

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

## FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

### ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**“VALIDACION DE UN METODO ANALITICO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC), PARA CUANTIFICACION DE AMOXICILINA Y ACIDO CLAVULANICO EN TABLETAS RECUBIERTAS .”**

**INFORME DE PRÁCTICAS PRE-PROFESIONALES**

**PARA OPTAR EL**

**TITULO ACADEMICO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AUTOR:**

- **Br. ZAVALA BLAS, Cesar Oswaldo**

**ASESOR:**

- **Dr. CURO VALLEJOS, Yuri**

**TRUJILLO – PERÚ**

**2012**

## INDICE

Dedicatoria	.....i
Agradecimiento	.....ii
Miembros del Jurado	.....iv
Presentación	.....v
Resumen	.....vi
Abstract	.....vii
I. INTRODUCCION	..... 1
II. MATERIAL Y METODO	.....8
III. RESULTADOS	.....36
IV. DISCUSIÓN	.....40
V. CONCLUSIONES	.....43
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	.....44
VII. ANEXOS	.....46

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

## DEDICATORIAS

**A ti Señor** , Dios de abraham por ser la luz de mis días y permitirme la vida para lograr este paso importante, por darme salud y fuerzas para seguir... seras siempre mi inspiración y por ti seguire hasta cumplir tus planes.

**A mis padres**, porque creyeron en mí y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera, y porque el orgullo que sienten por mi, fue lo que me hizo ir hasta el final. Va por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí.

**A mis hermanos:** Oswaldo y Eduardo quienes estimo y quiero con todo mi corazón, porque son la razón para seguir adelante, por comprenderme y apoyarme en momentos fundamentales de mi vida. Con todo cariño quiero compartir con ustedes este logro en mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

*Un especial agradecimiento al **Dr.Q.F. Yuri Curo V.**  
por concederme su confianza, amistad y un acertado  
asesoramiento para la realización de presente trabajo,  
gracias amigo mío.*

*A la **Dra. Q.F. Julisa Ortiz LI.** por ser mi mentora y amiga ,gracias  
a sus enseñanzas he logrado mucho, puessin su apoyo nohubiese  
sido posible la realización del presente informe.*

**CESAR OSWALDO ZAVALA BLAS**

### **UN ESPECIAL AGRADECIMIENTO**

A **Laboratorios Medifarma S.A** por permitirme desarrollar mis practicas Pre-Profesionales, donde adquirí nuevos conocimientos, y a todo ese gran equipo de trabajo que me dio la confianza para seguir adelante, del cual estoy orgulloso de integrarlo.

**CESAR OSWALDO ZAVALA BLAS**

## **MIEMBROS DEL JURADO**

---

**Dr. Q.F. LUIS CHAVEZ ABANTO**

**PRESIDENTE**

---

**Dr. Q.F. YURI CURO VALLEJOS**

**MIEMBRO**

---

**Dr. Q.F. FRANCISCO SAAVEDRA SUAREZ**

**MIEMBRO**

## **PRESENTACION**

### **Señores Miembros del Jurado Dictaminador**

Dando cumplimiento a lo establecido por el reglamento de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, sometemos a vuestra honorable consideración y elevado criterio el presente informe titulado:

**“VALIDACION DE UN METODO ANALITO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC), PARA CUANTIFICACION DE AMOXICILINA Y ACIDO CLAVULANICO EN TABLETAS RECUBIERTAS ”.**

Es propicia esta oportunidad para manifestar el mas sincero reconocimiento a nuestra Alma Mater y toda su plana docente que, con su capacidad y buena voluntad, contribuyeron con nuestra formación profesional.

Dejamos a criterio, señores miembros del jurado, la calificación del presente informe.

Trujillo, Octubre del 2012

---

**Zavala Blas Cesar Oswaldo**

## RESUMEN

En el presente Informe se determino los parámetros para la validación del método analítico por cromatografía líquida de alta resolución, para la cuantificación de Amoxicilina y Acido Clavulánico en el producto Amoxicilina 500 mg /Acido Clavulánico 125 mg tableta recubierta, evaluándose : la Especificidad, Intervalo, Linealidad, Exactitud, Precisión y Robustez. Definidas las condiciones de trabajo se evaluó previamente la aptitud del sistema, los resultados fueron conformes a las especificaciones para un método cromatografico recomendadas por la USP 35 NF 30. Se demostró que el método analítico es específico dado que no se evidencio interferencia de los productos degradados o excipientes en el análisis de los principios activos; El ensayo de linealidad del método y sistema obtuvo un coeficiente de correlación menor de 0,995 para ambos activos demostrando que nuestra metodología analítica es lineal; Es precisa ya que el Coeficiente de Variación de la repetibilidad y en precisión intermedia es menor al 2% dentro de los límites permitidos para ambos activos; Es exacta, con una recuperación media de 99.83% y 99.90 % para Acido Clavulánico y Amoxicilina respectivamente; El objetivo de esta validación es garantizar que el método utilizado es el adecuado y satisface los requisitos para la aplicaciones analíticas deseadas.

**Palabras claves:** Amoxicilina, Acido Clavulánico, validación, Cromatografía Líquida de Alta Resolución, Especificidad, Linealidad, Precisión, Exactitud, Robustez e Intervalo.



## ABSTRACT

In the present report found the parameters for the validation of the analytical method for high resolution liquid chromatography for quantification of amoxicillin and clavulanic acid in the product Amoxicillin 500 mg / clavulanate 125 mg coated tablet, evaluated: specificity, range, linearity, accuracy, precision and robustness. Defined working conditions previously evaluated the ability of the system, the results were in line with the specifications for a chromatographic method recommended by the USP 35 NF 30. It was shown that the specific analytical method is evidenced as no interference of the degraded products or excipients in the analysis of the active principles. The assay system linearity of the method and obtained a correlation coefficient less than 0.995 for both active proving that our analytical methodology is linear, is accurate as the coefficient of variation of repeatability and intermediate precision is less than 2% within the allowable limits for both assets, is accurate, with an average recovery of 99.83% and 99.90% for Clavulanic Acid Amoxicillin and respectively the purpose of this validation is to ensure that the method used is appropriate and meets the requirements for the desired analytical applications.

Keywords: amoxicillin, clavulanic acid, validation, high resolution liquid chromatography, specificity, linearity, precision, accuracy, robustness and range.

## I. INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica constantemente busca la mejora continua de la calidad de los medicamentos y su total garantía de seguridad, la calidad de los medicamentos se logra en toda la cadena del proceso de producción, desde la investigación y desarrollo del producto hasta el último análisis sobre el producto final, ya que depende de la calidad un efecto terapéutico óptimo.<sup>2,3</sup>

La utilización de un medicamento determinado depende en gran medida de la seguridad que este ofrece a quién lo requiere. Una parte importante de esta seguridad radica en que la producción del medicamento se realice cumpliendo altísimos estándares de calidad para lo cual se lleva a cabo toda una serie de pruebas antes, durante y después del proceso de fabricación. Todo lo anterior se encuentra regulado por normas que establecen los criterios que un medicamento debe cumplir antes de ser comercializado.<sup>2</sup>

Es responsabilidad compartida entre el comercializador, la autoridad reguladora y la sociedad en general, garantizar la eficacia y seguridad de todos los medicamentos que se comercializan en el Mercado Nacional, mediante el fortalecimiento de la autoridad reguladora. Una de las técnicas validadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es la aplicación de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), exigiéndose que cada productor, laboratorio o importador realicen control de calidad según Farmacopea correspondiente, de acuerdo al protocolo presentado para autorizar esa especialidad medicinal. Esta es la regla de oro para asegurar la calidad.

(3)

Debido a esto se han venido formulando diferentes programas y parámetros por varias instituciones para lograr el Aseguramiento de la Calidad de los distintos productos. Los procedimientos de prueba para la evaluación de niveles de calidad de los artículos farmacéuticos están sujetos a diversos requisitos. Según el Artículo 501 de la ley federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos, los ensayos y especificaciones de los ensayos y especificaciones de las monografías constituyen norma legales. Los Reglamentos sobre Buenas Practicas de Manufactura vigentes(21 CFR 211-194-a) requieren que los métodos de prueba, que se utilicen para evaluar el cumplimiento de los artículos farmacéuticos con las especificaciones establecidas deben cumplir normas adecuadas de exactitud y confiabilidad. En nuestro país tenemos a la Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas (DIGEMID), quienes a través de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y las Buenas practicas de Laboratorio (BPL), aseguran la calidad de los medicamentos.<sup>1,2</sup>

Las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) constituyen un conjunto de normas mínimas establecidas para la ejecución de los procedimientos destinados a garantizar la calidad uniforme y satisfactoria de los productos farmacéuticos y cuya característica de diseño deben estar dentro de los límites aceptados y vigentes.<sup>4</sup>

La aplicación de las BPM por parte de los fabricantes, asegura que todos los lotes de los productos farmacéuticos sean elaborados con materias primas de calidad adecuada, que cumplan con las especificaciones de la farmacopea tomada como referencia, que se hayan envasado y rotulado en forma correcta, sean estables y tengan la adecuada disponibilidad durante su vida útil si se mantienen en las

condiciones especificadas en las normas de almacenamiento e indicaciones en el rotulado y mas importante la correcta validación de sus métodos ensayo.<sup>5,6</sup>

De acuerdo a las BPM un medicamento es en si mismo, un producto complejo que requiere un protocolo de estandarización que solo puede garantizarse mediante la utilización de métodos de análisis apropiados. Los estudios de validación constituyen una parte esencial de las BPM deben efectuarse conforme a los protocolos definidos de antemano. Siempre que sea factible la validación debe completarse antes de la entrega o implementación del producto.

Debe prepararse y archivar un reporte escrito que resuma los resultados y las conclusiones registradas. Deben establecerse procesos y procedimientos sobre la base un estudio de validación. Los cuales se sometan periódicamente a una revalidación para asegurar que con ellos se puedan seguir obteniendo resultados deseados.<sup>6</sup>

La validación de un procedimiento analítico es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplan los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.<sup>6</sup>

La validación debe ser realizada de conformidad con el protocolo de validación, el cual debe incluir los procedimientos y criterios de aceptación. Los resultados deben ser documentados en el informe de validación, también se incluye la justificación, descripción en detalle, debiendo proporcionar suficiente información que permita a los analistas con una formación adecuada, llevar a cabo el análisis sin problema alguno y con la confiabilidad necesaria.<sup>3, 6, 7,</sup>

En el caso de cromatografía se recomienda como mínimo incluir la descripción las condiciones cromatográficas, los reactivos necesarios, las normas de referencia, las fórmulas para el cálculo de los resultados y sistemas de idoneidad. Las características de desempeño analítico o de fiabilidad comprenden criterios fundamentales de validación y de los que derivan en la práctica todos los parámetros de validación, así tenemos: <sup>10, 11,12</sup>

- **Especificidad:** La capacidad de un método para determinar el analito sin interferencia de impurezas, productos de degradación, excipientes u otras sustancias presentes en la muestra.

Este parámetro se debería determinar antes de iniciar el estudio de cualquier otro parámetro de validación dado que debe conocerse en que grado la respuesta del método es únicamente proporcionada por el analito, sin interferencia de otras sustancias con él, de una u otra forma. <sup>6,10</sup>

- **Linealidad:** La capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido. <sup>10</sup>

- **Intervalo:** Intervalo entre la concentración superior e inferior para las cuales se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método.

- **Precisión:** Capacidad de un método para proporcionar resultados próximos entre si. Grado de dispersión de los resultados analíticos respecto a su valor medio. Se puede estudiar los siguientes niveles:
  - *Repetibilidad.* Evalúa la precisión del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (aparatos, reactivos, analista) en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.
  - *Precisión Intermedia.* Evalúa la precisión del método frente a variaciones internas del laboratorio (analista, día, instrumento, etc).
  
- **Exactitud:** Expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero, valor nominal, teórico o un valor de referencia y el valor encontrado experimentalmente. Capacidad del método analítico para proporcionar resultados lo más cercanos posibles al valor teórico o nominal. Matemáticamente se expresa como el valor numérico del error sistemático (diferencia entre el valor medio hallado y el verdadero) o bien como error relativo porcentual.<sup>10</sup>
  
- **Robustez:** Medida de la capacidad de un método analítico para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando idea de su fiabilidad o estabilidad durante su empleo en rutina.

Cabe resaltar que en el presente informe se hizo el estudio de *la Especificidad, Linealidad, Intervalo, Precisión, Exactitud y Robustez*. Debido a que el *límite de detección* y el *límite de cuantificación* son necesariamente estudiados siempre que el método de análisis se emplee en la determinación de impurezas o trazas de principio activo. En un método de análisis de valoración de contenido, como es el caso no fue necesario debido a que se

trabajó con rangos muy alejados de la mínima cantidad detectable o cuantificable por el equipo.<sup>6, 10, 11</sup>

Los requisitos de las pruebas farmacopeicas varían desde valoraciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones subjetivas de atributos. Considerándose esta amplia variedad, es lógico que diferentes procedimientos de prueba requieran diferentes esquemas de validación. Las categorías de pruebas para las que se exige datos de validación según USP 35, son;<sup>10, 11</sup>

**CATEGORIA I.-** Cuantificación de componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservadores) en productos farmacéuticos terminados.

**CATEGORIA II.-** Determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados.

**CATEGORIA III.-** Determinación de las características de desempeño (disolución, liberación de fármacos).

**CATEGORIA IV.-** Pruebas de identificación.

En el presente trabajo de investigación, se validó un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de Amoxicilina y Ácido Clavulánico en Amoxicilina 500 mg/ Ácido Clavulánico 125 mg tabletas recubiertas teniendo en cuenta la monografía USP 35 NF 30, y la Internacional Conference on Harmonisation of technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for human Use (ICH). Con este procedimiento se probará la confiabilidad del método analítico para asegurar la calidad, eficacia e inocuidad del medicamento. Por tanto al validar este método analítico, se obtendrá un procedimiento reproducible, cumplirá las características y especificaciones de calidad predeterminadas.

Por lo expuesto anteriormente, planteamos el siguiente problema:

¿Cumple con las exigencias de desempeño de validación el método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, para la cuantificación de Amoxicilina y Acido Clavulánico en Tabletas recubiertas?

Con cual se pretende alcanzar los siguientes objetivos:

**OBJETIVO GENERAL:**

Demostrar mediante evidencia documentada que el método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), para la cuantificación de Amoxicilina y Acido Clavulánico en tabletas recubiertas cumpla con las exigencias de desempeño de Validación.

**OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

1. Determinar la *Especificidad* sometidas a diferentes condiciones de trabajo.
2. Determinar los parámetros de *Linealidad, Intervalo, Precisión, Exactitud y Robustez*.



## II. MATERIAL Y MÉTODO

### 1. MATERIAL:

#### 1.1. MATERIAL DE TRABAJO:

- **PRODUCTO:**

Nombre : Amoxicilina 500 mg (como Amoxicilina trihidrato)- Acido Clavulánico 125 mg (como Clavulanato de potasio) tabletas recubiertas.

- **ESTÁNDAR SECUNDARIO:**

- **AMOXICILINA**

Principio activo : Amoxicilina Trihidratoal 86%  
Nº análisis : AXU-110620152  
Lote : MP000001831  
Potencia (base tal cual) : 84.68%  
Humedad : 0,45%  
Fecha de vencimiento : Mayo - 2015

- **CLAVULANATO DE POTASIO**

Principio activo : Clavulanato de Potasio al 42%  
Nº análisis : MP000001031  
Lote : CKA-12222  
Potencia (base tal cual) : 41.8% como Acido Clavulanico  
Humedad : 0,45%  
Fecha de vencimiento : Marzo - 2013

## 1.2. MATERIAL DE LABORATORIO:

- Pipetas volumétricas de 2 y 5 mL
- Pipetas graduadas de 5 mL
- Matraces volumétricos (fiolas) de 50, 100, 200 y 1 000 mL
- Probetas de 500 y 1 000 mL
- Mortero y pilón de porcelana
- Columna cromatográfica Phenomenex Luna L1 150 mm x 4.6 mm x 5  $\mu$ m
- Columna cromatográfica PurospherStar L1 150 mm x 4.6 mm x 5  $\mu$ m
- Portafiltro
- Viales de 2 mL
- Membranas filtrantes (0,45  $\mu$ m)

## 1.3. REACTIVOS:

- Metanol HPLC  
Marca: Merck  
Lote N°: I630812
- Fosfato de sodio monobásico  
Marca: J.T. Baker  
Lote N°: C30C02
- Hidróxido de sodio  
Marca: Merck  
LoteN°: B0619898 109
- Acido Orto-Fosforico 85%  
Marca: Merck  
LoteN°: A045585

**1.4. EQUIPOS:**

ITEM	NOMBRE	SERIE	MARCA	MODELO	CODIGO	CALIFICADO CALIBRADO
1	Cromatógrafo Líquido de Alta Performance	JP60801074 DE60556359 DE60556309 DE60556545 DE60555234	Agilent Technologies	AT 1200 DAD	AT 1200-1	Conforme
2	Cromatógrafo Líquido de Alta Performance	JP73065320 DE62957622 DE64768711 DE63070613 DE71362657	Agilent Technologies	AT 1200 VWD	AT 1200-2	Conforme
3	Balanza Analítica	1126411545	Mettler Toledo	XS204	CFQ-BAL-01	Conforme
4	Balanza Analítica	B107112635	Mettler Toledo	XS105DU	CFQ-BAL-03	Conforme
5	Potenciómetro	123225106	Mettler Toledo	AG8603	----	Conforme
6	Estufa	08-35251	Binder	ED 53	CFQ-2824-CPE-01	Conforme

**2. MÉTODO:****2.1. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS :**

La selección de parámetros de desempeño de la validación se determinó según las características de la muestra y tipo de método analítico. El método a evaluar pertenece a la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) versión 35 - NF30, del procedimiento analítico para la cuantificación de Amoxicilina 500 mg / Acido Clavulánico 125 mg como producto terminado. De acuerdo a esto nos ubicamos dentro de la Categoría I (<1225> USP35 NF30), en la cual las exigencias nos indica

tener en cuenta: *Especificidad, Linealidad (Linealidad del Sistema y Linealidad del Método), Intervalo, Exactitud, Precisión (Repetibilidad instrumental, Repetibilidad del método y Precisión intermedia) y Robustez.*

## 2.2. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS:<sup>11</sup>Cromatografía Líquida de alta Performance (H.P.L.C.).

- **FASE MÓVIL** : Preparar una mezcla filtrada y desgasificada de:  
Buffer fosfato de sodio pH 4.4 : Metanol HPLC (950:50)  
Buffer fosfato de sodio pH 4.4:  
Disolver 7.8 g de fosfato de sodio monobásico anhidro  
(8.93 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado)  
, en un matraz volumétrico de 1 000 mL, con 900 mL  
de agua purificada  
y ajustar a pH  $4.4 \pm 0.1$  con hidróxido de sodio 20% p/v.  
Diluir a volumen con agua purificada y homogeneizar.
- **DETECTOR** : UV, 220 nm
- **COLUMNA** : L1 (octadecilsilano) 150.0 mm x 4.6 mm x 5  $\mu$ m
- **VELOCIDAD DE FLUJO** : 1.0 mL/minuto
- **TEMPERATURA** : 25 °C
- **VOLUMEN DE INYECCIÓN** : 20  $\mu$ L
- **TIEMPO DE RETENCIÓN** : Ácido Clavulánico : 4.0 minutos aproximadamente  
Amoxicilina : 7.0 minutos aproximadamente
- **TIEMPO DE CORRIDA** : 10 minutos aproximadamente

### 2.3. PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO:

#### **-Preparación del estándar.-**

Pesar con exactitud alrededor de 72 mg de Amoxicilina estándar secundario Trihidrato, transferir a unmatraz volumétrico de 100 mL, disolver con 50 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. (Solución stock - unmatraz volumétrico A).

Pesar con exactitud alrededor de 92 mg de Clavulanato de Potasio estándar secundario, transferir a unmatraz volumétrico de 100 mL, disolver con 50 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. (Solución stock-matraz volumétrico B).

#### Mezcla de estándares:

Medir 5 mL delmatraz volumétricoA y 2 mL del matraz volumétricoB, transferir a unmatraz volumétrico de 50 mL y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar, Filtrar por membrana PVDF 0.45  $\mu\text{m}$  de porosidad e inyectar.

#### **-Preparación de la muestra.-**

Pesar individualmente 20 tabletas, colocarlas en un mortero y moler hasta obtener polvo fino. Pesar con exactitud alrededor de 537 mg de polvo fino (equivalente a 244 mg de Amoxicilina), transferir a unmatraz volumétrico de 200 mL, adicionar 80 mL de agua purificada, agitar mecánicamente por 10 minutos y llevar a ultrasonido por 15 minutos, diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. Medir con pipeta volumétrica 5 mL del sobrenadante, transferir a unmatraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar, filtrar por membrana PVDF 0.45  $\mu\text{m}$  de porosidad e inyectar.

Los cálculos para la valoración de Amoxicilina y Acido Clavulanico obedecieron a lo siguiente :

Amoxicilina mg/tab. =

$$\frac{A M}{A St} \times \frac{W St}{100} \times \frac{5}{50} \times Pot St \times \frac{200}{WM} \times \frac{100}{5} \times p.p$$

Donde:

- A M : Área de la muestra.
- A St : Área del estándar.
- W St : Peso del estándar expresado en mg.
- W M : Peso de muestra problema expresada en mg.
- p.p. : Peso promedio expresado en mg.
- PotSt : Potencia del estándar expresado en fracción decimal como tal cual.

AcidoClavulánico mg/tab. =

$$\frac{A M}{A St} \times \frac{W St}{100} \times \frac{2}{50} \times Pot St \times \frac{200}{WM} \times \frac{100}{5} \times p.p$$

Donde:

- A M : Área de la muestra.
- A St : Área del estándar.
- W St : Peso del estándar expresado en mg.
- W M : Peso de muestra problema expresada en mg.
- p.p. : Peso promedio expresado en mg.
- PotSt : Potencia del estándar expresado en fracción decimal como ácido clavulánico tal cual.

## **2.4. VALIDACION DEL METODO ANALITICO:**

Se prepararon las muestras para los análisis correspondientes en cada parámetro de validación, teniendo en cuenta procedimientos de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria y la USP 35-NF 30, las cuales detallamos a continuación:

### **2.4.1. PRECISIÓN DEL SISTEMA:**

Para evaluar la precisión instrumental inyectar 6 veces consecutivas una solución del estándar preparada.

#### **a. Preparación del estándar**

Pesar con exactitud alrededor de 72 mg de Amoxicilina estándar secundario Trihidrato, transferir a unmatraz volumétrico de 100 mL, disolver con 50 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. (Solución stock - unmatraz volumétrico A).

Pesar con exactitud alrededor de 92 mg de Clavulanato de Potasio estándar secundario, transferir a unmatraz volumétrico de 100 mL, disolver con 50 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. (Solución stock-matraz volumétrico B).

#### Mezcla de estándares:

Medir 5 mL delmatraz volumétrico A y 2 mL delmatraz volumétrico B, transferir a unmatraz volumétrico de 50 mL y diluir a volumen con agua purificada.

Homogeneizar, Filtrar por membrana PVDF 0.45  $\mu$ m de porosidad e inyectar.

## **2.4.2. ESPECIFICIDAD:**

Este estudio se dividió en dos partes:

- Determinación de Interferencia de Excipientes.
- Determinación de productos de degradación.

Tratar el principio activo con los siguientes métodos de degradación artificial del analito o hasta lograr una degradación del analito:

- Hidrólisis alcalina, por calentamiento en baño maría con NaOH 0.1 N por 2 horas y posterior neutralización con HCl 0.1 N.
- Hidrólisis ácida, por calentamiento en baño maría con HCl 0.1 N por 2 horas y posterior neutralización con NaOH 0.1 N.
- Degradación por UV por 5 días.
- Termólisis, por calentamiento en estufa a 80 °C por 15 horas.
- Oxidación, por 2 horas en baño maría con V gotas de peróxido de hidrógeno al 30%.

### **A. Determinación de Interferencia de Excipientes**

#### **a. Preparación del estándar**

Se procedió de manera similar que la Aptitud del Sistema.

#### **b. Placebo**

Pesar con exactitud alrededor de 537 mg de placebo y transferir a una matraz volumétrico de 200 mL, adicionar 80 mL de agua purificada, agitar mecánicamente por 10 minutos y llevar a ultrasonido por 15 minutos, diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. Medir con pipeta volumétrica 5 mL del sobrenadante, transferir a una fiola de 100 mL, diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar, filtrar por membrana PVDF 0.45  $\mu$ m de porosidad e inyectar.



**c. Recobro**

Pesar individualmente 20 tabletas, colocarlas en un mortero y moler hasta obtener polvo fino. Pesar con exactitud alrededor de 537 mg de polvo fino (equivalente a 244 mg de Amoxicilina), transferir a una fiola de 200 mL, adicionar 80 mL de agua purificada, agitar mecánicamente por 10 minutos y llevar a ultrasonido por 15 minutos, diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. Medir con pipeta volumétrica 5 mL del sobrenadante, transferir a una fiola de 100 mL, diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar, filtrar por membrana PVDF 0.45  $\mu\text{m}$  de porosidad e inyectar. Preparar 6 muestras.

**B. Determinación de Interferencia de Productos de Degradación**

**a. Preparación del estándar**

Se procedió de manera similar que en el parámetro anterior.

**b. Hidrólisis ácida.**

**- Dosaje del Placebo degradado:**

Pesar con exactitud alrededor de 537 mg de placebo y transferir cada uno a un matraz volumetrico de 200 mL, se agregó 5 mL de HCl 0,1 N; llevándose a baño maría 50 ° C por 2 horas. Se procedió a enfriar, neutralizó con 5 mL de NaOH 0,1 N, adicionar 80 mL de agua purificada, agitar mecánicamente por 10 minutos y llevar a ultrasonido por 15 minutos, diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. Medir con pipeta volumétrica 5 mL del sobrenadante, transferir a un matraz volumetrico de 100 mL, diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar, filtrar por membrana PVDF 0.45  $\mu\text{m}$  de porosidad e inyectar.

**- Dosaje de la muestra degradada:**

Pesar con exactitud alrededor de 537 mg de muestra y transferir cada uno a un matraz volumétrico de 200 mL, se agregó 5 mL de HCl 0,1 N; llevándose a baño maría 50 ° C por 2 horas. Se procedió a enfriar, neutralizó con 5 mL de NaOH 0,1 N, adicionar 80 mL de agua purificada, agitar mecánicamente por 10 minutos y llevar a ultrasonido por 15 minutos, diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. Medir con pipeta volumétrica 5 mL del sobrenadante, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar, filtrar por membrana PVDF 0.45 µm de porosidad e inyectar.

**c.Hidrólisis básica.**

Pesar con exactitud alrededor de 537 mg de muestra y transferir cada uno de ellos a un matraz volumétrico de 200 mL, se agregó 5 mL de NaOH 0,1 N; llevándose a baño maría a 50° C por 2 horas. Se procedió a enfriar, neutralizó con 5 mL de HCl 0,1 N, adicionar 80 mL de agua purificada, agitar mecánicamente por 10 minutos y llevar a ultrasonido por 15 minutos, diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. Medir con pipeta volumétrica 5 mL del sobrenadante, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar, filtrar por membrana PVDF 0.45 µm de porosidad e inyectar. Se preparó una muestra y se analizó por duplicado.

**d. Oxidación**

Pesar con exactitud alrededor de 537 mg de muestra y transferir a un matraz volumétrico de 100 mL; se agregó 5 gotas de Peroxido de Hidrogeno; llevándose a baño maría a 50° C por 2 horas, adicionó 30 mL de solución diluyente, sonicó por 2 minutos para disolver y llevó a volumen con solución diluyente. Se diluyó 5 mL de la solución anterior en matraz volumétrico de 100 mL con el diluyente. Se enrazó y homogeneizó (concentración = 0,05 mg/mL). Se preparó una muestra y se analizó por duplicado.

**e. Termólisis**

Pesar con exactitud alrededor de 537 mg de muestra y transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, cada uno de ellos en un matraz volumétrico de 100 mL; se expuso al tratamiento de calor en estufa a 80°C durante 15 horas., adicionó 50 mL de solución diluyente, sonicó por 2 minutos para disolver y llevar a volumen con solución diluyente. Se diluyó 5 mL de la solución anterior en matraz volumétrico (fiola) de 100 mL con el diluyente. Se enrazó y homogeneizó (concentración = 0,05 mg/mL). Se preparó una muestra y se analizó por duplicado.

**f. Luz Ultravioleta.**

Se pesó 1 mL de suspensión placebo, 100 mg de Amoxicilina Trihidrato y muestra (1 mL de placebo + 100 mg de Amoxicilina Trihidrato); cada uno de ellos en un matraz volumétrico de 100 mL; se expuso al tratamiento de luz ultravioleta durante 5 días; pasado este periodo se adicionó 30 mL de

solución diluyente, sonicó por 2 minutos para disolver y llevó a volumen con solución diluyente. Se diluyó 5 mL de la solución anterior en matraz volumétrico de 100 mL con el diluyente. Se enrazó y homogeneizó (concentración = 0,05 mg/mL). Se preparó una muestra y se analizó por duplicado.

### **2.4.3. LINEALIDAD DEL SISTEMA:**

Se preparo pesadas independientes de estándar secundario y por triplicado 5 niveles de concentración, que cubran el rango de trabajo, al 50%, 75%, 100%, 125% y 150% de la concentración nominal de trabajo.

#### **a. Concentración al 50%**

Pesar con exactitud alrededor de 36 mg de estándar de Amoxicilina Trihidrato, transferir a una matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 50 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. (Solución stock - Fiola A).

Pesar con exactitud alrededor de 46 mg de estándar de Clavulanato de Potasio , transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 50 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. (Solución stock – Fiola B)

#### Mezcla de estándares:

Medir 5 mL de la fiola A y 2 mL de la fiola B, transferir a fiola de 50 mL y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar, Filtrar por membrana PVDF 0.45  $\mu$ m de porosidad e inyectar.

**b. Concentración al 75%**

Pesar con exactitud alrededor de 54 mg de estándar de Amoxicilina Trihidrato, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 50 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. (Solución stock - Fiola A).

Pesar con exactitud alrededor de 69 mg de estándar de Clavulanato de Potasio , transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 50 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. (Solución stock – Fiola B)

Mezcla de estándares:

Medir 5 mL de la fiola A y 2 mL de la fiola B, transferir a fiola de 50 mL y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar, Filtrar por membrana PVDF 0.45  $\mu\text{m}$  de porosidad e inyectar.

**c. Concentración al 100%**

Pesar con exactitud alrededor de 72 mg de estándar de Amoxicilina Trihidrato, transferir a una matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 50 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. (Solución stock - Fiola A).

Pesar con exactitud alrededor de 92 mg de estándar de Clavulanato de Potasio , transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 50 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. (Solución stock – Fiola B)

Mezcla de estándares:

Medir 5 mL de la fiola A y 2 mL de la fiola B, transferir a matraz volumétrico de 50 mL y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar, Filtrar por membrana PVDF 0.45  $\mu\text{m}$  de porosidad e inyectar.

**d. Concentración al 125%**

Pesar con exactitud alrededor de 90 mg de estándar de Amoxicilina Trihidrato, transferir a una matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 50 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. (Solución stock - Fiola A).

Pesar con exactitud alrededor de 115 mg de estándar de Clavulanato de Potasio , transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 50 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. (Solución stock – Fiola B).

Mezcla de estándares:

Medir 5 mL de la fiola A y 2 mL de la fiola B, transferir a un matraz volumétrico de 50 mL y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar, Filtrar por membrana PVDF 0.45  $\mu\text{m}$  de porosidad e inyectar.

**e. Concentración al 150%**

Pesar con exactitud alrededor de 108 mg de estándar de Amoxicilina Trihidrato, transferir a una matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 50 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. (Solución stock - Fiola A).

Pesar con exactitud alrededor de 138 mg de estándar de Clavulanato de Potasio, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 50 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. (Solución stock – Fiola B)

Mezcla de estándares:

Medir 5 mL de la fiola A y 2 mL de la fiola B, transferir a fiola de 50 mL y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar, Filtrar por membrana PVDF 0.45  $\mu\text{m}$  de porosidad e inyectar.

**2.4.4. LINEALIDAD DEL MÉTODO:**

Preparar soluciones de placebo enriquecidos con principio activo en tres niveles de concentración que cubran el intervalo de trabajo (70, 100 y 130%), por pesadas independientes y por triplicado:

**a. Concentración al 70%**

Pesar con exactitud alrededor de 50.4 mg de estándar secundario de Amoxicilina Trihidrato y agregar placebo, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 50 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. (Solución stock - Fiola A).

Pesar con exactitud alrededor de 64.4 mg de estándar secundario de Clavulanato de Potasio y agregar placebo, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 50 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10

minutos y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. (Solución stock – Fiola B).

Mezcla de estándares:

Medir 5 mL de la fiola A y 2 mL de la fiola B, transferir a matraz volumétrico de 50 mL y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar, Filtrar por membrana PVDF 0.45  $\mu\text{m}$  de porosidad e inyectar.

**b. Concentración al 100%**

Pesar con exactitud alrededor de 72 mg de estándar secundario de Amoxicilina Trihidrato y agregar placebo, transferir a una matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 50 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. (Solución stock - Fiola A).

Pesar con exactitud alrededor de 92 mg de estándar secundario de Clavulanato de Potasio y agregar placebo, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 50 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. (Solución stock – Fiola B)

Mezcla de estándares:

Medir 5 mL de la fiola A y 2 mL de la fiola B, transferir a matraz volumétrico de 50 mL y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar, Filtrar por membrana PVDF 0.45  $\mu\text{m}$  de porosidad e inyectar.



**c. Concentración al 130%**

Pesar con exactitud alrededor de 93.6 mg de estándar secundario de Amoxicilina Trihidrato y agregar placebo, transferir a una matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 50 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. (Solución stock - Fiola A).

Pesar con exactitud alrededor de 119.6 mg de estándar secundario de Clavulanato de Potasio y agregar placebo, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 50 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. (Solución stock – Fiola B)

Mezcla de estándares:

Medir 5 mL de la fiola A y 2 mL de la fiola B, transferir a fiola de 50 mL y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar, Filtrar por membrana PVDF 0.45  $\mu$ m de porosidad e inyectar.

**2.4.5. EXACTITUD:**

Para este estudio se trabaja con las mismas muestras preparadas para la determinación de la linealidad del método

**a. Preparación del estándar**

Pesar con exactitud alrededor de 72 mg de estándar secundario de Amoxicilina Trihidrato, transferir a una matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 50 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos

y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar.  
(Solución stock - Fiola A).

Pesar con exactitud alrededor de 92 mg de estándar secundario de Clavulanato de Potasio, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 50 mL de agua purificada, llevar al ultrasonido por 10 minutos y diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar.  
(Solución stock – Fiola B)

**b. Preparación de la muestra**

Se trabajó con las muestras al 70%, 100% y 130%, preparadas para determinar la *Linealidad* del método. Se analizó por triplicado cada una de ellas.

**2.4.6. PRECISION**

**- REPETIBILIDAD**

Analizar un lote fabricado y analizar independientemente 6 muestras.

**a. Preparación del estándar**

Se procedió de manera similar que en el preparación de estándar de la Exactitud.

**b. Preparación de la muestra**

Pesar individualmente 20 tabletas, colocarlas en un mortero y moler hasta obtener polvo fino. Pesar con exactitud alrededor de 537 mg de polvo fino (equivalente a 244 mg de Amoxicilina), transferir a una fiola de 200 mL, adicionar 80 mL de agua purificada, agitar mecánicamente por 10 minutos y llevar a ultrasonido por 15 minutos, diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. Medir con pipeta volumétrica 5 mL del sobrenadante, transferir a una fiola de 100 mL, diluir a volumen con agua

purificada. Homogeneizar, filtrar por membrana PVDF 0.45  $\mu\text{m}$  de porosidad e inyectar. Preparar 6 muestras.

- **PRECISION INTERMEDIA:**

El análisis se llevó a cabo por 2 analistas en días diferentes. Cada analista preparó 6 muestras del producto a la concentración nominal (100%) y se procedió de la siguiente manera:

**a. Precisión Intermedia día 1 - Analista "A"**

**a.1. Preparación del estándar**

Se tomó el estándar realizado en la repetibilidad.

**a.2. Muestra**

Se tomó las muestras realizadas en repetibilidad.

**b. Precisión Intermedia día 2 - Analista "B"**

**b.1. Preparación del Estándar**

Se procedió de manera similar que en el preparación de estándar de la Exactitud.

**b.2. Muestra**

Pesar individualmente 20 tabletas, colocarlas en un mortero y moler hasta obtener polvo fino. Pesar con exactitud alrededor de 537 mg de polvo fino (equivalente a 244 mg de Amoxicilina), transferir a una fiola de 200 mL, adicionar 80 mL de agua purificada, agitar mecánicamente por 10 minutos y llevar a ultrasonido por 15 minutos, diluir a volumen con agua purificada. Homogeneizar y dejar sedimentar. Medir con pipeta volumétrica 5 mL del sobrenadante, transferir a una fiola de 100 mL, diluir a volumen con agua

purificada. Homogeneizar, filtrar por membrana PVDF 0.45  $\mu\text{m}$  de porosidad e inyectar. Preparar 6 muestras.

#### **2.4.7. ROBUSTEZ:**

##### **- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA DESPUÉS DE 48 HORAS EN REFRIGERACIÓN.**

Se consideran las 2 primeras muestras de la repetibilidad como análisis inicial y estas mismas muestras permanecen aproximadamente 48 horas en refrigeración y se vuelven a correr con un estándar recientemente preparado.

##### **a. Preparación del estándar**

Se procedió de manera similar que en el preparación de estándar de la Exactitud.

##### **b. Preparación de la muestra**

Se consideró las 2 primeras muestras de la repetibilidad como análisis inicial y luego las mismas muestras se volvió a correr después de 48 horas en refrigeración con un estándar recién preparado.

##### **- COMPARACIÓN DE LA MUESTRA EN DIFERENTE COLUMNA:**

Se consideran las 2 primeras muestras de la repetibilidad como análisis inicial y estas mismas muestras se vuelven a correr en la columna de otro fabricante (PurospherStar RP-18 150 mm x 4.6 mm x 5  $\mu\text{m}$ ).

##### **a.- Preparación del estándar**

Se procedió de manera similar que en el preparación de estándar de la Exactitud.

##### **b.- Preparación de la muestra**

Se consideró las 2 primeras muestras de la repetibilidad como análisis inicial y luego las mismas muestras se volvió a correr en la columna de otro fabricante con un estándar recién preparado.

### 3. ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico de regresión lineal, T -

Student y ANOVA con un nivel de significancia del 95%. ( $\alpha = 0,05$ ).<sup>6</sup>

#### 3.1. ESTUDIO DE LA LINEALIDAD:<sup>2, 11, 15</sup>

##### a) Cálculo de la recta de Regresión

$$y = b x + a$$

x = Concentración (mg/mL)

y = Área del pico cromatografico (Abs)

Siendo: a=Valor de la pendiente

b=Termino independiente

n = número de mediciones

##### b) Fórmula para hallar:

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

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

##### b.1. Coeficiente de correlación:

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

##### b.2. Coeficiente de Determinación:

$$R^2 = (R)^2$$

### b.3. Test Estadístico de Linealidad

Significación estadística de la varianza ( $S^2$ ) de la pendiente b:

$$S^2_{X,Y} = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n-2}$$

$$S^2_b = \frac{S^2_{X,Y}}{\sum x^2 - (\sum x)^2/n}$$

Desviación estándar relativa (S rel.) de la pendiente b:

- Límites de confianza de la pendiente:

$$B = b \pm t S_b$$

### b.4. Test de T:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|b|}{S_b}$$

Desviación estándar relativa (S rel.) del término independiente a:

- Límites de confianza del intercepto:

$$A = a \pm t S_a$$

### b.5. Test estadístico del coeficiente de correlación (R):

$$t_R = \frac{|R| \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-R^2}}$$

### b.6. Factor respuesta:

$$C V_f (\%) = \frac{S_f}{\text{Prom } f} \times 100$$

Donde: Desviación Estándar: Sf

Coefficiente de Variación: f

### 3.2. ESTUDIO DE LA EXACTITUD:<sup>1, 11,15</sup>

#### a. Promedio de Estándar (ST):

$$ST = \frac{St\ 1 + St\ 2}{2}$$

Donde:

St : Estándar 1 (mg )

St : Estándar 2 (mg )

#### b. Determinación del Factor

$$F = \frac{W\ St}{100} \times \frac{5}{50} \times Pot\ St \times \frac{200}{WM} \times \frac{100}{5} \times p.p$$

A M : Área de la muestra.

A St : Área del estándar.

W St : Peso del estándar expresado en mg.

W M : Peso de muestra problema expresada en mg.

p.p. : Peso promedio expresado en mg.

PotSt : Potencia del estándar expresado en fracción decimal como tal cual.

#### c. Muestra Hallada:

$$mg\ Hallado = \frac{\text{Área Muestra}}{\text{Área Estándar}} \times F$$

Donde:

- mg/tab : Miligramos de por tableta  
 A mp : Área de la muestra  
 A St : Área promedio del estándar  
 F : Factor de la muestra

**d. Porcentaje de Recuperación (% Rec):**

$$\% R = \frac{X_H \times 100}{X_A}$$

Donde:

- $X_H$  : Cantidad Hallada  
 $X_A$  : Cantidad Añadida

**3.3. ESTUDIO DE LA PRECISIÓN, REPETIBILIDAD:<sup>5,15</sup>**

**a. Determinación de la cantidad en mg/tab:**

Amoxicilina mg/tab. =

$$\frac{A M}{A St} \times \frac{W St}{100} \times \frac{5}{50} \times Pot St \times \frac{200}{WM} \times \frac{100}{5} \times p.p .$$

Donde:

- A M : Área de la muestra.  
 A St : Área del estándar.  
 W St : Peso del estándar expresado en mg.  
 W M : Peso de muestra problema expresada en mg.  
 p.p. : Peso promedio expresado en mg.



PotSt : Potencia del estándar expresado en fracción decimal como tal cual.

AcidoClavulanico mg/tab. =

$$\frac{A M}{A St} \times \frac{W St}{100} \times \frac{2}{50} \times Pot St \times \frac{200}{WM} \times \frac{100}{5} \times p.p$$

Donde:

- A M : Área de la muestra.  
 A St : Área del estándar.  
 W St : Peso del estándar expresado en mg.  
 W M : Peso de muestra problema expresada en mg.  
 p.p. : Peso promedio expresado en mg.  
 PotSt : Potencia del estándar expresado en fracción decimal como ácido clavulánico tal cual.

**b. Determinación del coeficiente de variación:**

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

Dónde:

- Desviación estándar : (s)  
 Coeficiente de variación : (CV)  
 Promedio : ( x )

**c. Límites de Confianza:**

$$\text{Intervalo de Confianza Individual} = \bar{X} \pm t_{\text{tabla}} \cdot S$$

$$\text{Intervalo de Confianza Promedio} = \bar{X} \pm \frac{t_{\text{tabla}} \cdot S}{\sqrt{n}}$$

### 3.4. ESTUDIO DE ROBUSTEZ:<sup>5, 15</sup>

$$|d_1| = \frac{\text{PMI} - \text{PMF}}{100}$$

Dónde:

PMI : Promedio de muestras iniciales (%)

PMF : Promedio de muestras finales (%)

## 4. ESPECIFICACIONES Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.

Se estableció a priori para cada uno de los parámetros a evaluar, según Procedimiento Operativo Estándar (P.O.E). de Validación de métodos analíticos de Laboratorios Medifarma S.A.

Los criterios de aceptación para cada uno de los parámetros estudiados, son los siguientes:

### 4.1. ESPECIFICIDAD:

El método es *Específico* si el placebo y los posibles productos de degradación, no deben dar una respuesta cuantificable (Interferencia  $\leq 2\%$ ). Es decir la posible degradación no interfieren con la determinación del analito.<sup>6, 10,</sup>

**4.2 . LINEALIDAD:**

El método posee una adecuada *Linealidad* si la recta de regresión construida con las concentraciones de los analitos y sus áreas respectivas cumple con los parámetros de regresión lineal y significación estadística.<sup>6</sup>

**Cuadro N° 1:** Criterios de aceptación para *Linealidad*:

Parámetro	Criterio de aceptación
Coefficiente de Correlación	$r \bullet 0,995$
Coefficiente de Determinación	$r^2 \bullet 0,990$
Test de linealidad	RSD < 2,0%
Anova	$F_{exp} > F_{tablas}$
Significación estadística de la pendiente	$t_{exp} > t_{tabla}$

**4.3. EXACTITUD:** El método es *Exacto* si cumple con lo siguiente:**Cuadro N° 2:** Criterios de aceptación para *Exactitud*:

Parámetro	Criterio de aceptación
% Recuperación	98 – 102 %
t de Student	$t_{exp} < t_{tabla}$

**4.4. PRECISIÓN:** El método es *Preciso* si Desviación Estándar Relativa(DSR) de los diferentes tipos de estudio cumplan con los criterios de aceptación.<sup>6</sup>

**Cuadro N° 3:** Criterios de aceptación para *Precisión*:

<b>Tipo de estudio</b>	<b>Criterio de aceptación</b>
Repetibilidad del Sistema	DSR < 2,0 %
Repetibilidad del Método	DSR < 2.0 %
Precisión Intermedia	DSR < 4,0 %

**4.5. RANGO:**

Por ser un ensayo de valoración de un producto terminado cuya especificación es de 90% a 120%, el intervalo de trabajo será: 70% - 130% de la concentración de trabajo para Amoxicilina y Acido Clavulánico.

**4.6. ROBUSTEZ:**Cuadro N°4 Criterios de aceptación para *Robustez*

<b>Tipo de estudio</b>	<b>Criterio de aceptación</b>
-La comparación de la muestra en diferente columna.	RSD $\leq$ 2% $ d_1  \leq 2\%$
-Estabilidad de la muestra después de 48 horas en refrigeración.	RSD $\leq$ 2% $ d_1  \leq 2\%$

Siendo:

 $|d_1|$  : Diferencia Absoluta

RSD: Desviación estándar relativa

### III. RESULTADOS

**CUADRO N°4: PARAMETROS DE DESEMPEÑO DE LA VALIDACION DEL METODO ANALITICO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC) PARA LA CUANTIFICACION DE ACIDO CLAVULANICO**

PARAMETRO	LIMITES	RESULTADOS
<b>Especificidad:</b> Interferencia debido a excipientes y/o degradados	Ausencia de interferencia	Conforme
<b>Linealidad:</b> a) <u>Sistema</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>Ecuación de la Recta:</li> <li>Coefficiente de Correlación</li> <li>Coefficiente de Determinación:</li> <li>Test de ANOVA :</li> <li>Test de Linealidad:</li> <li>-Coefficiente de Variación de los Factores de Respuesta "f"</li> <li>Intervalo de confianza de la pendiente "b":</li> <li>Intervalo de confianza del Intercepto "a"</li> </ul>	$y = bx + a$ Mayor a 0.995 Mayor a 0.990 $F_{exp} > F_{tabla}$  $RSD \leq 2\%$ $b \pm t_{tabla} \cdot S_b$ $t_{exp} > t_{tabla}$ $a \pm t_{tabla} \cdot S_a$ $t_{exp} < t_{tabla}$	$y = 16\,934.3080x + 10.4868$ 0.9996 0.9992 $15\,536.607 > 4.667$  1.393% $2152.724 \pm 2195.369$ $124.646 > 2.160$ $-10.83621 \pm 1.29585$ $1.699 < 2.160$
b) <u>Método</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>Ecuación de la Recta:</li> <li>Coefficiente de Correlación</li> <li>Coefficiente de Determinación</li> <li>Test de ANOVA</li> <li>Test de Linealidad:</li> <li>-Coefficiente de Variación de los Factores de Respuesta "f"</li> <li>Intervalo de confianza de la pendiente "b":</li> <li>Intervalo de confianza del Intercepto "a"</li> </ul>	$y = bx + a$ Mayor a 0.995 Mayor a 0.990 $F_{exp} > F_{tabla}$  $RSD \leq 2\%$ $b \pm t_{tabla} \cdot S_b$ $t_{exp} > t_{tabla}$ $a \pm t_{tabla} \cdot S_a$ $t_{exp} < t_{tabla}$	$y = 22\,264.2331x - 2.8052$ 0.9998 0.9996 $19\,635.2049 > 5.591$  0.63% $21\,888.52 - 22\,639.94$ $140.126 > 2.365$ $-8.759 - 3.149$ $1.114 < 2.365$

<b>Exactitud:</b>		
Porcentaje de Recuperación:	98% - 102%	99.83%
<b>Precisión:</b>		
<u>Precisión Instrumental:</u>		
- De los Tiempos de retención	RSD $\leq$ 2%	0.18%
- De las Áreas	RSD $\leq$ 2%	0.31%
<u>Repetibilidad:</u>	RSD $\leq$ 2%	0.32%
- Intervalo de Confianza del 95% Individual	$X \pm t_{\text{tabla}} \cdot S$	12613.00% $\pm$ 104.00%
- Intervalo de Confianza del 95% de la Media	$X \pm \frac{t_{\text{tabla}} \cdot S}{\sqrt{n}}$	12613.00% $\pm$ 43.00%
<u>Precisión Intermedia:</u>	RSD $\leq$ 4%	0.23%
<b>Robustez</b>		
-La comparación de la muestra en diferente columna.	RSD $\leq$ 2% $ d_1  \leq 2\%$	0.10% 0.10%
-Estabilidad de la muestra después de 48 horas en refrigeración.	RSD $\leq$ 2% $ d_1  \leq 2\%$	0.57% 0.41%

**CUADRO N°5: PARAMETROS DE DESEMPEÑO DE LA VALIDACION DEL METODO ANALITICO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC) PARA LA CUANTIFICACION DE AMOXICILINA**

PARAMETRO	LIMITES	RESULTADOS
<b>Especificidad:</b> -Interferencia debido a excipientes y/o degradados	Ausencia de interferencia	Conforme
<b>Linealidad :</b> a) <u>Sistema</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ecuación de la Recta:</li> <li>• Coeficiente de Correlación</li> <li>• Coeficiente de Determinación</li> <li>• Test de ANOVA</li> <li>• Test de Linealidad: -Coeficiente de Variación de los Factores de Respuesta "f"</li> <li>• Intervalo de confianza de la pendiente "b":</li> <li>• Intervalo de confianza del Intercepto "a"</li> </ul> b) <u>Método</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ecuación de la Recta:</li> <li>• Coeficiente de Correlación</li> <li>• Coeficiente de Determinación</li> <li>• Test de ANOVA</li> <li>• Test de Linealidad: -Coeficiente de Variación de los Factores de Respuesta "f"</li> <li>• Intervalo de confianza de la pendiente "b".</li> <li>• Intervalo de confianza del Intercepto "a"</li> </ul>	$y = bx + a$ Mayor a 0.995 Mayor a 0.990 $F_{exp} > F_{tabla}$ $RSD \leq 2\%$ $b \pm t_{tabla} \cdot S_b$ $t_{exp} > t_{tabla}$ $a \pm t_{tabla} \cdot S_a$ $t_{exp} < t_{tabla}$  $y = bx + a$ Mayor a 0.995 Mayor a 0.990 $F_{exp} > F_{tabla}$ $RSD \leq 2\%$ $b \pm t_{tabla} \cdot S_b$ $t_{exp} > t_{tabla}$ $a \pm t_{tabla} \cdot S_a$ $t_{exp} < t_{tabla}$	$y = 17\ 080.3999x - 27.7328$ 0.9991 0.9982 $7\ 070.552 > 4.667$ 1.660% $16\ 641.567 \pm 17\ 519.233$ $84.087 > 2.160$ $-56.22029 \pm 0.75467$ $2.103 < 2.160$  $y = 17\ 150.6854x - 1.1665$ 0.9999 0.9998 $28\ 501.724 > 5.591$ 0.470% $16\ 910.466 - 17\ 390.905$ $168.825 > 2.365$ $-16.267 - 13.934$ $0.183 < 2.365$

<b>Exactitud:</b>		
Porcentaje de Recuperación:	98% - 102%	99.90%
<b>Precisión:</b>		
<u>Precisión Instrumental:</u>		
De los Tiempos de retención	RSD $\leq$ 2%	0.41%
De las Áreas	RSD $\leq$ 2%	0.41%
<u>Repetibilidad:</u>	RSD $\leq$ 2%	0.28%
- Intervalo de Confianza del 95% Individual	$X \pm t_{\text{tabla}} \cdot S$	508.53 $\pm$ 3.64
- Intervalo de Confianza del 95% de la Media	$X \pm \frac{t_{\text{tabla}} \cdot S}{\sqrt{n}}$	508.53 $\pm$ 1.48
<u>Precisión Intermedia:</u>	RSD $\leq$ 4%	0.37%
<b>Robustez:</b>		
-La comparación de la muestra en diferente columna	RSD $\leq$ 2% $ d_1  \leq$ 2%	0.51% 0.52%
-Estabilidad de la muestra después de 48 horas en refrigeración	RSD $\leq$ 2% $ d_1  \leq$ 2%	0.57% 0.41%



#### IV. DISCUSIÓN

En la prueba de la Aptitud del Sistema o Precisión Instrumental, se debe realizar antes de iniciar el estudio de otros parámetros de validación, dado que así se conoce en que grado de respuesta entre el instrumento y el analito, para Acido Clavulánico se obtuvo un RSD de áreas de pico de 0.41 % y un RSD de tiempos de retención de 0.41%; para Amoxicilina se obtuvo un RSD de áreas de pico de 0.18 % y RSD de tiempos de retención de 0.31% , estos resultados vienen a ser el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas a partir de la misma muestra homogénea, en ambos casos están dentro de lo permitido siendo el valor máximo de 2%.<sup>1,2</sup>

Para Especificidad en la determinación de interferencia de excipientes se trabajó tanto el placebo, la solución estándar y el recobro (placebo más estándar), no encontrándose picos que interfieran con el pico cromatográfico de Amoxicilina Trihidrato y Acido Clavulánico, es decir no hubo picos que eluyan al mismo tiempo de retención, comprobándose que los excipientes no influyen sobre los analitos de interés.<sup>3,4,5</sup>

Para la determinación de interferencia de productos de degradación, sometidos a diferentes exposiciones drásticas, se encontró que en ninguno de los casos de sometimiento del placebo, principio activo y muestra; resulto una degradación significativa, ya que los porcentajes se encuentran en las mismas proporciones. Cabe mencionar que al someter el principio activo y la muestra a las diferentes exposiciones, el área del pico no se ve disminuida por lo cual el principio activo y la muestra, tiene resistencia a los cambios drásticos.<sup>4,5</sup>

El gráfico de respuesta vs concentración para Amoxicilina y Acido Clavulánico demuestra que el método por HPLC produce una respuesta lineal para las muestras. La ecuación de la recta que se obtiene en la linealidad del método demuestra que el método responde linealmente en el rango de trabajo empleado. Para la linealidad del sistema y método se pudo constatar que el valor de coeficiente de correlación es menor de 0.995, y el coeficiente de determinación es menor de 0.990 para ambos activos, lo que indica la existencia de una proporcionalidad entre las concentraciones y las respuestas, señalando que el sistema conserva la linealidad esperada. El análisis estadístico de regresión ofreció F experimental mayor a F tabla ( $F > 4.667$ ) para el  $p=0,05$  %, demostrando que el modelo lineal proporciona un buen ajuste a los datos; Para verificar la linealidad del sistema y del método en el valor de t de Student experimental fue mayor que el t Tabla (2.160) para el  $p=0,05$  % de confianza, por lo que el intercepto difiere significativamente de cero, lo que significa que el sistema a evaluar no está afectado por un error sistemático. Por otra parte, se mostraron pendientes próximas a la unidad, con t experimental menor al t tabla (2,160) y valores de probabilidad ( $p= 0,05$ ) establecido como límite, por lo que deducimos que el valor observado es estadísticamente igual a cero, es decir este intervalo de confianza del intercepto incluye el cero.<sup>8,9</sup>

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado, como se puede evidenciar el valor de los porcentajes promedio de muestra recuperada de Amoxicilina y Acido Clavulánico fue 99.83% y 99.90 respectivamente, están dentro de los límites de las especificaciones (98,0% - 102,0%) y un RSD menor de 2% (0.5%), por lo que la exactitud es correcta según sus respectivas

especificaciones. Este resultado nos condujo a considerar que los errores sistemáticos del método no fueron significativos, por lo que puede considerarse exacto. La recuperación esperada depende de la matriz de la muestra, del procedimiento de la preparación de la muestra y de la concentración del analito en la misma.<sup>1,5,9</sup>

La precisión, evaluada como repetibilidad, mostró resultados satisfactorios, pues el coeficiente de variación para ambos activos fue menor al 2%. Su estimación se realiza con el cálculo del coeficiente de variación de las respuestas obtenidas y con los intervalos de confianza cada nivel de concentración estudiado.<sup>5,9</sup>

Los resultados de la precisión intermedia se observa el coeficiente de variación total es menor que el 4,0 % para ambos activos. Además se comprobó que no existen diferencias significativas desde el punto de vista estadístico entre los resultados obtenidos para ambos analistas. Con esto se comprobó el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones establecidas en la técnica analítica aplicada.<sup>9,10</sup>

En este estudio se evaluó la estabilidad de las muestras después de 48 horas en refrigeración asimismo con columnas cromatografías diferentes, donde se observó que los resultados de Amoxicilina y Acido Clavulánico cumplen con el criterio de aceptación siendo el RSD menor al 2%, demostrando la robustez del producto.<sup>10,11</sup>

## V. CONCLUSIÓN

- Los resultados obtenidos cumplen con los parámetros de desempeño de validación, por tanto, el método por cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la cuantificación de Amoxicilina y Acido Clavulánico en Tabletas recubiertas propuesto, es adecuado para su uso en el análisis del producto con la formulación actual.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y QUÍMICA

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AEFI. “VALIDACION DE METODOS ANALITICOS”. Monografía AEFI. Barcelona - España , 2001; 23-36, 46-85.
2. Huber L., A.: “GOOD LABORATORY PRACTICE AND CURRENT GOOD MANUFACTURING PRACTICE”. Copyright © Agilent Technologies. Printed in Germany. 2010; 36.
3. USP35-NF30.: “FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA” Tomo 1, Tomo 4. Edición anual en español. 2012; 752-756.
4. A laboratory guide to method validation and related topics. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. Eurachem Guide. Guía para la validación de métodos de ensayo. OAA.DC-LE-05. 2009. [en línea] [Con fecha de acceso el 26 de setiembre del 2012]. Web disponible en:  
[http://www.suelos.org.ar/adjuntos/validacion\\_metodos\\_analiticos.pdf](http://www.suelos.org.ar/adjuntos/validacion_metodos_analiticos.pdf).
5. Dirección General De Medicamentos Insumos y Drogas (DIGEMID). : “MANUAL DE BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA DE PRODUCTOS FARMACETICOS”. Aprobado bajo Resolución Ministerial N° 055-99. SA/DM. Perú. 1999; 26, 71.
6. Oleksiuk, A.; “VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA POR HPLC PARA LA CUANTIFICACION DE LOSARTAN POTASICO EN COMPRIMIDOS RECUEBIERTOS”. Unidad de práctica profesional para optar el título de Químico Farmacéutico. Universidad de chile. Santiago – Chile. 2009. [en línea] [Con fecha de acceso el 12 Octubre del 2012]. Web disponible en:  
[http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2006/oleksiuk\\_a/html/index.html](http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2006/oleksiuk_a/html/index.html)

7. Hirata, M.: “¿Porque Validar Métodos Analíticos?”.Argentina.2010. [en línea]  
[Con fecha de acceso el 12 Octubre del 2012]. Web disponible en:  
Disponible en:  
<http://www.scribd.com/doc/4925527/porque-validar-metodos-analiticos>
8. Agencia Española de Medicamentos y Productos sanitarios, anexo 15  
“CUALIFICAACIÓN Y VALIDACIÓN”. España. [en línea] [Con fecha de  
acceso el 28 de setiembre del 2012]. Web disponible  
en:[www.agemed.es/actividad/sgInspeccion/docs/28-anexo15.pdf](http://www.agemed.es/actividad/sgInspeccion/docs/28-anexo15.pdf)
9. Dirección General De Medicamentos Insumos y Drogas (DIGEMID). : “MANUAL  
DE BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA DE PRODUCTOS  
FARMACETICOS”. Aprobado bajo Resolución Ministerial N° 055-99. SA/DM.  
Perú. 1999; 26, 78.
10. Convención de Inspección Farmacéutica (PIC). Guía de Buenas Practicas de  
Fabricación para los Medicamentos. anexos, Abril 2008
11. Yost,R.; Ettore, L.; Colon, R. “INTRODUCCIÓN A LA  
CROMATOGRAFIALIQUIDA Práctica”.Ed. Perkin Elmer Corporation. E.E.U.U.  
1980; 32-37.