

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**"Determinación del contenido y la potencia antibiótica de  
Penicilina G, Penicilina V y Ampicilina, mediante la  
comparación de los resultados obtenidos por los métodos  
microbiológico, yodométrico y cromatografía líquida de  
alta presión"**

Informe de Tesis

Presentado por

LIGIA MARIA OROZCO TORALLA

Para optar al título de

QUIMICA FARMACEUTICA

Guatemala, abril de 1994

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

DL  
06  
†(670)RF

**JUNTA DIRECTIVA DE LA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

DECANA	LICDA. CLEMENCIA DEL PILAR GALVEZ DE AVILA
SECRETARIO	LIC. JOSE FRANCISCO MONTERROSO SALINAS
VOCAL I	LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
VOCAL II	LICDA. THELMA ALVARADO DE GALLARDO
VOCAL III	LIC. MIGUEL ORLANDO GARZA SAGASTUME
VOCAL IV	BR. JORGE LUIS GALINDO AREVALO
VOCAL V	BR. EDGAR ANTONIO GARCIA DEL POZO

## **ACTO QUE DEDICO**

**A DIOS**

**Por ser la luz que siempre ilumina mi vida.**

**A mis padres  
Héctor Orozco y  
Marta de Orozco**

**Por su amor, comprensión y apoyo durante toda  
mi carrera**

**A José Roberto**

**Por su amor y ayuda incondicionales en todo  
momento.**

**A mis hermanos  
Lucky, Alfredo,  
Karla y Mariela**

**Por su constante apoyo.**

**A mi sobrino  
Miguel Angel**

**Con mucho cariño.**

**A mis abuelitos  
Manuel Toralla  
Maria Eugenia de Orozco**

**En recuerdo a su memoria.**

**A Mamatoyita y  
Papamax**

**Con respeto y cariño.**

**A mis amigos y  
compañeros de Promoción**

**Por todos los momentos compartidos.**

**A mi familia en general**

**A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia**

**A la Universidad de San Carlos de Guatemala**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Lic. Roberto Benavides por su asesoría en la elaboración de este trabajo de tesis.**

**Al Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos LUCAM, por permitir la realización de la parte experimental de esta investigación.**

**A los catedráticos de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia que colaboraron con mi formación profesional.**

## CONTENIDO

1. RESUMEN . . . . .	.1
2. INTRODUCCION . . . . .	.2
3. ANTECEDENTES . . . . .	.3
4. JUSTIFICACION . . . . .	.8
5. OBJETIVOS . . . . .	.9
6. HIPOTESIS . . . . .	.10
7. MATERIALES Y METODOS . . . . .	.11
8. RESULTADOS . . . . .	.28
9. DISCUSION . . . . .	.33
10. CONCLUSIONES . . . . .	.36
11. RECOMENDACIONES . . . . .	.37
12. REFERENCIAS . . . . .	.38
13. ANEXOS . . . . .	.40

## 1. RESUMEN

El principal objetivo de la presente investigación, fue comparar la sensibilidad y exactitud relativas de los métodos yodométrico, cromatografía líquida de alta presión y microbiológico, para la cuantificación de principios activos en muestras de Ampicilina sódica inyectable, Pencilina G inyectable y Penicilina V en tabletas.

Para el efecto se utilizaron 15 muestras de cada antibiótico, las cuales fueron analizadas por los métodos ya indicados. Los resultados de la investigación demostraron que los métodos yodométrico y cromatográfico son similares en cuanto a exactitud y sensibilidad con respecto al método microbiológico, para la cuantificación de cada uno de los principios activos estudiados, por lo que pueden ser utilizados de manera confiable.

Los métodos yodométrico y cromatográfico demostraron tener, entre sí, una exactitud relativa similar en cuanto a la cuantificación de Ampicilina sódica y Penicilina V. Sin embargo, para el caso de Penicilina G, el método cromatográfico demostró mayor exactitud, por lo que se recomienda la utilización del mismo para determinar la concentración de este principio activo.

## 2. INTRODUCCION

Los antibióticos son medicamentos importantes para el tratamiento de infecciones producidas por variedades diferentes de microorganismos. Por este motivo, es indispensable que todas las formas farmacéuticas de antibióticos disponibles en el mercado guatemalteco, cumplan con los requisitos establecidos en la Legislación Nacional (Anexo No. 1). Algunos de estos antibióticos son Ampicilina sódica, Penicilina G y Penicilina V (Fenoximetilpenicilina).

La comisión Guatemalteca de Normas, COGUANOR, ha establecido como método oficial para determinar la potencia antibiótica de Penicilina G, Penicilina V y Ampicilina sódica el microbiológico y como método oficial para cuantificar el principio activo el yodométrico. La calidad de los antibióticos es oficialmente controlada, en Guatemala, por el Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos, LUCAM, el cual se encuentra en busca de nuevas técnicas de análisis químico que sean más rápidas, precisas, exactas y confiables.

Por este motivo, la presente investigación tuvo como principal objetivo comparar los resultados obtenidos del análisis microbiológico, yodométrico y cromatográfico, de muestras comerciales de Penicilina G, Penicilina V y Ampicilina sódica, para determinar la relación entre los resultados del primer método y los resultados de los otros dos y establecer si existen diferencias significativas entre estos.

### 3. ANTECEDENTES

La determinación cuantitativa de antibióticos es una de las áreas más difíciles en el análisis farmacéutico. El mayor problema de los métodos existentes es su falta de especificidad (1).

Entre los métodos existentes para la cuantificación de antibióticos se encuentran los ensayos microbiológicos y los métodos físico-químicos: yodométrico y cromatográfico.

Los métodos microbiológicos tienen como principal ventaja su versatilidad y simplicidad. Casi cualquier agente antimicrobiano puede ser valorado mediante este sistema siempre y cuando exista una técnica adecuada y un medio adecuado. Su principal desventaja es la falta de especificidad, variabilidad en los grados de exactitud y la lentitud en la obtención de los resultados (2).

MASUDA Y TAMIOKA (1978), señalan que el mejor método para determinar la actividad bactericida de los antibióticos B-lactámicos es aquel en el que se emplean medios de cultivo solidificados en una caja de Petri (método microbiológico en placa). Sin embargo, al mismo tiempo indican que este método requiere de un trabajo de laboratorio bastante meticuloso (3).



GRASSO Y MEINARDI (1978) mencionan que los métodos para medir la concentración mínima de inhibición in vitro, a pesar de ser los más utilizados para determinar el potencial de eficacia terapéutica de los antibióticos, no reproducen exactamente la situación que ocurre al ser utilizados in vivo. Es decir, en los ensayos in vitro, el antibiótico está en contacto con el microorganismo durante un período relativamente largo y a una concentración constante. La situación in vivo es diferente, ya que la concentración del antibiótico cambia después de la administración por lo que el contacto es corto, especialmente en el caso de aquellos antibióticos que se eliminan rápidamente del organismo como las penicilinas (4).

Por la falta de especificidad de los métodos microbiológicos disponibles, surge la necesidad de buscar otros métodos adecuados, sensitivos, específicos y reproducibles. La cromatografía líquida de alta presión fue observada como una alternativa (2).

Los ensayos cromatográficos pueden adaptarse con relativa facilidad a una variedad de antibióticos, con la ventaja de su gran especificidad. Además ofrecen otras ventajas tales como preparación rápida y simple de la muestra, tiempo corto de análisis, cambio fácil de una fase móvil a otra y resultados precisos (2).

HAGINAKA Y WAKAI (1986) indican que se han desarrollado métodos de cromatografía líquida de alta presión, los cuales poseen gran selectividad y sensibilidad en cuanto a la determinación de penicilinas. Estos métodos implican la degradación del compuesto con hidróxido de sodio (5).

Los métodos cromatográficos han demostrado ser de gran sensibilidad para la determinación de algunos antibióticos así como de compuestos involucrados en su biosíntesis. HUSHER, LEWIS Y HUGHES (1985) reportan un método cromatográfico para la determinación de los compuestos involucrados en la biosíntesis de penicilina y cefalosporinas (6).

DANIELSON Y TARGOVE (1988) describen un método de cromatografía líquida de alta presión con degradación alcalina en presencia de cloruro de mercurio, para separar penicilinas. Este método es aplicable a fluidos biológicos (7).

MOATS (1990), se refiere a la utilidad de la cromatografía en cuanto al análisis de residuos de antibióticos. Moats dice que el análisis de residuos requiere mayor sensibilidad y especificidad, las cuales se logran con la cromatografía líquida, además de tener la ventaja de requerir pequeña cantidad de muestra (8).

Por otra parte, existen varios reportes de estudios realizados con anterioridad sobre métodos de cromatografía líquida para la cuantificación de ampicilina y penicilina V potásica.

MARGOSIS (1987), se refiere a la validación de un método de cromatografía líquida para la cuantificación de ampicilina base y ampicilina sódica, el cual demostró buena resolución y reproducibilidad de resultados (9).

MOPPER (1987) señala, en su estudio para la cuantificación de Penicilina V potásica en tabletas y granulos para solución oral por cromatografía líquida, que el método microbiológico es demasiado lento, tedioso y poco exacto debido a su poca especificidad en cuanto a las penicilinas. En cuanto a la titulación yodométrica, dice que es un método relativamente rápido, sin embargo, es inespecífica ya que el punto final de la titulación es afectada por el consumo de yodo por otras sustancias diferentes a la penicilina. Por lo dicho anteriormente, se desarrolló un método cromatográfico para cuantificar la Penicilina V potásica en estas formas farmacéuticas. Este método es selectivo, exacto y menos afectado por los excipientes y productos de degradación de las formas farmacéuticas (10).

En los últimos años la cromatografía líquida se ha convertido es una técnica ampliamente utilizada en el campor del análisis de medicamentos, incluyendo los antibióticos (2).

Por otra parte, los procedimientos biológicos generalmente menos precisos, consumen mayor tiempo y trabajo que los ensayos químicos, por lo que resultan más adecuados en los casos donde:

- La identidad química del pricipio activo no sido dilucidada
- No hay ensayo químico adecuado para medir la concentración de principio activo, aunque se haya establecido su estructura
- La purificación del principio activo para realizar el ensayo químico no es suficiente
- Lo que interesa determinar es la actividad biológica (potencia) y no cuantificar el principio activo (11).

#### 4. JUSTIFICACIONES

En el Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos, LUCAM, se utiliza como norma oficial para la determinación de potencia antibiótica el método microbiológico indicado por COGUANOR. Sin embargo, en algunas de las muestras analizadas de Penicilina G, Penicilina V potásica y Ampicilina sódica este método no ha reportado resultados reproducibles produciendo pérdida de tiempo y de materiales.

Debido a lo expuesto anteriormente, surgió la necesidad de realizar un estudio comparativo de los resultados obtenidos del análisis microbiológico, yodométrico y cromatográfico, de muestras de Penicilina G, Penicilina V y Ampicilina sódica recibidas en LUCAM, para establecer la relación entre la potencia antibiótica y concentración de principio activo y así determinar el grado de variabilidad que existe entre los datos obtenidos por los tres métodos. Todo esto con el fin de determinar si en aquellos casos en los que el análisis de antibióticos por el método microbiológico no resulte adecuado, pueda realizarse un análisis confiable con el método yodométrico y/o cromatográfico para poder garantizar así la calidad de antibióticos.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Contribuir al mejoramiento de las técnicas utilizadas para el análisis de antibiótico en las muestras de estos, recibidas en el LUCAM. en beneficio de la población guatemalteca.

### **5.2 Objetivos específicos**

- 5.2.1 Determinar la potencia antibiótica de las muestras de Penicilina G, Penicilina V y Ampicilina por método microbiológico.
- 5.2.2 Determinar la concentración de principio activo de Penicilina G, Penicilina V y Ampicilina mediante los métodos yodométrico y cromatografía líquida.
- 5.2.3 Comparar la exactitud y sensibilidad relativas de los métodos yodométrico y cromatográfico para la cuantificación de principio activo de Penicilina G, Penicilina V y Ampicilina.
- 5.2.4 Establecer la relación existente entre el método microbiológico y los métodos yodométrico y cromatográfico para la cuantificación de principio activo en muestras comerciales de Penicilina G, Penicilina V y Ampicilina sódica.

## **6. HIPOTESIS**

Los resultados de la determinación de potencia antibiótica de muestras comerciales de Penicilina G inyectable, Penicilina V potásica tabletas y Ampicilina sódica inyectables obtenidos por el método microbiológico, son similares a los resultados de contenido de principio activo obtenidos por los métodos químicos: yodométrico y cromatografía líquida.

## **7. MATERIALES Y METODOS**

### **7.1 Universo de Trabajo**

Se utilizaron 15 muestras de Penicilina G inyectable, 15 de Penicilina V potásica tabletas y 15 de Ampicilina sódica inyectable. Estas muestras fueron seleccionadas entre el total de muestras que se reciben en el LUCAM (Laboratorio Unificado para el control de Alimentos y Medicamentos).

### **7.2 Medios.**

#### **7.2.1 Recursos Humanos.**

Ligia María Orozco Toralla.	<b>Autora del trabajo</b>
Licenciado Roberto Benavides.	<b>Asesor</b>

#### **7.2.2 Recursos Materiales.**

##### **7.2.2.1 Equipo y Material de Laboratorio**

- Sistema para cromatografía líquida:

Bomba Beckman 114 M Solvent Delivery Model

Detector Spectroflow 757 Absorbance detector, Kratos

Columna C-18 J.T. Baker, 5 micron; 4.6 x 150 mm



- Balanza analítica
- Cristalería
- Incubadora
- Cajas de Petri
- Discos analíticos
- Baño de vapor
- Papel pH
- Espátula de metal

#### 7.2.2.2 Reactivos

- Solución de Tiosulfato de sodio 0.01 N
- Solución de yodo 0.01 N
- Indicador de almidón
- Acido clorhídrico 0.1 N
- Hidróxido de sodio 0.1 N
- Patrón de Pencilina G
- Patrón de Ampicilina USP
- Patrón de Ampicilina sódica
- Patrón de Pencilina V potásica
- Buffer de fosfatos pH 6
- Acetonitrilo HPLC
- Metanol HPLC
- Acido acético

- Solución de NaCl 9%
- Medios de cultivo No. 1 y No. 2
- Cepas de Staphulococcus aureus
- Cepas de Bacillus subtilis

### **7.3 Procedimiento.**

Las muestras fueron analizadas por tres métodos: microbiológico, yodométrico y cromatográfico (cromatografía líquida).

#### **7.3.1 Metodo microbiológico para la determinación de la potencia antibiótica de Penicilina G Y Penicilina V (12)**

- 7.3.1.1 Preparación de la solución patrón concentrada de 1000 UI/ml:  
Disolver una cantidad de patrón de penicilina con potencia debidamente certificada, suficiente para preparar una solución con concentración 1000 UI/ml en solución amortiguadora de fosfato de potasio al 1 % (Anexo No. 2).
- 7.3.1.2 Preparación de las soluciones de trabajo: Diluir la solución patrón concentrada con solución amortiguadora de fosfato de potasio al 1% para obtener las siguientes concentraciones:

<b>Solución</b>	<b>Concentración de Penicilina en UI/ml</b>
Solución de trabajo a (Sa)	0.64
Solución de trabajo b (Sb)	0.80
Solución de referencia (Sr)	1.00
Solución de trabajo d (Sd)	1.25
Solución de trabajo e (Se)	1.56

### 7.3.1.3 Preparación de la muestra:

**Inyectables:** Se diluye el polvo en la cantidad especificada de agua para inyección y se mide una cantidad de la suspensión preparada que, después de disuelta con solución amortiguada de fosfato de potasio al 1% de pH 6, contenga aproximadamente 1 UI/ml de penicilina según lo declarado en la etiqueta.

**Tabletas:** Se pesan 20 tabletas, se obtiene el peso promedio por tableta. Triturar las tabletas hasta obtener polvo fino y pesar una cantidad suficiente para obtener una concentración de aproximadamente 1 UI/ml de penicilina según lo declarado en la etiqueta. Diluir con solución amortiguadora de fosfato de potasio al 1% de pH 6.

#### 7.3.1.4 Preparación de cajas de Petrí

Colocar en cada de Petrí estéril, 21 ml de medio antibiótico No. 2 (Anexo No. 2). Inocular en el medio antibiótico No. 1 (Anexo No. 2) 1 ml de la suspensión de trabajo de Staphylococcus aureus (Anexo No. 2). Agregar 4 ml de la suspensión anterior sobre las cajas de Petrí ya preparadas y dejar enfriar con la tapadera entreabierta.

#### 7.3.1.5 Preparación de la curva patrón:

Preparar 12 cajas de Petrí de la misma forma que se indicó en el inciso anterior. Agrupar en cuatro grupos de tres cajas. En cada caja se colocan 3 discos impregnados con solución de referencia (Sr), preparada como se indico en el inciso 7.3.1.2, en posición alterna. Luego colocar los tres discos restantes de cada grupo con la soluciones de trabajo Sa, Sb, Sd, Se. (Ver figura en Anexo No. 3).

Incubar las cajas a 32-35°C por 16-18 h. Medir las zonas de inhibición con regla milimetrada. Promediar los diámetros de las zonas de inhibición de cada solución de trabajo para obtener: Xa, Xb, Xd, Xe y los diámetros de las zonas de inhibición de la solución de referencia Sr, obteniéndo: Xra, Xrb, Xrd, Xre. Promediar los 36

diámetros de las 36 zonas de inhibición de la solución de referencia para obtener XR (promedio de los diámetros de las 36 zonas). Este se utiliza para corregir los diámetros de las soluciones de trabajo.

Corregir los diámetros mediante las siguientes fórmulas:

$$\begin{aligned} S_a &= X_{Ca} = (X_R - X_{ra}) + X_a \\ S_b &= X_{Cb} = (X_R - X_{rb}) + X_b \\ S_d &= X_{Cd} = (X_R - X_{rd}) + X_d \\ S_e &= X_{Ce} = (X_R - X_{re}) + X_e \end{aligned}$$

Preparar la curva patrón con las siguientes fórmulas:

$$B = \frac{3X_{Ca} + 2X_{Cb} + X_R - X_{Ce}}{5}$$

$$C = \frac{3X_{Ce} + 2X_{Cd} + X_R - X_{Ca}}{5}$$

#### 7.3.1.6 Valoración de la potencia de la muestra:

Preparar 6 cajas de Petri de la forma ya indicada. Colocar en forma alterna tres discos impregnados con solución de referencia y los tres restantes con la solución de la muestra.

Incubar las cajas a 32-35°C por 16 - 18 h. Medir la zona de inhibición y promediarlas para obtener XM y XrM. La potencia del antibiótico se determina mediante la curva patrón. La cantidad obtenida representa la concentración del antibiótico en UI/ml, que se relaciona con el factor de dilución correspondiente para calcular el contenido real de penicilina en la muestra original.

**7.3.2 Método microbiológico para la determinación de la potencia antibiótica de Ampicilina: (13)**

La metodología utilizada es la misma que la de Penicilina a excepción del microorganismo utilizado para preparar la suspensión concentrada, en este análisis se utiliza *Bacillus subtilis* (Anexo No. 2).

**7.3.3 Método yodométrico para la determinación del contenido de Penicilina G y Penicilina V: (14-16).**

**7.3.3.1 Preparación de la muestra y patrón: Ver cuadro en Anexo No. 4.**

**7.3.3.2 Preparación de la muestra y patrón inactivados: Transferir 2 ml de la solución de muestra y patrón preparados de acuerdo al inciso anterior y colocarlos en frascos erlenmeyer con tapón esmerilado.**

Agregar 2 ml de NaOH 1 N, si no se ha usado en la dilución de la muestra, y dejar reposar por 15 minutos. Agregar 2 ml de solución de HCl 1 N y 10 ml de solución de yodo 0.01 N medidos con bureta y dejar reposar por 15 minutos.

**7.3.3.3 Titulación:** Titular el exceso de yodo con la solución 0.01 N de tiosulfato de sodio. Cerca del punto final agregar una gota de pasta de almidón y seguir agregando tiosulfato de sodio, hasta que desaparezca el color azul de complejo de almidón-yodo.

**7.3.3.4 Determinación en blanco:** Esta titulación se efectúa para establecer la cantidad de yodo que no es consumida por el principio activo. Transferir 2 ml de la solución de muestra y de la solución patrón a frascos erlenmeyer con tapon esmerilado. Agregar 10 ml de yodo 0.01 N medidos con bureta y titular el exceso de éste con tiosulfato de sodio 0.01 N.

**7.3.3.5 Cálculos:**

Determinación del factor F:

$$F = \frac{(m \times P)}{V_s}$$

Donde:

m = Masa del patrón en miligramos contenida en los 2 ml titulados.

**P =** Potencia del patrón en UI o microgramos por miligramo.

**Vs =** Mililitros de solución de tiosulfato de sodio usados en la titulación en blanco del patrón de trabajo, menos los mililitros usados en la titulación de la solución del patrón inactivado.

**Determinación de la potencia del antibiótico como materia prima:**

Unidades o microgramos de antibiótico por miligramo =  $\frac{V_u \times F}{m_1}$

**Donde:**

**Vu =** mililitros de solución de tiosulfato de sodio usados en la titulación en blanco de muestra, menos los mililitros gastados en la titulación de la solución de la muestra inactivada.

**m1 =** masa en miligramos de la muestra contenida en los 2 mililitros de la solución titulada.

**Cálculo de la potencia en producto terminado:**

Unidades internacionales de potencia de antibiótico por forma de presentación =  $\frac{V_u \times F \times d}{2n}$

Miligramos de antibiótico por forma de presentación =  $\frac{V_u \times F \times d}{n \times 2000}$

**Donde:**

**d =** Factor de dilución.

**n =** número de formas de presentación o unidades de producto en la muestra analizada.



**7.3.4 Método yodométrico para la determinación del contenido de Ampicilina. (14,15,17)**

- 7.3.4.1 Preparación de la muestra y la solución patrón: Pesar exactamente una cantidad de Ampicilina sódica suficiente para preparar una solución con concentración de 1.25 mg de Ampicilina por ml (ver Anexo No. 5).**
- 7.3.4.2 Preparación de la muestra y patrón inactivados: Seguir el procedimiento indicado para Penicilina G y V, según inciso 7.3.3.2.**
- 7.3.4.3 Titulación: Seguir el procedimiento indicado para Penicilina G y V, según inciso 7.3.3.3.**
- 7.3.4.4 Determinación en blanco: Transferir 2 ml de la solución de muestra y de la solución patrón de trabajo, a frascos erlenmeyer con tapón esmerilado. Agregar 10 ml de yodo 0.01 N y 0.1 ml de HCl 1 N. Titular el exceso de yodo con tiosulfato de sodio 0.01 N.**
- 7.3.4.5 Cálculos: Seguir el procedimiento indicado para Penicilina G y V, según el inciso 7.3.3.5.**

**7.3.5 Método cromatográfico para la cuantificación de Penicilina V  
(tabletas): (18)**

**Fase móvil:** Preparar una mezcla de agua, acetonitrilo y ácido acético glacial (650:350:5.75). Filtrar y desgasificar.

**Solución patrón:** Disolver una cantidad exactamente pesada de patrón de Penicilina V en la fase móvil, para obtener una solución de concentración 2.5 mg/ml.

**Muestra:** Pesar no menos de 20 tabletas de Penicilina V y triturarlas en un mortero. Pesar exactamente el equivalente a 400,000 UI y transferirlos a un balón de 100 ml. Aforar con fase móvil, agitar y filtrar.

**Sistema cromatográfico:** El detector ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 254 nm, columna C-18 y flujo de 1 ml/min.

**Procedimiento:** Inyectar en forma separada volúmenes iguales (10 microlitros) de solución de patrón y muestra. Registrar el cromatograma y medir la respuesta para el pico mayor.

**Cálculos:** Calcular la cantidad de unidades de Penicilina V para cada mg de muestra con la siguiente fórmula:

$$25(CP/Wu)(ru/rs)$$

Donde:

**C =** Concentración, en mg/ml, del patrón de Penicilina V

**P =** Potencia calculada del patrón de Penicilina V

**Wu =** Peso en mg de la muestra

**ru =** Area bajo la curva de la muestra

**rs =** Area bajo la curva del patrón

### **7.3.6 Método cromatográfico para la cuantificación de Ampicilina sódica (inyectables) (18)**

**Fase móvil:** Preparar una mezcla de agua, acetonitrilo, fosfato de potasio monobásico 1 M y ácido acético (909:80:10:1). Filtrar y desgasificar.

**Diluyente:** Mezclar 10 ml de fosfato de potasio monobásico y 1 ml de ácido acético, diluir con agua a 1000 ml y mezclar.

**Solución patrón:** Disolver una cantidad adecuada de patrón de Ampicilina en el diluyente para preparar una solución con concentración de 1 mg/ml.

**Muestra:** Pesar una cantidad de muestra adecuada para preparar una solución con concentración de 1 mg/ml. Disolver en el diluyente.

**Sistema cromatográfico:** El detector ultravioleta (UV) a una longitud de

onda de 254 nm, columna C-18, flujo 2 ml/min.

**Procedimiento:** Inyectar en forma separada volúmenes iguales (10 microlitros) de solución patrón y muestra. Registrar el cromatograma y medir la respuesta para el pico mayor.

**Cálculos:** Calcular la cantidad, en microgramos de ampicilina, en cada mg de muestra tomada con la siguiente fórmula:

$$100(CP/WU)(r_u/r_s)$$

**Donde:**

C = Concentración , en mg/ml, de patrón de ampicilina

P = Potencia calculada del patrón de ampicilina

Wu = Peso en miligramos de la muestra

r<sub>u</sub> = Area bajo la curva de la muestra

r<sub>s</sub> = Area bajo la curva del patrón

### **7.3.7 Método cromatográfico para la cuantificación de Penicilina G sódica y benzatínica (inyectables): (18)**

**Solución amortiguadora de fosfato 0.05 M, pH 6:** Disolver 6.8 g de fosfato de potasio monobásico en 900 ml agua, ajustar con NaOH 1 N a un pH de 6, diluir a 1000 ml y mezclar.

**Fase móvil:** Preparar una mezcla de solución amortiguadora de fosfato

0.05 M y acetonitrilo (4:1), filtrar y desgasificar.

**Solución patrón:** Transferir 80 mg de patrón de Penicilina G sódica a un balón aforado de 100 ml, agregar 50 ml de fase móvil agitar hasta dilución y aforar.

**Muestra:** Pesar una cantidad de muestra suficiente para preparar una solución de concentración 0.8 mg/ml. Diluir en fase móvil.

**Sistema cromatográfico:** El detector ultravioleta (UV) con una longitud de onda de 225 nm, columna C-18 y flujo de 2 ml/min.

**Procedimiento:** Inyectar en forma separada volúmenes iguales (10 microlitros) de solución patrón y muestra. Registrar el cromatograma y medir la respuesta para el pico mayor.

**Cálculos:** Calcular el porcentaje de Penicilina G con la fórmula:

$$(G_s W_s / W_u)(r_u / r_s)$$

**Donde:**

**G<sub>s</sub>** = Contenido de penicilina G en el patrón en porcentaje

**W<sub>s</sub>** = Contenido de penicilina G en el patrón (mg)

**W<sub>u</sub>** = Contenido de penicilina G en la muestra (mg)

**r<sub>u</sub>** = Area bajo la curva de la muestra

**r<sub>s</sub>** = Area bajo la curva del patrón

**7.3.8 Método cromatográfico para la cuantificación de Penicilina G procaína (inyectables): (18)**

**Fase móvil:** Disolver 14 g de fosfato de potasio monobásico y 6.5 g de hidróxido de tetrabutilamonio (4 en 10) en 700 ml de agua llevar a pH 7 con KOH 1 N diluir a 1000 ml. Mezclar 500 ml de esta solución con 250 ml de acetonitrilo y 250 ml de agua. Ajustar a pH 7.5 con KOH o ácido fosfórico diluido.

**Solución patrón:** Utilizando cantidades exactamente pesadas de Penicilina G procaína clorhidrato y potásica, preparar una solución en fase móvil que contenga concentraciones de 0.54 y 0.8 mg/ml respectivamente.

**Muestra:** Pesar el equivalente a 70 mg de Penicilina G procaína (muestra) y pasarlos a un balón aforado de 50 ml, agregar 30 ml de fase móvil, poner en ultrasonido por un minuto y aforar.

**Sistema cromatográfico:** El detector ultravioleta (UV) a 235 nm, columna C-18 y flujo de 1 ml/min.

**Procedimiento:** Inyectar en forma separada volúmenes iguales (10 microlitros) de solución patrón y muestra. Registrar el cromatograma y medir la respuesta para el pico mayor. Tiempos de retención relativos: 1 min para procaína y 2.2 min para penicilina G.

**Cálculos:** Calcular el porcentaje de Penicilina G con la fórmula:

$$50C(Gs/Wu)(ru/rs)$$

**Donde:**

**C =** Concentración en mg/ml de patrón de penicilina G

**Gs =** Contenido de penicilina G en el patrón en porcentaje

**Wu =** Contenido de penicilina procaína en la muestra (mg)

**ru =** Area bajo la curva de la muestra

**rs =** Area bajo la curva del patrón

### **7.3.9 Diseño estadístico.**

La sensibilidad es función de la linealidad del método y puede definirse como el intervalo que incluye los niveles alto y bajo del analito que pueden ser determinados en la región lineal del método. La sensibilidad está dada en relación a la concentración del analito presente y se expresa como la relación del cambio en la respuesta instrumental medida al cambio de la concentración del principio activo presente en la muestra, es decir que es posible estimarla por medio de la pendiente de la ecuación de linealidad (19).

Para comparar los resultados obtenidos del análisis de muestras por los métodos utilizados en este trabajo de investigación, y para determinar la

relación que existe entre éstos se utilizó el análisis de correlación lineal, evaluándose el coeficiente de correlación lineal ( $r$ ), la pendiente y el origen por medio de pruebas de hipótesis ( $t$  de Student). Si los métodos presentan la misma relación en cuanto a la concentración de principio activo, se espera un coeficiente de correlación altamente significativo y que la pendiente sea igual a uno y el intercepto igual a cero.

La exactitud relativa de los métodos es determinada mediante la comparación de las pendientes, es decir, si las pendientes son iguales a uno los métodos son equivalentes en cuanto a exactitud, de lo contrario no lo son (19).



Tabla No. 1:

## Concentraciones de Ampicilina Sódica (mg/vial)

No. Muestra	Yodometrico	Microbiologico	HPLC	Teórico
A-1	533.67	545.00	532.74	500.00
A-2	485.42	495.00	551.86	500.00
A-3	527.50	520.00	520.54	500.00
A-4	482.59	475.00	478.40	500.00
A-5	506.84	530.00	491.81	500.00
A-6	514.69	465.00	536.57	500.00
A-7	844.57	850.00	797.98	1,000.00
A-8	576.92	570.62	530.37	500.00
A-9	584.37	500.50	510.28	500.00
A-10	974.71	1,000.20	952.41	1,000.00
A-11	400.72	400.42	335.46	500.00
A-12	433.32	440.31	430.38	500.00
A-13	413.78	420.20	420.36	500.00
A-14	387.41	389.04	390.67	500.00
A-15	467.90	490.00	470.74	500.00

Tabla No. 2:

## Concentraciones de Penicilina G (U/mial)

No. Muestra	Yocométrico	Microbiológico	HPLC	Teórico
G-1	547.671.83	542.000.00	644.345.88	1.000.000.00
G-2	630.941.65	588.000.00	609.126.45	1.000.000.00
G-3	1.255.669.30	1.200.000.00	1.148.678.20	1.200.000.00
G-4	2.533.189.90	2.675.000.00	2.493.348.00	2.500.000.00
G-5	1.330.670.60	1.030.000.00	347.905.00	1.000.000.00
G-6	2.563.766.00	10.900.000.00	10.980.057.00	10.000.000.00
G-7	401.672.63	448.000.00	413.319.75	500.000.00
G-8	2.366.729.20	2.350.000.00	2.359.676.00	2.500.000.00
G-9	2.519.289.30	2.400.000.00	2.264.068.00	2.500.000.00
G-10	1.247.573.30	1.176.000.00	1.159.722.80	1.200.000.00
G-11	3.909.107.10	4.060.000.00	4.020.000.00	4.000.000.00
G-12	1.000.669.40	1.020.000.00	1.011.918.60	1.000.000.00
G-13	1.369.976.30	1.544.000.00	1.290.000.00	1.500.000.00
G-14	1.956.403.10	1.920.000.00	1.050.000.00	1.000.000.00
G-15	4.389.385.00	4.600.000.00	4.060.000.00	4.000.000.00

Tabla No. 3

## Concentraciones de Penicilina V (UI/Tab)

No. Muestra	Yodometrico	Microbiologico	HPLC	Teórico
V-1	1,191,470.30	1,164,000.00	1,212,536.80	1,200,000.00
V-2	1,141,646.80	1,194,822.90	1,246,000.00	1,200,000.00
V-3	1,193,707.30	1,248,000.00	1,140,538.70	1,200,000.00
V-4	1,000,661.47	1,140,000.00	1,026,371.00	1,000,000.00
V-5	1,360,049.40	1,346,143.00	1,332,236.60	1,500,000.00
V-6	1,115,649.50	1,248,000.00	1,130,459.00	1,200,000.00
V-7	1,216,768.20	1,320,000.00	1,144,791.30	1,200,000.00
V-8	890,327.30	886,326.60	680,237.29	1,000,000.00
V-9	313,463.40	897,700.55	390,937.77	1,000,000.00
V-10	905,083.00	900,300.00	907,382.58	1,000,000.00
V-11	1,117,006.30	1,119,390.50	1,121,775.00	1,200,000.00
V-12	1,408,669.70	1,320,000.00	1,343,751.60	1,500,000.00
V-13	1,226,331.10	1,173,626.70	1,120,342.30	1,200,000.00
V-14	847,742.56	840,000.00	877,436.43	1,000,000.00
V-15	1,496,548.00	1,421,395.90	1,348,443.90	1,500,000.00

Ecuaciones de la recta obtenidas en la comparación de los resultados del análisis de muestras, utilizando el método microbiológico como referencia.

**Tabla No. 4. AMPICILINA SODICA**

	MICROBIOLOGICO
HPLC	$y = 41.11 + 0.91 x$ $r = 0.9752$ <sup>1</sup>
YODOMETRICO	$y = 28.12 + 0.95x$ $r = 0.9854$ <sup>1</sup>

**Tabla No. 5. PENICILINA G**

	MICROBIOLOGICO
HPLC	$y = -75254.9 + 0.99x$ $r = 0.9974$ <sup>1</sup>
YODOMETRICO	$y = 105784.2 + 0.90x$ $r = 0.9982$ <sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>(p > 0.05)

Tabla No. 6. PENICILINA V

	MICROBIOLOGICO
HPLC	$y = 153258.9 + 0.84x$ $r = 0.9270^2$
YODOMETRICO	$y = 1163.06 + 0.99x$ $r = 0.9349^2$

Ecuación de la recta:  $y = a + bx$

Donde:

a = intercepto.

b = pendiente.

---

<sup>2</sup> (P > 0.05)

## 9. DISCUSION DE RESULTADOS

En las tablas 4, 5 y 6 se pueden observar las ecuaciones obtenidas de la comparación de los resultados del análisis de muestras de Ampicilina sódica (inyectable), Penicilina G (inyectable) y Penicilina V (tabletas) (Tablas 1, 2 y 3 respectivamente), por los métodos yodométrico y cromatográfico con respecto al microbiológico que fue utilizado como método de referencia; al mismo tiempo se presentan los valores del coeficiente de correlación "r" para cada una de las ecuaciones.

Al analizar las 6 ecuaciones obtenidas, se encontró que los valores de las pendientes (b) para los tres antibióticos estudiados, no fueron significativamente diferentes a 1 ( $p > 0.05$ ), lo cual indica que la sensibilidad relativa de los métodos yodométrico y cromatográfico es similar a la del método microbiológico. Esto quiere decir que los métodos poseen una sensibilidad similar para detectar diferentes concentraciones de los principios activos de los antibióticos estudiados.

El análisis estadístico demostró que los valores de los interceptos (a) obtenidos en las 6 ecuaciones no fueron significativamente diferentes de 0 ( $p > 0.05$ ), y que los valores del coeficiente de correlación "r" en las seis ecuaciones fueron significativos, es decir, aproximadamente igual a 1 ( $p < 0.05$ ).

Con los datos anteriores  $b=1$ ,  $a=0$  y  $r=1$  para todos los casos, se puede afirmar que los métodos yodométrico y cromatográfico son equivalentes en relación al microbiológico, es decir que poseen sensibilidad y exactitud relativas similares, para determinar concentraciones de Ampicilina sódica, Penicilina G y Penicilina V, en las formas farmacéuticas ya indicadas. Por lo tanto, los resultados obtenidos del análisis de muestras con los métodos yodométrico y cromatográfico son igualmente confiables que aquellos obtenidos por el método microbiológico; y por lo que cualquiera de los dos primeros métodos podría reemplazar al tercero.

La selección del método a utilizar para la cuantificación de principio activo de muestras de Ampicilina sódica inyectable, Penicilina G inyectable y tabletas de Penicilina V, dependerá entonces de los recursos tanto materiales como humanos de los cuales se disponga en el laboratorio y de la rapidez con la cual se desee obtener los resultados, pues la cromatografía líquida de alta presión da resultados en un tiempo menor al que emplea el método yodométrico y este necesita de menos tiempo que el que requiere el microbiológico.

Es importante indicar que el método microbiológico puede ser sustituido por los métodos yodométrico y/o cromatográfico cuando el objetivo del análisis es cuantificar el principio activo de las muestras de antibióticos y no determinar la potencia antibiótica de los mismos. En este caso el método microbiológico no puede ser sustituido, pues con métodos fisicoquímicos no se puede medir el poder de un antibiótico para inhibir el crecimiento bacteriano.

En los resultados de la prueba de paralelismo entre los métodos yodométrico y cromatográfico donde se determina la exactitud relativa de los mismos, se concluyo que para la cuantificación de Ampicilina sódica y Penicilina V ambos métodos son similares en cuanto a exactitud pues sus pendientes (0.91 y 0.95 [ $p > 0.05$ ]) para ampicilina y (0.84 y 0.99 [ $p > 0.05$ ]) para Penicilina V no mostraron una diferencia significativa, por lo que se puede decir que fueron iguales.

Con la Penicilina G no sucedió lo mismo pues las pendientes para los dos métodos mostraron diferencia significativa (Tabla No. 2), lo cual quiere decir que los métodos no son similares en exactitud para cuantificar este antibiótico. Como la pendiente del método cromatográfico es la más cercana a 1 (0.99), que la pendiente del método yodométrico (0.90), se puede decir que el método cromatográfico es más exacto que el otro y por lo tanto más confiable.



## 10. CONCLUSIONES

- 10.1 La sensibilidad relativa de los métodos yodométrico y cromatográfico para detectar diferentes concentraciones de Ampicilina, Penicilina G y Penicilina V, es similar a la del método microbiológico.
- 10.2 Los métodos yodométrico y cromatográfico para cuantificación de Ampicilina, Penicilina G y Penicilina V, son igualmente confiables que el método microbiológico, por lo que este puede reemplazarse en cualquier momento por cualquiera de los anteriores.
- 10.3 Los métodos yodométrico y cromatográfico para cuantificación de Ampicilina sódica en inyectables y Penicilina V en tabletas son igualmente confiables pues poseen exactitud relativa similar.
- 10.4 El método cromatográfico para cuantificación de Penicilina G en inyectables es más confiable que el método yodométrico.
- 10.5 La selección del método a utilizar para la cuantificación de principio activo en muestras de Ampicilina sódica inyectable, Penicilina G inyectables y Penicilina V en tabletas depende de los recursos humanos y materiales disponibles y de la rapidez con la que se desea obtener los resultados.

## **11. RECOMENDACIONES**

- 11.1 Utilizar para la cuantificación de principios activos de Ampicilina sódica en inyectables, Penicilina G en inyectables y Penicilina V en tabletas el método de cromatografía líquida de alta presión, el cual demostró ser igualmente confiable que el microbiológico con la ventaja de poder dar resultados en un tiempo mucho más corto.**

**12. REFERENCIAS**

- 12.1 Pryde A. & Gilbert M. Application of High Performance Liquid Chromatography. Great Britain: Chapman and Hall, 1979. 255 p. (p. 57-69).
- 12.2 Hawk G., et al. Biological and Biomedical Applications of Liquid Chromatography. USA:Marcel Decker Inc. Vols. 12, vol. 10 y 12, 1979. 736 p. (p. 603-615).
- 12.3 Masuda G, Tomioka S. Quatitative Assessment of Bactericidal Activities of B-Lactam Antibiotics by Agar Plate Method. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1978; 14:587-595.
- 12.4 Grasso S, Meinardi G. New in vitro model to study the effect of antibiotic concentration and rate of elimination on antibacterial activity. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1978; 13:570-576.
- 12.5 Haginaka J, Wakai,J. Liquid Chromatography determination of Penicillins by postcolumn degradation with sodium hypochlorite. Anal. Chem.,1986; 58:1986- 1988.
- 12.6 Usher J, Lewis M, Hughes,D. Determination by HPLC of some compounds involved in the biosynthesis of penicillin and cephalosporin. Biochemistry; 149:105-110.
- 12.7 Danielson N, Targove M. Pre- and Postcolumn derivatization chemistry in conjunction with HPLC for Pharmaceutical Analysis. Journal of Chromatography Science; 26:362-368.
- 12.8 Moats W. Liquid Chromatography approaches to antibiotic residue analysis. J. Assoc. Off. Anal. Chem.; 73:343- 345.
- 12.9 Margois M. Quantitative liquid chromatography of ampicillin: Collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem.; 70:206-211.
- 12.10 Mopper B. Liquid chromatography determination of Penicillin V Potassium in tablets and powders for oral solution. J. Assoc. Off. Anal. Chem.; 70:39-41.
- 12.11 Litter, M., Farmacología. 7a. ed. Buenos Aires: El Ateneo, 1986. 1872 p.

- 12.12 Determinación de potencia para Penicilina G. Método Microbiológico. Guatemala: Comisión Guatemalteca de Normas, COGUANOR, Ministerio de Economía, Guatemala, C.A.
- 12.13 Determinación de potencia para Ampicilina. Método Microbiológico. Guatemala: Comisión Guatemalteca de Normas, COGUANOR, Ministerio de Economía, Guatemala, C.A.
- 12.14 The United States Pharmacopeia. XXI ed. USA: Mack Printing Co., 1985. 1683 p. (p. 59-63, 792-802).
- 12.15 Food and Drug Administration (FDA) Code of Federal Regulations. Washington: United States Government Printing Office. Title 21, parts 300 - 499. 1992. 1001 p. (p. 466-515).
- 12.16 The United States Pharmacopeia. XXII ed. USA: Mack Printing Co., 1990. 2067 p. (p. 87-92, 1024-1031, 1036- 1040, 1538-1544, 1710-1712).
- 12.17 Determinación de potencia para Penicilina, Método yodométrico. Guatemala: Comisión Guatemalteca de Normas, COGUANOR, Ministerio de Economía, Guatemala, C.A.
- 12.18 Determinación de potencia para Ampicilina, Método yodométrico. Guatemala: Comisión Guatemalteca de Normas, COGUANOR, Ministerio de Economía, Guatemala, C.A.
- 12.19 Consulta verbal en el Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC.
- 12.20 Gennaro, A., et al. Farmacia. 17a. ed. Buenos Aires: Panamericana. Vols. 2, vol. 2. 1987. 2723 p. (p.1617- 1627).
- 12.21 Index Merck, 10th ed. United States: Merck & Co. Inc. 1983. 1463 p.
- 12.22 Moffat, A., et al. Clark's Isolation and Identification of Drugs. 2nd ed. London: The Pharmaceutical Press. 1986. 1223 p. (p. 351, 390, 887-888, 926).
- 12.23 Martindale, The Extra Pharmacopeia. 28th ed. London: The Pharmaceutical Press. 1982. 2025 p. (p. 1076- 1085, 1091-1098, 1101-1110).

**13. ANEXOS.**

**ANEXO No. 1**

**GENERALIDADES DE LA LEGISLACION NACIONAL PARA EL CONTROL DE  
ANTIBIOTICOS**

La Comisión Guatemalteca de Normas, COGUANOR, define la potencia antibiótica como "el poder de un antibiótico de inhibir el crecimiento bacteriano." Al mismo tiempo indica que es directamente proporcional a la concentración de principio activo del mismo (12).

Esta comisión ha establecido métodos microbiológicos para la determinación de potencia antibiótica y métodos químicos para la cuantificación de principio activo.

Estos métodos están basados en aquellos descritos en la Farmacopea de los Estados Unidos y en el Código de Regulaciones Federales del mismo país.

La Farmacopea de los Estados Unidos edición XXI, 1985 (14), describe en forma general el método microbiológico para determinar potencia antibiótica. Sin

embargo, en la monografía individual de cada antibiótico (Penicilina G, Penicilina V y Ampicilina) se presenta el método yodométrico para calcular el contenido de principio activo.

El Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos edición 1988 (15), describe ambos métodos y señala el yodométrico como método conclusivo para inferir la potencia antibiótica de Penicilina G, Penicilina V y Ampicilina y el microbiológico para determinar la potencia de los mismos.

La Farmacopea de los Estados Unidos edición XXII, 1990 (16), presenta los métodos mencionados con anterioridad, pero además, introduce el método cromatográfico (cromatografía líquida de alta presión), para cuantificación de principio activo. En esta última edición se ha reemplazado el método yodométrico, para todas las formas farmacéuticas de Penicilina V y algunas de Ampicilina, por el método cromatográfico. También establece una técnica para la determinación de contenido de Penicilina G (sódica, benzatínica y procaína) utilizando la cromatografía líquida de alta presión.

## ANEXO No. 2

**DESCRIPCION DE SOLUCIONES, SUSPENCIONES Y  
MEDIOS DE CULTIVO****1. Solución amortiguadora de fosfatos pH 6**

Se disuelven 2.0 g de fosfato de potasio dibásico y 8.0 g de fosfato monobásico en agua destilada y se lleva hasta un volumen de 1000 ml. Se ajusta a un pH de 6.00 con solución 18 N de ácido fosfórico o con solución 10 N de hidróxido de potasio y se esteriliza (12).

**2. Suspensión concentrada de *Staphylococcus aureus***

Se transfiere el microorganismo, con el asa para inocular, a un tubo de ensayo que contiene medio de cultivo No. 2 (ver más adelante) en forma inclinada y se incuba a 32- 35° C por 18-24 h. Se lava el crecimiento del microorganismo en toda la superficie del medio con 3 ml de solución de cloruro de sodio estéril y se transfiere la suspensión del lavado a una botella Roux que contenga 250 ml del medio de cultivo No. 2. La botella debe moverse para permitir que la suspensión se ponga en contacto con toda la superficie del medio de cultivo. Se incuba a 32-35° C por 24 h.

Se agregan 50 ml de solución de cloruro de sodio estéril, unas perlas de vidrio y se lava el crecimiento de la superficie del medio de cultivo, teniendo cuidado de no romperla. Esta suspensión concentrada se pasa a un frasco estéril de 300 ml y se guarda en refrigeración. En estas condiciones es estable por una semana (12).

### **3. Suspensión concentrada de Bacillus subtilis**

Se prepara de igual forma que la suspensión de Staphylococcus aureus , pero utilizando en este caso Bacillus subtilis.

### **4. Suspensión de trabajo**

Se ajusta el espectrofotómetro a 100 % de transmitancia con una longitud de onda de 580 nm usando solución de cloruro de sodio al 0.9 %. Se determina la cantidad de solución salina que se necesita agregar a un determinado volumen de la suspensión concentrada indicada anteriormente, para obtener una transmitancia de  $25 \pm 1\%$ , a una longitud de onda de 580 nm. Las diluciones se preparan de acuerdo al volumen requerido de trabajo. La dilución puede refrigerarse durante una semana (12).

### **5. Medio de cultivo antibiótico No.1**

Se disuelven 6 g de peptona, 4 g de digerido pancreático de caseína, 3 g de extracto de levadura, 1.5 g de extracto de carne, 1 g de dextrosa y 15 de agar en 1000 ml de agua destilada. Se agita hasta disolución completa. Se mide el pH y se ajusta, si fuera necesario a 6.5-6.6 con hidróxido de sodio 1 N o con ácido clorhídrico 1 N, antes de esterilizar. Esterilizar en botellas de 160 ml por 15 minutos a 15 libras/pulgada<sup>2</sup>, 121°C (12).

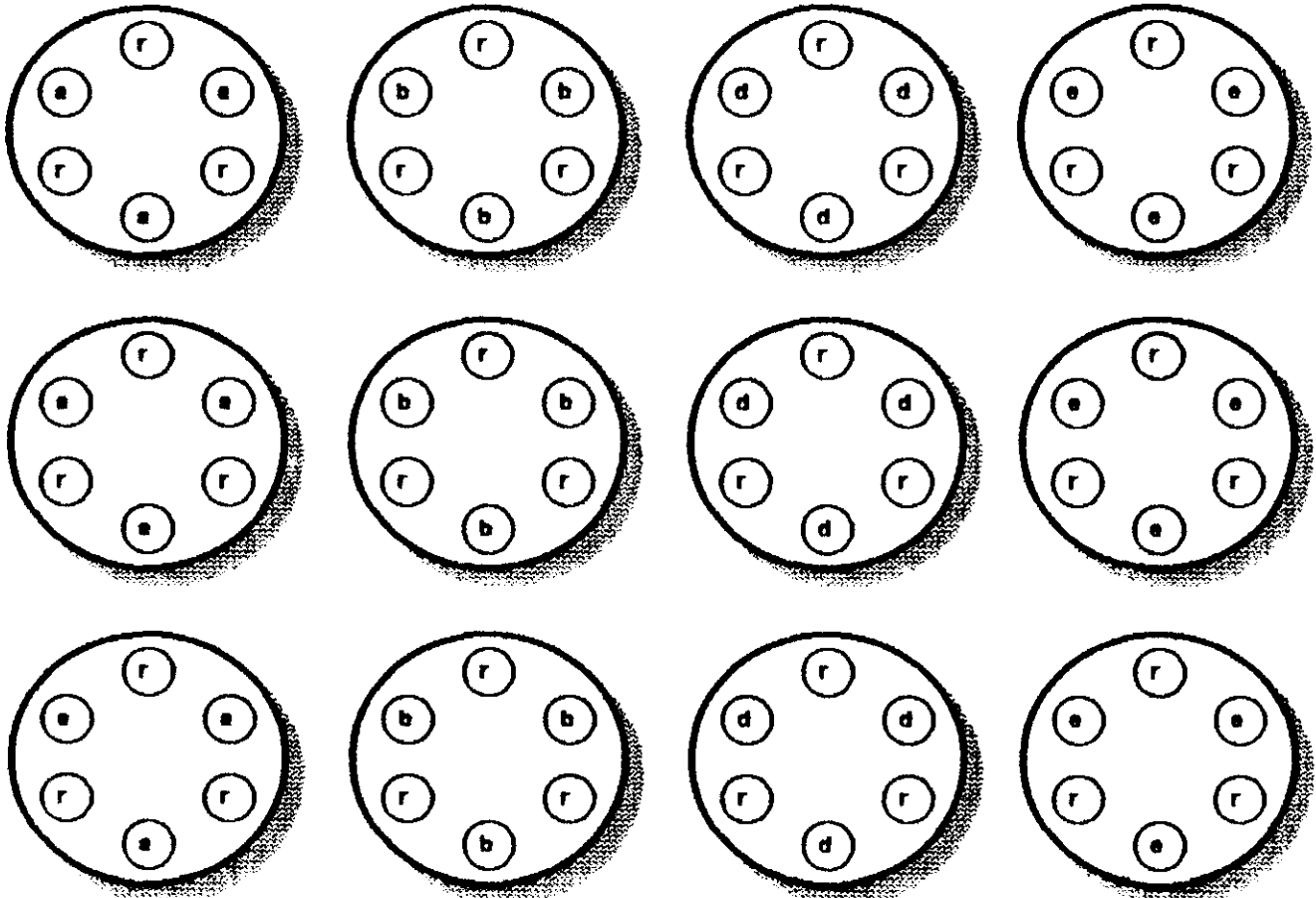
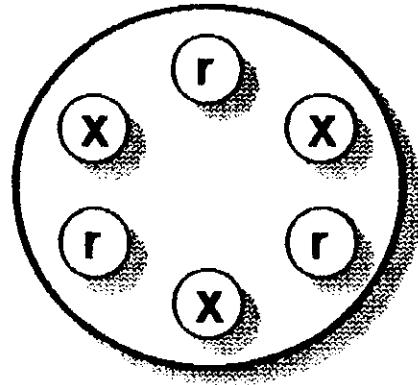
### **1.6 Medio de cultivo antibiótico No. 2**

Se disuelven 6 g de peptona, 3 g de extracto de levadura, 1.5 g de extracto de carne y 15 de agar en 1000 ml de agua destilada y se procede como se indicó en el numeral 1.5 (12).



## Disposición de los Discos en las cajas de Petri Método Microbiológico

**X: muestra**  
**a: Sa : Solución de trabajo a**  
**b: Sb: Solución de trabajo b**  
**d: Sd: Solución de trabajo d**  
**e: Se : Solución de trabajo e**  
**r: Sr : Solución de referencia**



## ANEXO No. 4

**Preparación de Muestras y Patrones para el  
Método Yodométrico (17)**

<b>Antibiótico</b>	<b>Solvente</b>	<b>Diluyente</b>	<b>Concentración final en UI/ml</b>
Penicilina G Benzatínica Sol. blanco	ninguno	agua destilada	2000
Penicilina G benzatínica sol. inactivada	ninguno	Sol. NaOH 1N	2000
Penicilina G potásica	ninguno	sol. amort. <sup>3</sup>	2000
Penicilina G procaína	2 ml metanol	sol. amort. <sup>3</sup>	2000
Penicilina G sódica	ninguno	sol. amort. <sup>3</sup>	2000
Penicilina V	2 ml metanol	sol. amort. <sup>3</sup>	2000
Penicilina V benzatínica sol. blanco	ninguno	agua destilada	2000
Penicilina V benzatínica sol. inactivada	ninguno	Sol. NaOH 1N	2000
Penicilina V Potásica	ninguno	sol. amort. <sup>3</sup>	2000

<sup>3</sup>Solución amortiguadora al 1.0 % de fosfato de potasio de pH 6. (Anexo No. 2)

**ANEXO No. 5****PREPARACION DE MUESTRAS DE AMPICILINA (18)**

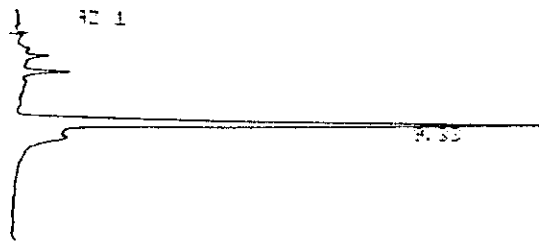
<b>ANTIBIOTICO</b>	<b>SOLVENTE</b>	<b>CONCENTRACION mg/ml</b>
<b>Ampicilina</b>	<b>agua</b>	<b>1.25</b>
<b>Ampicilina Sódica</b>	<b>Sol. amort. <sup>4</sup></b>	<b>1.25</b>

---

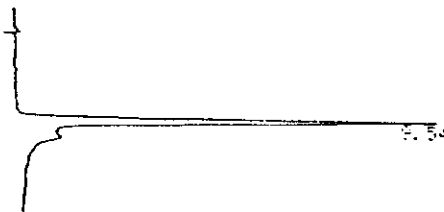
<sup>4</sup>Solución amortiguadora al 1 % de fosfato de potasio de pH 6. (Anexo No. 2)

CROMATOGRAMAS DE AMPICILINA SODICA

ESTANDAR



MUESTRA

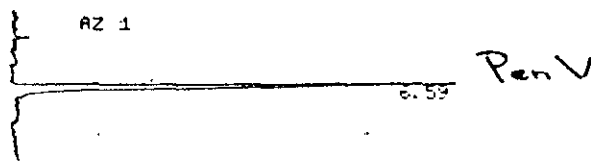


CROMATOGRAMAS DE PENICILINA G

ESTANDAR

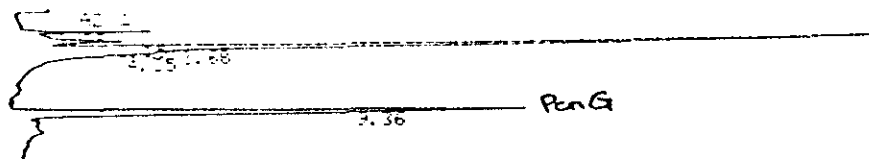


MUESTRA

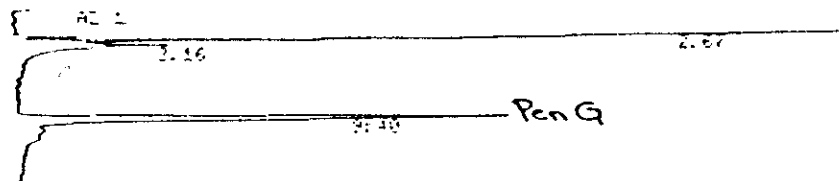


CROMATOGRAMAS DE PENICILINA V

ESTANDAR



MUESTRA



*L. Orozco*

Ligia Maria Orozco Toralla  
AUTORA

*R. Benavides*

Lic. Roberto Benavides  
ASESOR

*G. Navas Escobedo*

Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo  
DIRECTORA ESCUELA DE QUIMICA FARMACEUTICA

*11*

*C. Gálvez de Avila*

Licda. Clemencia Gálvez de Avila  
DECANA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS  
QUIMICAS Y FARMACIA

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central