

34
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

COMPARACION DE DOS METODOS ANALITICOS PARA CUANTIFICAR AMOXICILINA EN SUSPENSION

T E S I S

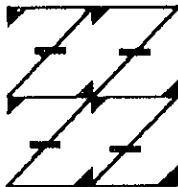
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A

MIGUEL ANGEL ROSALES CRESPO

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXIÓN

ASESOR: M. en C. CATALINA MACHUCA RODRIGUEZ

MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2674 02



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Biol Ernesto Mendoza Vallejo.

Vocal: M EN C Catalina Machuca Rodríguez.

Secretario M en C Armando Cervantes Sandoval

1er Suplente: Q.F.B Idalia Leticia Flores Gómez

2º Suplente. Q.F.B Patricia Parra Cervantes

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio de Medicamentos y Productos
Biologicos, SmithKline Beecham Farmacéutica.

Asesor del Tema: M. en C. Catalina Machuca Rodríguez

Sustentante Miguel Angel Rosales Ciespo

I N D I C E

INTRODUCCION.....	1
I. ANTECEDENTES TEORICOS.....	2
A. Definición y Clasificación de los Antibióticos....	2
B. Monografía de la Amoxicilina.....	4
C. Suspensiones.....	9
D. Cromatografía.....	11
E. Yodometría.....	17
F. Validación de Métodos Analíticos.....	23
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
III. OBJETIVOS.....	29
IV. HIPOTESIS DE TRABAJO.....	30
V. PARTE EXPERIMENTAL.....	31
A. Material,Equipo y Reactivos.....	31
B. Metodología General.....	33
VI. RESULTADOS.....	36
VII. ANALISIS DE RESULTADOS.....	63

VIII.	CONCLUSIONES.....	69
IX.	ANEXOS.....	71
X.	REFERENCIAS.....	74
XI.	GLOSARIO.....	77

INTRODUCCION

En algunos laboratorios se elaboran productos antibióticos β -lactámicos derivados de la penicilina a los cuales se realiza el ensayo químico por diferentes métodos.

Entre estos encontramos a la amoxicilina el cual es un antibiótico de amplio espectro con actividad contra microorganismos como H. influenzae, E. coli, etc.

Se compararon dos métodos alternativos para cuantificar amoxicilina en suspensión (Cromatografía de líquidos de alta presión y Yodométrico), demostrándose que ambos son lineales, exactos, precisos, específicos y reproducibles por lo que se concluye que se puede determinar indistintamente amoxicilina en suspensión por cualquiera de los dos métodos.

También, ambos métodos fueron comparados de acuerdo a costos y tiempo de operación; observándose que el método de cromatografía es más costoso que el yodométrico; no así en el tiempo de análisis que es menor en el de cromatografía lo cual nos representa un beneficio analítico, y a su vez en las áreas de producción.

Se decidió entonces emplear el método cromatográfico como parámetro de control de calidad, por los beneficios que éste representa.

I. ANTECEDENTES TEORICOS

A. Definición y Clasificación de los Antibióticos

Etimológicamente, antibiótico significa destruir vida, y de acuerdo a esto cualquier agente ya sea físico, químico o mecánico podría ser un antibiótico; sin embargo el concepto de que las sustancias producidas por un microorganismo puede matar a otras es muy antiguo, así por ejemplo los Chinos sabían hace poco más de 2500 años de las propiedades de la cáscara enmohecida de la soya, la cual aplicaban en infecciones como antibiótico, (1).

Los antibióticos son clasificados tomando en cuenta su estructura química y su mecanismo de acción en: (2,3,4).

* Los que inhiben o activan enzimas que rompen las paredes celulares bacterianas, causando pérdida de la viabilidad y a menudo lisis celular; por ejemplo penicilinas y cefalosporinas.

* Los que actúan directamente sobre la membrana celular; afectando la permeabilidad de la membrana y provocando filtración de compuestos intracelulares; entre éstos se encuentran las polimixinas y agentes antifúngicos de nistatina que se unen a los esteroides de la pared bacteriana.

* Los que afectan la función de los ribosomas bacterianos provocando inhibición irreversible de la síntesis de proteínas; por ejemplo cloranfenicol, tetraciclinas, eritromicina, lincomicina.

* Los que se unen a la unidad ribosomal 30S y provocan acumulación de complejos iniciales de la síntesis de proteínas y lectura errónea de ácidos ribonucleicos mensajero (ARNm) y producción de polipéptidos anormales, éstos pertenecen al grupo de los aminoglucósidos, que son bactericidas.

* Los que afectan el metabolismo del ácido nucleico, por ejemplo la rifampicina, que inhibe la ARN-polimerasa dependiente del ácido desoxiribonucleico (ADN).

* Los antimetabolitos que incluyen el trimetopim y las sulfonamidas que bloquean pasos metabólicos específicos esenciales para el microorganismo.

En el presente trabajo son considerados solo antibióticos que destruyen la pared celular bacteriana mediante reacciones enzimáticas (antibióticos β -lactámicos).

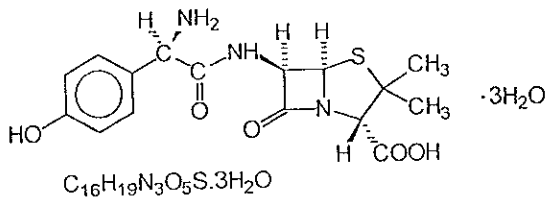
B. Monografía de la Amoxicilina

1. Descripción

Sinónimos. Acido 6- [D- (-)-alfa-amino-p-hidroxifenil-acetamido] penicilínico; p-hidroxiampicilina; amoxicilina; alfa-amino-p-hidroxibencilpenicilina; ácido 6-(p-hidroxi-alfa-aminofenilacetamida) penicilínico.

Trihidrato: A-Gram, Amodex, Amoxibiotic, Amoxidal, Amoxil, Moxipen, Clamoxil, Moxal, Moxaline, Pamocil, Penamox, Robamox, Ultimox, Wymox.

A. Fórmula y peso molecular



419.46 g/mol

Figura 1. Estructura Química de la Amoxicilina (5).

La amoxicilina trihidrato es un polvo cristalino blanco o casi blanco, una de las pruebas requeridas para su certificación es la observación de sus cristales birrefringentes típicos de todas las penicilinas, con olor característico.

La absorción al ultravioleta determinada sobre una solución al 0.1 % en etanol presenta máximos a 230 nm 10854, a 274 nm 1400, en HCl 0.1 N a 229 nm 9500, a 272 nm 1080, en KOH 0.1 N a 248 nm 2200, a 291 nm 3000, (6).

Espectro de infrarojo (IR) Ver figura 2.

B. Rotación óptica

$$[\alpha]_D^{20} = + 246^{\circ} \quad (5).$$

C. Estabilidad de la Amoxicilina

La degradación de la amoxicilina es típica de la hidrólisis de todas las penicilinas. En condiciones alcalinas se descompone inicialmente abriendo su anillo β -lactámico, formándose ácido penicilóico, en éste se basa la absorción de yodo y la reacción de hidroxilamida; el ácido penicilóico finalmente pierde CO_2 y forma ácido penilóico, (6,7).

Todas la penicilinas semisintéticas son elaboradas a partir del ácido 6-aminopenicilínico, el cual no ha sido encontrado como un producto de degradación.

La amoxicilina trihidrato es un polvo cristalino blanco o casi blanco, una de las pruebas requeridas para su certificación es la observación de sus cristales birrefringentes típicos de todas las penicilinas, con olor característico.

La absorción al ultravioleta determinada sobre una solución al 0.1 % en etanol presenta máximos a 230 nm 10854, a 274 nm 1400, en HCl 0.1 N a 229 nm 9500, a 272 nm 1080, en KOH 0.1 N a 248 nm 2200, a 291 nm 3000, (6).

Espectro de infrarojo (IR) Ver figura 2.

B. Rotación óptica

$$[\alpha]_D^{20} = + 246^{\circ} \quad (5).$$

C. Estabilidad de la Amoxicilina

La degradación de la amoxicilina es típica de la hidrólisis de todas las penicilinas. En condiciones alcalinas se descompone inicialmente abriendo su anillo β -lactámico, formandose ácido penicilóico, en ésto se basa la absorción de yodo y la reacción de hidroxilamida; el ácido penicilóico finalmente pierde CO_2 y forma ácido penilóico, (6,7).

Todas la penicilinas semisintéticas son elaboradas a partir del ácido 6-aminopenicilínico, el cual no ha sido encontrado como un producto de degradación.

La amoxicilina en forma de dosificación oral, es una emulsión insoluble a 250 mg/5ml y tiene la capacidad de retener en un 90% su actividad por 2 semanas a temperatura ambiente y en un 100 % a 4 grados centígrados por 72 horas, (6).

D. Solubilidad

Solvente	mg/ml
. Acetato de etilo	insoluble
. Acetona	1.3
. Etanol (absoluto)	3.4
. Agua	4.0
. Metanol	7.5

Métodos de análisis

Las pruebas requeridas para la certificación de amoxicilina incluyen: potencia (950-1050 mcg/mg) en base anhidra; humedad (11.5-14 % por Karl Fisher); pH (3.5-6.0); cumplir con pruebas de seguridad; ser cristalina; dar una identificación en IR. El ensayo puede efectuarse yodométricamente así como por cromatografía de líquidos de alta presión, (8).

Evidencia farmacológica

La amoxicilina fue sintetizada y protegida por una patente

La amoxicilina en forma de dosificación oral, es una emulsión insoluble a 250 mg/5ml y tiene la capacidad de retener en un 90% su actividad por 2 semanas a temperatura ambiente y en un 100 % a 4 grados centigrados por 72 horas, (6).

D. Solubilidad

Solvente	mg/ml
. Acetato de etilo	insoluble
. Acetona	1.3
. Etanol (absoluto)	3.4
. Agua	4.0
. Metanol	7.5

Métodos de análisis

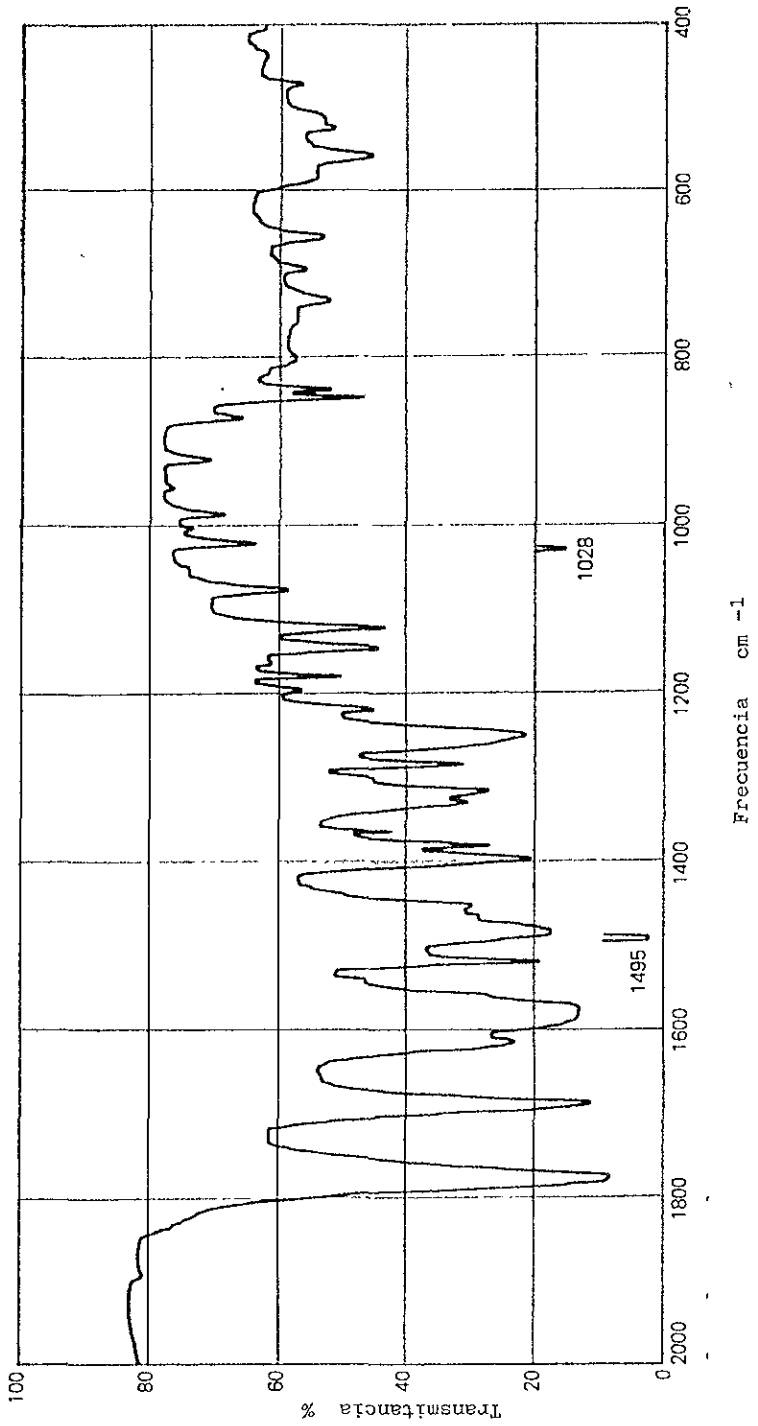
Las pruebas requeridas para la certificación de amoxicilina incluyen: potencia (950-1050 mcg/mg) en base anhidra; humedad (11.5-14 % por Karl Fisher); pH (3.5-6.0); cumplir con pruebas de seguridad; ser cristalina; dar una identificación en IR. El ensayo puede efectuarse yodométricamente así como por cromatografía de líquidos de alta presión, (8).

Evidencia farmacológica

La amoxicilina fue sintetizada y protegida por una patente

varios años después que la ampicilina, la cual es una de las penicilinasas más comunes.

New y Winsel demostraron que la amoxicilina y la ampicilina poseen un espectro antibacteriano similar, de igual forma, reportaron que la amoxicilina fue absorbida mejor y produce mejores niveles de suero que la ampicilina. Sutherland et. al. amplió este panorama cuando comparó ambas penicilinas encontrando una mayor actividad contra Staphylococcus aureus, estreptococos β -hemolíticos, Hemophilus influenzae, E. coli, (8,9).



∞ Figura 2. Espectro de Infrarojo de Amoxicilina Trihidrato.

C. Suspensiones

Una suspensión farmacéutica se define como una dispersión heterogénea que contiene material insoluble finamente dividido, suspendido en un medio líquido.

Se administran por vía oral, intramuscular o subcutánea, se aplican en tópicos y se usan oftálmicamente. Como algunos productos se preparan ocasionalmente en forma seca para colocarlos en suspensión al dispersarlos mediante la adición de un vehículo apropiado, esta definición se extiende para incluir dichos productos, (10).

Una suspensión formulada adecuadamente debe cumplir con ciertos criterios. Las partículas dispersas deben tener un tamaño tal que no permita sedimentación rápida en el recipiente, pero si hay sedimentación, el sedimento no debe ser una pasta dura sino debe ser capaz de redispersarse con un esfuerzo mínimo por el paciente. Además el producto debe ser de fácil fluidez, sabor agradable y resistente al ataque microbiano.

Parámetros a controlar durante el proceso de fabricación de una suspensión:

- . Tamaño de partícula
- . Adición correcta de las materias primas
- . Velocidad y tiempo de mezclado

Controles de calidad necesarios para una suspensión, (11).

- . Organolépticas
- . Valoración del principio activo
- . Redispersabilidad
- . Humedad (Karl Fisher) en caso de polvo p/reconstituir
- . Velocidad de sedimentación
- . Volúmen de sedimentación
- . Ensayo microbiológico (en caso de antibióticos)
- . Densidad
- . pH

D. Cromatografía

La palabra cromatografía de las palabras griegas Kromatos (color) y graphos (escrito) fue asociada en un principio con sustancias coloridas, (12).

En el año de 1850, Runge descubrió la formación de zonas coloridas al añadirse sustancias colorantes sobre papel secante, sin embargo el desarrollo más importante se realizó en el año de 1906 con los experimentos de Michel Tswet; quién utilizó una columna larga de vidrio, rellena de sulfato de calcio finamente dividido y observó que cuando la mezcla de pigmentos verdes de las plantas se ponen en lo alto de una columna y a continuación se agrega éter de petróleo, aparecen una serie de bandas horizontales de distintos colores, los cuales corresponden a cada uno de los pigmentos de la mezcla, lo cual indicaba que se lleva a cabo una separación a lo largo de la columna, (13).

En el año de 1930 la cromatografía de adsorción fue utilizada como un método preparativo; posteriormente en 1941 Martin y Synge introducen la cromatografía de reparto entre líquidos, más que la adsorción de un líquido en un sólido. Para 1959 Porath y Flodin introducen la cromatografía de filtración en gel la cual es una poderosa herramienta para la separación de sustancias de alto peso molecular, (14).

A principio de 1969, por primera vez se aprecian las ventajas de la cromatografía de alta resolución en la que se efectúan análisis automatizados de aminoácidos; por esta década J.C. Moore

y Waters Associates introducen la cromatografía en gel, (15).

La cromatografía comprende una serie de métodos para separar mezclas moleculares que dependen de las diferentes afinidades de los solutos entre dos fases inmiscibles. Una de las fases es un lecho fijo de gran área superficial (fase estacionaria) mientras que otra puede ser líquida o gaseosa (fase móvil) esta se mueve a través de la superficie de la fase estacionaria o sobre ella, (14).

Los métodos cromatográficos se clasifican de acuerdo a la naturaleza de la fase estacionaria y la fase móvil. Así cuando la fase estacionaria es un líquido el proceso se llama cromatografía de partición; mientras que cuando es un sólido se llama de adsorción.

Se han desarrollado dos enfoques teóricos para describir el paso de solutos a través de un sistema cromatográfico; estos se basan en un sistema de reparto múltiple o en uno continuo de adsorción-desorción.

El primero es la teoría de los platos, basada en el trabajo de A.P. Martin y R.L. Synge, que considera el sistema cromatográfico como una serie discreta de platos teóricos siendo cada uno de ellos una unidad dentro del sistema en los que hay un equilibrio del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria. El movimiento del soluto se considera como una serie de transferencias paso a paso entre plato y plato.

La segunda es la velocidad en que se considera la dinámica de las partículas del soluto a medida que pasa a través de los

espacios ubicados en la fase estacionaria del sistema, al igual que la cinética de estas partículas a medida que son transferidas a la fase estacionaria y desde ella, (12).

Es posible aplicar las formas básicas de cromatografía (adsorción, partición, intercambio iónico y exclusión de tamaño) al análisis de productos farmacéuticos, empleando una serie de técnicas que difieren una de otra de acuerdo a la naturaleza de la fase móvil y estacionaria que utilicen, así como el equipo para realizar dicha cromatografía.

La elección de la técnica depende de varios factores, entre los que destacan la complejidad de la muestra que se pretende analizar, las propiedades fisicoquímicas de los componentes. La resolución requerida, el tiempo de análisis así como la facilidad de la técnica.

Existen varias técnicas cromatográficas: de papel, de capa fina, de gases, de filtración, sobre gel, de líquidos; para los fines del presente trabajo nos enfocaremos a la cromatografía de líquidos.

La cromatografía de líquidos es una de las técnicas más útiles con la que cuenta el analista, ya que por medio de ésta se hace posible realizar separaciones de mezclas basándose en diversas características como son: polaridad de los solutos, coeficiente de partición, peso molecular, naturaleza iónica o su capacidad para formar complejos de afinidad.

En la cromatografía de líquidos la separación tiene lugar en una columna empacada; la fase estacionaria puede ser sólido con

capacidad adsorptiva o un soporte inerte revestido de una capa líquida, mientras que la fase móvil es un líquido, (13,14).

El proceso de la cromatografía de líquidos se puede realizar mediante los procesos siguientes:

Cromatografía de Líquidos clásica

Esta consiste básicamente en una columna de vidrio de diámetro entre 2 y 10 cm, rellena de algún material como gel de sílice, alúmina, azúcar, etc., cuyas partículas son por lo general de un tamaño cercano a 200 micras. La muestra se disuelve en la fase móvil y se coloca en la parte superior de la columna con la ayuda de un cuentagotas o de una pipeta, posteriormente se agrega un disolvente con el cual se eluya la muestra a través de la columna, el flujo del solvente se alcanza por gravedad en la columna, y las fracciones de la muestra individuales se colectan manualmente. En este tipo de cromatografía se emplea por lo general una vez la columna y después se desecha, por lo que el relleno de la columna tiene que ser repetido para cada separación, representando un significativo gasto de material así como el empleo de varias horas de trabajo, además que la detección y la cuantificación se lleva a cabo por análisis manual de las fracciones; generalmente se usa una técnica auxiliar como: espectrofotometría, análisis químico, infrarojo o registro gravimétrico para evaluar el contenido de cada uno de los componentes así como su posible identificación de las fracciones colectadas de la muestra.

Cromatografía de Líquidos de Alta Presión

En este método se emplean columnas de acero de diámetro muy reducido rellenas de materiales especiales pulverizados con tamaño de partícula de entre 3 y 40 micras.

Este tipo de columna es muy eficaz pero ofrece una gran resistencia al flujo de la fase móvil, es decir una gran caída de presión, por lo que es necesario emplear sistemas de bombeo de alta presión; la cantidad de la fase estacionaria es pequeña, por lo que se requiere que la muestra también lo sea (0.1-10 mg).

Las columnas empleadas son reutilizables, por lo que se pueden llevar a cabo muchas separaciones individuales en una misma columna.

La inyección precisa de la muestra se lleva a cabo fácil y rápidamente, empleando una jeringa de inyección. Puesto que se emplean bombas de alta presión se obtiene un flujo controlado y rápido del solvente a través de la columna.

El flujo controlado da por resultado una operación más reproducible lo cual significa una gran precisión y exactitud en los análisis por elución.

La detección y cuantificación se lleva a cabo con detectores de varios tipos, esto rinde un cromatograma final sin la intervención directa del operador.

La cromatografía de líquidos de alta presión ofrece grandes ventajas al analista, pero también tiene sus limitaciones como se muestra a continuación.

Ventajas

- . Velocidad de análisis
- . Alta resolución
- . Automatización
- . Resultados cuantitativos y reproducibles
- . Amplio espectro de aplicaciones

Desventajas

- . Equipo costoso
- . No existe detector universal
- . Experiencia indispensable
- . Elevado costo de operación

Así este tipo de cromatografía ofrece un informe exacto de la separación de los componentes de la mezcla en un corto tiempo y un mínimo de esfuerzo, (16).

Para el ensayo químico de amoxicilina se usa el método de cromatografía de líquidos de alta presión; este método se basa en la absorción que tiene la amoxicilina a una longitud de onda de 273 nm por la afinidad que presenta este antibiótico en los sitios activos de la fase estacionaria en la columna y su posterior cuantificación por detección al ultravioleta a esta longitud de onda. Este parece ser un excelente procedimiento para cuantificar amoxicilina, ya que no requiere ser degradado, (17).

E. Yodometría

El elemento yodo existe en varios estados de oxidación analíticamente importantes y están representados por especies tan conocidas como yoduro / yodo, monocloruro de yodo, yodato y peryodato. Son de importancia especial los procesos de oxidación y reducción en que intervienen los dos estados de oxidación inferiores: yodo y yoduro.

En todos los procedimientos directos e indirectos se efectúan valoraciones con una solución estándar de yodo que contiene una concentración relativamente alta de yoduro potásico o se efectúan valoraciones de yodo en presencia de yoduro en exceso.

En ninguno de los dos casos se forma yodo sólido y la concentración de yodo acuoso es ordinariamente pequeña comparada con la concentración de triyoduro, (18).

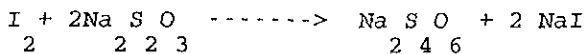
Se han propuesto dos clasificaciones mayores de los métodos redox:

Primero los llamados métodos directos, donde una solución de triyoduro o de yodo disuelto en yoduro potásico como medio sirve como agente oxidante estándar, a este método se le llama método yodimétrico.

Segundo, se emplean métodos llamados indirectos en los cuales se forma triyoduro por acción del ión yoduro en exceso con algún agente oxidante, éstos se designan comúnmente como métodos yodométricos, (19).

Para los fines del presente trabajo nos enfocaremos al método yodométrico.

Para la valoración de triyoduro se usa invariablemente una solución estándar de tiosulfato de sodio; en la aplicación del método analítico indirecto o yodométrico ha de tenerse siempre la seguridad de que se ha completado la reacción entre el oxidante fuerte y el yoduro en exceso antes de dar comienzo a la valoración con tiosulfato. De otro modo todo oxidante fuerte presente al comienzo de la valoración oxidará posiblemente tiosulfato a azufre o sulfato, al igual que a tetrionato y con ello alterara la estequiometría de la reacción triyoduro-tiosulfato, que es la que se pretende; así podemos decir que el método yodométrico se destina a la determinación de sustancias que por si mismas son agentes oxidantes fuertes y el procedimiento consiste en la reacción previa de esta sustancia con un exceso de ión yoduro para formar ión triyoduro, seguida de la valoración de ión triyoduro con una solución estándar de tiosulfato de sodio; luego entonces el punto final de la valoración está señalado por la desaparición final del yodo libre, (20).



En general, no se usa yodo como sustancia estándar primaria, por la incomodidad que supone preparar y pesar yodo sólido puro y seco.

En la práctica pocas veces es necesario pesar yodo sólido con exactitud porque en general se prepara una solución de yodo de la concentración deseada aproximada y luego se estandariza.

Cuando el yodo sólido es poco soluble en agua, su solubilidad aumenta considerablemente en presencia de yoduro de potasio en exceso a causa de la formación de ión triyoduro, así para preparar una solución de yodo es aconsejable mezclar el yodo sólido y el yoduro de potasio en un volumen pequeño de agua hasta que el yodo se disuelva por completo, y luego diluir con agua hasta el volumen deseado.

Varios son los factores que afectan la estabilidad y concentración de las soluciones de yodo, entre las más importantes encontramos las siguientes: la sublimación del yodo, lo cual se puede evitar guardando las soluciones de yodo en recipientes bien cerrados y de color ámbar así como en un lugar fresco ya que el calor aumenta la volatilidad del yodo; también evitar el contacto directo con el oxígeno atmosférico ya que éste causa la oxidación de ión yoduro a yodo, (18,20).

El tiosulfato de sodio se disuelve muy bien en agua y así resulta sencillo preparar una solución de esta sal. Sin embargo hay varios factores que intervienen en la estabilidad de las soluciones de tiosulfato, como son: el pH, metales pesados, bacterias que consumen azufre. El efecto de la acidez sobre las soluciones de tiosulfato es de especial interés ya que en un medio ácido muy diluido se descompone muy lentamente con la formación de azufre elemental y con hidrogénulfito.

Aunque el tiosulfato es inestable en medio ácido nada impide su uso como valorante de yodo o triyoduro; el oxígeno por sí mismo no tiene efecto especial sobre las soluciones del tiosulfato; pero en presencia de impurezas de metales pesados causan oxidación gradual de tiosulfato a tetrionato, (21).

La reacción entre el tiosulfato y el yodo o triyoduro es inmediata, por el hecho de que la mayoría de los otros oxidantes convierten tiosulfato a sulfito o sulfato y no en tetrionato.

En general la reacción yodo tiosulfato transcurre rápidamente a todo los valores de pH entre 0 y 7.

Para la determinación del punto final de la valoración de yodo-tiosulfato se emplea almidón que es un indicador interno sensible que experimenta una interacción altamente específica con el yodo. El punto final de la valoración con una solución estándar de triyoduro se señala por la aparición del color azul formado por el complejo yodo-almidón, y el color azul desaparece en el punto final.

Cuando se usa almidón como indicador para yodo es preciso observar varias precauciones generales. El almidón no ha de estar presente en estas soluciones que se valoran, hasta que la concentración de yodo libre es lo bastante baja, ya que grandes cantidades de yodo causan coagulación de la suspensión de almidón y promueven así mismo la descomposición de esta sustancia.

La suspensión de almidón debe guardarse de manera que se evite la exposición al aire, y toda posible fuente de bacterias ya que esto provoca la descomposición del almidón. Así también el almidón

debera emplearse a temperatura ambiente, ya que la sensibilidad del punto final almidón-yodo disminuye marcadamente en soluciones a temperatura más alta.

Así pues la amoxicilina (antibiótico β -lactámico) puede ser cuantificado por el método yodométrico.

La degradación de la amoxicilina es típica de la hidrólisis de todas la penicilinas. En condiciones alcalinas se decompone inicialmente abriendo su anillo β -lactámico hasta ácido penicilóico, en ésto se basa la valoración de absorción de yodo.

Aunque la molécula sola de amoxicilina no consume yodo, el ácido penicilóico sí. La reacción para cuantificar amoxicilina involucra varios pasos, se requieren dos alicuotas de una solución de amoxicilina las cuales se transfieren a matraces por separado; a la muestra se agrega hidróxido de sodio lo que provoca que el anillo β -lactámico se abra, luego entonces se agrega un exceso de yodo; el yodo no consumido es titulado con tiosulfato de sodio, se usa siempre un blanco. Luego entonces la diferencia de volúmenes nos da el contenido de amoxicilina en la alicuota.

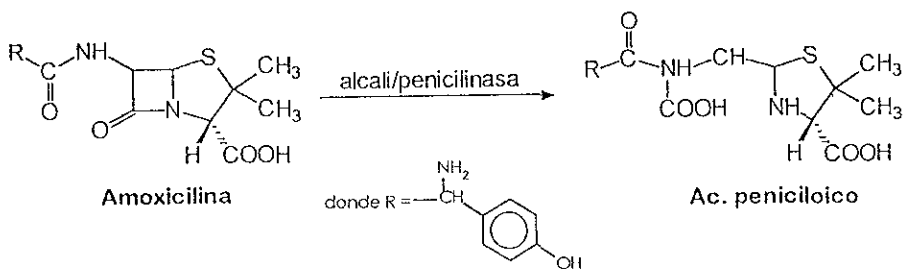


Figura 3. Reacción de degradación de Amoxicilina, (23,24).

Esta reacción en particular depende de varios factores, entre los más importantes está el pH y la concentración de yodo en la solución; así pues la reacción yodo-tiosulfato debe tener lugar en medio ácido antes de efectuarse, (22).

F. Validación de Métodos Analíticos

La validación de un método analítico así como la comparación con otros, se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad de un método satisface los requerimientos para las aplicaciones analíticas deseadas, (25).

En la aplicación de los criterios para la validación y comparación de uno o varios métodos analíticos, prevaleciera ante todo la experiencia y criterio del analista que lleva a cabo el estudio.

Conceptos y Determinaciones

* Linearidad del sistema.

Es la relación que se establece mediante una línea recta entre una propiedad física, química o biológica con la cantidad de fármaco a analizar.

Se evalúa construyendo una curva de calibración a partir del análisis de diferentes soluciones de la sustancia de interés, usualmente 50, 80, 100, 120 y 150 % preparadas a partir de una misma solución patrón.

Los datos obtenidos, se representan en un gráfico y se calculan los siguientes parámetros estadísticos: X, DE, CV, r, r^2 y b.

Criterio de aceptación en la linealidad del sistema:

$$CV \leq 1.5 \%$$

$$r \geq 0.99$$

$$r^2 \geq 0.98$$

$$b = 0$$

* Linealidad del método

Mide el grado en que la respuesta del método, al trabajar en un rango determinado de concentraciones, se aproxima a una función lineal del tipo $y = mx + b$.

Rango: está definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior de la sustancia de interés, en el cual se demuestra que el método es preciso, exacto, específico y lineal.

Se realizan análisis por triplicado de soluciones preparadas por la adición de la sustancia de interés a placebos del producto, usualmente 50, 80, 100, 120, y 150 % de la cantidad especificada en el marbete.

Con los resultados obtener: la gráfica de la curva, la ecuación empírica de la recta y los parámetros muestrales; X, DE, CV, m, b, r y r^2 .

Donde el criterio de aceptación en linealidad del método es:

$$\% \text{ de recobro } 98 - 102 \%$$

$$CV \leq 2 \%$$

$$r \geq 0.99$$

$$r^2 \geq 0.98$$

$$m = 1$$

$$b = 0$$

* Exactitud y Repetibilidad al 100 %

Es la dispersión que existe entre una serie de datos con respecto a un valor central, que es el valor real (100 %) obtenido por un mismo analista utilizando idénticas condiciones de análisis.

Se expresa como el % de recobro, obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener una concentración final correspondiente al 100 %.

Adicionar a placebos del producto (6 como mínimo) la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100 %, analizarlos independientemente utilizando el método propuesto, en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

Calcular el % de recobro, X, DE, CV, IC al 95 %

Donde los criterios son:

- . El % de recobro debera estar entre 98-102 %
- . Estadígrafo de contraste t Student y χ^2

$$t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$$

$$\chi^2_{\text{calc}} < \chi^2_{\text{tab}}$$

* Especificidad (métodos de control de calidad).

Es un término utilizado para indicar que la respuesta obtenida en el método se debe única y exclusivamente a la sustancia que se desea determinar y no a otras sustancias que pudieran estar presentes en el material por analizar.

Con el método propuesto analizar placebos del producto e identificar la(s) respuesta(s) del(los) principio(s) activo(s), y si procede, de los excipientes y/u otras sustancias presentes en la formulación.

Criterio: la respuesta obtenida por el método debe satisfacer los siguientes requisitos:

- . Placebo: no se obtiene respuesta $\leq 2 \%$
- . Estándar: se obtiene respuesta en un 100 %
- . Placebo cargado 100 %: se obtiene respuesta

* Estabilidad de la muestra analítica

Son las condiciones durante las cuales una muestra del producto mantiene su propiedad medible en un lapso de tiempo determinado.

Se determina por la comparación de los resultados de los análisis iniciales de tres muestras del producto terminado con los obtenidos de las muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones; por ejemplo: temperatura, humedad, luz, refrigeración, etc., dependiendo de las propiedades

físicas y químicas de la sustancia de interés.

Reanalizarlas bajo las condiciones de trabajo, utilizando una solución patrón recientemente preparada para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el método analítico propuesto. Los análisis deben ser efectuados por un mismo analista.

Criterio: la muestra es estable si el intervalo de confianza (IC) para la diferencia de la media muestral con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no exceda en intervalo de 98-102 %.

* Reproducibilidad

Es la correlación entre mediciones repetidas respecto a variaciones en la operación; tales variaciones radican en que las determinaciones son efectuadas por diferentes analistas, en distintos días, en el mismo y/o diferente laboratorio usando el mismo y/o diferente equipo, (25,26,27,28,29).

Analizar tres muestras del producto de un mismo lote cuando menos 2 por analista en 2 días diferentes. Se debe trabajar de manera independiente partiendo de una muestra homogénea del producto al 100 % de la concentración teórica.

La reproducibilidad se maneja en % de recobro.

Con los resultados se calcula X, DE y CV

Criterio utilizado $CV \leq 2\%$

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La validación de métodos analíticos así como la comparación estadística entre éstos, es parte fundamental en el desarrollo de una nueva formulación y de la técnica de análisis de control de calidad en donde el químico verifica si el estudio, evaluado sistemáticamente, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado.

La industria farmacéutica dedica especial interés en la validación y comparación de métodos analíticos debido al gran incremento de productos que tienen que ver con la salud, por otro lado se hace cada vez más necesario el desarrollo de métodos analíticos adecuados. La necesidad de reformular formas farmacéuticas para mejorar su calidad, exige el desarrollo de métodos analíticos alternativos así como su comparación con otros para que éstos sean más confiables y disminuyan costos y tiempos de operación en la industria.

Actualmente la amoxicilina contenida en una suspensión se cuantifica por el método yodométrico, así como por cromatografía de líquidos de alta presión, por lo que la comparación estadística de ambos métodos, en función de costos y tiempo de análisis, permitirá tomar decisiones más confiables sobre la elección de un método en particular.

III. OBJETIVOS

Objetivo General:

. Evaluación de dos métodos analíticos para cuantificar amoxicilina en suspensión y determinar el método adecuado para ser utilizado como parámetro de control de calidad.

. Llevar a cabo la comparación de los métodos analíticos (fotométrico y cromatográfico de líquidos de alta presión), mediante:

Determinación de la:

- .Linealidad del sistema
- .Linealidad de los Métodos
- .Exactitud y repetibilidad de los Métodos
- .Especificidad de la Muestra Analítica
- .Reproducibilidad
- .Estabilidad de la Muestra Analítica
- .Comparación de costos y tiempo de operación

IV. HIPOTESIS DE TRABAJO

La comparación de dos métodos analíticos será válida si la relación dosis - respuesta obtenida por la muestra es representada por una línea recta y ésta es paralela a la del patrón, para los dos métodos comparados.

Sin embargo, la relación de costo-beneficio puede ser el parámetro que valida cual de los métodos analíticos sea el más adecuado para ser utilizado comercialmente.

V. PARTE EXPERIMENTAL

A. Material, Equipo y Reactivos

Material	Descripción
Matraz volumétrico (Blau brand)	100 ml
Matraz yodométrico (Pyrex)	125 ml
Pipeta volumétrica (Pyrex)	2, 10 ml
Bureta graduada (Pyrex)	25 ml
Pipeta graduada (Pyrex)	5 ml
Filtros (Millipore)	tipo HA de 0.45 micras
Equipo para filtración (Schott Duran)	250 ml
Probeta graduada (Pyrex)	1000 ml
Jeringa para inyector (Becton Dickinson)	3 ml
Equipo	Descripción
Balanza analítica (200 gr)	Sartorius BA110S
Parrilla de agitación magnética	Corning
Cromatógrafo de Líquidos	Beckman modelo 166
Sistema de bombeo continuo	Beckman modelo 166
Inyector (20 ml)	Rheodyne modelo 7725
Columna fase reversa ODS (C18)	Beckman
Detector ultravioleta	Beckman modelo 116

Módulo de interfases	Beckman modelo 166
Computadora	IBM modelo 50Z
Impresora	Epson FX 850

Reactivos	Descripción
Hidróxido de sodio (R.A.)	Merck
Acido clorhídrico (R.A.)	Merck
Tiosulfato de sodio (R.A.)	Merck
Yodo (sólido) (R.A.)	Merck
Almidón (R.A.)	Merck
Fosfato de sodio monobásico (R.A.)	Merck
Metanol (R.A. y HPLC)	Mallinckrodt
Amoxicilina trihidrato estándar primario (85.0 %) lote= BRL 2333	SBP
Amoxicilina trihidrato (materia prima (85.0%) lote= 9601000233	SBQ

B. Metodología General

Metodología General:

Valoración de amoxicilina en suspensión por el método yodométrico:

Preparación de la solución de referencia: pesar 100 mg de amoxicilina (estándar de referencia) ajustando el peso al 100 % de su pureza, transferirlo a un matraz volumétrico de 100 ml y adicionar 20 ml de agua destilada y entonces someter esta solución a baño de ultrasonido por 3 minutos, posteriormente aforar al volumen y homogenizar la solución; esta contendrá una concentración de 1 mg/ml.

Solución problema: disolver una cantidad adecuada de la muestra (896.6 mg de placebo cargado, que para la exactitud y repetibilidad tendrá una concentración de 0.6, 0.8, 1.0, 1.25 y 1.5 mg/ml; y para la linealidad del método tendrá una concentración de 1.0 mg/ml); (para la estabilidad de la muestra se pesan 896.6 mg de muestra de producto, ésta contendrá una concentración de 1.0 mg/ml); (para la linealidad de sistema se pesan 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5 mg/ml ajustando el peso al 100 % de la pureza de la sustancia de interés (amoxicilina), en un matraz volumétrico de 100 ml con agua destilada, someter a baño de ultrasonido por unos 3 minutos y entonces aforar al volumen y homegenizar la suspensión, luego entonces la solución está lista para su análisis.

Procedimiento:

A 2 ml de la solución de referencia y de la muestra, por separado, añadir 2 ml de solución 1.0 N de hidróxido de sodio, mezclar y dejar reposar por 15 minutos. Adicionar a cada uno de los matraces 2 ml de solución 1.2 N de ácido clorhídrico y 10 ml de solución 0.01 N de yodo, inmediatamente colocar un tapón a los matraces y cubrirlos con agua, dejarlos reposar durante 15 minutos protegidos de la luz. Titular con solución 0.01 N de tiosulfato de sodio, para visualizar el punto final de la titulación, agregar unas gotas de almidón SI (Solución Indicador) casi al final de la titulación, continuar hasta que el color azul desaparezca.

Determinación del blanco: colocar en 2 matraces por separado 2 ml de la solución de referencia y 2 ml de la solución problema, agregar a ambos 10 ml de solución de yodo 0.01 N, enseguida adicionar 0.1 ml de solución 1.2 N de ácido clorhídrico; titular inmediatamente con solución 0.01 N de yodo, para visualizar el punto final de la titulación adicionar unas gotas de almidón SI casi al final de la titulación, continuar hasta que el color azul desaparezca.

Cálculos para determinar cantidad de amoxicilina en la muestra problema:

$$\frac{\text{ml bco. mta} - \text{ml mta}}{\text{ml bco.stdr} - \text{ml stdr}} \times \% \text{ adicionado} = \% \text{ de amoxicilina}$$

Valoración de amoxicilina en suspensión por el método de cromatografía de líquidos de alta presión:

Fase móvil: pesar 7.8 gr de fosfato de sodio monobásico y disolver en 900 ml de agua destilada, ajustar el pH a 4.4 y entonces aforar a 1000 ml y homogenizar la solución. Mezclar 950 ml de la solución amortiguadora (buffer) con 50 ml de metanol (grado HPLC), filtrar a través de una membrana tipo HA de 0.45 micras y desgasificar la solución en baño de ultrasonido por 10 minutos.

Condiciones cromatográficas:

- . columna C18 fase reversa
- . detector UV a 273 nm
- . flujo de la fase 1 ml/min.
- . volumen de la inyección 20 mcl

Preparación de la solución de referencia y problema:

Se prepararán de igual manera y en las mismas concentraciones como se describió con anterioridad en el método yodométrico, con la precaución de que todas las soluciones deberán de ser filtradas.

Procedimiento: inyectar 20 mcl de la solución estándar por duplicado para estandarizar el cromatógrafo; una vez realizado esto, inyectar 20 mcl de la solución problema; el integrador de la computadora proporcionara el resultado en % de la dosis de amoxicilina.

VI. RESULTADOS

* Linearidad del sistema (cromatografía de líquidos de alta presión).

Concentración mg/ml	Respuesta ABC
0.5	152.63034
0.5	152.70697
0.5	153.52170
0.75	229.50681
0.75	229.26846
0.75	229.41562
1.0	304.27090
1.0	304.14645
1.0	304.27173
1.25	380.87161
1.25	383.43283
1.25	380.02066
1.5	455.50815
1.5	455.34119
1.5	454.89737

Tabla I. Resultados obtenidos para la linearidad de sistema.

Parámetro evaluado:	Valor experimental
Coefficiente de correlación (r)	1.0000
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9999
Error estándar de regresión ($S^2_{y/x}$)	114.9422
Ordenada (b)	1.9994
Pendiente (m)	302.6546
t (0.025) g.l= 13; teórico= 2.16	0.0217

Prueba de hipótesis para la ordenada:

$$H_0 : b = 0$$

$$H_a : b \neq 0$$

Criterio de aceptación:

Si $t(0.025) < t_{exp.} < (0.975) \implies H_0$ se acepta

Area de aceptación:

$$-2.16 < 0.0217 < 2.16$$

* Linearidad del sistema (Yodometría).

Concentración mg/ml	Respuesta ml gastados
0.5	7.5
0.5	7.48
0.5	7.5
0.75	6.25
0.75	6.3
0.75	6.2
1.0	5.05
1.0	5.0
1.0	4.95
1.25	3.75
1.25	3.75
1.25	3.7
1.5	2.5
1.5	2.48
1.5	2.5

Tabla II. Resultados obtenidos para la linearidad del sistema.

Parámetro evaluado	Valor experimental
Coefficiente de correlación (r)	- 1.0
Coefficiente de determinación (r ²)	1.0
Error estándar de regresión (S [^] y/x)	3.55
Ordenada (b)	10.007
Pendiente (m)	- 5.0067
t (0.025) gl=13; teórico 2.16	0.8760

Prueba de hipótesis para la ordenada:

$$H_0 : b = 0$$

$$H_a : b \neq 0$$

Criterio de aceptación:

Si $t(0.025) < t_{exp} < t(0.975) \implies H_0$ se acepta

Area de aceptación:

$$-2.16 < 0.876 < 2.16$$

LINEARIDAD DEL SISTEMA (CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION) PARA AMOXICILINA

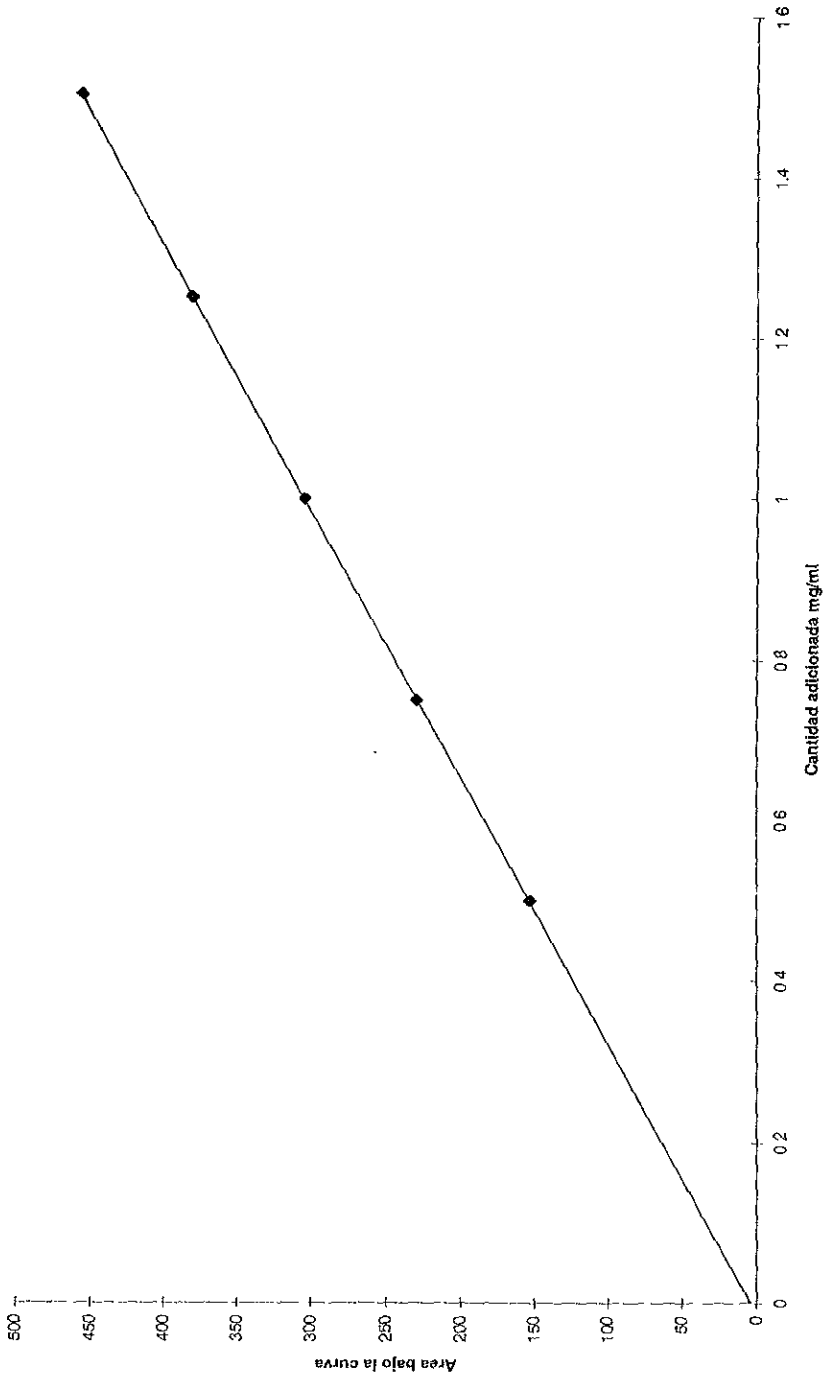


Figura 4. Linealidad del Sistema Cromatográfico.

LINEARIDAD DEL SISTEMA (YODOMETRIA) PARA AMOXICILINA

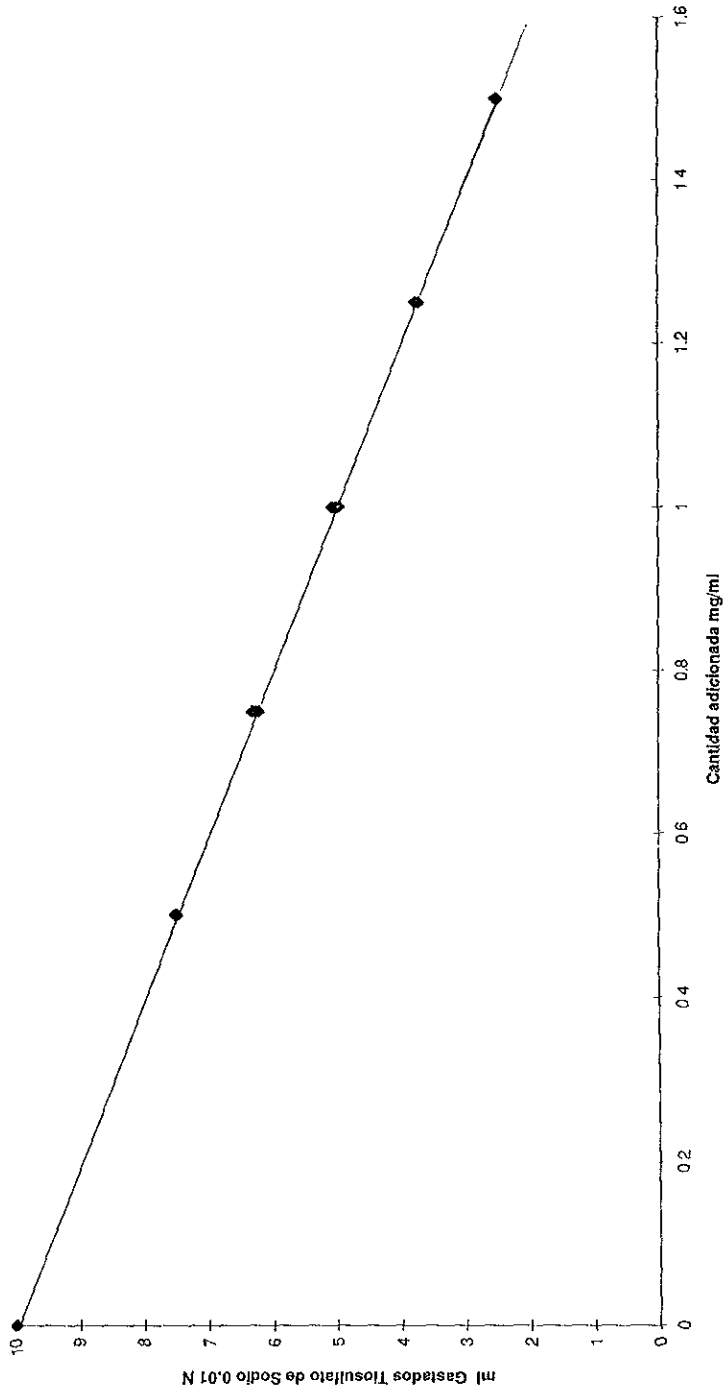


Figura 5. Linealidad del Sistema Yodométrico..

* Linearidad del método (cromatografía de líquidos de alta presión).

Cantidad adicionada mg/ml (x)	Cantidad recuperada mg/ml (y)	% de recobro R
0.6	0.606632	101.1058
0.6	0.607040	101.1733
0.6	0.606347	101.0578
0.8	0.796613	99.5766
0.8	0.805872	100.7340
0.8	0.808840	101.1050
1.0	1.008300	100.8310
1.0	1.005461	100.5461
1.0	1.006993	100.6993
1.2	1.203670	100.3058
1.2	1.206838	100.5698
1.2	1.202486	100.2072
1.5	1.500708	100.2256
1.5	1.503384	100.0472
1.5	1.504010	100.2673

Tabla III. Resultados obtenidos para la linealidad del método.

Cálculos preliminares:

$$\Sigma x = 1530$$

$$N = 15$$

$$\Sigma x^2 = 170700$$

$$\Sigma R = 1508.4520$$

$$\Sigma Y = 1537.3204$$

$$\Sigma R^2 = 151698.1195$$

$$\Sigma Y^2 = 172096.6255$$

$$R = 100.5635$$

$$\Sigma xy = 171395.812$$

$$DE = 0.4597$$

$$m = 0.996525$$

$$CV = 0.4571$$

$$b = 0.0084$$

$$r^2 = 0.9999$$

$$t(0.05), gl=13 \text{ para } (m) = 0.0534$$

$$t(0.05), gl=13 \text{ para } (b) = 0.2949$$

$$\text{Error estándar de regresión } (S^{\wedge}y/x) = 0.3345$$

Prueba de hipótesis para la pendiente:

$$H_0 : m = 1$$

$$H_a : m \neq 1$$

Criterio de aceptación:

$$\text{Si } t(0.05) < t_{\text{exp}} < (0.975) \implies H_0 \text{ se acepta}$$

Area de aceptación:

$$-2.16 < 0.0534 < 2.16$$

Intervalo de Confianza

$$0.717 < 1 < 1.2813$$

Prueba de hipótesis para la ordenada al origen

$$H_0 : b = 0$$

$$H_a : b \neq 0$$

Criterio de aceptación:

$$\text{Si } t(0.05) < t_{\text{exp}} < (0.975) \implies H_0 \text{ se acepta}$$

Area de aceptación:

$$-2.16 < 0.2949 < 2.16$$

Intervalo de confianza

$$- 0.4579 < 0 < 0.4614$$

* Linearidad del método (Yodometría).

Cantidad adicionada mg/ml (x)	Cantidad recuperada mg/ml (y)	% de recobro R
0.6	0.59	98.3333
0.6	0.60	100.0000
0.6	0.61	101.6667
0.8	0.80	100.0000
0.8	0.80	100.0000
0.8	0.81	101.2500
1.0	1.00	100.0000
1.0	1.01	101.0000
1.0	1.00	100.0000
1.2	1.20	100.0000
1.2	1.19	99.1677
1.2	1.20	100.0000
1.5	1.50	100.0000
1.5	1.51	100.6667
1.5	1.49	99.3333

Tabla IV. Resultados obtenidos para la linealidad del método

Cálculos preliminares:

$$\Sigma x = 1530$$

$$N = 15$$

$$\Sigma x^2 = 170700$$

$$\Sigma R = 1500.4167$$

$$\Sigma y = 1531$$

$$\Sigma R^2 = 150092.0347$$

$$\Sigma y^2 = 170827$$

$$R = 100.02$$

$$\Sigma xy = 170760$$

$$DE = 0.7878$$

$$m = 0.99713$$

$$CV = 0.7876$$

$$b = 0.0036$$

$$r^2 = 0.9995$$

$$r = 0.9998$$

$$t(0.05), gl= 13 \text{ para } (m) = 0.2696$$

$$t(0.05), gl= 13 \text{ para } (b) = 0.0034$$

$$\text{Error estándar de regresión } (S^{\wedge}y/x) = 0.3356$$

Prueba de hipótesis para la pendiente:

$$H_0 : m = 1$$

$$H_a : m \neq 1$$

Criterio de aceptación:

$$\text{Si } t(0.05) < t_{\text{exp}} < (0.975) \implies H_0 \text{ se acepta}$$

Area de aceptación

$$- 2.16 < 0.2696 < 2.16$$

Intervalo de confianza

$$0.2183 < 1 < 1.2154$$

Prueba de hipótesis para la ordenada al origen:

$$H_0 : b = 0$$

$$H_a : b \neq 0$$

Criterio de aceptación:

$$\text{Si } t(0.05) < t_{\text{exp}} < (0.975) \implies H_0 \text{ se acepta}$$

Area de aceptación:

$$-2.16 < 0.0034 < 2.16$$

Intervalo de confianza

$$- 0.3054 < 0 < 0.3126$$

GRAFICA DE COMPARACION PARA LA LINEARIDAD DE LOS METODOS (CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION Y YODOMETRICO) PARA AMOXICILINA

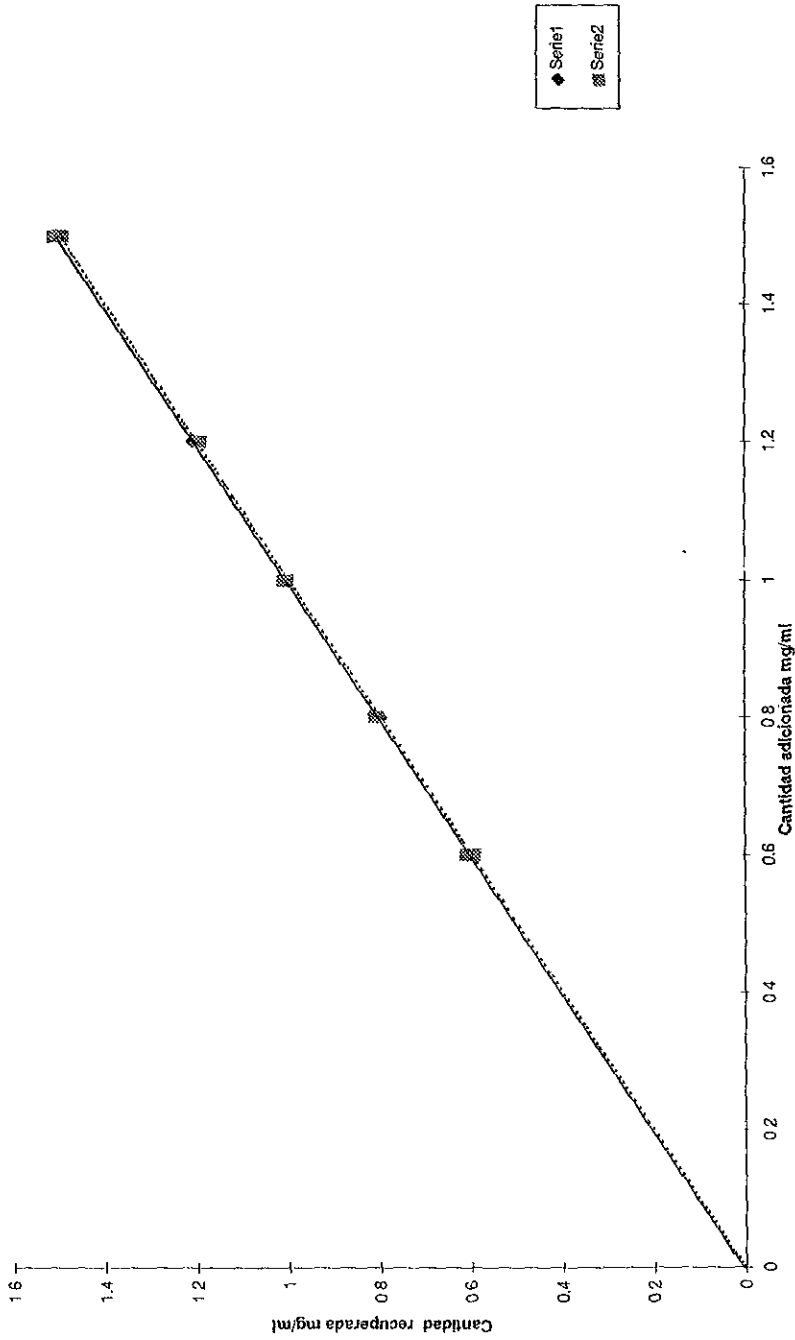


Figura 6. Gráfica de Comparación para la Linealidad de los metodos.

* Exactitud y Repetibilidad al 100 % (cromatografía de líquidos de alta presión).

Cantidad adicionada mg/ml (x)	Cantidad recuperada mg/ml (y)	% de recobro R
1.0	1.0092	100.92
1.0	1.0057	100.57
1.0	1.0053	100.53
1.0	0.9973	99.73
1.0	0.9919	99.19
1.0	1.0051	100.51
1.0	0.9994	99.94
1.0	0.9996	99.96
1.0	0.9997	99.97
1.0	1.0016	100.00
1.0	0.9999	99.99
1.0	0.9957	99.57

Tabla V. Resultados obtenidos para la exactitud y repetibilidad .

Cálculos preliminares:

$$\Sigma R = 1198.42$$

$$\Sigma R^2 = 119685.3$$

$$R = 100.0733$$

$$S = 0.4832$$

$$CV = 0.4828$$

$$\sigma^2 = 0.2335$$

Repetibilidad:

$$X_i^2 = (0.025), g_1 = 11; \text{teórico} = 3.816$$

$$X_i^2 = (0.975), g_1 = 11; \text{teórico} = 21.92$$

$$X_i^2 \text{ experimental} = 5.18$$

Exactitud:

$$t (0.025), g_1 = 11 \text{ teórico} \pm 2.201$$

$$t \text{ experimental} = - 1.58$$

Hipótesis de contraste para la Repetibilidad:

$$H_0 : \sigma^2 \leq 2 \%$$

$$H_a : \sigma^2 > 2 \%$$

Criterio de aceptación:

$$X_{i^2} (0.025) < X_{i^2} \text{ exp} < X_{i^2} (0.975) \implies H_0 \text{ se acepta}$$

Area de aceptación:

$$3.816 < 5.18 < 21.92$$

Intervalo de confianza

$$0.1172 < 0.2335 < 0.673$$

Hipótesis de contraste para la Exactitud:

$$H_0 : = 100 \%$$

$$H_a : \neq 100 \%$$

Criterio de aceptación:

$$Si \pm t (0.05) \leq t \text{ exp} \implies H_0 \text{ se acepta}$$

Area de aceptación:

$$- 2.201 < - 1.58 < 2.201$$

Intervalo de confianza

$$99.69 < 100 < 100.3070$$

* Exactitud y Repetibilidad al 100 % (Yodometría).

Cantidad adicionada mg/ml (x)	Cantidad recuperada mg/ml (y)	% de recobro R
1.0	1.0	100.00
1.0	1.01	101.00
1.0	1.0	100.00
1.0	1.02	102.00
1.0	0.99	99.00
1.0	1.01	101.00
1.0	1.01	101.00
1.0	0.99	99.00
1.0	0.99	99.00
1.0	1.00	100.00
1.0	0.99	99.00
1.0	0.99	99.00

Tabla VI. Resultados obtenidos para la exactitud y repetibilidad.

Cálculos preliminares:

$$\Sigma R = 1200$$

$$\Sigma R^2 = 120012$$

$$R = 100.00$$

$$S = 1.0445$$

$$CV = 1.0445$$

$$\sigma^2 = 1.0910$$

Repetibilidad:

$$X_{i^2} (0.025), g_1 = 11; \text{teórico} = 3.816$$

$$X_{i^2} (0.975), g_1 = 11; \text{teórico} = 21.92$$

$$X_{i^2} \text{ experimental} = 6.0$$

Exactitud:

$$t (0.025), g_1 = 11$$

$$t \text{ experimental} \pm 0.0$$

Hipótesis de contraste para la repetibilidad:

$$H_0 : \sigma^2 \leq 2 \%$$

$$H_a : \sigma^2 > 2 \%$$

Criterio de aceptación:

$$X_i^2 (0.025) < X_i^2 \text{ exp} < X_i^2 (0.975) \implies H_0 \text{ se acepta}$$

Area de aceptación:

$$3.816 < 6.0 < 21.92$$

Intervalo de confianza

$$0.5475 < 1.0910 < 3.144$$

Hipótesis de contraste para la exactitud:

$$H_0 : = 100 \%$$

$$H_a : \neq 100 \%$$

Criterio de aceptación:

$$S_i \pm t (0.05) \leq t \text{ exp} \implies H_0 \text{ se acepta}$$

Area de aceptación:

$$- 2.201 < 0.0 < 2.201$$

Intervalo de confianza

$$99.33 < 100 < 100.6636$$

* Especificidad del método (cromatografía de líquidos de alta resolución).

<u>Sustancia relacionada</u>	<u>% de Recobro</u>
Amoxicilina (materia prima)	100.05
Placebo adicionado (100 %)	100.25
Placebo del producto	0.0

Tabla VII. Resultados obtenidos para la especificidad del método.

Criterio: Como se observa en la tabla VII la respuesta obtenida por el método se debe únicamente a la sustancia de interés, por lo tanto, el método se considera específico para la amoxicilina.

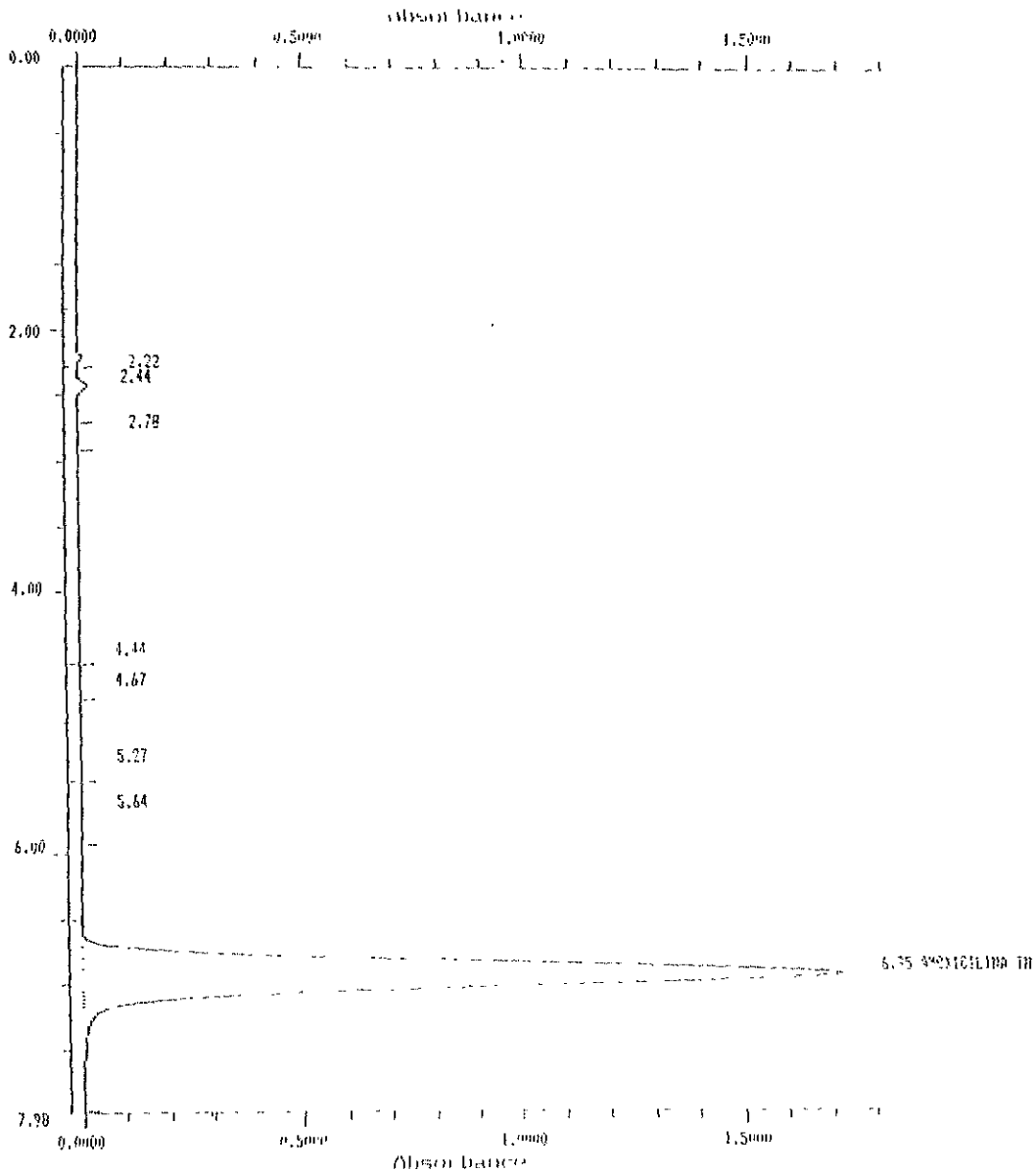


Figura 7. Cromatograma de Amoxicilina Trihidrato Estándar.

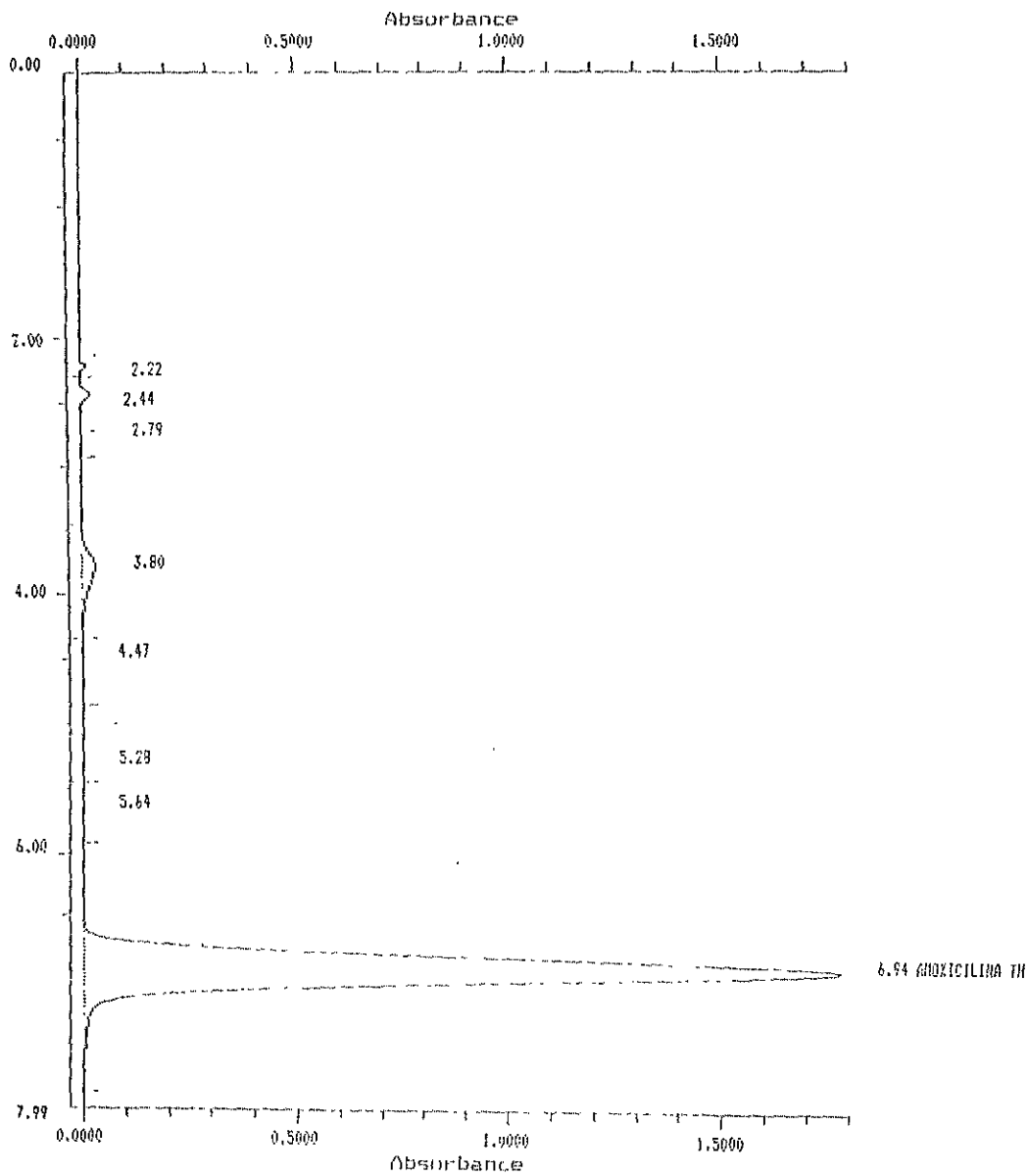


Figura 8. Cromatograma de Placebo Adicionado.

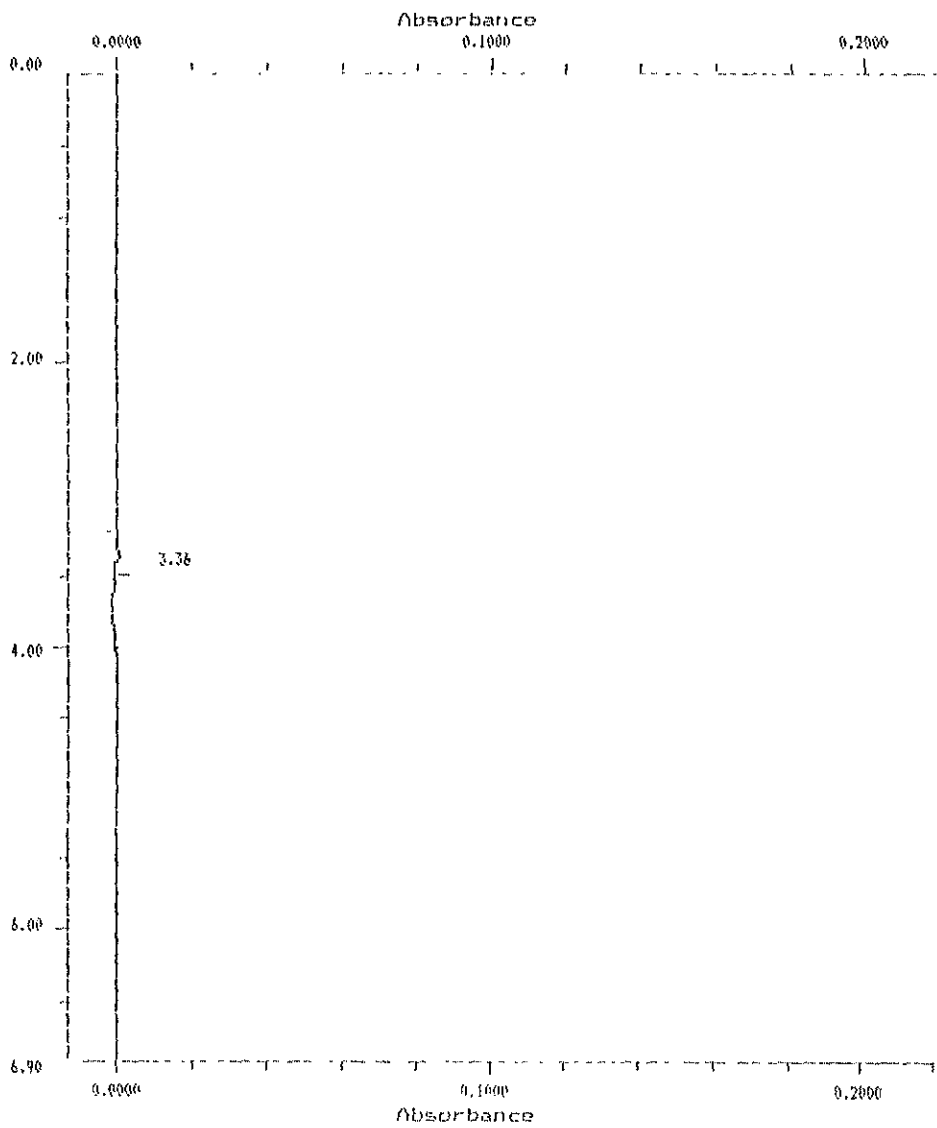


Figura 9. Cromatograma de Placebo.

* Especificidad del método (Yodométrico).

<u>Sustancia relacionada</u>	<u>% de Recobro</u>
Amoxicilina (materia prima)	99.7
Placebo adicionado (100 %)	100.0
<u>Placebo del producto</u>	<u>0.0</u>

Tabla VIII. Resultados obtenidos para la especificidad del método.

Criterio: como se observa en la tabla VIII la respuesta obtenida por el método se debe únicamente a la sustancia de interés, por lo tanto, el método se considera específico para la amoxicilina.

* Estabilidad de la muestra analítica (Cromatografía de líquidos de alta presión).

Condición/Tiempo	Muestra del producto		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Inicial	100.1141	100.7015	100.9739
T.A./ 24 Hr.	100.8291	100.2760	101.9138
T.A./ 72 Hr.	94.3295	95.9993	95.4925
4° C/ 24 Hr.	99.3588	101.0268	100.1267

Tabla IX. Resultados de la muestra analítica almacenada a temperatura ambiente 24 y 72 horas, y refrigeración a 4°C por 24 horas.

Intervalo de confianza		
T.A./ 24 Hr.	- 0.8664 a 1.6734	Muestra estable
T.A./ 72 Hr.	- 6.6203 a - 4.025	No es estable
4°C./ 24 Hr.	- 1.69 a 0.8454	Muestra estable

Intervalo de confianza en estabilidad de la muestra analítica.

Criterio por intervalo de confianza:

. La muestra es estable a temperatura ambiente 24 horas y refrigeración 24 horas ya que en el intervalo de confianza se incluye el valor de cero.

. La muestra no es estable a temperatura ambiente por 72 horas ya que en el intervalo de confianza no se incluye el valor de cero.

* Estabilidad de la muestra analítica (Yodometría).

Condición /tiempo	Muestra del producto		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
T.A./ 24 Hr.	100.2	100.00	101.00
T.A./ 72 Hr.	94.00	95.00	95.40
4°C./ 24 Hr.	99.80	100.20	101.00

Tabla X. Resultados de la muestra analítica almacenada a temperatura ambiente 24 y 72 horas, y refrigeración 24 horas.

	Intervalo de confianza		
T.A./ 24 Hr.	- 1.5	a 1.58	Muestra estable
T.A./ 72 Hr.	- 6.76	a - 4.36	No es estable
4°C./ 24 Hr.	- 1.23	a 1.1	Muestra estable

Intervalo de confianza en estabilidad de la muestra analítica.

Critero por intervalo de confianza:

. La muestra es estable a temperatura ambiente 24 horas y refrigeración 24 horas ya que en el intervalo de confianza se incluye el valor de cero.

. La muestra no es estable a temperatura ambiente por 72 horas ya que en el intervalo de confianza no se incluye el valor de cero.

* Reproducibilidad : Cromatografía de líquidos de alta presión.

		Analista	
		1	2
		99.9346	101.0016
1		99.8956	99.1075
		99.9367	100.1113
Día			
		100.0036	99.3674
2		100.1158	100.9361
		100.0845	100.2532

Resultados obtenidos para la reproducibilidad del método (Cromatografía de líquidos de alta presión), los cuales se encuentran expresados en % de recobro de amoxicilina.

Parámetro evaluado	Valor calculado
Media (X)	100.0675
Desviación estándar (S)	0.5252
Coefficiente de variación (CV)	0.5248

Criterio utilizado:

$$CV \leq 2 \%$$

* Reproducibilidad: Yodometría.

		Analista	
		1	2
		100.00	99.80
1		101.00	99.40
		101.00	100.00
Día			
		99.80	101.60
2		100.00	99.40
		99.80	100.00

Resultados obtenidos para la reproducibilidad del método (yodometría), los cuales se encuentran expresados en % de recobro.

Parámetro evaluado	Valor calculado
Media (X)	100.15
Desviación estándar (S)	0.6829
Coefficiente de variación (CV)	0.6819

Criterio utilizado:

$$CV \leq 3 \%$$

Comparación estadística de los dos métodos (Cromatografía de líquidos de alta presión con relación a Yodometría).

* Repetibilidad: se utiliza la información generada del porcentaje recuperado de la linealidad de los métodos:

DE 1 = 0.4597	N 1 = 15
DE 2 = 0.7878	N 2 = 15
gl = 14	F con (0.975) = 2.95
LSIC = 1.0045 ; LIIC = 0.3405	

En el intervalo se encuentra el valor de uno.

* Exactitud al 100 % : información generada del porcentaje recuperado de la exactitud al 100 %.

R 1 = 99.8684 %	N 1 = 12
R 2 = 100.00 %	N 2 = 12
DE 1 = 0.4832	
DE 2 = 1.0445	
gl = 22	t con (0.975) = 2.074
DEP = 1.0083	
LSIC = 1.1584 ; LIIC = - 0.5347	

En el intervalo se encuentra el valor de cero.

* Linearidad de los métodos para las pendientes:

$$SE^2 = 0.3101$$

$$S^2_{dm} = 4.2363 \times 10^{-5}$$

$$g_1 = 26 \qquad t \text{ con } (0.975) = 2.064$$

$$LSIC = 0.0128 ; LIIC = - 0.0140$$

En el intervalo de encuentra el valor de cero.

* Linearidad de los métodos para las ordenadas:

$$S^2_{do} = 0.5648$$

$$g_1 = 26 \qquad t \text{ con } (0.975) = 2.064$$

$$LSIC = 2.7531 ; LIIC = - 1.0861$$

En el intervalo se encuentra el valor de cero.

Comparación en cuanto a costos y tiempo de análisis de los dos métodos (Cromatografía de líquidos de alta presión con relación a Yodometría).

Se realizó un estudio de tiempo de análisis y costos de operación para cuantificar amoxicilina en suspensión, en el tiempo de análisis se incluye: preparación de reactivos, de soluciones muestra y de estándar patrón, análisis de muestra, tiempo de informe final. Para el análisis de costos se incluye: reactivos, uso de equipos, materiales adicionales (papelería, material consumible, etc), costo hora/hombre.

Parámetro evaluado	Método	
	Cromatografía de Líquidos de alta presión	Yodometría
Tiempo de análisis	40 minutos	3 Horas
Costo de operación	\$ 380	\$ 55

VII. DISCUSION

a. Linearidad del sistema.

Se determinó preparando soluciones patrón de amoxicilina estándar primario a las concentraciones de 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, y 1.75 mg/ml, estas soluciones se analizaron por triplicado cada una y por un solo analista obteniéndose tres lecturas para cada concentración. Con los resultados obtenidos se calculo r , r^2 , ordenada y t student para la ordenada y se construyó una curva de calibración (fig.4 y fig. 5) para cada uno de los métodos.

Se observa en los resultados (tabla I y tabla II) que el coeficiente de correlación experimental es de 1.0 para el método cromatográfico y de 0.9846 para el método yodométrico, dado que estos valores son mayores que el valor establecido teóricamente (0.98), esto indica que existe una gran relación entre las dos variables (concentración contra respuesta obtenida), quedando demostrado que la variación de la variable de respuesta se relaciona directamente con la variable independiente (concentración) y que tal relación es lineal. El valor de t student en la inferencia acerca de la ordenada para ambos sistemas tiene un valor considerado como cero lo que corrobora la hipótesis alternativa (H_a) para cada uno de los métodos propuestos.

b. Linearidad del método.

Este parámetro se evaluó preparando placebos adicionados con

cantidades exactas de amoxicilina (materia prima), cada uno de manera independiente a 5 concentraciones diferentes que corresponden a 60, 80, 100, 125, 150 % de la concentración central que es de 1.0 mg/ml (tabla III y tabla IV) para el método cromatográfico y yodométrico respectivamente. Se prepararon soluciones por triplicado para cada uno de los placebos; el estándar se preparó pesando 117.6 mg/100 que corresponde a 100 mg ajustados al 100 % de la pureza del estándar.

El análisis de los placebos se hizo por triplicado para cada uno de los métodos a comparar (cromatográfico-yodométrico) por un solo analista y bajo las mismas condiciones de operación. Con los resultados obtenidos para cada método se calculó y se construyó una curva de linealidad (fig. 6); graficando cantidad adicionada contra cantidad recuperada. Para la comparación de la linealidad de los métodos se usó información generada de las pendientes y ordenadas con una probabilidad acumulada de 0.975.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la comparación para la linealidad de ambos métodos se tiene que en el intervalo el límite superior es de 0.128 y el inferior -0.014 para las pendientes; para las ordenadas el límite superior es de 2.7531 y el límite inferior es de - 1.06861. Se puede observar que en ambos intervalos se encuentra el valor de cero, lo cual indica que ambos métodos son lineales, es decir, que la pendiente para ambos métodos se considera como 1 y la ordenada como cero. Lo cual puede ser corroborado también en la fig. 6 donde se compara la linealidad

de ambos métodos, es decir, que la relación dosis respuesta se representa por una línea recta, lo que corroborar la hipótesis de trabajo.

c. Exactitud y Repetibilidad de los métodos.

Se determinó preparando seis placebos del producto, cada uno con la cantidad necesaria de amoxicilina (materia prima) para obtener la concentración del 100 %, el estándar se preparó de igual manera que para la linealidad del método; el análisis de los placebos se hizo por duplicado para cada uno de los métodos a comparar (tabla V y tabla VI); con los resultados obtenidos para cada método se obtuvo el porcentaje de recobro, R , S , CV , σ^2 . Para la repetibilidad de los métodos se uso información generada del porcentaje recuperado para la linealidad de los métodos (tabla III y tabla IV). Se compararon mediante los datos de desviación estándar que para el método cromatográfico es de 0.4597 y para el yodométrico es de 0.7878 con una probabilidad acumulada de 0.975.

De acuerdo a los resultados para el intervalo se obtuvo el límite superior 1.0045 y el límite inferior 0.3405; se observa aquí que en el intervalo se localiza el valor de 1 por lo que se considera que los métodos son repetibles y que no existe diferencia en el análisis por un mismo analista.

Para la exactitud se uso información generada del porcentaje recuperado de la exactitud al 100 % (tabla V y tabla VI) se compararon mediante los datos promedio del porcentaje recuperado que para el método cromatográfico es de 100.0733 y para el

yodométrico es de 100.00 %, con una probabilidad acumulada de 0.975. De acuerdo a los datos obtenidos para el intervalo se obtuvo el límite superior 1.1584 y el límite inferior -0.5374. Aquí, podemos observar que en el intervalo se encuentra el valor de cero por lo que se dice que ambos métodos son exactos.

d. Especificidad del método.

Este parámetro se evaluó analizando las muestras preparadas, placebo, placebo adicionado, materia prima (amoxicilina); el estándar se preparó de igual manera que para la linealidad del método.

Como se observa de los resultados obtenidos para el método cromatográfico (fig.7,fig,8,fig,9), y para el método yodométrico (tabla VIII), tanto el placebo adicionado como la materia prima (amoxicilina) presentan respuesta similar es decir se detecta el activo (amoxicilina) sin que exista interferencia de posibles productos de degradación; de igual manera el placebo del producto no mostró interferencia es decir que no se detectó por los métodos propuestos; luego entonces de acuerdo a estos resultados se concluye que ambos métodos son específicos para detectar amoxicilina en suspensión.

e. Estabilidad de la muestra analítica.

Se determinó mediante el análisis de tres muestras del producto, sometidas a dos diferentes condiciones (temperatura

ambiente y refrigeración 4°C), las muestras se analizaron de manera inicial, 24 horas y 72 horas, usando una solución patrón preparada recientemente para cada tiempo de análisis, las muestras se reanalizaron bajo las mismas condiciones de trabajo de acuerdo a lo establecido para los métodos propuestos, el análisis se efectuó por un mismo analista.

De acuerdo a los resultados obtenidos (tabla IX y tabla X), la muestra se considera estable durante 24 horas a temperatura ambiente y refrigeración; no así 72 horas a temperatura ambiente ya que la concentración del activo disminuye en un 6 % aproximadamente.

f. Reproducibilidad.

Se determinó mediante el cálculo del coeficiente de variación realizado en el análisis de seis muestras homogéneas del producto con una concentración cercana al 100 % de la concentración teórica.

Los análisis se realizaron por dos analistas en dos días diferentes usando los métodos propuestos (Cromatografía de líquidos de alta presión y método Yodométrico) con el mismo equipo y en el mismo laboratorio.

Obteniéndose al coeficiente de variación que para los dos métodos es menor al 2 %; se concluye que no existe interacción entre analista-día para los métodos propuestos.

g. Comparación en costo y tiempo de operación.

Se realizó un estudio de tiempo de análisis y costos de operación, para poder obtener un resultado final de la cuantificación de amoxicilina en suspensión.

De acuerdo a los resultados obtenidos (tabla XIII) se nota que el método de cromatografía de líquidos de alta presión es más costoso en comparación con el método yodométrico; no así en tiempos de operación que es más rápido el análisis por cromatografía que por yodometria, lo que reporta un beneficio en las areas de producción al tener un resultado más rápido.

VIII. CONCLUSIONES

Se determinó la comparación de los métodos en base a las reglas de decisión y se llegó a la conclusión de que se puede determinar indistintamente el principio activo (amoxicilina) por cualquiera de los dos métodos comparados.

Estadísticamente se encontró que los *sistemas analíticos* son lineales en un rango de concentración de 50 a 150 % del principio activo. Además es preciso al analizar muestras con una concentración cercana a 1 mg/ml establecida en la linealidad del sistema.

Existe una relación lineal entre ambos y con la del patrón en un rango de 0.6 a 1.5 mg/ml; ya que ambos poseen una ordenada al origen considerada como cero y una pendiente aproximada igual a 1.

Se considera que los métodos son exactos y repetibles a la concentración central de 1 mg/ml. Son reproducibles, ya que no existe diferencia significativa en que el análisis sea efectuado por uno u otro analista en el mismo o diferente día.

Ya que el placebo no presenta interferencia en el ensayo para ambos métodos, se consideran específicos para determinar amoxicilina en suspensión.

Se establece que la muestra preparada para su uso posee una estabilidad de hasta 24 horas a temperatura ambiente y a 4 grados por el mismo tiempo; por lo que pasado éste no se recomienda analizar las muestras ya que los resultados obtenidos no se

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

consideran confiables.

En cuanto a costos y tiempo de análisis se determinó que es más costoso el análisis por cromatografía de líquidos que el de yodometría no así en su tiempo de análisis que es más rápido por el método cromatográfico.

Como conclusión general los métodos se consideran lineales, exactos, repetibles, específicos y reproducibles para el principio activo en estudio y que la muestra es estable hasta por 24 horas a temperatura ambiente y refrigeración.

Por lo tanto se toma la decisión de usar el método cromatográfico como parámetro de control de calidad para cuantificar amoxicilina en suspensión ya que este da un resultado en menor tiempo de análisis, además de que la muestra no requiere degradación como en el método yodométrico; lo que reporta un beneficio para las áreas productivas de una industria.

IX. ANEXOS

Evaluación estadística de los parámetros analíticos en la comparación de los métodos analíticos.

- . Media $\bar{x} = \Sigma x / n$
- . Desviación estándar $DE = \sqrt{[n(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2 / n(n-1)]}$
- . Coeficiente de variación $CV = (DE/\bar{x}) (100)$
- . Coeficiente de correlación
 $r = \sqrt{[(n(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y))^2 / (n(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2)(n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2)]}$
- . Coeficiente de determinación r^2
- . Pendiente $m = [n(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)] / [n(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2]$
- . Ordenada al origen $b = \Sigma y - m(\Sigma x) / n$
- . Error estándar de regresión $S_{y/x} = \sqrt{[\Sigma x^2 - m\Sigma xy - b\Sigma y] / (n-2)}$
- . Factor de confianza para (b)
 $FC = [t(0.975)] [S_{y/x}] [\sqrt{\Sigma xi^2 / n \Sigma (xi - \bar{x})^2}]$
- . Estadígrafo de contraste (b)
 $t = (b - b_0) / (S_{y/x}) (\sqrt{[\Sigma xi^2 / n \Sigma (xi - \bar{x})^2]})$
- . Intervalo de confianza al 95 % para (b)
 $IC = b - FC < b < b + FC$
- . Factor de confianza para (m)
 $FC = [t(0.975)] [S_{y/x} / DE(\sqrt{n-1})]$
- . Estadígrafo de confianza para (m)
 $t = (m - m_0) DE \sqrt{(n-1) / S_{y/x}}$

- . Intervalo de confianza (IC) al 95 % para (m)

$$IC = m - FC < M < m + C$$
- . Porcentaje recuperado

$$\% \text{ de recobro} = \text{mg adicionados} / \text{mg recuperados}$$
- . Coeficiente de variación $CV = (DE/x) 100$
- . Factor de confianza para la exactitud

$$FC = t (0.975) DE / \sqrt{n}$$
- . Estadígrafo de contraste para la exactitud

$$t = (x - \bar{x}) / (DE / \sqrt{n})$$
- . Intervalo de confianza al 95 % para la exactitud

$$x - FC < x < x + FC$$
- . Estadígrafo de contraste para la repetibilidad

$$X_i^2 = (n-1) DE^2 / \sigma^2$$
- . Estadígrafo de contraste para la estabilidad de la muestra analítica.

$$t^* = C(\text{comparaciones}), \text{ g.l.} = 2(C+1)$$
- . Intervalo de confianza para la estabilidad de la muestra analítica.

$$IC = \bar{x}_i + x_{ot} \pm \sqrt{[S_{pi}^2 (2/3)]}$$
- . Factor para la estabilidad de la muestra analítica.

$$I = \frac{\text{análisis muestra/condición/tiempo} (100)}{\text{análisis inicial}}$$
- . Media para el factor I $I = \Sigma I / N$
- . Intervalo para la repetibilidad de los métodos.

$$LSIC = \frac{DE_1^2}{DE_2^2} \times F ; \quad LIIC = \frac{DE_1^2}{DE_2^2} \times \frac{1}{F}$$
- $F = N-1$ con probabilidad de (0.975).

. Intervalo para la exactitud al 100 %.

$$DEP = \left[\frac{(N1-1) DE1^2 + (N2-1) DE2^2}{N1+N2 - 2} \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$LSIC = (R1-R2) + t \times DEP \times \frac{1}{n1} + \frac{1}{n2}$$

$$LIIC = (R1-R2) - t \times DEP \times \frac{1}{n1} + \frac{1}{n2}$$

t = N1+N2-2 con probabilidad de (0.975)

. Intervalo para la linealidad de los métodos (pendientes)

$$SE^2 = \frac{[\sum y1^2 - m1 \sum xy1 - b1 \sum y1] + [\sum y2^2 - m2 \sum xy2 - b2 \sum y2]}{t1n1 + t2n2 - 4}$$

$$S^2 dm = SE^2 \left[\frac{1}{\sum x1^2 - \frac{(\sum x1)^2}{n1t1}} + \frac{1}{\sum x2^2 - \frac{(\sum x2)^2}{n2t2}} \right]$$

$$LSIC/LIIC = (m1-m2) \pm t \times \sqrt{S^2 dm}$$

. Intervalo para la linealidad de los métodos (ordenadas)

$$S^2 do = S^2 E \left[\frac{1}{n1t1} + \frac{1}{n2t2} + \frac{(\sum x1)^2}{n1^2 t1^2 [\sum x1^2 - \frac{(\sum x1)^2}{n1t1}]} + \frac{(\sum x2)^2}{n2^2 t2^2 [\sum x2^2 - \frac{(\sum x2)^2}{n2t2}]} \right]$$

$$LSIC/LIIC = (b1-b2) \pm t \times \sqrt{S^2 do}$$

X. REFERENCIAS

1. Remington Pharmaceutical Sciences, 18 ed., Mack Publishing Co., U.S.A., (1990).
2. Hammond, S.M., Lambert, P.A., Antibiotics and Antimicrobial Action. The Camelot Press Ltd, Southampton, Great Britain, (1978).
3. Brock, T.D., Biología de los Microorganismos , Omega, S.A., Barcelona, (1976).
4. Sutherland, R., et. al., Antimicrobial Agents and Chemoterapy, 407 (1971).
5. The Merck Index, 11 th ed., U.S.A. (1994).
6. Toome, V., Hofman-La Roche, Private Communication.
7. Florey, K., Analitical Profiles of Drugs Substances, Academic Press, New York, (1972).
8. New, H.C., y Winsell, E.B., Antimicrobial Agents and Chemoterapy, 407 (1971).
9. Goodman, G., Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, ed. Médica Panamericana, México, (1986).
10. Hellman, J., Farmacotécnia Teórica y Práctica, 3a ed., Vol. VII, Edit. Continental, S.A. de C.V., México, (1982).
11. Remington, J., Farmacía, 17a. ed., Médica Panamericana, Buenos Aires, (1987).
12. Browing, D.R., Cromatografía, ed. Toray Massen, Barcelona, (1971).

13. Boulanger, P., Cromatographie Et Organique Biologique, ed. Masson et Cie., Paris, (1975).
14. Glaxiola, V., Cromatografía Principios y Técnicas, ed. El Manual Moderno, S.A., México, (1975).
15. Snyder, L., Introduction to Modern Liquid Chromatography, ed. John Willey and Sons, U.S.A., (1988).
16. Hamilton, R., Introduction to High Performance Liquid Chromatography, ed. John Willey and Sons, U.S.A., (1977).
17. Método Microbiológico y HPLC para determinar Amoxicilina en Tabletas, Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 15 (2), (1990).
18. Skoog, D., Fundamentos de Química Analítica, ed., Reverte S.A., México, (1981).
19. Ficarro, M., Validation of High Performance Liquid Chromatography and Gas Chromatography, Beckman Pharmaceutical Manufacturing, U.S.A., (1984).
20. Fischer, R., Compendio de Análisis Químico Cuantitativo, ed. Interamericana, México, (1981).

21. Keneth, C., Curso de Análisis Farmacéutico, ed. Reverte, Barcelona, (1981).
22. Martindale, The Extra Pharmacopeia, 28 Edition, The Pharmaceutical Press, New York, (1982).
23. Pranab, K., Analitical Profiles of Drug Substances, ed. Academic Press, (1988).
24. Smith, C., Textbook of Pharmacology, ed. Saunders Company, New York, (1992).
25. Un Acercamiento a la Validación de Métodos Analíticos, Pharma News, 1 (5), (1990).
26. Norma Técnica: Guias Generales de Validación, Dirección General de Control de Insumos para la Salud, Secretaria de Salud, México, (1988).
27. Daniel, W., Bioestadística Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud, ed. UTHEA, México, (1996)
28. Why Validation, Sterling drugs Inc., 67 (4), (1978).
29. Un Acercamiento a la Validación de Métodos Analíticos, Pharma News, 1 (6), (1990).

XI. GLOSARIO

X=	Promedio Aritmético del porcentaje recuperado
DE=	Desviación Estándar
CV=	Coefficiente de Variación
r=	Coefficiente de Correlación
r ² =	Coefficiente de Determinación
m=	Pendiente
b=	Ordenada de Origen
IC=	Intervalo de Confianza
bco=	Blanco
mta=	Muestra
star=	Estándar
ABC=	Area Bajo la Curva
R=	Porcentaje de Recobro
T.A.=	Temperatura Ambiente
LSIC=	Límite Superior del Intervalo de Confianza
LIIC=	Límite Inferior del Intervalo de Confianza
SE ² =	Varianza Error de Regresión
S ² dm=	Varianza de la Diferencia de la Pendiente
S ² do=	Varianza de la Diferencia de la Ordenada