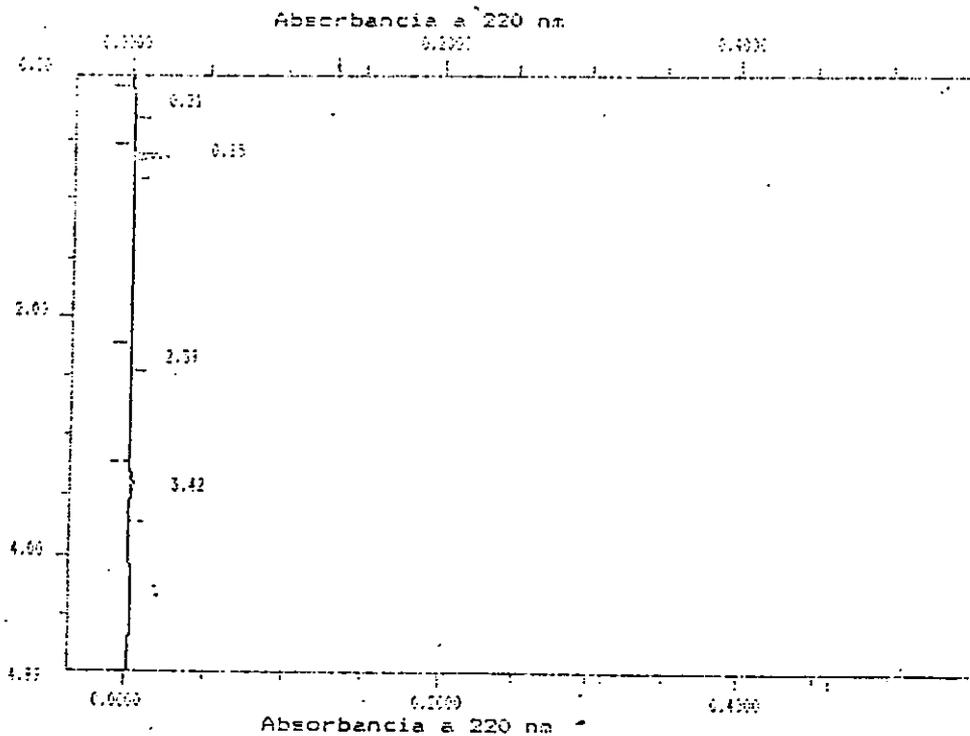
CROMATOGRAMA No. 3

.....
 LOTE:

Type	Sample Name	Sample Amount	Ref. Std. Amount	Scale Factor	No. Inj	Vial No.	Inject Vol. μ l
Unk	PLACAP2			1.00000	1 / 1	6	10 (from File)

Peak Number	Retention Time	Substition Name	Component Name	Peak Area	Peak Weight	Area Percent	Area Conc	Rel. Ret	Ret. Time
1	0.21								
2	0.35								
3	2.31								
4	3.42								

.....



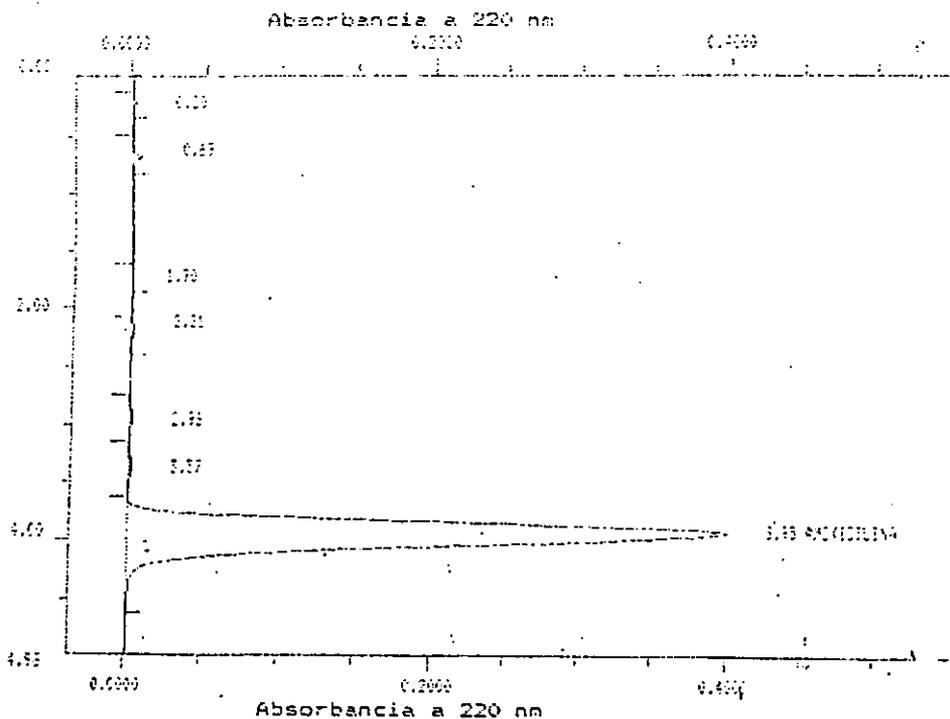
ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO PARA
 AMOXICILINA TRIHIDRATADA CÁPSULAS

CROMATOGRAMA No. 4

NOTAS:

Envase	Envase	Envase	Envase	Envase	Envase	Envase	Envase
Marca	Marca	Marca	Marca	Marca	Marca	Marca	Marca
100	0070		1.00000	1 / 1	10	10	(Free File)

Peak Number	Retention Time	Component Name	Peak Area	Peak Height	Area Percent	Mass Code	Ref. Pat. Type
1	0.981	AMOXICILINA	91.9980	0.80012	99.250	NIS	0.000
TOTALS			91.9980	0.80012	99.250		



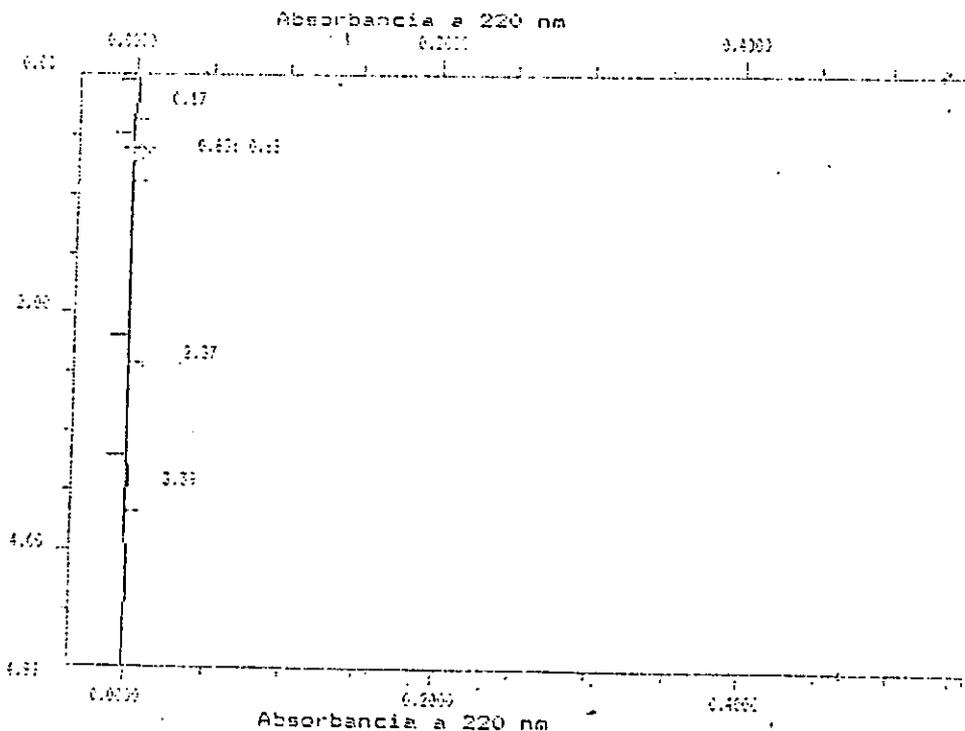
ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO PARA
 AMOXICILINA TRIHIDRATADA SUSPENSIÓN

CROMATOGRAMA No.5

018000947 001 01000
 LOTE:

Test	Sample Name	Sample Amount	Int Std Amount	Scale Factor	No. Inj	Vol. Inj	Inject Vol ul
001	0.45000			1.00000	1 / 1	10	10 (from file)

Peak Number	Retention Time	Component Name	Peak Area	Peak Height	Area Percent	Base Code	Ret. Time
1	0.17						
2	0.40	Amox					
3	2.37						
4	3.39						



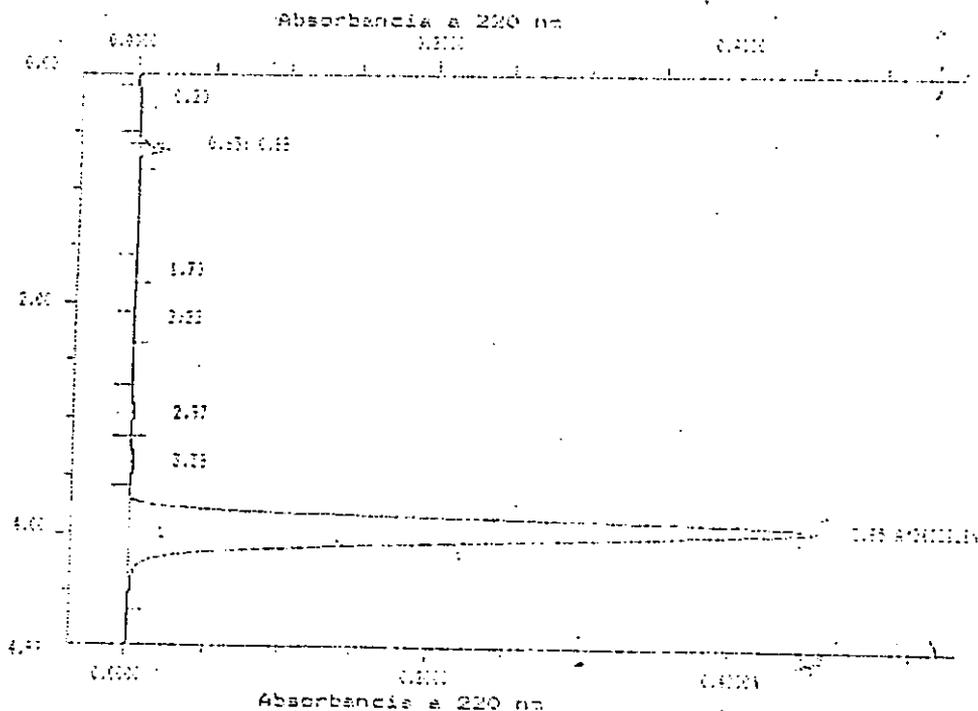
ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO PARA
AMOXICILINA TRIHIDRATADA SUSPENSIÓN

CROMATOGRAMA No. 6

Pr:100.29% Kw:10.00%
L07E:

Type	Sample Name	Sample Amount	Int Std Amount	Scale Factor	Nr. Inj	Vial Nr.	Inject Vol. ul
Una	21891			1.0000	1 / 1	14	10 (1000 File)

Peak Number	Retention Time	Component Name	Peak Area	Peak Height	Area Percent	Mass Conc	Rel. Ret
1	0.574	AMOXICILINA	105.97992	0.45740	97.45%	N/A	0.000
TOTAL			105.97992	0.45740	97.45%		



ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO PARA VALORACIÓN AMBROXOL CLORHIDRATO EN CÁPSULAS.

RESULTADOS:

- 1.- El cromatograma No.7 corresponde a la inyección del blanco (metanol).
No se observa ningún pico en 5 minutos del desarrollo del cromatograma.

- 2.- El cromatograma No.8 corresponde a la solución de clorhidrato de ambroxol, sustancia de referencia preparada como lo indica el método analítico. Se observa un pico con un tiempo de retención (Tr) de 3.00 minutos que corresponde a una posible degradación del clorhidrato de ambroxol; la cantidad en la que puede presentarse no es significativa en la cuantificación.

El pico con Tr= 3.63 minutos corresponde al clorhidrato de ambroxol, entre los dos picos existe una resolución de: 0.965.

- 3.- El cromatograma No.9 corresponde al placebo de cápsulas.
No se obtuvo ningún pico que interfiriera en la determinación del clorhidrato de ambroxol.

- 4.- El cromatograma No.10 corresponde a la muestra analítica de cápsulas.

El pico con $Tr = 3.61$ es el clorhidrato de ambroxol.

Resolución: 0.965.

Factor de simetría: 1.26

**ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO PARA VALORACIÓN AMBROXOL CLORHIDRATO EN
SUSPENSIÓN.**

- 1.- El cromatograma No.7 y el No.8 corresponden al blanco y a la solución de referencia de ambroxol clorhidrato, respectivamente.
- 2.- El cromatograma No.11 corresponde al placebo de suspensión. No se obtuvo ningún pico que interfiriera en la determinación de clorhidrato de ambroxol.
- 3.- El cromatograma No.12 corresponde a la muestra analítica de suspensión.

El pico con $Tr = 3.66$ es el clorhidrato de ambroxol.

Resolución: 0.965

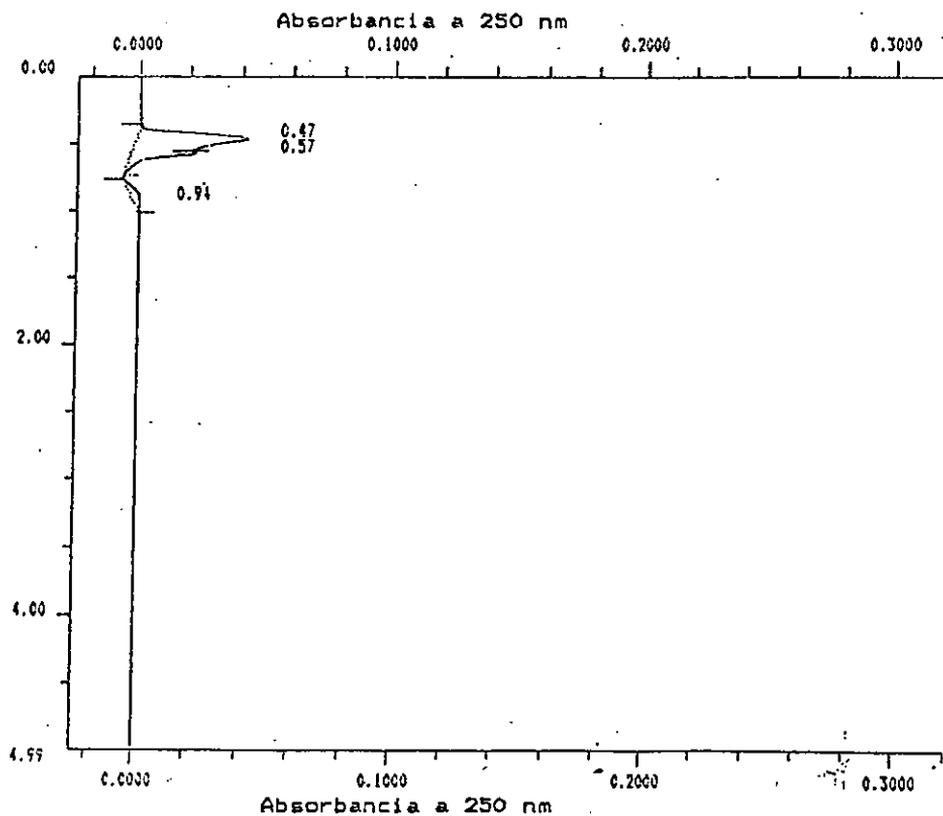
Factor de simetría: 1.26.

ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO PARA

AMBROXOL CLORHIDRATO.

CROMATOGRAMA No.7

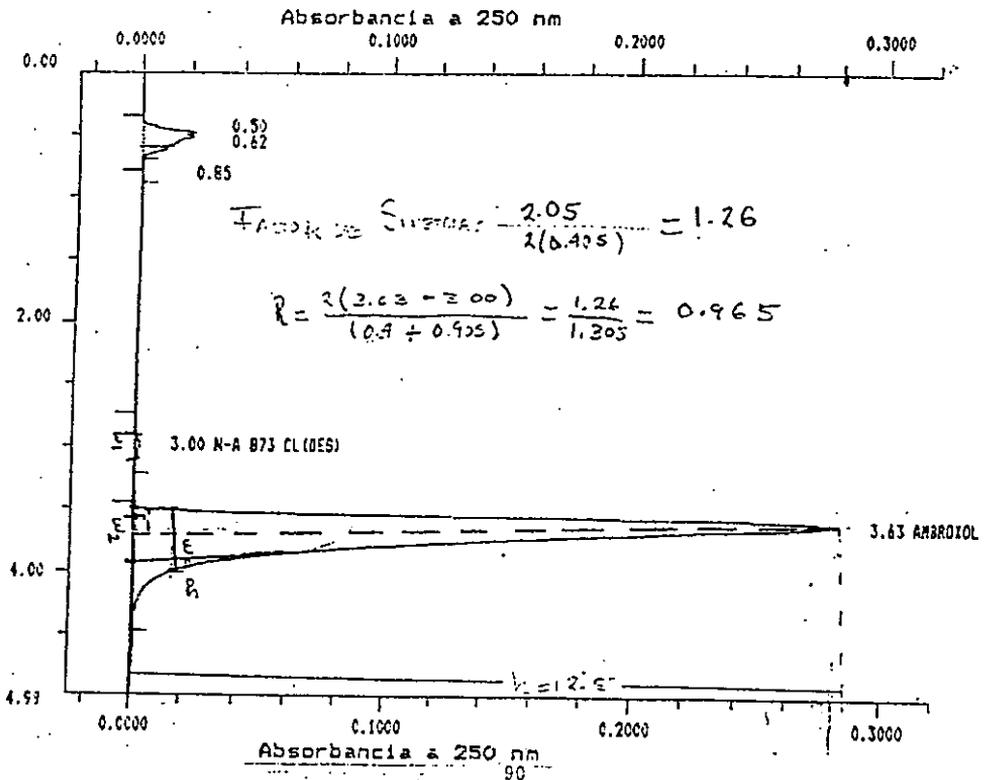
Type	Sample Name	Sample Amount	Int Std Amount	Scale Factor	Nr. Inj	Vial Nr.	Inject Vol ul
Unk	ECOLL			1.00000	1 / 1	1	20 (free File)
Peak Number	Retention Time	Component	Peak Area	Peak Height	Base Code	Response Factor	



ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO PARA
AMBROXOL CLORHIDRATO

CROMATOGRAMA No.8

Type	Name	Amount	Amount	Factor	Inj	Nr.	Vol ul
Unk	STDES			1.00000	1 / 1	12	20 (from file)
Peak Number	Retention Time	Component	Peak Area	Peak Height	Base Code	Response Factor	
1	3.004	N-A 873 CL (DES)	0.27296	0.00168	RCB	0.0000	
2	3.629	AMBROXOL	63.83321	0.28300	RCB	0.0000	
TOTALS			64.11118	0.28458			

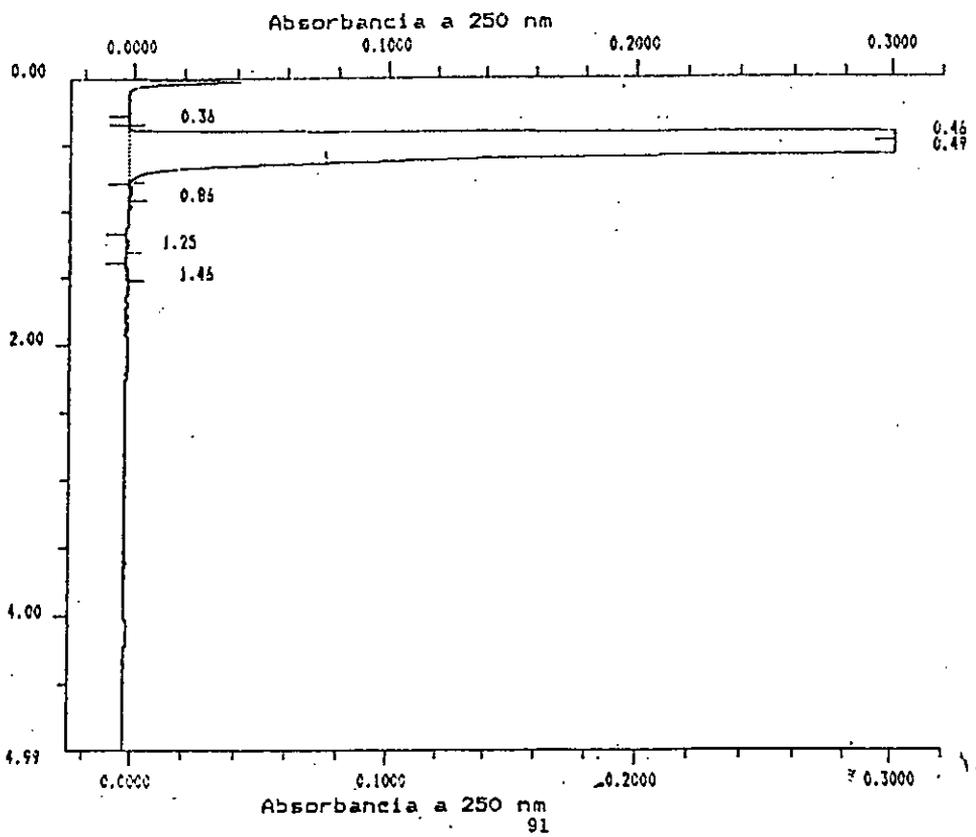


ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO PARA

AMBROXOL CLORHIDRATO, CÁPSULAS

CROMATOGRAMA No.9

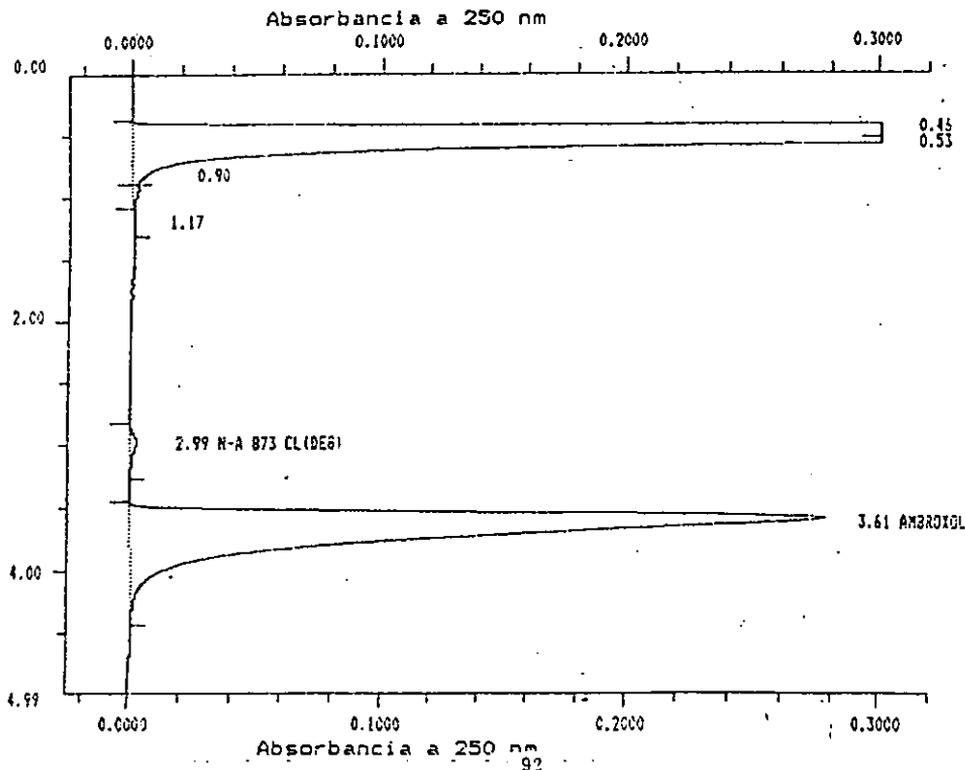
Type	Name	Amount	Amount	Factor	Inj	Nr.	Vol ul	
Unt	PBOC-1		1.00000	1 / 1	6	20		(from File)
Peak Number	Retention Time	Component	Peak Area	Peak Height	Base Code	Response Factor		
.....	
.....	



ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO PARA
AMBROXOL CLORHIDRATO CÁPSULAS

CROMATOGRAMA No.10

Type	Sample Name	Sample Amount	Inc. conc Amount	Scale Factor	No. Inj	Vol. Nr.	Inj. Vol. uL
Unit	CAPIES			1.00000	1 / 1	10	20 (from file)
Peak Number	Retention Time	Component	Peak Area	Peak Height	Base Code	Response Factor	
1	2.929	N-A B73 CL(DES)	0.43193	0.60253	BCB	0.0000	
2	3.609	AMBROXOL	61.86029	0.27335	BCB	0.0000	
TOTALS			62.29222	0.28089			



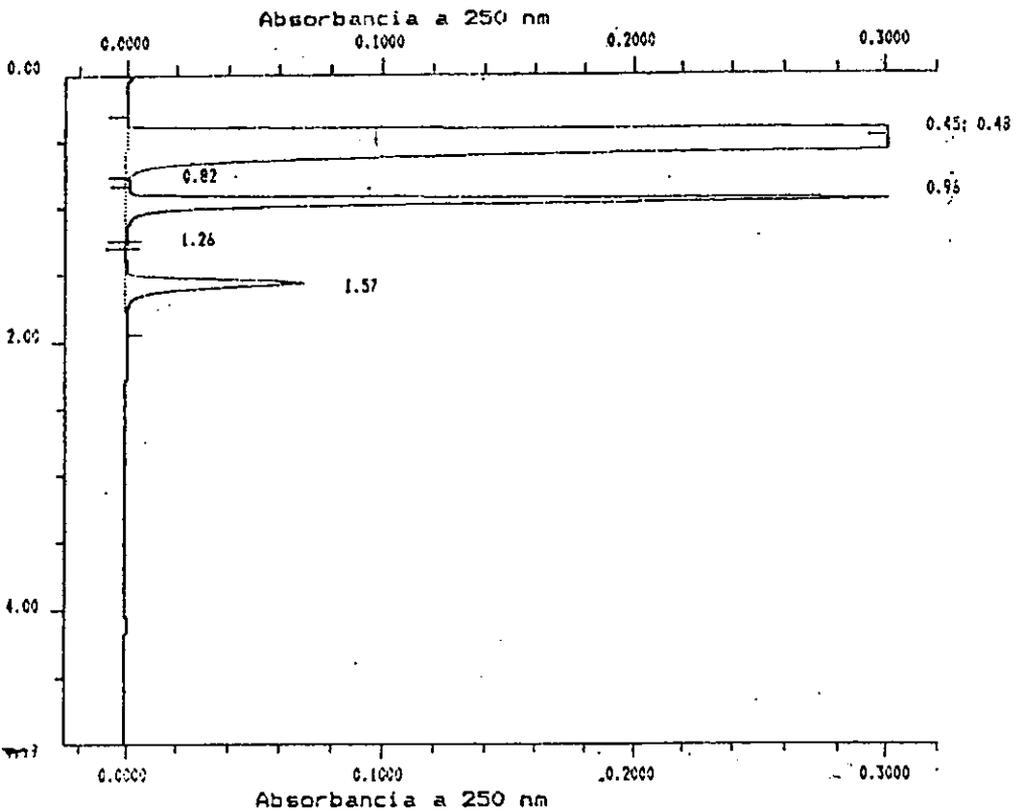
ESPECIFICIDAD DEL METODO PARA

AMBROXOL CLORHIDRATO SUSPENSIÓN

CROMATOGRAMA No. 11

Type	Name	Amount	Amount	Factor	Inj	Nr.	Vol ul	Subject
Unk	PBOS-1			1.00000	1 / 1	8	20	(from File)

Peak Number	Retention Time	Component	Peak Area	Peak Height	Base Code	Response Factor

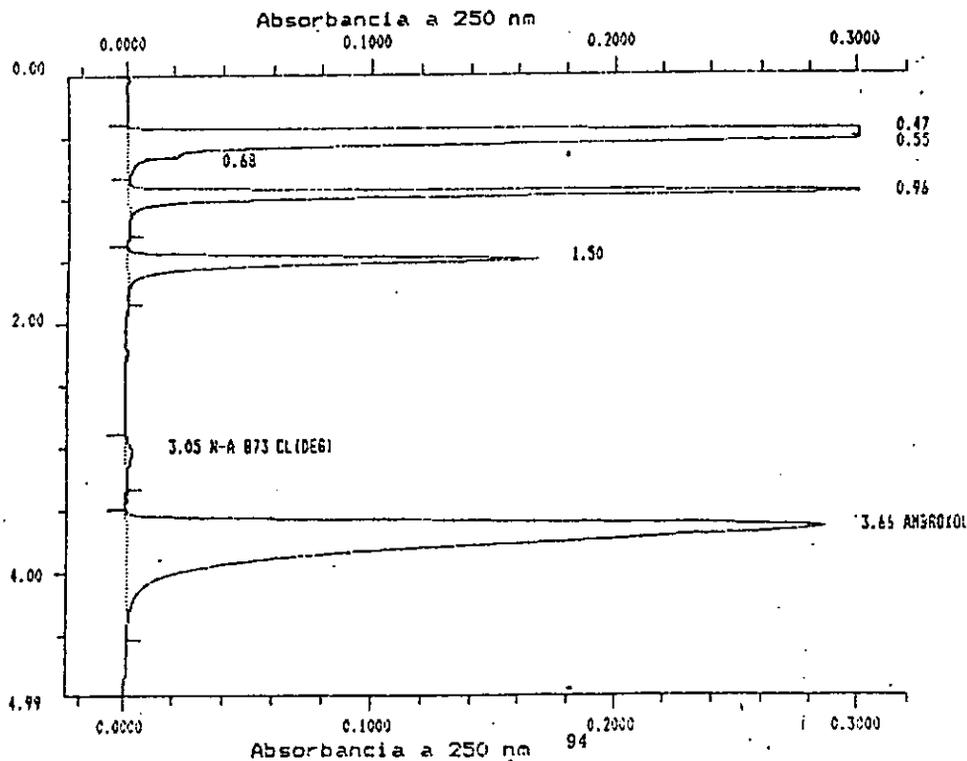


ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO PARA

AMBROXOL CLORHIDRATO SUSPENSIÓN

CROMATOGRAMA No.12

Type	Sample Name	Sample Amount	Int Std Amount	Scale Factor	Nr. Inj	Vial Nr.	Inject Vol ul	
Unt	SUEST-1			1.00000	1 / 1	13	20	(from file)
Peak Number	Retention Time	Component	Peak Area	Peak Height	Base Code	Response Factor		
1	3.045	N-A B73 CL (DEG)	0.39670	0.00232	BCB	0.0000		
2	3.661	AMBROXOL	63.68739	0.28722	BCB	0.0000		
TOTALS			64.08410	0.28954				



ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA PARA EL
MÉTODO DE VALORACIÓN DE AMOXICILINA
TRIHIDRATADA EN CÁPSULAS.

DIA	1 _o	2 _o
	M _o	M ₁
%RECUPERADO	100.9	101.4
	101.9	100.3
	101.6	100.7
No. DE MUESTRAS	3	3

Cuadro de comparación de los resultados contra los
parámetros estadísticos.

	RESULTADO	CRITERIO
Intervalo de confianza.	0.687±1.061 de -0.374 a 1.748	El intervalo de confianza debe incluir el valor de cero.
Media del factor I.	99.3 %	de 98 a 102 %

La muestra es estable en refrigeración ($6 \pm 1^{\circ}\text{C}$)
por 4 días ya que el intervalo de confianza incluye
el valor cero.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA PARA EL
MÉTODO DE VALORACIÓN DE AMOXICILINA
TRIHIDRATADA EN SUSPENSIÓN.

DIA	1 _o	2 _o
	M _o	M ₁
%RECUPERADO	100.3	101.4
	100.4	99.1
	98.2	99.9
No. DE MUESTRAS	3	3

Cuadro de comparación de los resultados contra los parámetros estadísticos.

	RESULTADO	CRITERIO
Intervalo de confianza.	-0.497 ± 2.309 de -2.806 a 1.812	El intervalo de confianza debe incluir el valor de cero.
Media del factor I.	100.5 %	de 98 a 102 %

La muestra es estable en refrigeración (6 ± 1°C) por 4 días ya que el intervalo de confianza incluye el valor cero.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA PARA EL MÉTODO DE VALORACIÓN DE AMBROXOL CLORHIDRATO EN CÁPSULAS.

DIA	1 ₀	2 ₀
	M ₀	M ₁
%RECUPERADO	100.9	100.7
	102.0	101.4
	99.5	99.1
No. DE MUESTRAS	3	3

Cuadro de comparación de los resultados contra los parámetros estadísticos.

	RESULTADO	CRITERIO
Intervalo de confianza.	0.430 ± 2.317 de -1.887 a 2.747	El intervalo de confianza debe incluir el valor de cero.
Media del factor I.	99.6%	de 98 a 102 %

La muestra es estable en refrigeración (6 ± 1°C) por 4 días ya que el intervalo de confianza incluye el valor cero.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA PARA EL MÉTODO DE VALORACIÓN DE AMBROXOL CLORHIDRATO EN SUSPENSIÓN.

DIA	1 _o	2 _o
	M _o	M ₁
%RECUPERADO	99.7	101.3
	101.2	99.7
	100.1	101.5
No. DE MUESTRAS	3	3

Cuadro de comparación de los resultados contra los parámetros estadísticos.

	RESULTADO	CRITERIO
Intervalo de confianza.	-0.520 ± 1.659 de -2.179 a 1.139	El intervalo de confianza debe incluir el valor de cero.
Media del factor I.	100.5 %	de 98 a 102 %

La muestra es estable en refrigeración ($6 \pm 1^\circ\text{C}$) por 4 días ya que el intervalo de confianza incluye el valor cero.

CONCLUSIONES

1. El sistema para la valoración de amoxicilina trihidratada es lineal y preciso.

1.1 Validación del método analítico de amoxicilina trihidratada cápsulas.

◆ El método es lineal dentro de un intervalo de 50% a 150%, considerando el 100% a la concentración final de la solución, de acuerdo a lo descrito en el método analítico.

La ecuación obtenida para este método analítico:

$$y = 0.992(x) + 0.035.$$

La hipótesis nula establecida para la ordenada y la pendiente se aceptaron de acuerdo a los resultados obtenidos estadísticamente.

El coeficiente de determinación fue igual a 0.999 y el coeficiente de regresión fue de 0.999.

El promedio de recuperación fue 99.4%, que está dentro del intervalo permitido.

El coeficiente de variación fue de 0.5% por lo tanto menor de 2.0%.

◆ El método es exacto con un % de recobro de 99.7% y un coeficiente de variación de 0.5%. Se acepto la hipótesis nula para la media.

◆ El método es preciso, ya que es reproducible y repetible. Es repetible ya que el coeficiente de variación fue de 0.9% por lo tanto menor de 2.0% y el % de recobro fue de 99.4 %, está dentro del intervalo de aceptación de 98 - 102 %.

Es reproducible ya que el coeficiente de variación fue de 0.5% por lo tanto menor de 2.0%, por lo que la hipótesis nula se acepta.

- ◆ El método es específico, ya que detecta la amoxicilina trihidratada y no los excipientes de la formulación de las cápsulas. Adicionalmente se obtiene un factor de simetría de 1.0 que es ideal para obtener una buena cuantificación.
- ◆ La muestra analítica es estable por cuatro días en refrigeración ($6 \pm 1^\circ\text{C}$), el valor de la media \bar{I} es de 99.3% la cual se encuentra dentro del intervalo de 98-102%; el intervalo de confianza incluye el valor de cero.
- ◆ El método analítico de amoxicilina trihidratada cápsulas es adecuado para ser utilizado como método de rutina en el producto analizado utilizando los reactivos, equipos y condiciones descritos.

1.2 Validación del método analítico de amoxicilina trihidratada suspensión.

- ◆ El método es lineal dentro de un intervalo de 50 % a 150 %, se considera el 100% a la concentración final de la solución de acuerdo a lo descrito en el método analítico. La ecuación obtenida para este método analítico:

$$y = 1.000(x) + 0.047$$

La hipótesis nula establecida para la ordenada y la pendiente se aceptaron de acuerdo a los resultados obtenidos estadísticamente.

El coeficiente de determinación fue de 0.999 y el coeficiente de regresión fue de 0.999.

El promedio de recuperación fue 100.3%, que está dentro del intervalo permitido.

El coeficiente de variación fue de 1.0%, por lo tanto menor de 2.0%.

◆ El método es exacto con un % de recobro de 100.2% y un coeficiente de variación de 1.0%, por lo tanto menor de 2.0%, por lo que la hipótesis nula se acepta para la media.

◆ El método es preciso ya que es reproducible y repetible. Es repetible ya que el coeficiente de variación fue de 1.1%, que es menor de 2.0% y el % de recobro de 99.4% está dentro del intervalo de aceptación de 98-102%, por lo que la hipótesis nula para la media se acepta.

Es reproducible porque el coeficiente de variación fue de 1.7%, por lo tanto menor de 2.0%, por lo que se acepta la hipótesis nula.

◆ El método es específico, ya que separa la amoxicilina trihidratada de los excipientes de la formulación de la suspensión. Además se obtiene un factor de simetría de 1.0 que es ideal para obtener una buena cuantificación.

- ◆ La muestra analítica es estable por cuatro días en refrigeración ($6 \pm 1^\circ\text{C}$), el valor de la media \bar{I} es de 100.5%, la cual se encuentra dentro del intervalo de 98-102%; el intervalo de confianza incluye el valor de cero.
- ◆ El método analítico de amoxicilina trihidratada suspensión es adecuado para ser utilizado como método de rutina en el producto analizado utilizando los reactivos, equipos y condiciones mencionados en este trabajo.

2. El sistema para ambroxol clorhidrato es lineal y preciso.

2.1 Validación del método analítico de ambroxol clorhidrato cápsulas.

- ◆ El método es lineal dentro de un intervalo de 50% a 150% , se considera el 100% a la concentración final de la solución de acuerdo a lo descrito en el método analítico.

La ecuación obtenida para este método analítico:

$$y = 0.999(x) - 0.013$$

La hipótesis nula establecida para la ordenada y la pendiente se aceptaron de acuerdo a los resultados obtenidos estadísticamente.

El coeficiente de determinación fue de 1.000 y el coeficiente de regresión fue de 1.000.

El promedio de recuperación fue 99.9%, el cual está dentro del intervalo permitido.

El coeficiente de variación fue de 0.4%, por lo tanto menor de 2.0%.

- ◆ El método es exacto con un % de recobro de 99.7% y un coeficiente de variación de 0.5%, por lo tanto menor de 2.0%, por lo que se acepta la hipótesis nula para la media.
- ◆ El método es preciso ya que es reproducible y repetible.
Es repetible porque su coeficiente de variación fue de 1.5%, por lo tanto menor de 2.0% y el % de recobro fue de 100.6%, el cual se encuentra dentro del intervalo de aceptación de 98 a 102%, por lo que la hipótesis nula para la media se acepta.

Es reproducible por que el coeficiente de variación es de 1.6%, por lo tanto menor de 2.0%, por lo que la hipótesis nula se acepta.
- ◆ El método es específico ya que separa el ambroxol clorhidrato de los excipientes de la formulación de cápsulas. Con el factor de simetría y la resolución obtenida que se obtiene puede lograrse una buena cuantificación.
- ◆ La muestra analítica es estable por cuatro días en refrigeración ($6 \pm 1^\circ\text{C}$), el valor de la media I es de 99.6%, la cual se encuentra dentro del intervalo de 98-102% y el intervalo de confianza incluye el valor de cero.
- ◆ El método analítico de ambroxol clorhidrato cápsulas es adecuado para ser utilizado como método de rutina en el producto analizado utilizando los reactivos, equipos y condiciones mencionados en este trabajo.

2.2 Validación del método analítico de ambroxol clorhidrato suspensión.

- ◆ El método es lineal dentro de un intervalo de 50% a 150%, se considera el 100% a la concentración final de la solución de acuerdo a lo descrito en el método analítico.

La ecuación obtenida para este método analítico:

$$y = 1.007(x) - 0.023$$

La hipótesis nula establecida para la ordenada y la pendiente se aceptaron de acuerdo a los resultados obtenidos estadísticamente.

El coeficiente de determinación fue de 1.000 y el coeficiente de regresión fue de 1.000.

El promedio de recuperación fue 100.6%, que está dentro del intervalo permitido.

El coeficiente de variación fue de 0.5%, por lo tanto menor de 2.0%.

- ◆ El método es exacto con un % de recobro de 100.3% y un coeficiente de variación de 0.6%, por lo tanto menor de 2.0%, por lo que la hipótesis nula para la media se acepta.

- ◆ El método es preciso ya que es reproducible y repetible.

Es repetible ya que el coeficiente de variación fue de 0.7%, por lo tanto menor de 2.0% y el %de recobro 100.6%, está dentro del

intervalo de aceptación de 98 a 102%. La hipótesis nula para la media se acepta.

Es reproducible por que el coeficiente de variación fue de 0.7%, por lo tanto menor de 2.0%, y la hipótesis nula se acepto.

- ◆ El método es específico ya que separa el ambroxol clorhidrato de los excipientes de la formulación de suspensión. Con el factor de simetría y la resolución obtenidos puede lograrse una buena cuantificación.
- ◆ La muestra analítica es estable por cuatro días en refrigeración ($6 \pm 1^\circ\text{C}$), el valor de la media I es de 100.5% la cual esta dentro del intervalo de 98-102%; el intervalo de confianza incluye el valor de cero.
- ◆ El método analítico de amoxicilina trihidratada suspensión es adecuado para ser utilizado como método de rutina en el producto analizado utilizando los reactivos, equipos y condiciones mencionados en este trabajo.

ANEXO 1

SOLUBILIDAD(23)

Siempre que se mencione la solubilidad debe entenderse que se determina a una temperatura de 25°C y esta propiedad se expresa con los siguientes términos:

TERMINOS	Cantidades aproximadas de disolventes en volumen por una parte de sustancia en masa.
Muy soluble	Menos de una parte
Fácilmente soluble	De 1 a 10 partes
Soluble	De 11 a 30 partes
Poco soluble	De 31 a 100 partes
Ligeramente soluble	De 101 a 1000 partes
Muy ligeramente soluble	De 1001 a 10000 partes
Casi insoluble	Más de 10000 partes

ANEXO 2

PRUEBA DE EFICIENCIA DE LA COLUMNA

Columna: LiChrosorb RP-18 (5 micras).

Catálogo: 50433 Columna: 317653.

Lote: 845633.

Longitud de la columna: 125 mm.

Diámetro interno: 4.0 mm.

Condiciones para la prueba de eficiencia de la columna:

Eluente: Acetonitrilo/agua 75:25.

Flujo: 1.0 ml/min.

Detección: 254 nm UV.

Volumen de la muestra: 10 microlitros.

Resultados esperados:

Composición por 100 ml:	Benceno 137.5 mg	Naftaleno 16.2 mg
Tiempo de retención (seg)	125.3	170.9
Resolución	1.3	2.2
Factor de simetría	1.4	1.3
HETP (micras)	20.2	17.9
No. de platos teóricos por cm.	49437.8	55783.9

Cálculos: ver las ecuaciones en el capítulo II.

Resultado de la prueba: Para la columna utilizada en la validación
de amoxicilina trihidratada:

Composición por 100 ml:	Benceno 177.8 mg	Naftaleno 15.9 mg
Tiempo de retención (seg)	120	166.8
Resolución	1.35	2.08
Factor de simetría	1.6	1.27
HETP (micras)	28.7	32.37
No. de platos teóricos por cm.	48778.3	51356.2

Resultado de la prueba: Para la columna utilizada en la validación
de ambroxol clorhidrato:

Composición por 100 ml:	Benceno 141.5 mg	Naftaleno 16.3 mg
Tiempo de retención (seg)	124.8	166.8
Resolución	1.31	2.08
Factor de simetría	1.3	1.1
HETP (micras)	22.12	22.01
No. de platos teóricos por cm.	56508.1	56780.0

NUMERO DE INYECCIONES RECOMENDADAS PARA CADA COLUMNA	
Método de análisis:	No. de inyecciones:
Amoxicilina trihidratada	600
Ambroxol clorhidrato	450

Las columnas que se utilizaron durante las validaciones cumplen con los criterios establecidos.

Los resultados nos indican que se pueden obtener cromatogramas simétricos y confiables para realizar una cuantificación.

La altura equivalente del plato teórico (HEPT) tiene un valor entre 0.01 y 0.1 mm, valor necesario para HPLC. Entre menor sea HEPT la columna será mejor.

La eficiencia está determinada por el No. de platos teóricos. Entre mayor sea el número es mayor la eficiencia de la columna. Con columna eficiente se obtienen los picos definidos y estrechos.

BIBLIOGRAFIA

1. Stevenson Robert, L.J Edward. "Basic liquid chromatography". Ed Varian.USA.1985,pág:1-41.
2. Alcantara Alejandro P. "Validación de métodos analíticos". PharmaNews. pag:19-20. Octubre 1990. Vol No.4.
- 3.- USP. National Formulary 1995. USP 23 NF18. United States Pharmacopeial Convection Inc, pág:100, 1982 y 1983.
4. Larry Paul W. "USP Perspectives on analytical methods Validation" Pharmaceutical Technology, pág:130-141. March 1991. Vol.15 No.3.
5. Guerra J, Martin J. "Validation of analytical methods by FDA laboratories" Pharmaceutical Technology. pág:74-84. March 1986.
6. Jiménez Enrique V. "Un acercamiento a la validación de métodos analíticos". PharmaNews, pág:16-17. Nov.1990. Vol 1. No.5.
7. Howard A.S, William R. "Chemical instrumentation a systematic approach". Third editio. Ed. Willey. 1989. Cap 26.
8. Bello Gerónimo. "La cromatografía líquida de alta resolución" PharmaNews, pág:28-32. Diciembre 1990. Vol.1.No.6.
9. The Index Merk. Eleventh edition. Centennial edition 1989.pág:392,610
10. C.H Boehringer Sohn Ingelheim Rhein. "Prescripción de análisis de amoxicilina trihidratada". 1976.
11. C.H Boehringer Sohn Ingelheim Rhein. "Prescripción de análisis de ambroxol clorhidrato". 1993.
12. Goodman y Gilman. "Las bases farmacológicas de la terapéutica" Octava edición. Ed. Panamericana.1993. pág: 1035-1049.
13. Florey Klaus. "Analytical profiles of drug substances". Ed. Academic Press. New York.San Franscisco 1978. Vol.7, pág:21-42.
14. Sutherland R, and Rolinsa. "Sterilization of Ommaya reservoir by instillation of vancomycin". American Journal Med. 1981, 71,1068.

15. Bodey G.P, and Nance J. "Antimicrobial agents and chemotherapy". 1972, pág 358.
16. Boehringer Ingelheim. "Resumen del grupo de trabajo HPLC. cromatografía líquida de alta resolución". 1985.
17. Catori Pedro. "Cuidados, síntomas y remedios para las columnas cromatográficas de alta resolución". PharmaNews. Dic 1990, Vol. 1, No. 6, pág:26-32.
18. Beckman. "Manual del equipo de HPLC. sistema Gold". 1989.
19. CIPAM. "Manual de validación de métodos analíticos".
20. Boehringer Ingelheim. "Manual de validación de métodos analíticos para el control de medicamentos". 1994.
21. Miller J.C. "Estadística para química analítica". Ed. Addison Wesley Iberoamérica. USA. Segunda edición. 1993.
22. Montgomery C.Douglas. "Diseño y análisis de experimentos". Ed. Grupo editorial Iberoamérica. México 1993.
23. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Sexta edición. México 1994, pág:23.
24. Dipalma M.D Joseph. "Drill's Pharmacology in medicine" Ed.MacGraw Hill. Fourth edition 1981. Philadelphia Pennsylvania. pag 1023-1025.
25. Diccionario de especialidades farmacéuticas. DEF, edición 41, 1995, pág:1544.
26. Jimenez Enrique V. "Parámetros estadísticos y procedimientos de validación. criterios de aceptación". Pharma News, Dic. 1990, Vol.1, pág:15-20.
27. Boehringer Ingelheim. "Prescripción de análisis de cápsulas con ambroxol clorhidrato y amoxicilina trihidratada".
28. Boehringer Ingelheim. "Prescripción de análisis de suspensión con ambroxol clorhidrato y amoxicilina trihidratada".