

2es



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

**VALIDACION DE UN METODO ANALITICO
POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE
ALTA RESOLUCION PARA LA CUANTIFICACION
DE AMOXICILINA EN CAPSULAS**

T E S I S
Que para obtener el titulo de
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

p r e s e n t a

VIRGINIA RAMIREZ ORTIZ



México, D. F.

1999

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

275022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente

Prof. Pérez Ruelas Joaquin

Vocal

Prof. Cárdenas Gutiérrez José Manuel

Secretario

Prof. González Monzón Norma Trinidad

Ier. Suplente

Prof. Alpizar Ramos María del Socorro

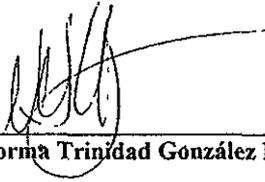
2º. Suplente

Prof. Rodríguez Juan Manuel

Sitio donde se desarrolló el tema:

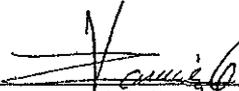
Laboratorios Novag Infancia S.A. de C.V.

Asesor de Tema:



Q.F.B. Norma Trinidad González Monzón

Sustentante:



Virginia Ramírez Ortiz

DEDICATORIA

Con cariño y respeto a mis Padres
Por el amor que siempre me han
Brindado.

Para mi esposo Miguel
Por compartir su vida conmigo.

A mis hijos Mauricio y Yazmin
Por todas las alegrías que día a día
Me ofrecen.

A mis hermanos
En especial a Evita,
Por sus consejos.

A los laboratorios Novag Infancia S.A. de C.V.
Por las facilidades otorgadas
Para la realización del presente trabajo.

A la profesora Norma González Monzón
Por su invaluable amistad.

A Teresa Villalobos e Imay Sepúlveda
Por su apoyo y bellos recuerdos.

A todos aquellos que desinteresadamente
Me han brindado su ayuda.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. GENERALIDADES	3
2.1 MONOGRAFÍA	3
2.2 CROMATOGRAFÍA	7
2.2.1 CLASIFICACIÓN	8
2.2.2 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN	10
2.2.3 PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS	11
2.2.4 EQUIPO	15
2.2.5 ANÁLISIS CUALITATIVO	17
2.2.5 ANÁLISIS CUANTITATIVO	17
3 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	18
3.1 DEFINICIONES	19
4. PARTE EXPERIMENTAL	23
4.1 EQUIPO Y MATERIAL	23
4.2 REACTIVOS	23
4.3 DETERMINACIÓN DE AMOXICILINA	24
4.3.1 PARÁMETROS INSTRUMENTALES	24
4.3.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	24
4.3.3 ANÁLISIS	26
4.3.4 CÁLCULOS	26

4.3.5 VALIDACIÓN DEL MÉTODO	27
4.3.6 RESULTADOS	31
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES	44
6. BIBLIOGRAFÍA	46

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN

La Industria Farmacéutica avanza continuamente en el desarrollo de nuevos medicamentos, lo que implica también el desarrollo de métodos analíticos que vayan a la par con el avance tecnológico. El Químico Analista siempre está interesado en como utilizar la información de los métodos analíticos y los procedimientos que se encuentran en la literatura, para lograr su implementación y optimización en congruencia con las necesidades que se presenten.

Para considerar que el método analítico cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado, es necesario llevar a cabo la validación del método analítico. Con el fin de homogeneizar los criterios y parámetros para la validación de métodos analíticos, la Food and Drug Administration (FDA) bajo los auspicios de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) de requerimientos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano, publicó una guía para la validación de métodos analíticos en marzo de 1995, en donde la extensión de la validación depende de la clasificación y características del método analítico que se va a validar.

Con el Tratado de Libre Comercio la armonización en la validación de métodos analíticos adquiere importancia para facilitar la homogenización en transacciones comerciales y en la transferencia de tecnología de un laboratorio a otro.

La validación del método analítico así como la calibración y/o verificación de todo instrumento de medición utilizado de acuerdo a un programa documentado, es parte integral del Sistema de Control de Calidad y es requisito de las buenas practicas de manufactura.

El presente trabajo tuvo por objeto la validación de un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), para la cuantificación de Amoxicilina en cápsulas.

CAPÍTULO 2
GENERALIDADES

2.1 AMOXICILINA TRIHIDRATADA

Nombres químicos (1)

6 - ((amino (4-hidroxifenil) acetil - amino) - 3,3 dimetil - 7 - oxo - 4 - tia - 1 - azabicyclo (3.2.0) heptano - ácido carboxílico, trihidrato.

Sinónimos (1)

Hidroxiampicilina

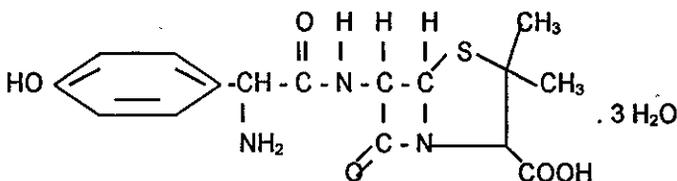
Fórmula molecular (1)

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

Peso molecular (1)

419.46

Fórmula desarrollada (1)



Descripción (2)

Polvo cristalino blanco, libre de partículas extrañas.

Solubilidad (2)

Ligeramente soluble en agua y metanol; insoluble en benceno, tetracloruro de carbono y cloroformo.

pH (2)

Entre 3.5 y 6.0, en una solución conteniendo 2 mg /mL.

Ensayos de identidad

El espectro de absorción infrarrojo de una dispersión de la muestra en bromuro de potasio, presenta máximos solamente a las mismas longitudes de onda que una preparación similar de USP Amoxicilina TS. (2)

Mezclar aproximadamente 10 mg con 1 mL de agua y adicionar 2 mL de una solución de tartrato cúprico de potasio y 6 mL de agua, un color magenta se produce inmediatamente. (3)

Agua (2)

De 11.5 a 14.5 % por el método de Karl Fisher .

Conservación (2)

En envases bien cerrados, protegidos de la luz.

Farmacocinética (4)

La amoxicilina es estable en medio ácido, se absorbe del tracto gastrointestinal en forma más rápida que la ampicilina, las concentraciones plasmáticas máximas son de 2 a 2.5 veces mayores que la ampicilina; por vía oral se absorbe cerca del 100 %. Una dosis oral de 250 mg produce una concentración plasmática máxima de unos 4 mcg/ mL, 17 % de amoxicilina se fija a proteínas y el volumen de distribución es de 0.4 mL/g.

Farmacodinamia (4)

Interfiere en la síntesis de peptidoglucanos que forman parte del material de la pared celular, por lo tanto, el protoplasto en crecimiento no puede formar su pared celular protectora y ocurre un estallamiento de la membrana celular, con la liberación del contenido celular.

Usos (4)

Es un antimicrobiano efectivo en el tratamiento de: infecciones del tracto respiratorio, otitis, infecciones del tracto urinario, infecciones respiratorias, infecciones tisulares, infecciones por salmonella, meningitis, gonorrea, infecciones gastrointestinales, infecciones del tracto biliar, endocarditis bacteriana.

Toxicidad (4)

Puede ocasionar reacciones alérgicas y erupciones cutáneas, choques anafilácticos, anemia hemolítica. Las reacciones pueden ser atenuadas por administración de antihistamínicos, suministrar por vía intramuscular de 0.3 a 1.0 mL de adrenalina en caso severo.

Dosis (4)

En niños una cucharadita (5 mL) de suspensión de 250 mg en 5 mL, cada ocho horas.

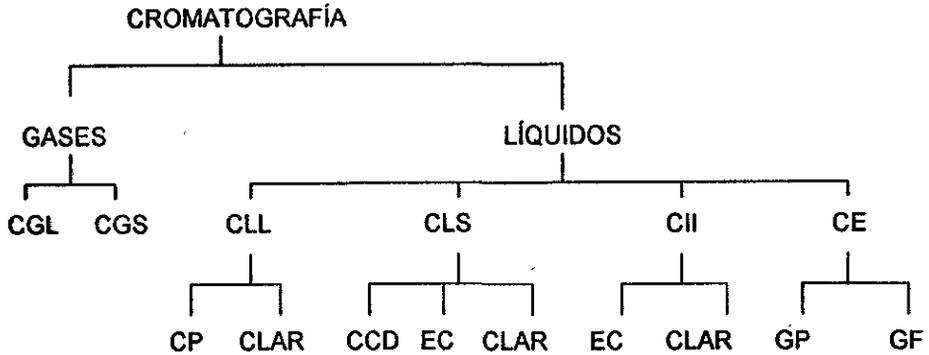
En adultos una cápsula de 500 mg cada ocho horas, una tableta de 1 g cada 8 horas.

2.2 CROMATOGRAFÍA

2.2.1 CLASIFICACIÓN (5, 6, 7)

La cromatografía es un método físico que permite separar, aislar e identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos. La separación se debe a la diferencia en el equilibrio de distribución de los componentes de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. Los componentes de la muestra migran a través del sistema cromatográfico solamente cuando están en la fase móvil. La velocidad de migración de un componente es una función del equilibrio de distribución. Los componentes que tienen distribuciones preferentes por la fase estacionaria migran más lentamente que aquéllos que tienen distribuciones preferentes por la fase móvil. La separación resulta de las diferentes velocidades de migración como una consecuencia de la diferencia en el equilibrio de las distribuciones.

De acuerdo con la naturaleza de las fases involucradas, y con los diferentes mecanismos de separación, se tienen diferentes tipos de cromatografía.



Donde:

CGL gas - líquido (partición)

CGS gas - sólido (adsorción)

CLL líquido - líquido (partición)

CLS líquido - sólido (adsorción)

CII de intercambio iónico

CE de exclusión

CP en papel

CLAR de líquidos de alta resolución

CCD en capa delgada

EC en columna

CP en papel

GP gel de permeación

GF gel de filtración

La cromatografía de líquidos en columna, basándose en la naturaleza de la fase estacionaria y en los procesos de separación, puede clasificarse en cuatro tipos:

- 1) Cromatografía de Adsorción
- 2) Cromatografía de Partición
- 3) Cromatografía de Intercambio Iónico
- 4) Cromatografía de Exclusión

1) Cromatografía de Adsorción

En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria es un adsorbente, y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción.

2) Cromatografía de Partición

En este tipo de cromatografía, la separación se basa en un reparto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

3) Cromatografía de Intercambio Iónico

En este tipo de cromatografía, el lecho estacionario tiene una superficie cargada iónicamente, con una carga contraria a la de la muestra. Esta técnica se usa con muestras iónicas o ionizables, cuanto mayor sea la carga de la muestra, más fuertemente será atraída hacia la superficie iónica, y por tanto, más tiempo tardará en ser eluída, la fase móvil es una solución reguladora acuosa, en el que el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elución.

4) Cromatografía de Exclusión.

En este tipo de cromatografía, se rellena la columna con un material que posea poros de dimensiones comprendidas entre ciertos límites, con lo que la muestra es retenida o filtrada según sea su tamaño moléculas.

Debido a que no siempre puede determinarse, con cual de los procesos implicados si el de adsorción o el de reparto desempeña el papel más importante, se definen dos o más tipos, según sea la polaridad relativa de las dos fases, de esta forma surge la Cromatografía en Fase Normal y la Cromatografía en Fase Inversa.

En la Cromatografía en Fase Normal, el lecho estacionario es de naturaleza fuertemente polar y la fase móvil es no polar, las muestras polares quedan retenidas durante tiempos mayores que los materiales menos polares o apolares.

En la Cromatografía en Fase Inversa, el lecho estacionario es de naturaleza no polar, mientras la fase móvil es un líquido polar, normalmente agua o algún alcohol. En este caso, cuanto más no polar sea la muestra, mayor será su retención.

2.2.2 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

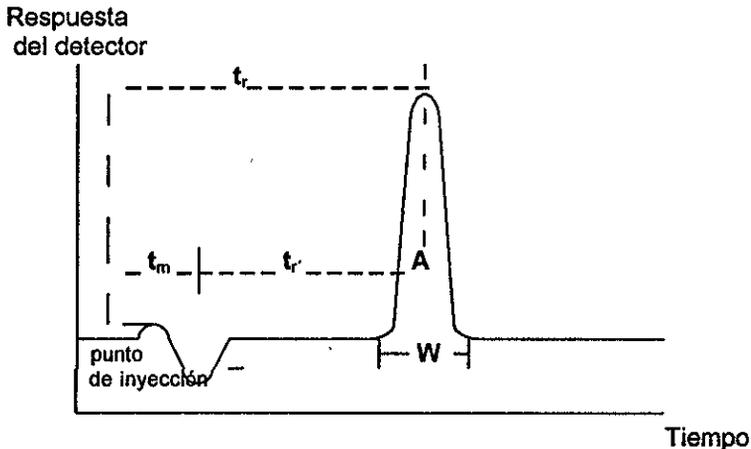
La cromatografía de líquidos clásica, presenta el inconveniente de tiempos de elución prolongados, lo cual ha motivado a mejorar la técnica de esta cromatografía, para lo cual se han empleado partículas de mucho menor tamaño, que han requerido de mayores presiones de entrada, y de nuevos detectores capaces de operar a bajo caudal y de detectar pequeñas cantidades de sustancias; como resultado de estos implementos surge lo que actualmente se conoce como Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución CLAR

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución se caracteriza por:

- a) Columnas reutilizables de diámetro pequeño (2 a 5 mm).
- b) Rellenos de columna de partículas pequeñas (5 a 50 micras).
- c) Presiones de entrada relativamente altas y flujo controlado de la fase móvil.
- d) Introducción precisa de la muestra, sin necesidad de inyectar grandes cantidades.
- e) Detectores continuos especiales, capaces de operar a caudales muy bajos y de detectar cantidades muy pequeñas.
- f) Instrumentos automatizados.
- g) Alta resolución.

2.2.3 PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS

Los picos gaussianos que representan el número de moléculas eluidas frente al tiempo, constituyen un cromatograma, tal como se muestra en la siguiente figura:



Los parámetros a evaluar en un cromatograma son:

- Tiempo de retención t_r

Es el tiempo que la muestra permanece dentro de la columna, y se mide desde el momento en que la muestra se introduce en el sistema, hasta que se obtiene el punto máximo de la señal.

- Tiempo muerto t_m

Es el tiempo requerido para eluir una sustancia no retenida en la columna.

- Tiempo de retención ajustado t_r'

Es la diferencia entre el t_r y t_m , es decir, el t_r es el tiempo total de permanencia en la columna, t_m es el tiempo que la sustancia permanece en la fase móvil; por lo tanto, t_r' es el tiempo que la sustancia permanece retenida en la fase estacionaria.

$$t_r' = t_r - t_m$$

- Anchura de la base del cromatograma W

Es la porción de línea base interceptada por tangentes trazadas a ambos lados de una señal cromatográfica. Este valor de anchura se emplea en el cálculo de la resolución y eficiencia de los sistemas cromatográficos.

- Número de platos teóricos N

Indica la capacidad de la columna para proporcionar picos estrechos y bien separados, mientras mayor sea N mayor número de platos teóricos tendrá la columna y por consiguiente será de mayor eficiencia o capacidad para la separación de los componentes.

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w} \right)^2$$

- Altura equivalente a un plato teórico AEPT

Se representa por:

$$AEPT = \frac{L}{N}$$

Donde L es la longitud de la columna y N el número de platos teóricos. Si el valor de AEPT es pequeño, es mayor el número de platos por unidad de longitud, y por lo tanto, la columna será más eficiente.

- Coeficiente de distribución o de reparto K

Se expresa por:

$$K = \frac{\text{cantidad de muestra/ mL de fase estacionaria}}{\text{cantidad de muestra/ mL de fase móvil}}$$

El coeficiente de distribución, es una propiedad física fundamental de cada sustancia. Es característico de cada compuesto, del sistema de fase móvil y de fase estacionaria en consideración, y está en función de la temperatura.

- Relación de capacidad K'

Es una medida de la retención de un componente por la fase estacionaria, y es característico para una columna dada.

$$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m} = \frac{\text{tiempo en la fase estacionaria}}{\text{tiempo en la fase móvil}}$$

- Resolución R

Indica la separación entre dos picos adyacentes en un cromatograma.

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_a + W_b}$$

- Selectividad α

Describe la retención relativa de los componentes en la fase estacionaria, es decir, que tanto se han separado los picos entre si, sin tomar en cuenta la amplitud de los mismos.

$$\alpha = \frac{t_{r2}}{t_{r1}}$$

Valores elevados de α significa mejores comparaciones.

2.2.4 COMPONENTES DE UN EQUIPO DE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

El cromatógrafo de líquidos consiste básicamente de un sistema de bombeo, el inyector, la columna cromatográfica, el detector, el integrador y el registrador.

- Bomba

Los sistemas de bombeo se encargan de proporcionar a la fase móvil, la presión necesaria para que, operando al flujo preciso, atravesase la columna cromatográfica.

- Inyector

La principal consideración en el diseño de un sistema de inyección de muestras, es la necesidad de proporcionar una zona de poco volumen, completamente barrida por la fase móvil, para evitar la difusión de la muestra.

- Columna cromatográfica

Básicamente, la columna consiste en un segmento de tubo de algún material inerte, de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones.

Con los avances en la tecnología de columnas ahora tenemos:

- a) Uniformidad de tamaño de partículas
- b) Elaboración de partículas de tamaño muy reducido
- c) Mejoramiento en los procesos de relleno de columnas

Existe básicamente tres tipos de materiales de empaque:

- a) Gel de sílice
- b) Gel de sílice modificada químicamente en la superficie con grupos orgánicos diferentes, y por lo tanto, con compartimiento de selectividad específica.
- c) Alúmina.

Los materiales de empaque de las columnas utilizadas en CLAR deben cumplir con los siguientes requisitos:

- a) Estabilidad estructural
- b) Grandes superficies de contacto
- c) Superficies estructurales abiertas, que sean de fácil acceso a la fase móvil.
- d) Resistencia para ser comprimidas por presiones altas.

- Detectores

El detector es un dispositivo capaz de monitorear en forma continua alguna propiedad fisicoquímica de los componentes de la muestra o de la solución que los contiene, generando una señal proporcional a la concentración de la muestra a medida que ésta sale de la columna.

Los detectores pueden ser de dos tipos:

- a) Aquellos que miden únicamente alguna propiedad del soluto por ejemplo, la absorción al espectro ultravioleta o fluorescencia.
- b) Aquellos que miden alguna propiedad del soluto y la fase móvil, por ejemplo, el de índice de refracción.

2.2.5 ANÁLISIS CUALITATIVO EN CLAR

La cromatografía de líquidos es en esencia, una técnica de separación y no de identificación, y aunque es posible obtener alguna información de tipo cualitativo, siempre se requiere de alguna técnica no cromatográfica, para efectuar la identificación certera de un compuesto determinado, por ejemplo resonancia magnética nuclear.

La forma de realizar una identificación, es comparando los tiempos de retención de las sustancias de referencia, pero esto no basta para una identificación certera, ya que dos sustancias pueden tener el mismo tiempo de retención bajo las mismas condiciones

2.2.6 ANÁLISIS CUANTITATIVO EN CLAR

El análisis cuantitativo consiste en la determinación de la cantidad presente de los componentes de la muestra.

El pico cromatográfico representa una curva gaussiana, que es una distribución de las moléculas que eluyen a lo largo del tiempo, el empleo de las áreas de los cromatogramas, se basa en que la concentración de un componente de la muestra, que es directamente proporcional a su área.

CAPÍTULO 3

VALIDACIÓN DE

MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual queda establecido por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. (8)

El criterio para validar un método analítico depende de: las necesidades del Laboratorio, de la aplicación que tenga el método, de los requerimientos oficiales, y de la experiencia y criterio farmacéutico del Químico Analista.

De acuerdo a la Conferencia Internacional de Armonización y a la USP entre otros documentos, el primer paso para la validación de un método analítico es determinar la categoría a la cual pertenece, las cuales son: (2, 9, 10, 12)

Categoría I: Métodos analíticos para la cuantificación de la mayoría de los componentes de sustancias a granel o ingredientes activos (incluyendo conservadores) en productos farmacéuticos terminados.

Categoría II: Métodos analíticos para la determinación de impurezas o componentes de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos métodos incluyen análisis cuantitativos y pruebas límite.

Categoría III: Métodos analíticos para la determinación de características de ejecución (por ej.: disolución, liberación del fármaco, etc.)

A continuación se presenta la información analítica requerida para cada categoría de análisis.

PARÁMETRO ANALÍTICO	ENSAYO			
	CATEGORÍA I	CATEGORÍA II		CATEGORÍA III
		CUANTITATIVO	PBAS. LIMITE	
Linealidad	Si	Si	No	*
Precisión	Si	Si	No	Si
Exactitud	Si	Si	*	*
Intervalo	Si	Si	*	*
Lim, detección	No	No	Si	*
Lim. Cuantificación	No	Si	No	*
Especificidad	Si	Si	Si	*
Tolerancia **	Si	Si	Si	Si

* Puede requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

** Robustes

3.1 DEFINICIONES (8)

LINEARIDAD. La linealidad de un método analítico es su habilidad para asegurar que los resultado analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

INTERVALO. El intervalo de un método analítico está definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles de concentración superior e inferior de la sustancia (incluyendo estos niveles), en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

EXACTITUD. La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el por ciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

PRECISIÓN. La precisión de un método analítico, 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 expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.).

b) **REPRODUCIBILIDAD.** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferente analista, en diferentes días, en el mismo y/o diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc.).

LÍMITE DE DETECCIÓN. Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual 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 aceptable bajo las condiciones de operación establecidas.

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

TOLERANCIA. Es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, columnas, lotes de reactivos, sistemas de elución, tipos de empaque (soporte, fase estacionaria, etc.), condiciones ambientales, etc.

ROBUSTES. Es una medida de la capacidad de un método analítico de permanecer inalterado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros. (10)

Provee una indicación de confiabilidad de un método analítico de uso normal.

CAPÍTULO 4
PARTE EXPERIMENTAL

4.1 EQUIPO Y MATERIAL

- Cromatógrafo de líquidos Beckman

a) Bomba modelo 126

b) Inyector automático 502 (detector de arreglo de diodos)

c) Detector de absorbancia U.V. de longitud de onda variable Mod. 168

d) Programa System Gold Versión 8.1

- Sistema de filtración para disolventes:

a) Membrana millipore tipo HVLP 0.45 micras para filtrar solventes orgánicos y acuosos

b) Papel filtro Whatman No. 1

c) Baño de ultrasonido

d) Matraces volumétricos 25, 50 100 ML

e) Equipo de filtración millipore

4.2 REACTIVOS

a) Agua destilada grado CLAR

b) Acetonitrilo grado CLAR

c) Fosfato de potasio monobásico

d) Hidróxido de potasio al 45 por ciento

e) Amoxicilina trihidratada estándar de referencia

4.3 DETERMINACIÓN DE AMOXICILINA EN CÁPSULAS DE GELATINA DURA

4.3.1 PARÁMETROS INSTRUMENTALES

Diluyente: 13.6 g de fosfato de potasio monobásico en 2000 mL de agua grado CLAR, ajustar a pH= 5 ± 0.1

Fase Móvil: Diluyente - Acetonitrilo (96 : 4) filtrada y degasificada

Velocidad de flujo: 1.5 mL/min

Columna: De acero inoxidable de 7.5 cm (longitud) y 3 mm (diámetro interno) empacadas con partículas esféricas de sílica de 5 μ de diámetro, recubiertas con octadecilsilano (Ultrasphere ODS, Beckman)

Detector: U.V a 230 nm

Volumen de inyección.: 20 μ L

Tiempo de corrida. 2.0 min

Ver el cromatograma en la página 40

Nota: Las condiciones cromatográficas descritas se aproximan a los parámetros óptimos. Sin embargo en base al equilibrio del sistema, a las variaciones de la columna, la elución del componente puede variar su tiempo de retención.

4.3.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Solución de Referencia:

Pesar con exactitud alrededor de 30 mg de estándar de amoxicilina trihidratada (ajustada con su humedad), y transferirlo cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar aproximadamente 20 mL de diluyente y someter a la acción de ultrasonido hasta completa disolución (aprox. 15 min), llevar a

volumen con el diluyente y mezclar. Transferir cuantitativamente una alícuota de 5 mL a un matraz volumétrico de 50 mL. Llevar a volumen con el diluyente y mezclar.

Solución Problema:

Pesar el contenido de 20 cápsulas, obtener el peso promedio, pulverizar y mezclar el polvo, por duplicado pesar con exactitud aproximadamente 73 mg de polvo (equivalente a 60 mg de amoxicilina) y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 50 mL de diluyente y someter a la acción de ultrasonido hasta completa disolución (aprox. 15 min) llevar a volumen con el diluyente y mezclar. Filtrar con papel Whatman No. 1 descartando los primeros 20 mL, transferir cuantitativamente una alícuota de 5 mL a un matraz volumétrico de 50 mL, llevar a volumen con el diluyente y mezclar.

Concentración teórica del estándar y la muestra \pm 60 microgramos/ mL:

Cada cápsula contiene:

Amoxicilina trihidratada

equivalente a 500.0 mg de amoxicilina base.

Acdisol -----6.2 mg
(croscamelosa sódica)

Estearato de Magnesio -----12.0 mg

Lactosa c.b.p.-----605.0 mg

4.3.3 ANÁLISIS

Equilibrar el cromatógrafo a las condiciones de operación establecidas, hasta tener una línea base estable e inyectar por duplicado 20 µL de solución estándar y de solución problema.

Al término del análisis lavar la bomba y la columna con 100 mL de agua grado CLAR y luego con 50 mL de acetonitrilo - agua (60:40)., y registrarse en la bitácora de uso de columna y equipo (anexo 1).

4.3.4 CÁLCULOS

Medir con exactitud la respuesta (área o altura de los picos) del estándar y la muestra, calcular la cantidad de Amoxicilina con la siguiente fórmula:

$$\text{mg de amoxicilina /cap.} = \frac{\text{Am} * \text{W std} * \text{FD} * \text{P std} * \text{W prom}}{\text{Astd} * \text{W m} * 100}$$

Donde:

Am = Área del pico de la muestra

Astd = Área del pico del estándar

FD Factor de dilución = FD muestra/FD estándar → aforos/alícuotas

Wm = Peso de la muestra en mg

Pstd = Potencia del estándar en %

Wprom = Peso promedio de cápsulas en mg/cap.

Wstd = Peso del estándar en mg

4.3.5 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

El método analítico a validar corresponde a la categoría I de acuerdo a la ICH, por lo tanto, los parámetros a evaluar fueron los siguientes:

LINEARIDAD DEL SISTEMA

Este parámetro se determina, construyendo una curva de calibración (concentración Vs respuesta medida), utilizando cuando menos 5 diluciones, preparadas a partir de una misma solución patrón, y haciendo el análisis cuando menos por duplicado para cada dilución.

En la tabla I se muestran los resultados obtenidos y su análisis estadístico.

Criterio:

$$CV \leq 1.5 \%, r \geq 0.99, r^2 \geq 0.98$$

PRECISION DEL SISTEMA

Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100 % establecido en la linealidad del sistema.

En la tabla II se muestran los resultados obtenidos y su análisis estadístico.

Criterio:

$$CV \leq 1.5 \%$$

LINEARIDAD DEL MÉTODO

Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos 3 diferentes cantidades de la sustancia de interés, (placebos cargados), cada uno de manera independiente, haciendo el análisis por triplicado.

En la tabla III se muestran los resultados obtenidos y su análisis estadístico.

Criterio:

Cantidad adicionada Vs cantidad recuperada: $m \approx 1$, $b \approx 0$, $r^2 \geq 0.98$

Promedio de recobro: 98 a 102 %

$CV \leq 2.0 \%$

EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100 %

Se determina de, cuando menos, 6 placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100 %, utilizando el método propuesto. Haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

En la tabla IV se muestran los resultados obtenidos y su análisis estadístico.

Criterio:

Promedio de recobro: 98 a 102 %

$CV \leq 2.0 \%$

PRECISION (REPRODUCIBILIDAD)

Se determina de una muestra homogénea del producto, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

En la tabla V se muestran los resultados obtenidos y su análisis estadístico.

CV total \leq 2.0 %

ESPECIFICIDAD

ESPECIFICIDAD PARA MÉTODOS DE CONTROL DE CALIDAD

Con el método propuesto:

1. Analizar placebos del producto.
2. Identificar la(s) respuesta(s) del(los) activo(s), y si procede, de los excipientes y/o de otras sustancias presentes.

En las figuras 1, 2, 3, 4 y 5 se muestran los resultados obtenidos.

Criterio:

Confirmar que el método analítico desarrollado es capaz de cuantificar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes.

ROBUSTES

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA

Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de 3 muestras, con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones.

En la tabla VI se muestran los resultados obtenidos y su análisis estadístico.

Criterio:

La muestra es estable, si el IC para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o el valor de la media para el factor I se encuentra entre 98 - 102 %.

ESPECIFICIDAD

El método analítico es específico para la determinación de amoxicilina en cápsulas ya que de acuerdo al cromatograma obtenido en el placebo (no hay respuesta alguna, ver figura 2) por lo que la respuesta obtenida solo se debe a la sustancia de interés.

4.3.6 RESULTADOS

TABLA I
LINEARIDAD DEL SISTEMA

CONCENTRACIÓN EN $\mu\text{g/mL}$ A PARTIR DE LA SOLUCIÓN PATRÓN	RESPUESTA MEDIDA EN ÁREA	FACTOR RESPUESTA
48.0139	17.5455	0.365521
54.0156	19.9097	0.368687
60.0174	22.1366	0.368933
66.0191	24.3469	0.368882
72.0208	26.4488	0.367334

$$m = 4.4936$$

$$X = 0.3678$$

$$b = 0.7913$$

$$DE = 0.0014$$

$$r = 0.9997$$

$$CV = 0.3992$$

$$r^2 = 0.9995$$

Cumple con el criterio ya que $CV \leq 1.5\%$; $r \geq 0.99$; $r^2 \geq 0.98$

TABLA II
PRECISION DEL SISTEMA

No. DE INYECCIÓN	RESPUESTA MEDIDA (AREA)	FACTOR RESPUESTA
1	22.0985	0.368297
2	22.1122	0.368526
3	22.2139	0.370221
4	22.1454	0.369079
5	22.1188	0.368636
6	22.1136	0.368549

DE = 0.00070

X = 0.3688

CV = 0.1900

Cumple con el criterio ya que el $CV \leq 1.5\%$

TABLA III
LINEARIDAD DEL MÉTODO

Tabla de cantidad adicionada contra cantidad recuperada

CANTIDAD ADICIONADA (μmL)	CANTIDAD RECUPERADA (μmL)	% RECUPERADO
$X_1=48.0292$	48.0968	100.14
	48.1433	100.23
	48.2385	100.43
$X_2=60.0366$	60.1551	100.20
	60.2284	100.32
	60.1359	100.33
$X_3=72.0439$	71.8887	99.78
	72.1081	100.09
	72.1042	100.08

Nota: $X_2 = 100\%$

$X = 100.18\%$

Cumple con el criterio ya que $m \approx 1$, $b \approx 0$, $r^2 = 0.98$

DE = 0.18494

CV = 0.1846

$X = 60.1332$

$b = 0.4478$

$m = 0.9941$

$r = 0.9999$

$r^2 = 0.9999$

TABLA IV

EXACTITUD Y REPETIBILIDAD AL 100 %

No. DE MUESTRA	% DE RECOBRO
1	100.12
2	99.96
3	100.23
4	100.19
5	100.21
6	100.14

DE = 0.0982

X = 100.14

CV = 0.0981

Cumple con el criterio de aceptación ya que el promedio de recuperación se encuentra dentro del 98 - 102 %, y el $CV \leq 2\%$.

TABLA V

PRECISION (REPRODUCIBILIDAD)

Datos de reproducibilidad en %

		ANALISTA	
		U NO	D O S
D	U	97.74	97.34
	N	97.87	96.66
	O	97.95	97.01
A	D	97.33 *	96.99
	O	97.53	96.72
	S	97.57	96.70

* Ejemplo: para analista 1 día 2

$$\frac{23.016725 \cdot 34.1 \cdot 2 \cdot 87.85 \cdot 591.8}{23.485730 \cdot 71.4 \cdot 100} = 486.67 \text{ mg/cáp} = 97.33 \%$$

X = 97.367

CV = 0.664%

DE = 0.646

TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA (ANADEVA)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F cal	F 0.05*
Analista	1	2.5891	2.5891	6.3329	38.51
Día	2	0.8176	0.4088	2.7326	6.06
Error	8	1.1969	0.1496	-----	-----

Interpretación:

Ya que $F_a < F_{gla/gld; 0.05}$ El método analítico es reproducible por los analistas.

Ya que $F_d < F_{gld/gle; 0.05}$ El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Repetibilidad del método analítico: 0.3867

Media aritmética total: 97.36

Desviación estándar total: 0.6469

Coefficiente de variación total: 0.6642 %

TABLA VI
ROBUSTES

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Las condiciones a las que se sometió la solución para el estudio de estabilidad, fueron las siguientes:

- a) Temperatura ambiente durante 3, 6, 12 y 24 horas.
- b) Refrigeración durante 24 horas.
- c) Protegido de la luz durante 24 horas.

Se utilizó una solución de referencia recientemente preparada a cada tiempo de reanálisis, las determinaciones las realizó un mismo analista.

Datos de estabilidad (%)

CONDICIÓN/ TIEMPO						
INICIAL	T.A. 3 h	T.A. 6 h	T.A. 12 h	T.A. 24 h	Ref. 24 h	Osc. 24 h
97.33	97.36	96.42	93.29	92.01	94.89	93.21
97.53	97.40	96.43	94.35	92.87	95.11	93.41
97.57	97.30	96.62	94.29	92.62	95.14	93.32

CONDICIÓN	INTERVALO DE C.	FACTOR I
Temperatura ambiente durante 3 horas	- 0.305 a 0.065	99.86 %
Temperatura ambiente durante 6 horas	- 1.209 a - 0.750	98.98 %
Temperatura ambiente durante 12 horas	- 4.320 a - 2.679	96.40 %
Temperatura ambiente durante 24 horas	- 5.590 a - 4.349	94.90 %
Refrigeración (2 °C) durante 24 horas	- 2.682 a - 2.177	96.83 %
Protegido de la luz durante 24 horas	- 4.176 a - 4.140	95.72 %

Conclusión: La muestra es estable solamente a temperatura ambiente durante 3 horas.

FIGURA 1: CROMATOGRAMA DE LA FASE MÓVIL

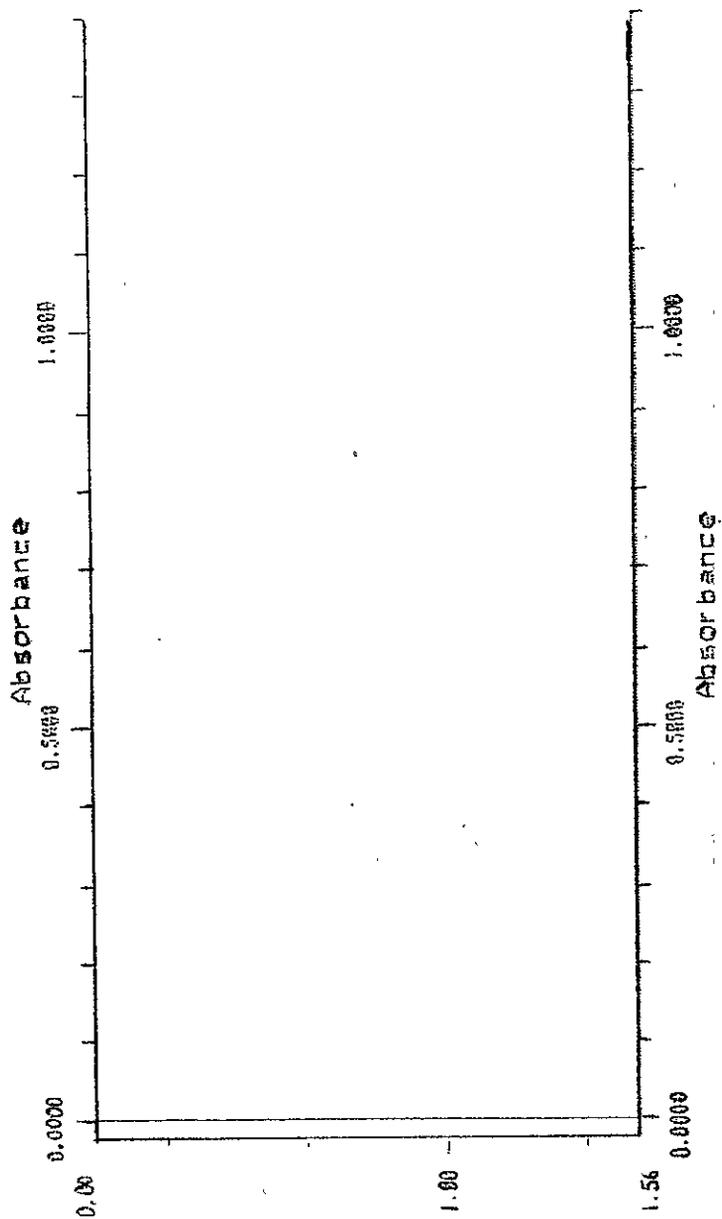


FIGURA 2: CROMATOGRAMA DEL PLACEBO

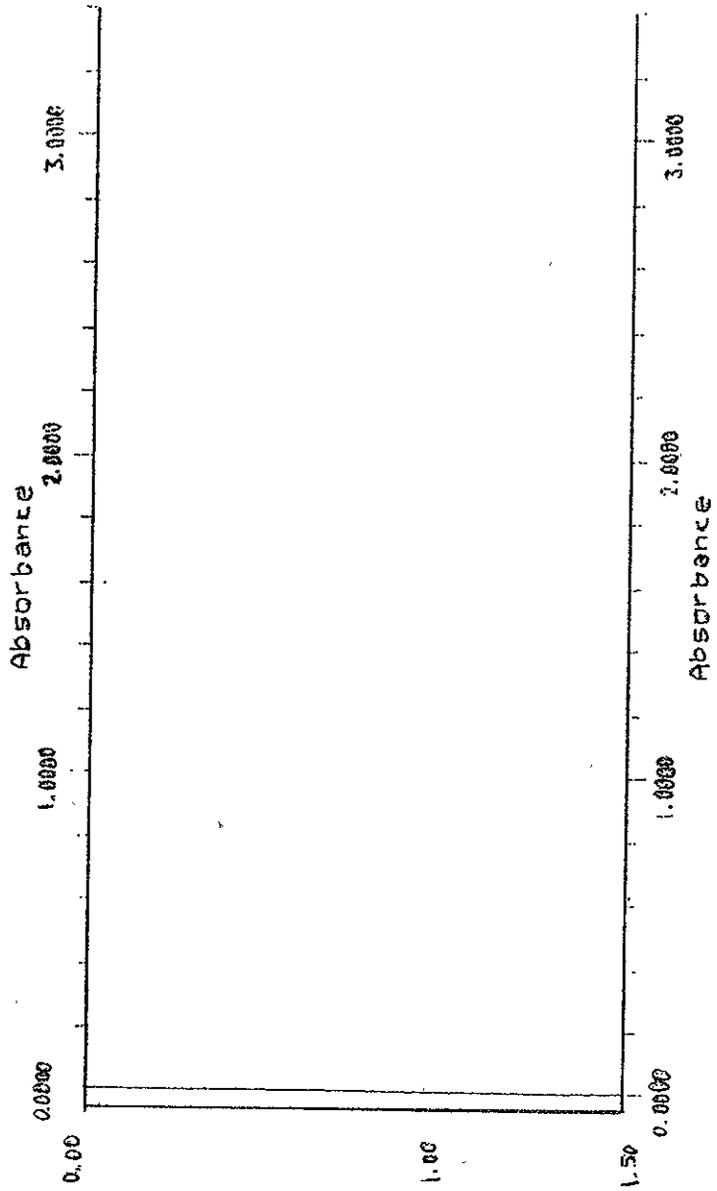


FIGURA 3: CROMATOGRAMA DE LA SUSTANCIA DE REFERENCIA DE

AMOXICILINA

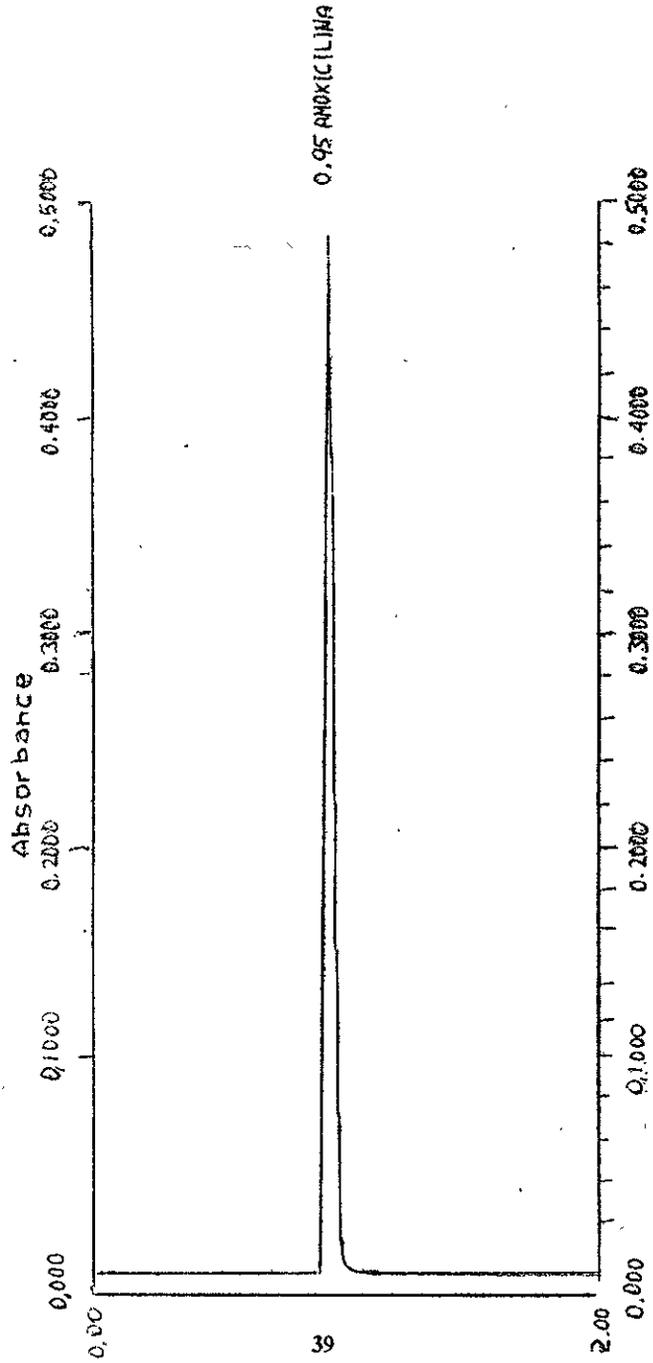
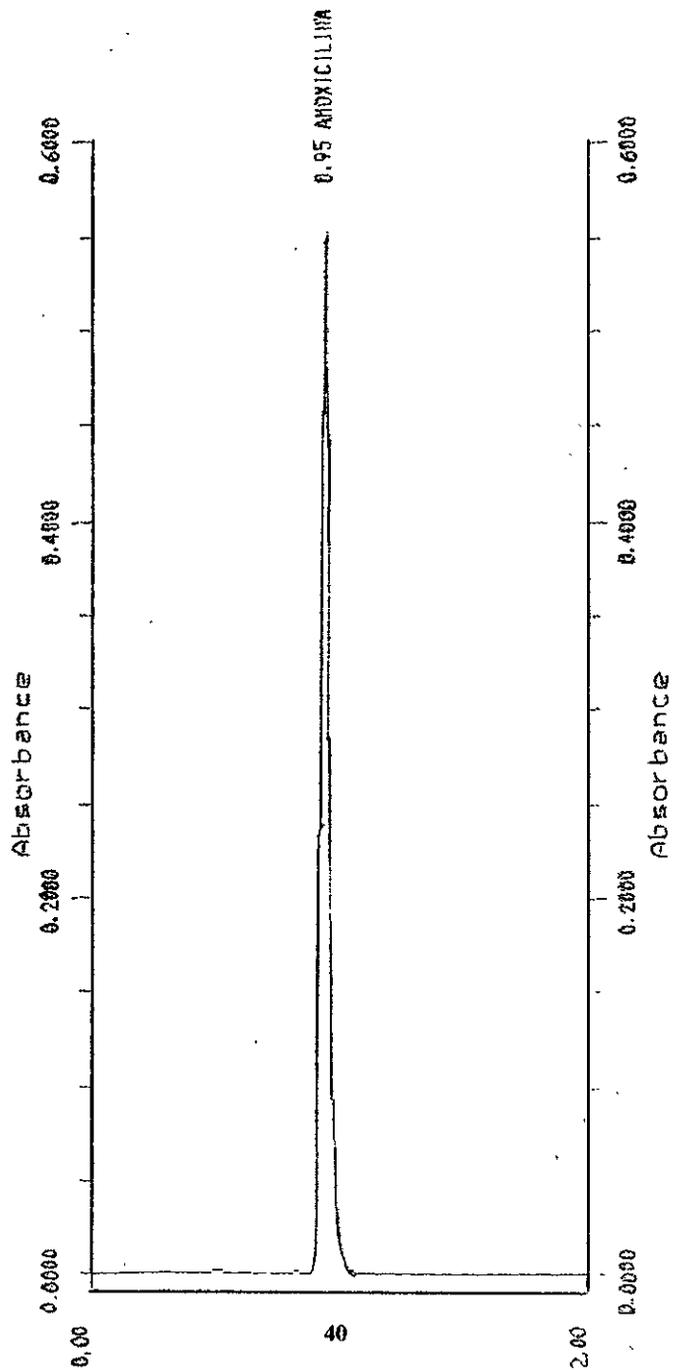


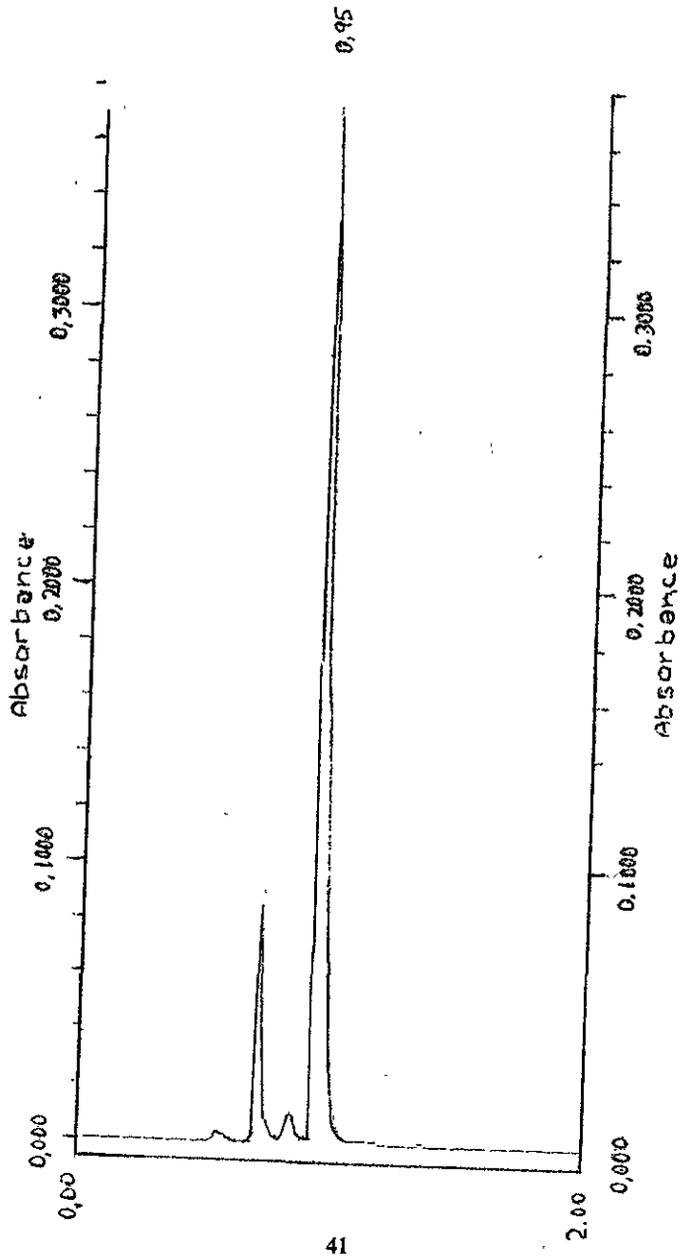
FIGURA 4: CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA DE CÁPSULAS DE

AMOXICILINA



ROBUSTES

FIGURA 5: CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA ANALITICA A
TEMPERATURA AMBIENTE DURANTE 36 HORAS



ANEXO 1

BITÁCORA DE USO DE COLUMNA

NOMBRE Y NUMERO DE COLUMNA							
DATOS DE LA COLUMNA							
FECHA DE APERTURA							
Fecha de análisis	Producto	Lote	Fase Móvil	Fase de lavado	Tiempo de uso	Analista	Observaciones

BITÁCORA DE USO DE EQUIPO

No. EQUIPO								
DATOS DEL EQUIPO (Detector, bomba, inyector)								
VERSION DEL SOFTWARE								
Fecha de análisis	Producto	Lote	No columna	Presión	Tiempo de uso	Analista	Observaciones o parámetros medidos	

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en los diferentes parámetros de validación evaluados, se concluye que el método analítico para determinar Amoxicilina en cápsulas cumple con:

- Linealidad del sistema

Puesto que se obtuvo un coeficiente de correlación mayor a 0.99 y la variación fue menor a 1.5 % en los intervalos de concentración empleados de Amoxicilina (80 a 120%).

- Precisión del sistema

Ya que se obtuvo un coeficiente de variación menor a 1.5 % al hacer 6 inyecciones consecutivas de la solución correspondiente al 100 %

- Linealidad del método

Por que se obtuvo un coeficiente de determinación mayor a 0.98 y un coeficiente de variación menor al 2 % y el por ciento de recobro estuvo entre 98 y 102 % al analizar los placebos a 3 diferentes concentraciones (80, 100 y 120 %) de la cantidad etiquetada.

- Exactitud y repetibilidad al 100 %

Ya que se obtuvo un coeficiente de variación menor al 2 %, y los promedios de recobro están entre 98 y 102 %, al analizar placebos cargados al 100 %, en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

- Precisión (reproducibilidad)

Ya que se obtuvo un coeficiente de variación menor al 2 %, y cumplió con el análisis de varianza, cuando se analizaron muestras de producto, por los analistas en 2 días diferentes y por triplicado.

- Especificidad para control de calidad

Ya que la respuesta obtenida en el cromatograma, es exclusiva del principio activo de interés (Amoxicilina).

- Estabilidad de la muestra

La muestra es estable solamente dentro de las 3 horas posteriores a su preparación.

- Por lo tanto, el presente método analítico para cuantificar Amoxicilina por CLAR, es confiable y se puede utilizar para valorar Amoxicilina en cápsulas en proceso y producto terminado.

(13)

CAPÍTULO 6
BIBLIOGRAFÍA

1. Hasson Y. Aboul-Enein.; Mohammed A. Loutfy.

Analitical Profiles of Drugs Substances,

Ed. Klaus Florey,

Academic Press,

New York, USA 1984

Volume 7, pág. 21 - 37.

2. The United States Pharmacopoeia XXIII

pág. 1982 - 1984

3. The Pharmaceutical CODEX

Eleven edition

London The Pharmaceutical Press 1979

pág. 37 y 38.

4. Goodman, Louis S.; Gilman Alfred.,

Las Bases Farmacológicas de la Terapétutica,

Ed. Interamericana,

Sexta Edición,

México, 1984.

5. Yost R. W.; Ettre L.S.,

Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica,

De. Perkin Elmer.

México, 1980.

6. García de Marina A.; Del Castillo B.,

Cromatografía Líquida de Alta Resolución,

De. Limusa,

México, D.F., 1988.

7. Snyder L.R.; Kirkland J.L.,

Introduction to Modern Liquid Chromatography,

2ª. Edition, John Willey & Sons, Inc.,

USA, 1974.

8. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C.,

Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación de la Dirección General
de Control de Insumos para la Salud, SSA.

Requisitos Mínimos para la Validación de Métodos Analíticos.,

9. Journal of Validation Technology

Validation of Analytical Methodology

Harry G. Brittain, Ph.D.

volume 3 number 3

mayo 1997

pág. 275 a 280.

10. Journal of Validation Technology

Analytical Method Validation

James D. Johnson

volume 2 number 2

febrero 1996

pág. 88 a 104.

11. Bernard T. Loftus

Pharmaceutical Process Validation

Capítulo 9 Analytical Methods Validation

Volume 23

USA 1974

pág. 251 a 254.

12. The Food and Drug Administration
Center for Drug Evaluation and Research
Validation of Chromatographic Methods
November 1994
pág. 1 a 30

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

13. Pharmaceutical & Cosmetic Quality
Validating Microbiological Methods
Julio/Agosto 1998
Pág. 19 a 22.

14. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993
Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico
farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.

15. Sistema Internacional de Unidades (SI)
Publicación Técnica CNM-MMM-PT-003
Centro Nacional de Metrología
Los Cués, Qro., México. Abril 1998.