

36
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA



DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

"DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO
ESPECTROFLUOROMETRICO PARA DETERMINAR
CLORHIDRATO DE CIPROFLOXACINA EN MATERIA
PRIMA Y PRODUCTO TERMINADO"

T E S I S TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A:

SONIA OVIEDO MORENO

DIRECTOR: M. EN C. BEATRIZ RAMIREZ MORA

ASESOR EXTERNO: Q. F. I. Guadalupe Rita Arenas Hernández

Cuahtitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1992



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.

Objetivos.....	1
General.....	1
Específicas.....	1
Introducción.....	3
Material y Equipo.....	11
Aparatos.....	11
Reactivos.....	12
Desarrollo Experimental.....	13
I.-Caracterización de la materia prima.....	13
II.-Desarrollo y Validación de método Espectrofluorométrico.....	13
III.-Aplicación del método.....	17
Resultados.....	22
I.- Caracterización de la materia prima.....	22
II.- Validación del método analítico.....	23
Linealidad del sistema.....	23
Límites de detección y cuantificación.....	28
Linealidad del método.....	29
Precisión del sistema.....	34
Precisión del método.....	35
Exactitud y repetibilidad del método al 100%.....	37

III.- Aplicacion del método.....	38
Resumen de resultados y criterios de aceptación.....	39
Discusión.....	46
Conclusiones.....	49
Anexo No.1.....	50
Anexo No.2.....	51
Apéndice.....	54
Procedimiento de calculo para evaluar Linealidad del sistema.....	54
Procedimiento de calculo para evaluar Linealidad del método.....	60
Procedimiento de calculo para evaluar Precisión del sistema.....	65
Procedimiento de calculo para evaluar Precisión del método.....	66
Procedimiento de calculo para evaluar Repetibilidad del método.....	69
Procedimiento de calculo para evaluar Exactitud del método.....	71
Bibliografía.....	74

OBJETIVOS:

GENERAL:

Desarrollar y validar un método alternativo al método oficial, utilizando para ello la fluorescencia nativa del Clorhidrato de Ciprofloxacina [33] y empleando la Espectrofluorometría [4,7,8,40,41] para la determinación de este antibiótico con precisión, exactitud y especificidad.

ESPECIFICOS:

1. Caracterizar la materia prima de acuerdo a la norma oficial existente (La Farmacopea de los Estados Unidos XXII 1er. Suplemento).

2. Determinar si las propiedades medidas en la caracterización están dentro de los límites de la norma oficial.

3. Encontrar las condiciones óptimas para la cuantificación por el método Espectrofluorométrico y para ello se hará lo siguiente:

3.1. Detectar el Clorhidrato de Ciprofloxacina a concentraciones elevadas (5 a 10 $\mu\text{g/ml}$) para saber si hay respuesta analítica.

3.2. Una vez detectada, obtener la concentración óptima desde el punto de vista de procedimiento, instrumental y gráfico.

4. Llevar a cabo la validación del método según documentos oficiales de La Farmacopea de los Estados Unidos XXII y La Organización Mundial de la Salud que establecen los siguientes parámetros de validación:

4.1. Verificar la linealidad del método desarrollado y propuesto: Linealidad en el sistema (incluyendo factores tales como equipo, condiciones instrumentales, procedimiento y estándar). Linealidad del método en sí (incluyendo factores tales como equipo, condiciones instrumentales, procedimiento y muestra).

- 4.2. Determinar la precisión del método:
 - 4.2.1. Repetibilidad.
 - 4.2.2. Reproducibilidad entre días.
 - 4.2.3. Reproducibilidad entre analistas.
- 4.3. Determinar la exactitud del método.
- 4.4. Dejar establecido la especificidad del método.
- 4.5. Determinar la sensibilidad y el límite de detección.
- 4.6. Analizar los resultados de los puntos anteriores de manera estadística.
- 4.7. Establecer conforme a los resultados estadísticos el grado de confiabilidad, las ventajas y limitaciones que ofrezca este método propuesto.

INTRODUCCION:

Después de la obtención y estudio del ácido nalidixico por más de veinte años, diversos compuestos relacionados químicamente fueron sintetizados para obtener nuevos agentes quimioterapéuticos con mejores propiedades farmacocinéticas y farmacológicas [9,12,20,28,30-32]. Dentro del grupo de las fluoroquinolonas fue sintetizado en 1983 por Bayer en la República Federal Alemana un nuevo tipo de antibiótico oral eficaz contra microorganismos Gram negativos que incluye a las Enterobacteriaceae, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia rettgeri*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Hemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*; presenta actividad moderada contra *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (incluso las cepas resistentes a la metilina), *Streptococcus*, *Ureaplasma urealyticum*. Su actividad antimicrobiana incluye a los microorganismos resistentes a las penicilinas, a las cefalosporinas y a los aminoglucósidos. La potencia "in vitro" de la Ciprofloxacina es de 4 a 8 veces mayor a la reportada con las otras quinolonas en la mayoría de los patógenos probados. Su principal ventaja es que permite el tratamiento oral de enfermedades como la osteomielitis, que antes requería la hospitalización para la administración de antibacteriales parenterales [1,2,5,9-18,20-32]. La Ciprofloxacina usualmente tiene acción bactericida, el mecanismo de acción del fármaco no ha sido esclarecido, al igual que las otras quinolonas inhibe a la enzima DNA girasa bacteriana (Topoisomerasa de tipo II), la replicación del DNA en la división celular se detiene,

probablemente la célula bacteriana evita copiar el DNA dañado para las generaciones subsiguientes, por lo que no es sorprendente que el fármaco mate a la bacteria [2,5,12,17,20,24,29-32]. Alcanza concentraciones séricas eficaces de 3-5 µg/ml después de una sola dosis de 500 mg, se distribuye ampliamente en tejidos y fluidos del cuerpo, generalmente se encuentra a elevadas concentraciones en bilis, ríñón, útero, fluido seminal, amígdalas, endometrio, trompas de Falopio y ovarios. En la mayoría de estos tejidos y fluidos las concentraciones alcanzadas son mayores que las séricas. El fármaco también se distribuye en tejido óseo, líquido extracelular, esputo, saliva, secreción nasal, músculo, tejido adiposo, cartilago. Es concentrada dentro de neutrófilos y las concentraciones promedio en estas células pueden ser de 2 hasta 7 veces mayores a las concentraciones extracelulares, sin embargo no muestra influencia en la quimotaxis, fagocitosis o función bactericida de granulocitos "in vivo", pero en concentraciones subinhibitorias de el fármaco se ha observado que puede hacer que la bacteria sea más susceptible para la fagocitosis y morir. El tiempo de vida de eliminación para adultos sanos es de 3 a 5 horas, su tiempo de distribución promedio es de 0.18-0.37 horas. Es parcialmente metabolizada en el hígado por modificación del grupo piperazino de su estructura química en al menos cuatro metabolitos, la Ciprofloxacina y sus metabolitos son excretados en orina y heces. El fármaco es excretado sin cambio en orina por filtración glomerular y secreción tubular, los metabolitos identificados como: Desetilciprofloxacina, Sulfociprofloxacina, Oxociprofloxacina y N-formilciprofloxacina son excretados en orina en los siguientes porcentajes 1-2%, 3-8%, 3-8% y menor al 1% de la dosis total, respectivamente. Los metabolitos tienen actividad

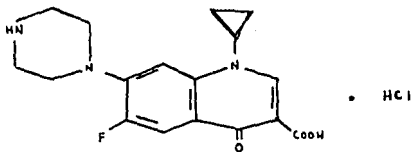
antibacteriana que aparentemente es menor a la Ciprofloxacina pero puede ser similar o mayor que la de algunos fármacos [5,9,12,17,20,24,28-31]. El fármaco es utilizado en adultos para el tratamiento de infecciones de las vías urinarias, de los huesos y de las articulaciones, de la piel, de los tejidos blandos, de las vías respiratorias, así como para infecciones gastrointestinales, la gonorrea, la quimioprofilaxis en pacientes neutropénicos y otras aplicaciones [17,22,30]. Su dosificación en fibrosis quística es de 750 mg cada 12 horas, para gonorrea una sola dosis de 250 mg, en infección intestinal 500 mg cada 12 horas durante 5 días, osteomielitis 750 mg cada 12 horas, infecciones de las vías respiratorias y de los tejidos blandos 750 mg cada 12 horas, infecciones de las vías urinarias 250-500 mg cada 12 horas. El tratamiento con Ciprofloxacina suele administrarse durante 7-14 días o más en infecciones severas. Los efectos colaterales de el fármaco son relativamente raros. La náusea, el vómito o la diarrea puede ocurrir hasta en 5% de los pacientes; los efectos adversos del Sistema Nervioso Central como agitación, mareo y temblor en 1 a 2% y las reacciones alérgicas prurito o eritema en 1 o 2%. Pueden ocurrir elevaciones transitorias de las transaminasas, pero son reversibles al suspender el medicamento [17]. La Ciprofloxacina esta comercialmente disponible para la administración oral como Clorhidrato de Ciprofloxacina Monohidratada. Para la caracterización fisicoquímica de este antibiótico en materia prima se recurrio de la Química Analítica la cual puede definirse como la ciencia y el arte de determinar la composición y cantidad de materiales en términos de los elementos o compuestos que ellos contengan. Históricamente, el desarrollo de métodos analíticos no ha sido concluido debido a la

introducción de nuevos instrumentos de medición. Los primeros análisis cuantitativos fueron gravimétricos y volumétricos; siendo posibles por la intervención de balanzas precisas y material de vidrio cuidadosamente calibrados. En las últimas décadas del siglo XIX con la invención de la Espectroscopía se logra un aprovechamiento analítico fructífero. Gradualmente pocos métodos Colorimétricos fueron introducidos, después se establecieron mediciones eléctricas que podían ser detectadas en titulaciones. Por el año de 1930, el rápido desarrollo de tubos fotoeléctricos, amplificadores y más reciente de transistores y otros artificios, dieron como resultado el establecimiento de muchas técnicas analíticas [8,19]. En base a las propiedades físicas y químicas de un elemento en particular o compuesto pueden seleccionarse las técnicas y métodos para su análisis. En el ámbito farmacéutico existen documentos oficiales que indican los métodos y técnicas a utilizar para el análisis físico-químico de los fármacos en materia prima y producto terminado. Para la caracterización del Clorhidrato de Ciprofloxacina en materia prima en este trabajo, se emplean métodos Gravimétricos, Volumétricos, Espectrofotométricos Infra-rojo, Ultravioleta, y por Cromatografía en Capa Fina para su identificación; y para su ensayo se emplea la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución según La Farmacopea de los Estados Unidos XXII [4,7,8,19,33]. Los métodos utilizados para su cuantificación en muestras biológicas reportados incluyen Microbiológicos [10,11], Polarográficos [26], Cromatográficos como Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución [1,10,11,15,16,23,27] y en formulaciones farmacéuticas el único reportado es el Espectrofotométrico Ultravioleta [14].

Debido a que el método "Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución" que establece La Farmacopea de los Estados Unidos XXII 1er. Suplemento es un método de alto costo y que requiere de mayor tiempo; se propone como alternativa un método Espectrofluorométrico para la cuantificación del Clorhidrato de Ciprofloxacina en materia prima y producto terminado, siendo el objetivo principal de este trabajo el desarrollo y validación del mismo, según los documentos oficiales de La Organización Mundial de la Salud y La Farmacopea de los Estados Unidos XXII para ser aplicado en la Industria, dentro de un Laboratorio Oficial de Control o ya sea como una proposición para ser incluido en la Farmacopea Nacional. Por otra parte la validación del método alternativo nos dará los límites de linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad y especificidad de las muestras en estudio.

La elección de la tecnología empleada se basa en las características propias de la molécula:

Clorhidrato de Ciprofloxacina



C₁₇ H₁₈ F N₃ O₃ HCl

P.M.367.81

por ser aromática, heterocíclica, rígida, altamente conjugada y además poseer un grupo fluor; tiene como propiedad ser altamente fluorescente, por lo que se recurrió a la Espectrofluorometría que

dada su instrumentación es una técnica que tiene una sensibilidad en el orden de nanogramos; así la combinación de las características de la molécula con las características de la tecnología dan como resultado un método altamente sensible que requiere de cantidades muy pequeñas del antibiótico para realizar su determinación [4,7,8,40,41].

Esta determinación como todas las determinaciones analíticas son medida de alguna propiedad de la molécula en estudio, en este caso específico es la medida de la fluorescencia ante una concentración fija del Clorhidrato de Ciprofloxacina, por lo que esta medida esta sujeta a error que es estimado a través del proceso de validación.

La validación de los métodos analíticos hoy en día es uno de los principales objetivos de la Industria Farmacéutica, Alimenticia y Química que asegura un adecuado control de la calidad tanto de la materia prima, producto en proceso, como del producto terminado y comprende una serie de pruebas sistemáticas por las cuales queda establecido de manera clara y objetiva, que el método de estudio reúne los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

Dichas pruebas consisten en evaluar las siguientes propiedades estadísticas de ejecución [21,33-38], conforme a los criterios de aceptación:

Linealidad del sistema.

Linealidad del método.

Precisión:

a) *Repetibilidad.*

b) *Reproducibilidad.*

Exactitud.

Límite de detección.

Límite de cuantificación.

Especificidad.

A continuación se define a cada propiedad estadística de ejecución:

Linealidad del sistema:

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

Linealidad del método:

Es la relación que se establece mediante una recta, entre una propiedad medible (cantidad de fármaco recuperado) y el valor real de la propiedad (cantidad de fármaco adicionado).

Precisión:

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa 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 normales de operación:

a) *Repetibilidad*, es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre las determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos aparatos y

técnicas. b) *Reproducibilidad*, es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo laboratorio utilizando el mismo equipo.

Exactitud:

Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia empleando para ello un estándar primario.

Límite de detección:

Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

Límite de cuantificación:

Es la menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

Especificidad:

Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida unicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

El método Espectrofluorométrico desarrollado deberá cumplir con las propiedades arriba señaladas para la aplicación analítica deseada.

MATERIAL Y EQUIPO:

APARATOS:

- * Balanza Analítica Sartorius 1602 MP.
- * Balanza Analítica Sauter.
- * Microbalanza Sartorius 4503 Micro.
- * Ultrasonido.
- * Mufla Thermolyne Modelo F-C1525.
- * Estufa.
- * Rayador para placas de cromatografía Shandon.
- * Revelador Ultravioleta para placas cromatográficas Products, Inc. W.H. Curtin and Co.
- * Potenciómetro Metrohm Herison E 536.
- * Espectrofotómetro Ultravioleta/Visible Perkin Elmer Lambda 2.
- * Espectrofotómetro Infra-rojo Pye Unicam SP 2000.
- * Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Varian 5000.
- * Espectrofluorómetro Aminco Bowman Cat. No. 4-8202.

Intruccion No. 768-E equipado con:

- Registrador Modelo 301 x-y Cat. No. 1620-814.
- Papel registrador Cat. No. 4-8286 registra valores x-y de Aminco graduado con 100 divisiones (vertical) y desde 200-800 nm en el eje horizontal 8 1/2 X 11 pulgadas, caja de 100 hojas.
- Osciloscopio, Cat. No. 4-8178. Su alcance es graduado con intervalo de λ de 200-600 $m\mu$ en eje horizontal.
- Osciloscopio y Camara (Analab) Cat. No. 1608-814 Tipo 1100/700.
- Lámpara de Xenón.
- Monocromadores para λ de excitación y λ de emisión de 200-800 nm.

- Microfotometro fotomultiplicador.
- Celda de vidrio para muestra de 1.0 cm X 3.0 cm.
- Cromato Vue Fluorescence Analysis
Cabinet Ultraviolet Products Model C-5 con lámparas ultravioleta de longitud de onda corta Angstrom 2537 y de longitud de onda larga Angstrom 3650.

REACTIVOS:

- Clorhidrato de Ciprofloxacina sustancia de referencia.
- Clorhidrato de Ciprofloxacina Materia Prima.
- Ciprofloxacina en cápsulas de 250 mg.
- Agua destilada.
- Agua deionizada.
- Hidróxido de amonio Grado Analítico (G.A.).
- Bromuro de potasio.
- Cloruro de metileno.
- Metanol G.A.
- Metanol para Cromatografía.
- Acetonitrilo para Cromatografía.
- Nitrato de plata G.A.
- Karl-Fisher G.A.
- Acido Sulfúrico G.A.
- Acido Acético G.A.
- Acido Nítrico G.A.
- Acido Clorhídrico G.A.
- Acido Fosfórico G.A.

DESARROLLO EXPERIMENTAL:

La parte experimental se divide en las siguientes etapas:

- I.- Caracterización de la materia prima.
- II.- Desarrollo y Validación del método.
- III.- Aplicación del método en producto terminado.

I.- CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA:

La materia prima fue analizada de acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos Americanos 1er. Suplemento teniendo como material de referencia un estándar primario del antibiótico, una vez caracterizada y cumpliendo la misma con las especificaciones oficiales y presentando propiedades semejantes a las del estándar primario (ver Anexo 1); se empleo esta materia prima para realizar el desarrollo y validación del método propuesto, eliminando así posibles fuentes de error en los resultados de la validación.

II.- DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFLUOROMÉTRICO:

Debido a que el método reportado [33] "Cromatografía de Líquidos a Alta Resolución", empleado para la determinación del Clorhidrato de Ciprofloxacina consiste, en el uso de un Cromatografo de Líquidos de Alta Resolución equipado con una columna C₁₈ (octadecil) con tamaño de partícula de 5-10 μ , de 0.5 mm de diámetro interno y 25 cm de longitud a una temperatura de 30 °C y empleando una fase móvil compuesta de acetonitrilo-acido fosfórico 0.0025M a pH 3.0 \pm 1 en una proporción de (87:13) a una velocidad de flujo de 1.5 ml/min, realizando la detección a una longitud de onda de 278 nm empleando para ello un detector ultravioleta de longitud de onda variable. Así

mismo la preparación de la solución de referencia y de la solución de la muestra es de la siguiente forma: Solución de referencia.- Disolver la cantidad necesaria del Clorhidrato de Ciprofloxacina en fase móvil para obtener una solución de concentración igual a 0.5 mg/ml. Solución de la muestra.- Transferir 25 mg del Clorhidrato de Ciprofloxacina a un matraz volumétrico de 50 ml disolver y aforar con fase móvil.

Procedimiento: Inyectar por separado volúmenes iguales (10 μ l) de la solución de referencia y de la muestra al Cromatógrafo, medir las respuestas de los principales picos registrados. Calcular la cantidad, en mg de C₁₇ H₁₈ F N₃ O₃ HCl empleando la siguiente fórmula:

$$(367.81/385.82) (50C) (r_u/r_r)$$

donde:

367.81 y 385.82 son los pesos moleculares del Clorhidrato de Ciprofloxacina anhidra y el Clorhidrato de Ciprofloxacina monohidratada, respectivamente.

C, es la concentración en mg/ml de la solución de referencia. r_r y r_u, son las áreas de los cromatogramas del antibiótico para la solución de referencia y la muestra, respectivamente.

Como se puede ver es un método de alto costo y que requiere de mayor tiempo por lo que se propone en este trabajo un método alternativo para la determinación del Clorhidrato de Ciprofloxacina, así fue que para ello se pensó en los siguientes factores y en una secuencia de pasos para desarrollar y validar el método por Espectrofluorometría :

1) Las características propias de la molécula. heterocíclica, la cual

es altamente conjugada, aromática, rígida y posee un grupo fluor, todo lo expuesto son las características propias de un compuesto fluorescente es decir si a este compuesto se le somete a la acción de la luz este absorbe energía radiante, sus electrones se excitan pasando de un nivel basal a niveles energéticos excitados, por regla general los electrones regresan a su estado normal la energía absorbida se vuelve a emitir en forma de luz, si la emisión es rápida (por lo general 10^{-8} seg) al fenómeno se le llama fluorescencia.

1.1) Se disolvió la materia prima en metanol y se observó si era o no fluorescente bajo la luz ultravioleta de longitud de onda corta y larga usando para este propósito el gabinete de análisis de fluorescencia "Cromato Vue".

2) Se determinó el disolvente más adecuado para la cuantificación; siendo la elección en términos de solubilidad, no interferencia y costo. Se probaron los siguientes solventes: agua, etanol, cloroformo y benceno; resultando el agua el más apropiado.

3) Se procedió a obtener el espectro de absorción para tener una aproximación de la longitud de onda de excitación empleando para ello un Espectrofotómetro UV-Visible Lambda 2.

Así de esta forma para medir la fluorescencia se recurrió a la técnica analítica de Espectrofluorometría que a diferencia del método oficial y dadas las condiciones del tratamiento de la muestra se perfilaba un procedimiento muy sencillo, rápido, de bajo costo y dada la técnica y la instrumentación muy sensible (en el orden de nanogramos).

4) Por lo que se procedio a continuacion a calibrar el equipo siguiendo las rutinas de diagnóstico (Ver Anexo 2), colocando el instrumento en las condiciones establecidas que adelante se señalan y empleando una solución de sulfato de quinina en H_2SO_4 0.1 N a la concentración $1 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Una vez calibrado el equipo se tiene la certeza que todas sus partes y funciones desde la lámpara de Xenón, el barrido de longitud de onda de los monocromadores de excitación y de emisión, la sensibilidad, la escala de amplificación de la respuesta, el detector; así como las funciones del graficador se encontraban en óptimas condiciones, dado que el espectro de emisión de la quinina así lo demostro al obtenerse un espectro de emisión a la longitud de onda esperada y a la longitud de onda de excitación fijada así como también la magnitud de la respuesta.

5) Calibrado del equipo se procedio a hacer la detección de la muestra preparando soluciones del antibiótico en agua destilada a concentraciones elevadas ($5-10 \mu\text{g}/\text{ml}$) haciendo el barrido de excitación y de emisión para establecer las longitudes de onda correspondientes. Posteriormente se determino la concentración óptima para la cuantificación de la emisión de fluorescencia, esto desde el punto de vista de procedimiento, instrumental y gráfico; es decir peso y diluciones adecuadas, sensibilidades y escala de amplificación no extremas y la magnitud de la respuesta centrada, dentro de las dimensiones (de 0 - 100 divisiones) de la escala de emisión; resultando ser de $2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$. Debido a que en muchos casos la intensidad de fluorescencia es afectada por el pH, sustancias

activadoras que la aumentan, agentes depresores que disminuyen el fenómeno y la temperatura, controlamos este último parámetro.

Establecidas las condiciones instrumentales que adelante se señalan y de procedimiento se continuo con la validación del método desarrollado, dicha validación cuenta con la evaluación de las propiedades estadísticas de ejecución fundamentales y necesarias para llevarla a cabo.

III.- APLICACION DEL METODO:

Al encontrar que el método desarrollado es sencillo, rápido, lineal, exacto, preciso y altamente sensible dado el rango de concentraciones manejadas (1 a 3 $\mu\text{g/ml}$) se procedio a hacer una aplicación del mismo en producto terminado cápsulas de Clorhidrato de Ciprofloxacina de 250 mg.

Solución de referencia:

Preparar una solución de referencia de Clorhidrato de Ciprofloxacina en agua destilada que contenga 2 $\mu\text{g/ml}$.

CONDICIONES INSTRUMENTALES:

Lámpara:	Xenón.
Arreglo:	No.3 (Ver Anexo 2)
Lambda de excitación:	324 nm.
Sensitividad:	5.0 microlumens/metro (Ver Anexo 2)
Factor de Multiplicación	0.03 (Ver Anexo 2)
Temperatura:	25 °C.

Procedimiento:

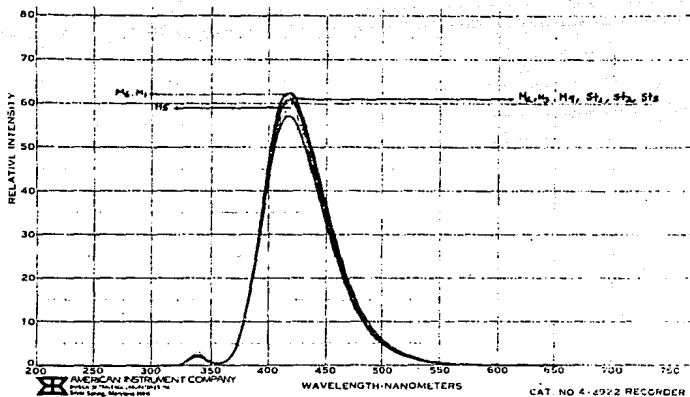
Tratamiento de la materia prima:

Pesar con exactitud 20.0 mg del Clorhidrato de Ciprofloxacina y disolverlo en 200.0 ml de agua destilada en el ultrasonido durante 15 minutos, con pipeta volumétrica medir 2.0 ml de la solución, transferirlos a un matraz volumétrico de 100.0 ml y llevar a volumen con agua destilada.

Tratamiento del producto terminado:

Determinar el peso promedio de 20 cápsulas, vaciar su contenido. Pesar la cantidad de polvo equivalente a 20.0 mg del Clorhidrato de Ciprofloxacina y seguir su tratamiento como se indica para materia prima.

Leer en el Espectrofluorómetro, colocado en las condiciones instrumentales que se describen, alicuotas del sextuplicado de la solución de la muestra y alternar con alicuotas del triplicado de la solución de referencia.



Gráfica Típica " Espectrograma de emisión de Fluorescencia del
 Clorhidrato de Ciprofloxacina ".

Determinaciones:

Los lineamientos y criterios de aceptación están basados en el sistema de validación propuesto por el experto en Estadística de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, G.F.B. Alejandro Alcantara [37].

Linealidad del sistema Se determina construyendo una curva de calibración de una misma solución de referencia utilizando las siguientes diluciones 1.0, 2.0 y 3.0 $\mu\text{g/ml}$; haciendo el análisis por triplicado para cada dilución.

Precisión del sistema Realizar el análisis por sextuplicado de una misma solución de referencia correspondiente al 100% (2.0 $\mu\text{g/ml}$).

Linealidad del método Se determina con placebos cargados del principio activo (Estándar 50% + Materia prima 50%) cada uno de manera independiente a las siguientes concentraciones 1.0, 2.0 y 3.0 $\mu\text{g/ml}$, haciendo los análisis por triplicado para cada concentración.

Precisión del método (Reproducibilidad) al 100%. - Se realiza con dos analistas en dos días diferentes por sextuplicado cada muestra, trabajando de manera independiente con la concentración de 2.0 $\mu\text{g/ml}$.

Exactitud y Repetibilidad al 100%. - Analizar 6 placebos cargados con el 100% del principio activo (Estándar 50% + Muestra 50%) a la concentración de 2.0 $\mu\text{g/ml}$, de manera independiente, por el mismo analista y en las mismas condiciones de operación.

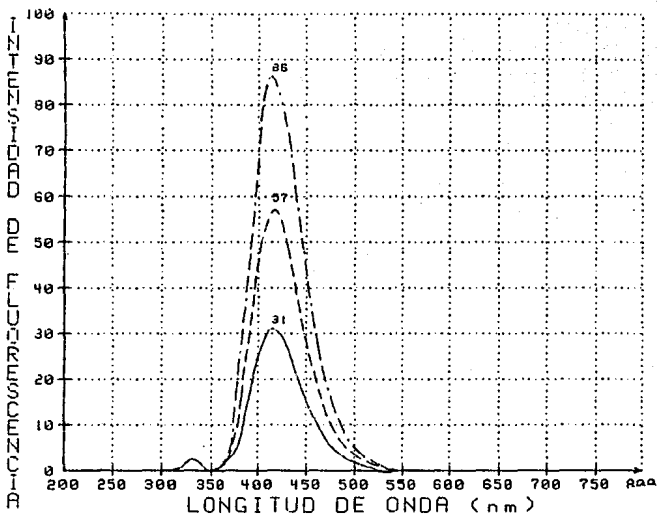
RESULTADOS:

I.- CARACTERIZACION DE LA MATERIA PRIMA (Ver Anexo 1).

II.- VALIDACION DEL METODO ANALITICO.

Linealidad del sistema.

La gráfica No.1 muestra los espectrogramas de fluorescencia del Clorhidrato de Ciprofloxacina a las concentraciones de 1.0, 2.0 y 3.0 $\mu\text{g/ml}$.



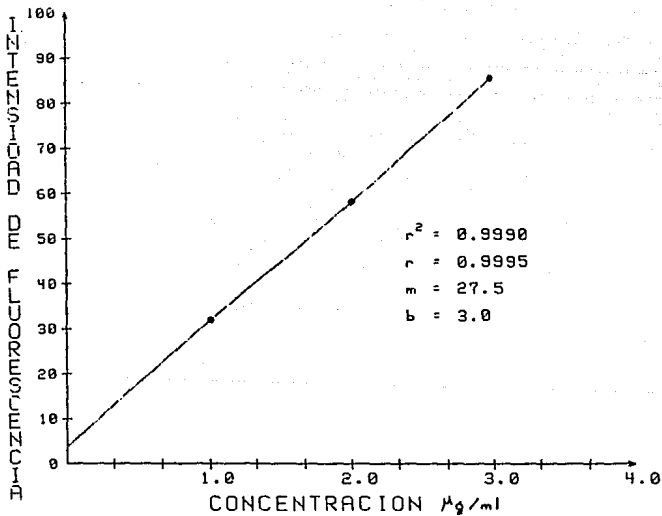
Gráfica No. 1

Linealidad del sistema.

CONCENTRACION ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	NÚMERO DE DETERMINACIONES	INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA
1.0	1	31.0
	2	31.0
	3	31.0
2.0	1	57.0
	2	57.0
	3	57.0
3.0	1	86.0
	2	86.0
	3	86.0

Tabla No.I Intensidades de fluorescencia obtenidas para cada concentración.

La gráfica No. II muestra la relación lineal simple entre la concentración y la intensidad de fluorescencia del Clorhidrato de Ciprofloxacina estándar.



Intervalo de linealidad de 1.0 - 3.0 $\mu\text{g/ml}$.

Gráfica II

Linealidad del sistema

Prueba del intercepto

Hipótesis nula $H_0: \beta = 0$

Hipótesis alterna $H_1: \beta \neq 0$

$t_{\text{experimental}} = 4.2425$

$t_{(0.975;1)} = 12.706$

$H_0: \beta = 0$ No se rechaza.

Intercepto relativo

$$\text{I.R.} = \frac{b}{\bar{y}}$$

$\text{I.R.} = 0.0517$

Intervalo de confianza para la ordenada al origen (b):

$$-5.9845 < 3.0 < 11.9884$$

Linealidad del sistema.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F _{experimental} .
Regresion	1	4537.5	4537.5	7058.3333
Error de regresion	7	4.5	0.6428	
Falta de ajuste	1	4.5	4.5	No determinada.
Error puro	6	0.0	0.0	

$F_{\text{experimental}} (7058.3333) > F_{\text{critica}} (12.25)$

Tabla No. II Resultados estadísticos del Análisis de la Varianza (ANAVEA) para esta linealidad.

Límites de detección y de cuantificación:

Clorhidrato de Ciprofloxacina materia prima.

CONCENTRACION ($\mu\text{g/ml}$)	NÚMERO DE DETERMINACIONES	INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA
0.1	1	3.0
	2	3.0
	3	3.0
0.05	1	2.0
	2	2.0
	3	2.0
0.025	1	1.0
	2	1.0
	3	1.0
Blancos	1	0.0
	2	0.0
	3	0.0

Tabla VI. Intensidades de fluorescencia reportadas para cada concentración empleada para determinar el límite de detección y el límite de cuantificación.

Límite de detección = $\sigma * t_{(n-1; 0.95)}$ [21,38].

Límite de cuantificación = $\sigma * t_{(n-1; 0.99)}$ [21,38].

donde:

σ = Desviación estándar de "n" replicaciones de los blancos.

$t_{(2, 0.95)}$ = 2.920

$t_{(2, 0.99)}$ = 6.965

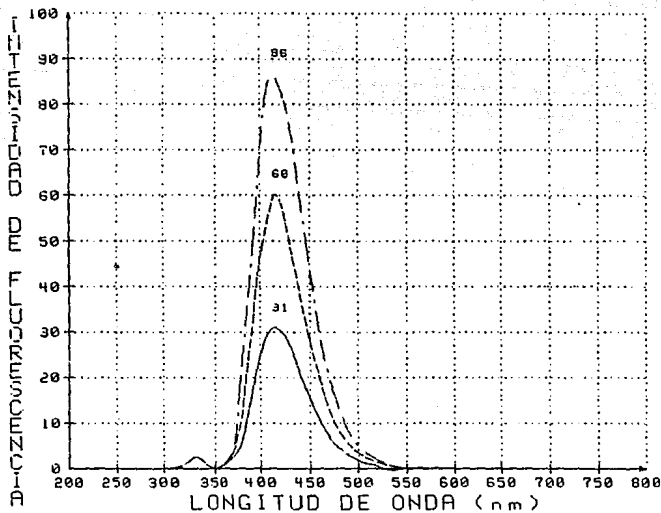
σ = 0.0

Límite de detección = $(2.920)(0.0) = 0.0$

Límite de cuantificación = $(6.965)(0.0) = 0.0$

Linealidad del método.

La gráfica No. III muestra los espectrogramas de fluorescencia del Clorhidrato de Ciprofloxacina materia prima a las concentraciones de 1.0, 2.0 y 3.0 $\mu\text{g/ml}$.



Gráfica No. III

Linealidad del método.

CONCENTRACION ($\mu\text{g}/\text{m}$)	NÚMERO DE DETERMINACIONES	INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA
1.0	1	31.0
	2	31.0
	3	31.0
2.0	1	60.0
	2	60.0
	3	60.0
3.0	1	86.0
	2	86.0
	3	86.0
Estándar 2.0	1	60.0
	3	60.0
	2	60.0

Tabla No. III Intensidades de fluorescencia obtenidas para cada concentración.

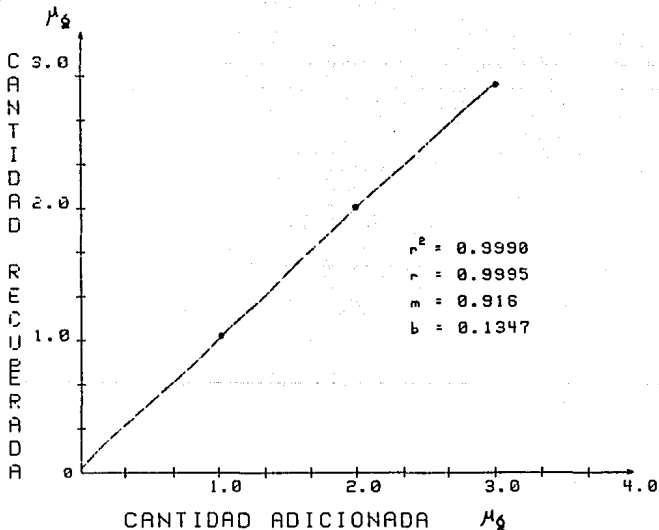
Linealidad del metodo.

Clorhidrato de Ciprofloxacina materia prima.

CANTIDAD ADICIONADA (μg)	CANTIDAD RECUPERADA (μg)
1.0	1.034
2.0	2.0
3.0	2.866

Tabla No. IV Cantidad recuperada de placebos cargados del antibiotico.

La gráfica No. IV muestra la relación lineal simple entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada del Clorhidrato de Ciprofloxacina materia prima.



Intervalo de linealidad 1.0 - 3.0 $\mu\text{g/ml}$.

Gráfica No. IV

Linealidad del método.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Experimental.
Regresion	1	5.03434	5.03434	7048.0706
Error de regresión	7	4.9×10^{-2}	7.14×10^{-4}	
Falta de ajuste	1	4.9×10^{-2}	4.9×10^{-4}	No determinada.
Error puro	6	0.0	0.0	

$F_{\text{experimental}} (7048.0706) > F_{\text{critica}} (12.25)$.

Tabla No. V Resultados estadísticos del Análisis de Varianza (ANADVA) para esta linealidad.

Precisión del sistema:

Clorhidrato de Ciprofloxacina Solución de referencia (2.0 µg/ml).

NUMERO DE DETERMINACION	INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA
1	63.0
2	62.0
3	63.0
4	64.0
5	62.0
6	62.0

Tabla VII. Intensidades de fluorescencia obtenidas para la concentración del 100% .

Coefficiente de Variación (CV)

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

$$CV = 1.30\%$$

Precisión del método:

Clorhidrato de Ciprofloxacina en materia prima (2.0 µg/ml), resultados expresados en porcentaje de recobro.

A N A L I S T A			
	I	II	
D	I	100.0%	97.7%
		102.3%	100.0%
		97.7%	100.0%
		97.7%	97.7%
		100.0%	97.7%
		100.0%	102.3%
A	II	97.7%	97.7%
		100.0%	100.0%
		100.0%	97.7%
		100.0%	100.0%
		97.7%	100.0%
		100.0%	100.0%

Tabla No. VIII. Porcentajes de recobro del Clorhidrato de Ciprofloxacina obtenidos por dos analistas en dos días diferentes.

Precisión del método:

Clorhidrato de Ciprofloxacina materia prima (2.0 µg/ml).
Análisis de Varianza (ANADEVA).

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F _{experimental}	F _{crítico}
Analista	1	0.2204	0.2204	1.0000	18.51
Día	2	0.4409	0.2204	0.0943	3.49
Error	20	46.7283	2.3364		

Tabla IX. Análisis de Varianza (ANADEVA) para evaluar la precisión del método en materia prima.

F_{a experimental} (1.0000) < F_{a crítica} (18.51).

F_{d experimental} (0.0943) < F_{d crítica} (3.49).

Coefficiente de Varianza Total (CV_t)

$$CV_t = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

$$CV_t = 1.44\%$$

Exactitud y repetibilidad del método al 100%.

Clorhidrato de Ciprofloxacina en materia prima (2.0 µg/ml).

NUMERO DE DETERMINACION	PORCENTAJE DE RECOBRO (%)
1	101.6
2	100.0
3	100.0
4	100.0
5	96.7
6	101.6

Tabla No.X Porcentajes de recobro del antibiótico en materia prima.

Porcentaje de recobro promedio $\bar{x} = 99.98$

Prueba de "t Student".

Hipótesis nula $H_0: \bar{x} = 100.0\%$

Hipótesis alterna $H_1: \bar{x} \neq 100.0\%$

t experimental = -0.0228

t tablas ($\alpha = 0.05$) = 2.5706

$H_0: \bar{x} = 100.0\%$ No se rechaza.

Intervalo de confianza para el porcentaje de recobro:

98.10% < 99.98% < 101.86%

Coficiente de Variación (CV):

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

CV = 1.79%

III.- APLICACION DEL METODO:

Clorhidrato de Ciprofloxacina en producto terminado (2.0 µg/ml).

Tabla No. XI

NUMERO DE DETERMINACION	PORCENTAJE DE RECUBRO (%)
1	100.0
2	100.0
3	100.0
4	102.5
5	102.5
6	100.0

Tabla XI. Porcentajes de recobro del antibiotico en producto terminado.

Porcentaje de recobro promedio \bar{x} = 100.83

Prueba de "t Student".

Hipótesis nula $H_0: \bar{x} = 100.0\%$

Hipótesis alterna $H_1: \bar{x} \neq 100.0\%$

t experimental = 1.5811

t (α = 0.05) = 2.5706

$H_0: \bar{x} = 100.0\%$ No se rechaza.

Intervalo de confianza para el porcentaje de recobro:

99.48% - 100.83% : 102.18%

Coficiente de Variacion (CV):

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

CV = 1.28%

RESUMEN DE RESULTADOS Y CRITERIOS DE ACEPTACION:

1.- Validación del método Espectrofluorométrico.

Linealidad del sistema.

Concentración del Clorhidrato de Ciprofloxacina estándar contra Intensidad de fluorescencia.

Resultados:

1.- $r^2 = 0.9990$

2.- $r = 0.9995$

3.- $b = 3.0$

4.- La ordenada pasa por el origen $H_0: \beta = 0$ no se rechaza dado que $t_{\text{experimental}} (4.2425) < t_{\alpha, 975; 1} (12.706)$.

5.- Intercepción relativa = 0.0517

6.- Intervalo de confianza para la ordenada al origen (b):
 $-5.9845 < 3.0 < 11.9884$

7.- Existe una relación altamente significativa entre la concentración del Clorhidrato de Ciprofloxacina estándar y la Intensidad de fluorescencia.

$$F_{\text{experimental}} (7058.3333) > F_{\text{critica}} (12.25)$$

8.- La falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada-propiedad medida no es determinada.

Criterios de aceptación:

1.- $r^2 \geq 0.98$, 2.- $r \geq 0.99$, 3.- $b \approx 0$

4.- Prueba del intercepto nulo:

Hipotesis nula $H_0: \beta = 0$

Hipotesis alterna $H_1: \beta \neq 0$

Si $t_{\text{experimental}} < t_{n-2; 0.025}$ no se rechaza H_0 la ordenada pasa por el origen.

Si $t_{\text{experimental}} > t_{n-2; 0.025}$ se rechaza H_0 la ordenada no pasa por el origen.

5.- El intercepto relativo debe ser menor a 10.2

6.- El intercepto debe encontrarse dentro del intervalo de confianza para la ordenada al origen.

7.- Existe una relación altamente significativa entre la cantidad y la propiedad medida cuando:

$$F_{\text{regresión}} > F_{\text{crítica}} (gl_r, gl_e; 0.01)$$

No existe una relación altamente significativa entre la cantidad y la propiedad medida cuando:

$$F_{\text{regresión}} < F_{\text{crítica}} (gl_r, gl_e; 0.01)$$

8.- La falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada propiedad medida no debe ser estadísticamente significativa cuando:

$$F_{\text{falta de ajuste}} < F_{\text{crítica}} (gl_r, gl_e; 0.05)$$

La falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada - propiedad medida es estadísticamente significativa cuando:

$$F \text{ falta de ajuste} > F_{(gl_r, gl_e; 0.05)}$$

Linealidad del método.

Cantidad adicionada contra Cantidad recuperada del Clorhidrato de Ciprofloxacina materia prima.

Resultados:

1.- $r^2 = 0.9990$

2.- $r = 0.9995$

3.- $m = 0.916$

4.- $b = 0.1347$

5.- Intervalo de confianza para la pendiente (m) =

$$0.7774 < 0.916 < 1.0546$$

6.- Intervalo de confianza para la ordenada al origen (b) =

$$-0.1648 < 0.1347 < 0.4341$$

7.- $F_{\text{experimental}} (7048.0706) > F_{\text{critica}} (12.25)$.

8.- La falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada - cantidad recuperada no es determinada.

Criterios de aceptación:

Cantidad adicionada contra Cantidad recuperada

1.- $r^2 \geq 0.98$, 2.- $r \geq 0.99$, 3.- $m \approx 1.0$, 4.- $b \approx 0$

5.- El valor obtenido de la pendiente debe encontrarse dentro de su intervalo de confianza.

6.- La ordenada al origen obtenida debe encontrarse dentro del intervalo de confianza para la misma.

7.- La relación lineal simple de la cantidad adicionada - cantidad recuperada debe ser altamente significativa cuando:

$$F_{\text{regresión}} > F_{\text{crítica}} \text{ (glr, glor; 0.05)}$$

La relación lineal simple de la cantidad adicionada - cantidad recuperada no es altamente significativa cuando:

$$F_{\text{regresión}} < F_{\text{crítica}} \text{ (glr, glor; 0.05)}$$

8.- La falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada - cantidad recuperada no debe ser estadísticamente significativa cuando:

$$F_{\text{falta de ajuste}} < F \text{ (glr, glor; 0.05)}$$

La falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada - cantidad recuperada es estadísticamente significativa cuando:

$$F_{\text{falta de ajuste}} > F \text{ (glr, glor; 0.05)}$$

Precisión del sistema.

Clorhidrato de Ciprofloxacina solución de referencia (2.0 µg/ml).

Resultado:

1.- Coeficiente de variación (CV) = 1.30%

Criterios de aceptación:

1.- C.V. \leq 1.5%

Precisión del método al 100%.

Clorhidrato de Ciprofloxacina materia prima.

Resultados:

Coeficiente de variación (CV) = 1.44%

2.- El método es preciso en:

Repetibilidad y Reproducibilidad entre analistas y días.

Fa experimental (1.0000) < Fa crítica (18.51).

Fd experimental (0.0943) < Fd crítica (3.49).

Criterios de aceptación:

1.- C.V. \leq 3.0%

2.- La reproducibilidad inter-analista y la reproducibilidad inter-día/analista, debe de satisfacer los requisitos establecidos para el principio de medición y/o para la utilización del método.

$F_{analistas} < F_{(gld, gld; 0.05)}$ El método analítico es reproducible por los analistas.

$F_{analistas} > F_{(gld, gld; 0.05)}$ El método analítico no es reproducible por los analistas.

$F_{días} < F_{(gld, gld; 0.05)}$ El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

$F_{días} > F_{(gld, gld; 0.05)}$ El método analítico no es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Exactitud y Repetibilidad del método al 100%

Clorhidrato de Ciprofloxacina materia prima (2.0 $\mu\text{g/ml}$).

Resultados:

1.- Porcentaje de recobro promedio $\bar{x} = 99.98\%$

2.- Intervalo de confianza para el porcentaje de recobro :

$$98.10\% < 99.98\% < 101.86\%$$

$H_0 : \bar{x} = 100.0\%$ El método es exacto, si $t_{exp.} (-0.0228)$
 $t_{(n-1, \alpha=0.05)} (2.5706)$.

3.- C.V. = 1.79%

Criterios de aceptación:

1.- La media aritmética del porcentaje recuperado, debe ser estadísticamente igual al 100%.

2.- El intervalo de confianza para la media, debe incluir el 100%.

3.- El C.V. \leq 3.0%

II.- Aplicación del método en Capsulas de Clorhidrato de Ciprofloxacina de 250.0 mg.

Clorhidrato de Ciprofloxacina en producto terminado (2.0 $\mu\text{g/ml}$).

Resultados:

1.- Porcentaje de recobro promedio \bar{x} = 100.83%

2.- Intervalo de confianza para el porcentaje de recobro :

$$99.48\% < 100.83\% < 102.18\%$$

H_0 : \bar{x} = 100.0% El método es exacto, si $t_{exp.}(1.5811) < t_{(n-1, \alpha=0.05)}(2.5706)$.

3.- C.V. = 1.28%

Criterios de aceptación:

1.- La media aritmética del porcentaje recuperado, debe ser estadísticamente igual al 100%.

2.- El intervalo de confianza para la media, debe incluir el 100%.

3.- El C.V. \leq 3.0%

DISCUSION:

En base a los resultados obtenidos para la materia prima empleada se puede decir que son satisfactorios según documentos oficiales para ser utilizada en el desarrollo y validación del método propuesto y eliminar posibles fuentes de error en los resultados de validación.

Los resultados de cada etapa de la validación mostraron lo siguiente:

Para la linealidad del sistema, todos los parámetros estadísticos relacionados están conforme a su criterio de aceptación, con excepción de la ordenada al origen que no es igual a cero pero si muy cercana a el, esto podemos atribuirlo a las siguientes causas: esta ordenada al origen pertenece a la linealidad del sistema, esto quiere decir que bajo las condiciones del tratamiento de la muestra y condiciones instrumentales a las que se determino la emisión de fluorescencia del clorhidrato de ciprofloxacina esta ordenada y su valor será una característica del sistema; puesto que estamos sobre el fenómeno de respuesta que tiene esta sustancia ante la excitación de sus moléculas por la luz de la lámpara de xenón a 324 nm y al variar sus concentraciones; esta respuesta estara influenciada y será fijada por las características de las condiciones de tratamiento y de las condiciones instrumentales y entre ellas una de las más determinantes es el fenómeno de "luz parásita" [40,41] la cual interfiere en la propiedad medida alterando la respuesta, hecho que se abate al realizar la linealidad del método con el cual se verifico ya que la ordenada al origen es casi cero 0.1347 comprobando que el proceso cuantitativo no se altera; además estadísticamente se demuestra que este valor no es significativo ya que se le practico las pruebas de intercepto nulo y la del intercepto relativo dando valores

dentro de especificaciones 0.0517 así como también al realizar el análisis de varianza en donde la recta presenta una muy buena linealidad, su F de regresión tiene un valor muy alto 7058.3 con respecto a su F crítica 12.25, con respecto a la falta de ajuste no pudo ser determinada dado que existe una reproducibilidad de los tres datos para cada uno de los tres puntos esto muestra que la población de datos de cada punto se comporta como una población normal, aunque cabe señalar que existe una limitante del equipo, al obtener las lecturas de la intensidad de fluorescencia estas se miden en papel registrador graduado con 100 divisiones en el eje de las "y" siendo motivo por el cual los resultados obtenidos no pueden ser más que expresados en unidad por lo que la medida esta sujeta a error de medición el cual es estimado y reflejado en la validación del método.

Con respecto a la linealidad del método, todos los parámetros se pueden considerar que se encuentran dentro de los requisitos establecidos. Por lo que respecta al límite de detección podemos ver que la mínima concentración del clorhidrato de ciprofloxacina que puede ser medida pero no necesariamente cuantificada y registrada con 95% de confianza es a partir de 0.0 μg /ml y para el límite de cuantificación con un nivel de confianza de un 99% también es a partir de 0.0 μg /ml de acuerdo a [21,38] y por los resultados obtenidos se puede observar que hay respuesta a concentraciones bajas con un grado de confiabilidad aceptables.

Una vez que el método ha cumplido con el requisito de linealidad; la siguiente etapa a analizar y discutir es la precisión la que comprendio a: la precisión del sistema y la del método; los parámetros

estadísticos de ambas, como se observa en los resultados están perfectamente dentro de los criterios de aceptación; el coeficiente de variación para precisión del sistema es de 1.3% y su límite es \leq 1.5% y para la precisión del método el coeficiente de variación es de 1.44% y el límite es de 3.0%; con respecto al análisis de varianza de estos resultados la "F" para analistas de 1.0000 y la "F" para días de 0.0943 están muy por debajo de los valores críticos correspondiente Fanalista 18.51 y Fdías 3.49 con lo cual se corrobora que el método es altamente preciso.

Habiendo demostrado que el método es preciso, se procedió a determinar si era exacto y los resultados dan un porcentaje de recobro del 99.98% con un coeficiente de variación de 1.79% con lo cual el método es exacto y así también lo muestra su intervalo de confianza pues dentro del mismo se encuentra el valor del 99.98%.

Como una medida más de evaluación del método, éste se aplicó en producto terminado; cápsulas de Clorhidrato de Ciprofloxacina de 250 mg y los resultados de las determinaciones realizadas dan un porcentaje promedio de 100.83% con un coeficiente de variación de 1.28% y al realizarse la prueba de "t Student" los valores de promedio, su desviación, intervalo de confianza y coeficiente de variación están dentro de los criterios de aceptación para la prueba.

CONCLUSIONES:

Se ha establecido las condiciones de tratamiento e instrumentales para el Clorhidrato de Ciprofloxacina así como también las etapas esenciales de validación y los parámetros estadísticos de ejecución para este método desarrollado.

El método se muestra sencillo, rápido, sensible, específico y de bajo costo; objetivo que se logra a través de las condiciones de procedimiento e instrumentales y de manera sobresaliente para la especificidad las longitudes de onda de excitación (324 nm) y de emisión (425 nm) pues con ello se centra y se asegura la identidad y exclusividad de la determinación en el ensayo. Permitiendo la cuantificación de este fármaco en materia prima y producto terminado sin presentar interferencias significativas en su determinación.

Por otra parte y de acuerdo con los criterios de aceptación y especificaciones; los parámetros estadísticos de ejecución como son: la linealidad del sistema, la linealidad del método, la precisión del sistema, la precisión del método (repetibilidad, reproducibilidad entre analistas y reproducibilidad entre días); así como la exactitud del método están dentro de las normas de validación para métodos Espectrofluorométricos.

Por la alta sensibilidad que demuestra se recomienda este método como una base para ser aplicado bajo previa validación en estudios farmacológicos y farmacocinéticos ya que alcanza a detectar concentraciones a las que se encuentra este antibiótico en los fluidos biológicos.

ANEXO No.1

I.- CARACTERIZACION DE LA MATERIA PRIMA

ESPECIFICACIONES

LIMITES

Identificación

A. El espectro de absorción Infra-roja de la muestra exhibe máximos de longitud de onda iguales al espectro de absorción del estándar.

B. La intensidad y el valor de Rf de la mancha principal obtenida por la muestra corresponden a la obtenida por el estándar.

C. Prueba de cloruros positiva.

pH

Entre 3.0 - 4.5, en una solución (1 en 40).

Agua

Entre 4.7% - 6.7%.

Residuos de ignición

No más de 0.1%

Sulfatos

No más de 0.04%

Metales pesados

0.002%

Pureza por HPLC

No menos del 98.0% y no más del 102.0% de $C_{17}H_{19}FN_3O_3$ HCl.

La materia prima del Clorhidrato de Ciprofloxacina se encuentra dentro de especificaciones y límites oficiales.

ANEXO No.2

- 1.- Encender la lámpara de Xénon y esperar 5 minutos.
- 2.- Encender el registrador colocando la plumilla en posición de stby.
- 3.- Colocar el arreglo de la unidad óptica en base a la siguiente tabla y tipo de análisis:

Tamaño, Arreglo y Posición de las rejillas
(Anchura de las rejillas en milímetros)

Arreglo	Monocromador. Rejilla 1	Rejilla 2	Rejilla 3 *	Rejilla 4 *	Rejilla 5	Monocromador. Rejilla 6	Factor de multiplicación Rejilla 7
+	1	0.5	3	3	0.5	1	0.5
2	2	1	3	3	1	2	1
3	3	2	3	3	2	3	2
4	4	3	4	4	3	4	3
**	5	4	5	5	4	5	5

* Estas rejillas sirven para eliminar o disminuir el ruido instrumental.

+ Alta resolución, recomendado para identificación.

** Alta sensibilidad, recomendado para el análisis de trazas.

Unidad óptica

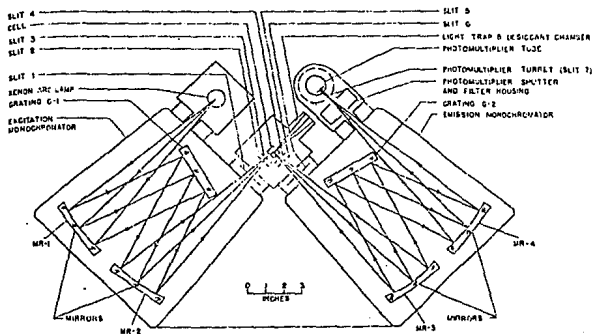


Figure 9. Optical Unit Showing Position of Slits (See Table VI)

Figura 1. Muestra la posición de las rejillas.

4.- Encender la unidad óptica.

5.- Encender y ajustar a cero el factor de multiplicación.

6.- Ajuste de la longitud de onda:

a) La longitud de onda registrada en el eje de las "x" debe corresponder a la longitud de onda marcada en los discos de emisión y excitación de la unidad óptica.

b) Ajustar la plumilla del registrador en la marca de $200\text{m}\mu$ en el eje de las "x".

c) Girar el disco de emisión hasta la longitud de onda de $800\text{ m}\mu$ corroborar que la plumilla del registrador se encuentre en la marca de $800\text{ m}\mu$ en el eje de las "x".

d) Repetir (c) pero con el disco de excitación.

e) Colocar en la celda 1 ml de la solución (Sulfato de quinina 0.1N) para calibrar el equipo, poner la celda en el compartimiento y cerrarlo.

f) Abrir la ventana del factor de multiplicación y ajustar el equipo hasta que la fluorescencia sea observada, colocando el fotómetro a una sensibilidad alta.

g) Realizar un barrido en el espectro de emisión y excitación; cuando la longitud de onda de excitación es determinada fijar el monocromador correspondiente para correr el espectrograma de emisión y obtener el valor máximo de fluorescencia para este espectro y verificar si el que obtuvimos es igual al reportado en bibliografía.

APENDICE

Procedimiento de calculo para evaluar la *LINEALIDAD DEL SISTEMA*:

Calcular :

S_x = Sumatoria de la cantidad adicionada.

S_x^2 = Suma de cuadrados de la cantidad adicionada.

S_y = Sumatoria de la propiedad medida.

S_y^2 = Suma de cuadrados de la propiedad medida.

S_{xy} = Suma del producto de la cantidad adicionada por la propiedad medida.

S_{yt} = Suma de cuadrados de los totales.

t = Número de concentraciones.

r = Número de replicaciones por concentración.

$n = rt$ = Número de pares ordenados.

Calcular el valor de la pendiente (m) y el valor de la ordenada al origen (b), con las siguientes ecuaciones:

$$m = \frac{(n) (S_{xy}) - (S_x) (S_y)}{(n) (S_x^2) - (S_x)^2}$$

$$b = \frac{(S_y) - (m) (S_x)}{n}$$

Construcción de la tabla del análisis de la varianza (ANADEVA)

Calcular:

SCR = Suma de cuadrados de regresión

$$SCR = (m) (S_{xy}) + (b) (S_y) - (S_y)^2/n$$

SCer = Suma de cuadrados del error de regresión.

$$SCer = S_y - (m) (S_{xy}) - (b) (S_y)$$

SCep = Suma de cuadrados del error puro.

$$SCep = S_y - (S_{y_i})^2/r$$

SCfa = Suma de cuadrados de la falta de ajuste.

$$SCfa = SCer - SCep$$

Tabla de ANADEVA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	Fexperimental
Regresión	1	SCr	SCr	$F_r = \frac{MCr}{MCer}$
Error de regresión	n-2	SCer	$\frac{SCer}{gler}$	
Falta de ajuste	(n-2)-t(r-1)	SCfa	$\frac{SCfa}{gafa}$	$F_{fa} = \frac{MCfa}{MCep}$
Error puro	t(r-1)	SCep	$\frac{SCep}{glep}$	

Determinar en la tabla de la distribución de "F" los valores para

Crítica de regresión ($gler/gler$; 0,05)

Crítica de la falta de ajuste ($gafa/glep$; 0,05)

Calcular:

r^2
 r^2 = Coeficiente de determinación.

$$r^2 = \frac{[n(S_{xy}) - (S_x)(S_y)]^2}{[n(S_x) - (S_x)^2][n(S_y) - (S_y)^2]}$$

r = Coeficiente de regresión.

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

Sy/x = Desviación estándar de la regresión.

$$Sy/x = (SCer/gCer)^{1/2}$$

Sb = Desviación estándar de la ordenada al origen.

$$Sb = Sy/x \left[\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{(Sx) - (Sx)^2/n} \right]^{1/2}$$

Determinar en la tabla de distribución "t" de Student, el valor para t (n-2, 0.975).

IC(b) = Intervalo de confianza para la ordenada al origen.

$$IC(b) = b \pm t_{(n-2; 0.975)} * (Sb)$$

Intercepto relativo [35,36]:

$$I.R. = \frac{b}{\bar{y}}$$

Prueba de hipótesis para la ordenada al origen (b):

Hipótesis Nula Ho: b = β donde: β = 0

Hipótesis Alternativa Hi: b ≠ β

Determinar en la tabla de distribución de "t" Student:

t (n-2; 0.975)

Calcular "t experimental" con la siguiente ecuación:

$$t_{\text{experimental}} = \frac{b - \beta}{\frac{S_{y/x}}{\sqrt{n S(Sx_i - \bar{x})^2}}}$$

Criterios de aceptación:

$$r^2 \geq 0.98, r \geq 0.99, b \approx 0$$

Existe una relación altamente significativa entre la cantidad y la propiedad medida cuando:

$$F_{\text{regresión}} > F_{\text{crítica}} (g_{lr}, g_{ler}; 0.05)$$

No existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida cuando:

$$F_{\text{regresión}} < F_{\text{crítica}} (g_{lr}, g_{ler}; 0.05)$$

La falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada - propiedad medida no debe ser estadísticamente significativa cuando:

$$F_{\text{falta de ajuste}} < F_{\text{crítica}} (g_{lr}, g_{ler}; 0.05)$$

La falta de ajuste a la relacion lineal simple cantidad
adicionada - propiedad medida es estadisticamente significativa
cuando:

F falta de ajuste > F critica (glr, gler:0.05)

El intercepto relativo I.R < 10.2

Prueba del intercepto nulo:

Hipotesis nula $H_0: b = \beta$

Hipotesis alterna $H_1: b \neq \beta$

Si $t_{\text{experimental}} < t_{n-2; 0.975}$ no se rechaza H_0 la ordenada pasa por
el origen.

Si $t_{\text{experimental}} > t_{n-2; 0.975}$ se rechaza H_0 la ordenada no pasa por
el origen.

Procedimiento de calculo para evaluar la *LINEALIDAD DEL METODO*:

Calcular :

S_x = Sumatoria de la cantidad adicionada.

S_x^2 = Suma de cuadrados de la cantidad adicionada.

S_y = Sumatoria de la cantidad recuperada.

S_y^2 = Suma de cuadrados de la cantidad recuperada.

S_{xy} = Suma del producto de la cantidad adicionada por la cantidad recuperada.

S_{yt} = Suma de cuadrados de los totales.

t = Número de concentraciones.

r = Número de replicaciones por concentración.

$n = rt$ = Número de pares ordenados.

Calcular el valor de la pendiente (m) y el valor de la ordenada al origen (b), con las siguientes ecuaciones:

$$m = \frac{(n)(S_{xy}) - (S_x)(S_y)}{(n)(S_x^2) - (S_x)^2}$$

$$b = \frac{(S_y) - (m)(S_x)}{n}$$

Construcción de la tabla del análisis de la varianza (ANADEVA)

Calcular:

SCr = Suma de cuadrados de regresión

$$SCr = (m) (Sxy) + (b) (Sy) - (Sy)^2/n$$

SCer = Suma de cuadrados del error de regresión.

$$SCer = Sy^2 - (a) (Sxy) - (b) (Sy)$$

SCep = Suma de cuadrados del error puro.

$$SCep = Sy^2 - (Syt.)^2/r$$

SCfa = Suma de cuadrados de la falta de ajuste.

$$SCfa = SCer - SCep$$

Tabla de ANADEVIA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F _{experimental} MCr Fr----- MCer
Regresion	1	SCr	SCr	
Error de regresion	n-2	SCer	SCer ---- gler	
Falta de ajuste	(n-2)-t(r-1)	SCfa	SCfa ---- glfa	MCfa Ffa----- MCep
Error puro	t(r-1)	SCep	SCep ---- glep	

Determinar en la tabla de la distribución de "F" los valores para

Fertica de regresión (gler/gler; 0.05)

Fertica de la falta de ajuste (glfa/glep; 0.05)

Calcular:

r^2 = Coeficiente de determinación.

$$r^2 = \frac{[n(S_{xy}) - (S_x)(S_y)]^2}{[n(S_x^2) - (S_x)^2][n(S_y^2) - (S_y)^2]}$$

r = Coeficiente de regresión.

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

Sy/x = Desviación estándar de la regresión.

$$Sy/x = (SCer/qler)^{1/2}$$

Sb = Desviación estándar de la ordenada al origen.

$$Sb = Sy/x \left[\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{(Sx) - (Sx) / n} \right]^{1/2}$$

Determinar en la tabla de distribución "t" de Student, el valor para t (n-2, 0.075).

IC(b) = Intervalo de confianza para la ordenada al origen.

$$IC(b) = b + t (n-2; 0.075) * (Sb)$$

IC(m) = Intervalo de confianza para la pendiente.

$$IC(m) = m + t (n-2; 0.075) * (Sm)$$

Criterios de aceptación:

Cantidad adicionada contra Cantidad recuperada

$$r^2 \geq 0.98, r \geq 0.99, m \approx 1.0, b \approx 0$$

La relación lineal simple de la cantidad adicionada - cantidad recuperada debe ser altamente significativa.

$$F_{\text{regresión}} > F_{\text{crítica}} (g_{lr}, g_{ler}; 0.05)$$

La falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada - cantidad recuperada no debe ser estadísticamente significativa.

$$F_{\text{falta de ajuste}} < F (g_{lr}, g_{ler}; 0.05)$$

Procedimiento de calculo para evaluar la PRECISION DEL SISTEMA:

Calcular:

S_y = Suma de la propiedad medida.

S_y^2 = Suma de cuadrados de la propiedad medida.

n = Número de mediciones.

\bar{y} = Valor de la media arimética:

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

σ = Desviación estándar de la propiedad medida:

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

C.V. = Coeficiente de variación:

$$C.V. = \frac{\sigma}{\bar{y}} \quad (100)$$

Criterio de aceptación:

C.V. \leq 1.5%

Procedimiento de calculo para evaluar la *PRECISION DEL METODO*:

Calcular:

$SY_{i..}$ = Suma para cada analista.

$SY_{ij.}$ = Suma de las combinaciones Analista-Día.

SY_{ijA} = Suma de cada dato elevado al cuadrado.

$Y_{...}$ = Suma total de los datos.

SC_a = Suma de cuadrados del analista:

$$SC_a = (SY_{i..})^2 / (d)(r) - (Y_{...})^2 / (dra)$$

donde:

r = Número de replicaciones.

d = Número de días.

a = Número de analistas.

SC_d = Suma de cuadrados del día anidado en el analista:

$$SC_d = (SSY_{ij.})^2 / r - (SY_{i..})^2 / (rd)$$

SC_e = Suma de cuadrados del error:

$$SC_e = (SSSY_{ijA})^2 - (SSY_{ij.})^2 / r$$

Construcción de la tabla del análisis de la varianza (ANAEVA)

Tabla de ANAEVA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F _{exp.}	F _{critica}
Analista	a-1	SCa	$MCa = \frac{SCa}{gla}$	$Fa = \frac{MCa}{MCd}$	$F_{gla, gld}$ 0.05
Día	(d-1)a	SCd	$MCd = \frac{SCd}{gld}$	$Fd = \frac{MCd}{MCE}$	$F_{gld, gld}$ 0.05
Error	(r-1)ad	SCe	$MCE = \frac{SCe}{gld}$		

Determinar en la tabla de la distribución de "F" los valores para

F_{critica} de analista ($gla, gld; 0.05$)

F_{critica} de día ($gld, gld; 0.05$)

El método analítico es reproducible por los analistas cuando:

$$F_{analistas} < F_{critica} (gla, gld; 0.05)$$

El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista cuando:

$$F_{días} < F_{critica} (gld, gld; 0.05)$$

El método no es reproducible por los analistas cuando:

$$F_{analistas} > F_{critica} (gla, gld; 0.05)$$

El metodo analitico no es reproducible en distintos dias por un mismo analista cuando:

$$F_{\text{dia}} > F_{\text{critica}} \text{ (gl.d.glo: 0.05)}$$

Procedimiento de calculo para evaluar la REPETIBILIDAD DEL METODO:

Calcular:

\bar{y} = Media aritmética total:

$$\bar{y} = \frac{Y_{...}}{n}$$

donde:

$$n = \text{adr}$$

σ = Desviación estándar total:

$$\sigma = \left[\frac{\sum_{ijk} n S S Y_{ijk}^2 - (Y_{...})^2}{n(n-1)} \right]^{1/2}$$

C.V.t = Coeficiente de variación total:

$$\text{C.V.} = \frac{\sigma}{\bar{y}} \times 100$$

Criterios de aceptación:

La reproducibilidad inter-analista y la reproducibilidad inter-día/analista, debe de satisfacer los requisitos establecidos para el principio de medición y/o para la utilización del método.

Fanalistas < $F_{\text{figla, gl1; } 0.05}$: El método analítico es reproducible por los analistas.

Fanalistas > $F_{\text{figla, gl1; } 0.05}$: El método analítico no es reproducible por los analistas.

Fdías < Figd, gte; 0.05)

El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Fdías > Figd, gte; 0.05)

El método analítico no es reproducible en distintos días por un mismo analista.

C.V. \leq 3.0%

Procedimiento de calculo para evaluar la EXACTITUD DEL METODO AL 100%:

Calcular:

S_y = Suma del porcentaje recuperado.

S_y^2 = Suma de cuadrados del porcentaje recuperado.

n = Número de recobros.

\bar{y} = Media aritmetica del porcentaje recuperado con la siguiente ecuación:

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

σ = Desviación estándar del porcentaje recuperado con la siguiente ecuación:

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

IC (x) = Intervalo de confianza para el porcentaje recuperado:

$$IC (x) = \bar{y} \pm t_{(n-1, 0.975)} \frac{\sigma}{n^{1/2}}$$

Prueba "t" Student para la media:

Hipotesis nula $H_0: \bar{x} = \mu$ donde: $\mu = 100\%$

Hipotesis alterna $H_1: \bar{x} \neq \mu$

Obtener en la tabla de distribución de "t Student" el valor de:

$$t (n-1, 0.975)$$

$$t_{\text{experimental}} = \frac{\bar{x} - \mu}{S_{\bar{x}}}$$

donde:

$$S_{\bar{x}} = \sigma / n$$

CV = Coeficiente de variación:

$$CV = \frac{\sigma}{x} \times 100$$

Criterios de aceptación:

Prueba de hipótesis para la media

Hipótesis nula $H_0: \bar{x} = 100\%$

Hipótesis alterna $H_1: \bar{x} \neq 100\%$

Si $t_{\text{experimental}} < t (n-1, 0.975)$; H_0 no se rechaza y el método se puede considerar exacto con un $\alpha = 0.050$.

Si $t_{\text{experimental}} > t (n-1, 0.975)$; H_0 se rechaza y el método se puede considerar no exacto con un $\alpha = 0.050$.

El intervalo de confianza para la media , debe incluir el 100%.

El coeficiente de variación debe ser menor o igual al 3.0%

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- AWNI M. WALID; et al. "Determination of Ciprofloxacin and its 7-Ethylendiamine metabolite in human serum and urine by High-Performance Liquid Chromatography". Journal of Chromatography, 419 (1987) p.p. 414-420.
- 2.- BUDABARIO SUSAN; et al. "The Index Merck" 11 ava. Edición. Publicado por Merck & Co. Inc. United States of America (1989) p.p. 2312.
- 3.- CARDONE J.MARIO "Method Validation Revisited : A Chemometric Approach" Pharmaceutical Research, Vol.7, No.2 (1990) p.p. 154-160.
- 4.- CONNORS KENNETH A. "A Textbook of Pharmaceutical Analysis" 2a. Edición. United States of America (1975) p.p. 227-247.
- 5.- CRUMP B; et al. "Pharmacokinetics and Tissue Penetration of Ciprofloxacin". Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Nov. (1983) p.p. 784-786.
- 6.- ERWIN KREYSZIG. "Introducción a la estadística matemática Principios y Métodos". Edit. Limusa México (1973).
- 7.- FLASCHKA H. A. ; et al. "Química Analítica Cuantitativa". Vol.I Ira. Edición. Edit. Continental S.A. México (1973) p.p. 499-501.

- 8.- GALEN W. EWING; "Instrumental Methods of Chemical Analysis".
Third Edition. Edit. Mc Graw-Hill. Tokio (1969).
- 9.- HOOPER DAVID C; et al. "The Fluoroquinolones: Pharmacology,
Clinical Uses, and Toxicities in Humans". Antimicrobial Agents and
Chemotherapy. Nov. (1985) p.p. 716-721.
- 10.- JEHL F; et al. "High-Performance Liquid Chromatographic Method
for Determination of Ciprofloxacin in Biological Fluids". Journal of
Chromatography, 339 (1985) p.p. 347-357.
- 11.- JOOS BEDA; et al. "Comparasion of High-Pressure Liquid
Chromatography and Bioassay for Determination of Ciprofloxacin in
Serum and Urine". Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Mar. (1985)
p.p. 353-356.
- 12.- LONTIE M; et al. "Les nouvelles quinolones". J. Pharm. Belg. 44,4
(1989) p.p. 292-301.
- 13.- MASSART D.L; et al. "Evaluation and Optimization of Laboratory
Methods and Analytical Procedures. A Survey of Statistical and
Mathematical Techniques". Capitulo 6 p.p. 143-164.
- 14.- MATHUR S. C; et al. "Determination Espectrophotometry of
Ciprofloxacin in Formulate Pharmaceutical". Indian Drugs. Apr. 27 (7)
(1990) p.p. 398-399.

- 15.- MORTON SEBASTIAN J; et al. "Determination of Norfloxacin and Ciprofloxacin Concentrations in Serum and Urine by High-Pressure Liquid Chromatography". Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Aug. (1986) p.p. 325-327.
- 16.- MYERS CAROLYN M; et al. "High-Performance Liquid Chromatography of Ciprofloxacin and its Metabolites in Serum, Urine and Sputum". Journal of Chromatography, 422 (1987) p.p. 153-164.
- 17.- NELSON DRES M; et al. "Quinolonas: Papel que desempeñan". Medicina Práctica Actualizada. Reinpresa de Atención Médica. México No.12 Diciembre (1989) p.p. 41-60.
- 18.- NILSSON INGRID; et al. "Assay of Ciprofloxacin and Norfloxacin in Serum and Urine by High-Performance Liquid Chromatography". Journal of Chromatography, 416 (1987) p.p. 207-211.
- 19.- OROZCO D. FERNARDDO. "Análisis Químico Cuantitativo". 16 ava. Edición. Edit. Porrúa. México (1985) p.p. 1-6.
- 20.- PAULSEN O. "The Antibacterial Activity, Pharmacology and Therapeutic Application of Ciprofloxacin". Drugs of Today. Vol.24, No.6 (1988) p.p. 361-401.
- 21.- RAMPAZZO PAOLO. "Standardisation and Validation of Analytical Methods in the Pharmaceutical Industry". 45 Supplementto No.6 (1990) p.p.807-815.

- 22.- ROSENTEIN EMILIO. "Diccionario de Especialidades Farmaceuticas".
37 ava. Edición. Ediciones PLM. (1991) p.p. 223-226.
- 23.- SHOLL H; et al. "Sensitive and Selective Determination of
Picogram Amount of Ciprofloxacin and its Metabolites in Biological
Samples Using High-Performance Liquid Chromatography and Photothermal
Post-Column Derivatization". Journal of Chromatography, 416 (1987)
p.p. 321-330.
- 24.- STHALAMANN RALPH. "Fluoroquinolones-A New Class of Antimicrobial
Agents". Drugs of Today. Vol.24 No.7 (1988) p.p. 529-536.
- 25.- TECKSTOR L; et al. "Polarography of Ciprofloxacin". Vestin Slov.
Kem. Drugs,36 (1), (1989) p.p. 25-34.
- 26.- TYCZKOWSKA KRZYSTYNA; et al. "High-Performance Liquid
Chromatography Method for the Simultaneous Determination of
Enrofloxacin and its Primary Metabolite Ciprofloxacin in Canine Serum
and Prostatic Tissue". Journal of Chromatography, 493 (1989) p.p.
337-346.
- 27.- WEBER ALLAN; et al. "Cuantitation of Ciprofloxacin in Body Fluids
By High-Pressure Liquid Chromatography". Antimicrobial Agents and
Chemotherapy, Apr. (1985) p.p. 531-534.
- 28.- WISE R; et al. "Pharmacokinetics of Intravenously Administered
Ciprofloxacin". Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Aug. (1984)
p.p. 208-210.

- 29.- "American Hospital Formulary Service". Published by Authority of the Board of Directors of the American Society of Hospital Pharmacists. (1990) p.p. 403-413.
- 30.- "Ciprofloxacin". Drugs of the Future. Vol.9, No.3 (1984) p.p. 179-182.
- 31.- "Ciprofloxacin". Drugs of the Future. Vol. 10, No.3 (1985) p.p. 237-241.
- 32.- "Ciprofloxacin". Drugs of the Future. Vol.11, No.3 (1986) p.p. 215-216.
- 33.- "The United States Pharmacopeia". Official From January 1, 1990. 1er. Suplemento. Twenty Second. USPXXII p.p. 1710-1712.
- 34.- "The Validation of Analytical Procedures Used in the Examination of Pharmaceutical Materials". World Health Organization. Organization Mondiale De La Sante. (1989) p.p. 1-5.
- 35.- "Un Acercamiento a la Validación de los Métodos Analíticos". 1ra. Parte. Pharma News (1991) p.p. 16-18.
- 36.- "Parámetros Estadísticos y Procedimiento de Validación, Criterios de Aceptación". 2a. Parte. Pharma News (1991) p.p. 15-20.

37.- QFB. ALEJANDRO ALCANTARA PINEDA; et al.

"Material de Apoyo al Curso Validación de Métodos Analíticos".

(1989) p.p. 1-103.

38.- "Federal Register".

Vol.49 No. 269 Friday, October 26

(1984) p.p. 198,199.

40.- "Theory, equipment and quality control"

Capítulos 1-6. p.p. 3-83.

41.- "Atomic Absorption Spectroscopy"

Capítulo 8 p.p. 252-313.