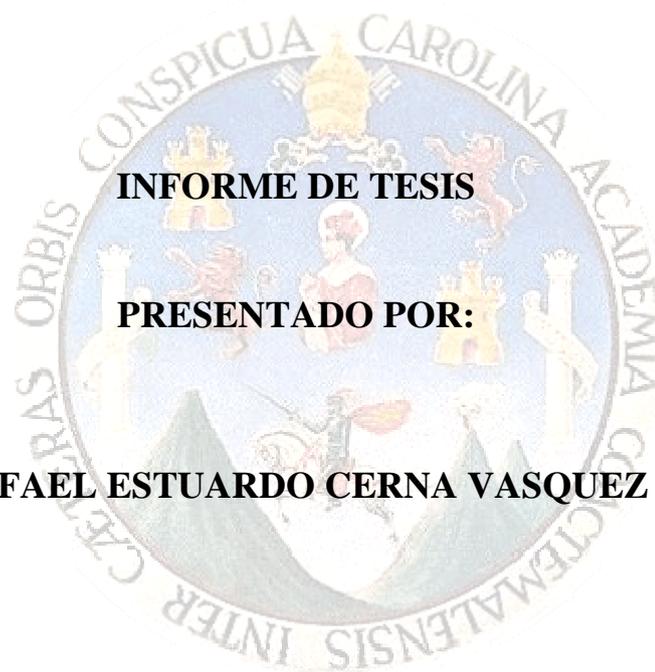


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**VALIDACION DEL METODO ESPECTROFOTOMETRICO EN
INFRARROJO PARA CUANTIFICACION
DE AMOXICILINA CAPSULAS DE 500mg**



INFORME DE TESIS

PRESENTADO POR:

RAFAEL ESTUARDO CERNA VASQUEZ

PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO

GUATEMALA, SEPTIEMBRE DEL 2006

ÍNDICE

	Página
1. RESUMEN.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	4
3. ANTECEDENTES.....	5
4. JUSTIFICACIONES.....	10
5. OBJETIVOS.....	11
6. HIPOTESIS.....	12
7. MATERIAL Y METODOS.....	13
7.1 PROCEDIMIENTO DE CUANTIFICACIÓN.....	14
7.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	17
8. RESULTADOS.....	21
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	25
10. CONCLUSIONES.....	27
11. RECOMENDACIONES.....	29
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
13. ANEXOS.....	32

1. RESUMEN

La evaluación de la cantidad de principio activo en un producto farmacéutico constituye un parámetro importante en control de calidad, por lo que es necesario validar los métodos de análisis destinados para dicho fin, mediante la demostración experimental de su funcionalidad.

El presente trabajo se desarrolló con el fin de demostrar que el método de cuantificación de amoxicilina por espectrofotometría infrarroja propuesto produce resultados confiables, precisos, exactos y reproducibles y que además constituye un método alternativo de utilidad para los laboratorios que producen dicho producto.

Los parámetros estadísticos evaluados en la validación del presente método de cuantificación son: especificidad o selectividad, linealidad, precisión, repetibilidad, perfil de precisión y exactitud.

Las muestras analizadas fueron aleatoriamente seleccionadas y sometidas bajo el mismo tratamiento a diferentes concentraciones, por triplicado, para evaluar la linealidad y especificidad del método.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un tratamiento estadístico para evaluar los parámetros anteriormente mencionados, calculando la desviación estándar, coeficiente de correlación, media, porcentaje de recuperación, y mínimos cuadrados.

Debido a que los resultados obtenidos cumplen con los parámetros estadísticos evaluados, se puede concluir que el método de cuantificación de amoxiclina por espectrofotometría infrarroja produce resultados confiables, precisos y reproducibles siempre que se analicen bajo las mismas condiciones que el método describe.

2. INTRODUCCION

En Guatemala las empresas farmacéuticas hacen uso de métodos e instrumentos para la cuantificación de los principios activos de los productos farmacéuticos que expenden y con los cuales se obtienen datos reproducibles, confiables y precisos, para garantizar la calidad al consumidor.

En la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 24) se hace mención del uso del método cromatográfico para la cuantificación de amoxicilina cápsulas, así mismo en la Farmacopea Británica de 1998 hace referencia al método espectrofotométrico de luz ultravioleta para la cuantificación de amoxicilina cápsulas.

La industria farmacéutica guatemalteca necesita contar con metodologías validadas diversas para la cuantificación de amoxicilina cápsulas, con lo cual pueden utilizar el método más conveniente y adecuado de acuerdo a las características del departamento de Control de Calidad de cada empresa.

La validación del método por espectrofotometría infrarroja para cuantificar amoxicilina cápsulas, proporcionará una metodología alternativa rápida, precisa y reproducible para realizar la cuantificación de amoxicilina cápsulas.

3. ANTECEDENTES

La amoxicilina derivado de la ampicilina es introducida al mercado farmacéutico en 1974, y pertenece al grupo de penicilinas semisintéticas. Actualmente estas penicilinas semisintéticas se obtienen a partir del ácido 6-aminopenicilánico, obtenido directamente de los tanques de fermentación del *Penicillium chrysogenum* o bien por acción de la acilasa o penicilinamidasa sobre la bencilpenicilina; dicho ácido se une con diferentes cadenas laterales y da lugar a dos subgrupos de penicilinas.

1. Las penicilinas peniclinasarresistentes por la presencia de su cadena lateral quedan protegidas de la ruptura del anillo B-lactámico e inactivación consiguiente por la enzima penicilinasasa, producida por los estafilococos resistentes a las penicilinas comunes como la penicilina G o la penicilina V. Así se han sintetizado a) la meticilina sódica o dimetoxifenilpenicilina sódica (Penaureus), muy inestable en medio ácido, por lo que requiere la vía parenteral; b) la oxacilina sódica con una cadena lateral isoxazol, más potente que la anterior y acidoestable o acidorresistente, siendo posible su utilización por vía bucal en las infecciones estafilocócicas, c) la dicloxacilina sódica, con dos átomos de cloro, más potente que la anterior y mejor absorción por vía oral.
2. Las mal llamadas penicilinas de "amplio espectro", mejor llamadas de espectro ampliado, ya que si bien poseen un espectro más extenso que las penicilinas anteriores algunas no pueden compararse con los

antibióticos de amplio espectro. Comprenden esencialmente: a) la ampicilina, derivado amínico de la penicilina G de configuración D, que es acidorresistente y puede usarse por vía oral, mientras que la ampicilina sódica se emplea por vía parenteral; b) la amoxicilina, p-hidroxiderivado del anterior y de mejor absorción digestiva, usándose por vía oral (compuesto de estudio), mientras que la amoxicilina sódica se emplea por vía parenteral; c) la metampicilina sódica, metilaminopenicilina, también de mejor absorción que la ampicilina; d) la carbenicilina disódica o carboxibencilpenicilina que actúa sobre la *Pseudomonas aeruginosa* o bacilo piocianico -las otras no-, pero requiere la vía parenteral -no se absorbe bien por la vía digestiva-, e) la pivampicilina, clorhidrato, éster del ácido piválico con la ampicilina, en el organismo -se absorbe mejor que la ampicilina- se hidroliza liberando la ampicilina -la que actúa-, f) la bacampicilina, clorhidrato, también un éster de la ampicilina, pero con el etoxicarboniloxietilo, que asimismo se absorbe mejor que la ampicilina y en el organismo libera ampicilina; g) la hetacilina potásica es un derivado del ácido 6-aminopenicilánico, pero en el grupo amino hay un anillo de imidazolina, y en el organismo -se absorbe por vía oral y parenteral- libera ampicilina; h) la epicilina se diferencia de la ampicilina por el reemplazo del radical fenilo por ciclohexadienilo, y de actividad semejante a la ampicilina, usándose por vía oral, mientras que la epicilina sódica se emplea por vía parenteral. (13).

Siendo la amoxicilina el compuesto cuyo método de cuantificación se validará por espectrofotometría infrarroja, es importante mencionar sus diferentes presentaciones, vías de

administración y dosis. Las presentaciones comercializadas son las siguientes: cápsulas de 250 y 500 mg (la presentación en cápsulas de 500mg es la que se empleará en el estudio), tabletas de 1 g, y en suspensión de 125/5 mL y 250/5 mL, frascos de 250 y 500 mg, polvo para disolver en 2 y 3 mL respectivamente de agua o solución salina. Dosis usuales: 250 mg 3 veces por día (vía oral), 500 mg, 3 veces por día (vía parenteral), hay que recalcar que la amoxicilina tiene mejor absorción por vía oral que parenteral y que guarda parentesco farmacológico y clínico cercano con la ampicilina, absorbiéndose más rápido y completo en las vías gastrointestinales en relación con la ampicilina lo cual constituye la principal diferencia entre uno y otro. El espectro antimicrobiano de la amoxicilina es esencialmente idéntico al de la ampicilina con la excepción importante de que aquella al parecer es menos eficaz que la segunda contra la shigelosis. (13)

Las concentraciones máximas de amoxicilina en el plasma son de 2 a 2.5 veces mayores que las de ampicilina después de ingestión de la misma dosis: los valores mencionados se alcanzan en término de dos horas y son en promedio 4 ug/ml cuando se administran 250 mg. Los alimentos no interfieren en la absorción del antibiótico. Tal vez por la mayor absorción de su congénere, la diarrea con la amoxicilina es menor que después de usar ampicilina. La incidencia de otros efectos adversos al parecer es semejante. La vida media de la amoxicilina es similar a la de la ampicilina pero las concentraciones efectivas de la amoxicilina oral son detectables en el plasma por un lapso dos veces mayor que en el caso de ampicilina por su absorción mas completa. En promedio, 20% de la amoxicilina

se liga a proteínas plasmáticas, cifra semejante a la observada con la ampicilina. Gran parte de una dosis del antibiótico se excreta en la forma activa en orina. El Probenecid retrasa la excreción del fármaco.

La amoxicilina y otros antibióticos de este grupo pueden ser protegidos de su destrucción por las B-lactamasas si se administran junto con los inhibidores de la B-lactamasa, como el ácido clavulánico o sulbactam, estas mezclas se han empleado contra Haemophilus influenzae o microorganismos coliformes productores de lactamasa. No se han aclarado por completo las posibles ventajas de estas mezclas sobre las cefalosporinas apropiadas. Cabe destacar que en algunos pacientes el tratamiento con amoxicilina es eficaz para la erradicación del Helicobacter pylori en la úlcera. Además de actuar contra esta enfermedad la amoxicilina es un compuesto de primera elección para el tratamiento de faringitis, escarlatina, otitis media, sinusitis, celulitis, erisipelas, neumonía, bacteremia, síndrome similar al choque tóxico y otras infecciones sistémicas causadas por el Streptococcus pyogenes y contra la neumonía, artritis, sinusitis y otitis causadas por el Streptococcus pneumoniae. El uso de la amoxicilina se ha extendido al tratamiento de heridas traumáticas-contaminadas como lo es el caso de mordeduras de animales y seres humanos en dosis de 0.5 g, tres veces al día durante 24 h, por PO para enfermos ambulatorios, y para el tratamiento de la enfermedad de Lyme en dosis de 500 mg tres veces al día durante 21 días. (11)

La información para la cuantificación de amoxicilina, como producto terminado en su presentación cápsulas, se reporta en la

Farmacopea de los Estados Unidos (USP 24), y en la Farmacopea Británica de 1998, las cuales reportan los siguientes métodos:

- Método USP 24:
Describe la cuantificación de la amoxicilina cápsulas por el método cromatográfico. (5)
- Método Farmacopea Británica 1,998.
Describe el método de espectrofotometría por luz ultravioleta para la cuantificación de la amoxicilina cápsulas. (2)

3. JUSTIFICACION

Guatemala es un país que tiene alta incidencia en diferentes afecciones provocadas por microorganismos que dan origen a enfermedades como la faringitis, escarlatina, otitis, neumonía y otras infecciones sistémicas; para las cuales la amoxicilina es clasificado como fármaco de primera elección.

Ya que Guatemala es un país en vías de desarrollo, depende del desarrollo tecnológico y no todas las Industrias Farmacéuticas Nacionales poseen un laboratorio de control de calidad.

Por lo anteriormente expuesto resulta necesario proporcionar métodos alternativos para la cuantificación de la amoxicilina en su presentación cápsulas (asegurando así que cumpla con las características establecidas por la USP 24). Por lo que el presente trabajo de tesis propone el método espectrofotométrico infrarrojo para la cuantificación de amoxicilina cápsulas, método que proporcionará resultados rápidos, confiables, precisos y reproducibles para la cuantificación del fármaco en mención.

Es indispensable contar con métodos alternativos, que aseguren que este producto cumpla con las características físicas químicas y microbiológicas establecidas por la USP.

5. OBJETIVOS

1 GENERALES:

- 1.1** Proporcionar una alternativa de análisis rápida, confiable, precisa y reproducible, que asegure que el producto que llega al consumidor cumple con las características establecidas.

2 ESPECIFICOS:

- 2.1** Determinar si el método por espectrofotometría infrarrojo empleado provee resultados confiables.
- 2.2** Determinar si el método por espectrofotometría infrarrojo provee resultados reproducibles.
- 2.3** Determinar si el método por espectrofotometría infrarrojo provee resultados precisos.

6. HIPOTESIS

El método por espectrofotometría infrarroja para la cuantificación de amoxicilina cápsulas, proporciona datos reproducibles, precisos y confiables.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Universo de trabajo:

Amoxicilina cápsulas de 500 mg, fabricada por laboratorios nacionales.

7.2 Muestra: se tomará en cuenta el 100% del universo. (Siendo el muestreo probabilístico)

7.3 Medios:

7.3.1 Recursos Humanos:

Licenciada Lorena del Carmen Cerna Vásquez (Asesora)

Licenciado Oscar Benecto Monzón (Coasesor)

Bachiller Rafael Estuardo Cerna Vásquez (Tesista)

7.3.2 Recursos Materiales:

7.3.2.1 Equipo:

Balanza analítica

Espectrofotómetro infrarrojo

Mortero y pistilo

Cronómetro

Agitador magnético

Pizeta

Espátula de metal

7.3.2.2 Cristalería:

Matraces volumétricos de 10, 50 y 1,000 mL

Pipetas volumétricas de 1, 2, 5 y 10 mL

Beakers de 10, 50, 100 y 250 ml

Varilla de vidrio

Embudos de filtración

7.3.2.3 Reactivos:

Acido clorhídrico en agua 0.05N.

Amoxicilina USP

7.4 Procedimientos:

7.4.1 Procedimientos de cuantificación:

•Preparación de la solución problema.

- ✓ Determinar el peso promedio de 20 cápsulas.
- ✓ Pesar el equivalente a 500 mg de amoxicilina base.
- ✓ Transferirlo a un balón aforado de 50 mL y agregar 25 mL de ácido clorhídrico 0.05N.
- ✓ Disolver con agitación por 15 minutos y aforar a 50 mL con ácido clorhídrico 0.05N. (Solución No.1).Concentración 12 mg/mL
- ✓ Transferir 10 mL de la solución No. 1 a un balón aforado de 10 ml, disolver y aforar a 10 ml con ácido clorhídrico 0.05N (Solución No. 2). Concentración 10mg/mL.

- ✓ Transferir 8 mL de la solución No. 1 a un balón aforado de 10 ml, disolver y aforar a 10 ml con ácido clorhídrico 0.05N (Solución No. 3). Concentración 8mg/mL.

- ✓ Transferir 6 mL de la solución No. 1 a un balón aforado de 10 ml, disolver y aforar a 10 ml con ácido clorhídrico 0.05N (Solución No. 4). Concentración 6mg/mL.

- ✓ Transferir 4 mL de la solución No. 1 a un balón aforado de 10 ml, disolver y aforar a 10 ml con ácido clorhídrico 0.05N (Solución No. 5). Concentración 4mg/mL.

- ✓ Elaborar soluciones a las siguientes concentraciones: 4, 6, 8, 10, y 12 mg/ml, por triplicado.

- ✓ Leer de 700 a 4,000 nm y determinar la longitud de onda de máxima absorbancia.

- **Preparación de la solución de referencia.**

- ✓ Pesar alrededor de 500 mg de amoxicilina USP y colocarlos en un matraz volumétrico de 50 mL, adicionar 25 mL de ácido clorhídrico 0.05N.

- ✓ Disolver con agitación por 15 minutos, completar al aforo de 50 mL con ácido clorhídrico 0.05N, homogenizar (Solución No. 6).

- ✓ Transferir 12 mL de la solución No. 6 a un balón aforado de 10 ml, disolver y aforar a 10 ml con ácido clorhídrico 0.05N (Solución No.7). Concentración 12mg/mL.

- ✓ Transferir 10 mL de la solución No. 6 a un balón aforado de 10 ml, disolver y aforar a 10 ml con ácido clorhídrico 0.05N (Solución No.7). Concentración 10mg/mL.

- ✓ Transferir 8 mL de la solución No. 6 a un balón aforado de 10 ml, disolver y aforar a 10 ml con ácido clorhídrico 0.05N (Solución No.7). Concentración 8mg/mL.

- ✓ Transferir 6 mL de la solución No. 6 a un balón aforado de 10 ml, disolver y aforar a 10 ml con ácido clorhídrico 0.05N (Solución No. 8). Concentración 6mg/mL.

- ✓ Transferir 4 mL de la solución No. 6 a un balón aforado de 10 ml, disolver y aforar a 10 ml con ácido clorhídrico 0.05N (Solución No. 9). Concentración 4mg/mL.

- ✓ Elaborar soluciones a las concentraciones: 4, 6, 8, 10 y 12 mg/mL, por triplicado.

- ✓ Leer de 700 a 4,000 nm y determinar la longitud de onda de máxima absorbancia.

grupo B. Seguidamente hacer un análisis de correlación lineal (producto sin interferentes en el eje X y producto con interferentes en el eje Y).

2. LINEALIDAD:

Determina el rango lineal de la respuesta analítica. Con los mismo datos del grupo B, realizar un análisis de regresión lineal (concentración conocida en el eje de X y respuesta analítica en el eje Y). Evaluar la ecuación de regresión por medio de análisis de varianza, t de Student para el coeficiente de correlación “r”. Siendo por lo tanto “r²” el coeficiente de determinación.

3. SENSIBILIDAD:

Determinación del rango dentro del cual el analito puede ser determinado y la relación entre la concentración teórica y la reportada por el método analítico.

Con los mismos datos del grupo B, realizar la prueba de t de Student para la hipótesis $H_0: b = 1$.

Si no son buenos resultados, se eliminan extremos y se repite el procedimiento, para dar el rango lineal y de sensibilidad.

4. PRECISION:

Grado de concordancia entre las valoraciones al hacerlas repetidas veces.

4.1 REPETIBILIDAD:

Utilizar un estándar de concentración conocida dentro del rango analítico (mg/mL) y medir la concentración del analito por lo menos 10 veces, realizando las mediciones bajo las mismas condiciones. Calcular el promedio y desviación estándar, con estos datos la repetibilidad puede establecerse por medio del coeficiente de variación, el cual no deberá ser mayor a un porcentaje preestablecido, según se indica:

Métodos cromatográficos	2%
Métodos químicos y espectrofotométricos	3%
Métodos microbiológicos	5%

El valor máximo del coeficiente de variación puede establecerse a priori por el investigador.

4.2 PERFIL DE PRECISION:

Con los datos obtenidos del grupo B del inciso 1, calcular los coeficientes de variación para cada concentración y realizar una gráfica (perfil de precisión). En el eje X se colocan las concentraciones conocidas del analito y en el eje Y los coeficientes de variación.

Se interpreta de acuerdo al valor límite pre-establecido del coeficiente de variación. De igual forma, se puede establecer el perfil de precisión con los datos del inciso 4.2.

5. EXACTITUD

Grado de acuerdo entre la concentración real y la reportada por el método analítico.

Con los mismos datos del grupo B del inciso 1, determinar el porcentaje de recuperación del analito:

$$\% r = \frac{\text{Concentración encontrada} \times 100}{\text{Concentración conocida}}$$

Con estos valores calcular su promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

Prueba de hipótesis $H_0: y = 100 \%$ (t de Student)

Luego analizar la ecuación de la recta en función de la siguiente hipótesis

$$H_0: a = 0$$

$$H_0: b = 1$$

El análisis estadístico se realiza por medio de la prueba de t de Student e indica si existe algún sesgo o lectura de fondo que afecte la exactitud (9).

8. RESULTADOS

8.1 Especificidad:

Para realizar la evaluación de este parámetro se realizaron cuantificaciones de amoxicilina en su presentación cápsulas a cinco diferentes concentraciones, siendo éstas las siguientes:

GRUPO A:

1. 12 mg/mL
2. 10 mg/mL
3. 8 mg/mL
4. 6 mg/mL
5. 4 mg/mL

Los análisis de cuantificación con el espectrofotómetro se realizaron por triplicado para cada concentración, obteniéndose una *t* de student pareada de 2.45, una desviación estandar de 0.1628 y una media de desviación de 0.2571 (Ver tabla 1, anexo 1)

8.2 Linealidad:

Con los datos respectivos a las concentraciones detectadas por el espectrofotómetro infrarrojo para las muestras del estándar, (siendo estas de 4, 6, 8, 10 y 12 mg/ml), se graficaron las concentraciones conocidas en el eje X y las concentraciones detectadas en el eje Y, haciendo un análisis de para obtener la ecuación de la recta. (Ver gráfica No. 1 y tabla No. 2, del anexo 1).

La ecuación de la recta que se obtuvo, en este análisis de regresión lineal fue:

$$Y = 0.98986X + 0.00592$$

Donde:

Y = Concentración detectada por el método

X = Concentración de amoxicilina en la muestra

0.98986 = Pendiente de la línea recta.

0.00592 = Intercepto entre la recta y el eje Y.

La recta posee una correlación lineal de $r = 0.99999$.

8.3 Precisión:

8.3.1 Repetibilidad:

Se analizó diez veces, la concentración de 8mg/ml de amoxicilina, (siendo esta concentración la más representativa) para cada una de los laboratorios que se tomaron en cuenta para este estudio, realizando las mediciones bajo las mismas condiciones de trabajo y el mismo experimentador. Este procedimiento se realizó dos veces.

En los resultados encontrados para la primera repetibilidad con las muestras de los laboratorios A, B y C se obtuvieron los siguientes resultados: (Ver tablas No. 3, 5, y 7. Gráficas No. 2, 4 y 6, anexo 1).

DATOS ESTADISTICOS	LABORATORIO “A”	LABORATORIO “B”	LABORATORIO “C”
Desviación estándar	1.28	1.20	1.19
Media	97.80	97.09	97.55
Coefficiente de variación	1.31	1.24	1.22

En los resultados encontrados para la segunda repetibilidad de las muestras de los laboratorios A, B y C se obtuvieron los siguientes resultados: (Ver tablas No. 4, 6, y 8. Gráficas No. 3, 5 y 7, anexo 1).

DATOS ESTADISTICOS	LABORATORIO “A”	LABORATORIO “B”	LABORATORIO “C”
Desviación estándar	1.73	1.09	1.24
Media	97.03	96.67	97.27
Coefficiente de variación	1.78	1.13	1.27

8.3.2 Perfil de precisión:

Con los datos del grupo B, se calculó el coeficiente de variación para cada concentración analizada y con estos datos se construyó la gráfica de perfil de precisión. (Ver tabla No. 9, anexo 1)

8.4 Exactitud:

Se determinó el porcentaje de recuperación de los datos del grupo A, obteniéndose los siguientes resultados. (Ver tabla No. 10, 11 y 12, anexo 1).

DATOS ESTADISTICOS	LABORATORIO "A"	LABORATORIO "B"	LABORATORIO "C"
Media	97.48	96.14	97.82
T student Teórico	2.306	2.306	2.306
T student Experimental	1.3011	2.0148	1.5370

9. DISCUSION DE RESULTADOS

El método propuesto para cuantificación de amoxicilina en su presentación de cápsulas de 500mg por espectrofotometría infrarroja, demostró ser selectivo para amoxicilina ya que se obtuvo una t de student pareada de 2.45 que es menor a la t crítica de 2.57 y con un intervalo de confianza del 95%.

El método presentó linealidad, indicando que los resultados son directamente proporcionales a la concentración del analito en las muestras dentro del rango de 4 mg/mL a 12mg/mL, ya que éste fue evaluado por triplicado y con concentraciones de 12, 10, 8, 6 y 4 mg/mL de amoxicilina. Este parámetro fue evaluado por triplicado y luego se procedió a graficar una recta y con el cálculo de mínimos cuadrados se ajustó para obtener la siguiente ecuación de la recta:

$$Y = 0.98986X + (0.00592)$$

El coeficiente de correlación de esta recta es de 0.9999.

Al evaluar el parámetro de precisión se obtuvo la repetibilidad al analizar una misma concentración (8mg/mL) de amoxicilina, diez veces bajo las mismas condiciones y por la misma persona, este procedimiento se realizó dos veces para obtener datos más confiables. Los coeficientes de variación entran dentro del rango aceptable para métodos espectrofotométricos que no debe ser mayor al 3%, como se detalla en las tablas de resultados.

Además el método demostró poseer exactitud ya que tiene un porcentaje de recuperación del principio activo no menor al 95%, y una t de student de experimental menor al de las tablas, esto tomando en cuenta que se trabajó con un $P = 0.05$.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 El método propuesto para cuantificar amoxicilina por espectrofotometría infrarroja cumple con los parámetros establecidos en la USP 24 por lo que da resultados exactos, confiables y reproducibles si se trabaja con el procedimiento e intervalo de concentración descrito.
- 10.2 El método validado en el presente trabajo es exacto, ya que los resultados coinciden con el valor real.
- 10.3 El método para cuantificar amoxicilina en su presentación cápsulas es preciso.
- 10.4 El método propuesto en el presente trabajo de investigación posee linealidad, ya que brinda resultados proporcionales a la concentración de amoxicilina analizado dentro del rango dado de 4 – 12 mg/mL.
- 10.5 La repetibilidad y el perfil de precisión obtenidos para el método validado demuestran que éste posee precisión para poder dar resultados similares al evaluar una muestra homogénea en forma repetitiva.

10.6 El método validado es capaz de dar resultados exactos, ya que los resultados coinciden con el valor real.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Evaluar la robustez del método de cuantificación de amoxicilina por espectrofotometría infrarroja, mediante el análisis de una muestra homogénea bajo diversas condiciones: diferentes analistas, instrumentos, lugares geográficos etc.

- 11.2 Al utilizar el presente método, trabajar bajo las mismas condiciones propuestas para poder así garantizar la confiabilidad de los resultados.

12. REFERENCIAS

- 12.1 The Merck Index. Twelve Edition. Published by Merck., Inc. USA. 1989. Pp 609.
- 12.2 British Pharmacopeia. Vol. I. Printed in the United Kindon by the Stationery Office Limited. London. 1998. Pp 959-961.
- 12.3 Martindale. Thirty-Second edition. Printed by World Color Book Services. USA. 1999. Pp. 151-153.
- 12.4 Approved Drug Product and Legal Requirements. USP DI 19 Th. United States Pharmacopeial Convention. USA. 1999. Pp. 2008.
- 12.5 USP 24 edition. 19 NF. United States Pharmacopeial Convention Inc. E.E.U.U. 1999. Pp. 1217-1218, 1855-1856, 1768-1777.
- 12.6 John E. Hoover. Dispensing of Medication. Eighth Edition. Publishing Mack. EEUU. 1976. Pg 476
- 12.7 Evaluations of Drug Interactions. Second edition. Published by the American Pharmaceutical Association. USA. 1976. Pp 166-176, 254.
- 12.8 Charles O. Wilson. Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry. Decimo Septima edición. Publicado por Organic Chemistry in Pharmacy. USA. 1977. Pp 283-84

- 12.9 Remington's Pharmaceutical Sciences Charman. Editorial Board. Fourteenth Edition. USA. 1993. Pp 1133-34
- 12.10 Skoog/Leardy. Análisis Instrumental. Cuarta edición. McGraw-Hill. España. 1994. Pp 296-347.
- 12.11 Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapeutica. Novena edición. McGraw-Hill. Mexico. 1996. Pp 974,1099-1101, 1119, 1145, 1151, y 1155.
- 12.12 Katzung, Bertram. Farmacología Básica y Clínica. Cuarta edición. El Manual Moderno. Mexico 1991. Pp 552 y 562.
- 12.13 Manuel Litter. Compendio de Farmacologia. Tercera edición. El Ateneo. Argentina. 1984. Pp 579 y 589.
- 12.14 Nakanishi, Koji. Infrared Absorption Spectroscopy. Nancodo Company Limiteded. Japon. 1962. Pp 1-17.
- 12.15 Folleto. Spectra-Tech Product Data Sheet. USA
- 12.16 Folleto. NICOLET. OMNIC TurboQuant Quantitative Analysis Sofware. USA.
- 12.17 Folleto. PROTEGE FT-IR Spectrometer with OMNIC SOFTWARE. NICOLET.

13. ANEXOS

ANEXO No. 1

TABLAS Y GRÁFICAS DE RESULTADOS

Especificidad:

Cuadro No.1:

No	Concentración Teórica	Concentración Detectada (Y1)	Concentración Detectada (Y2)	Concentración Detectada (Y3)
1	4.2994	3.9847	4.1045	4.1251
2	6.1420	6.0598	5.9743	5.9835
3	8.5886	8.4079	8.4592	8.4254
4	10.4414	10.2538	10.3367	10.3728
5	12.2840	12.0488	12.1092	12.2056

Desviación estándar: 0.1628

Promedio: 0.0.2571

t de student pareada: 2.45

CUADRO No. 2
LINEALIDAD
PARA EL METODO DE AMOXICILINA TRIIHDRATO

No. Muestra	mL de solución madre	Concentración en mg/mL de Amoxicilina	Concentración detectada	% respecto a 100 mg/mL de amoxicilina
1	0	0.0000	0.0000	0.0000
2	3.5	4.3414	4.2887	53.6087
3	5	6.2020	6.2421	78.0263
4	7	8.6828	8.5886	107.3575
5	8.6	10.6674	10.5674	132.0925
6	10	12.3802	12.4040	155.0500

R	0.99999
r2	0.99998
Intercepto (b)	0.00592
Pendiente (m)	0.98986

$$Y = mX + b$$

En donde:

Y = Absorbancia

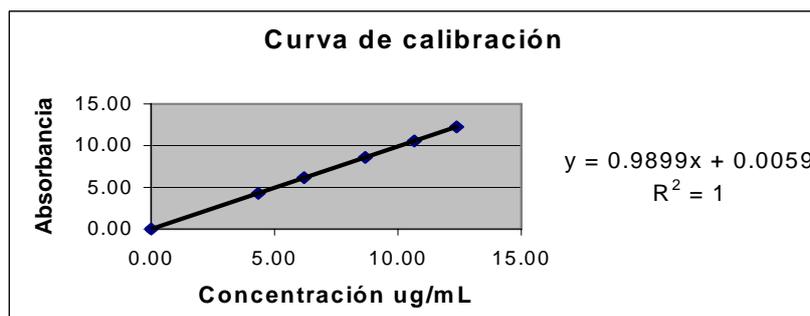
X = Concentración en $\mu\text{g/mL}$

m = Pendiente

b = Intercepto

$$A = 0.98986C + 0.00592$$

Gráfico No. 1
LINEALIDAD
METODO DE ANALISIS DE AMOXICILINA TRIHIDRATO

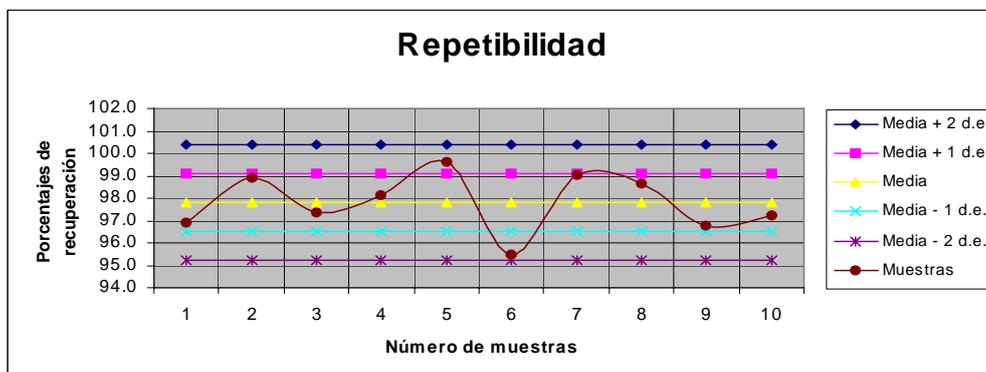


CUADRO No. 3
REPETIBILIDAD 1, LABORATORIO “A”
METODO DE ANALISIS DE AMOXICILINA TRIHIDRATO

Muestra No.	Concentración detectada	Concentración obtenida	Concentración teórica	% de recuperación
1	8.2446	8.3301	8.5988	96.88
2	8.4156	8.5031	8.5988	98.89
3	8.2846	8.3706	8.5988	97.35
4	8.3527	8.4394	8.5988	98.15
5	8.4758	8.5639	8.5988	99.59
6	8.1254	8.2096	8.5988	95.47
7	8.4289	8.5165	8.5988	99.04
8	8.3978	8.4851	8.5988	98.68
9	8.2345	8.3199	8.5988	96.76
10	8.2749	8.3608	8.5988	97.23

N	10
Media	97.80
D.estándar (d.e.)	1.28
Límite confianza 95%	0.27
Media real	98.97
CV	1.31
D.estándar (d.e.) x 2	2.56

Gráfico No. 2
REPETIBILIDAD 1, LABORATORIO “A”
METODO DE ANALISIS DE AMOXICILINA TRIHIDRATO

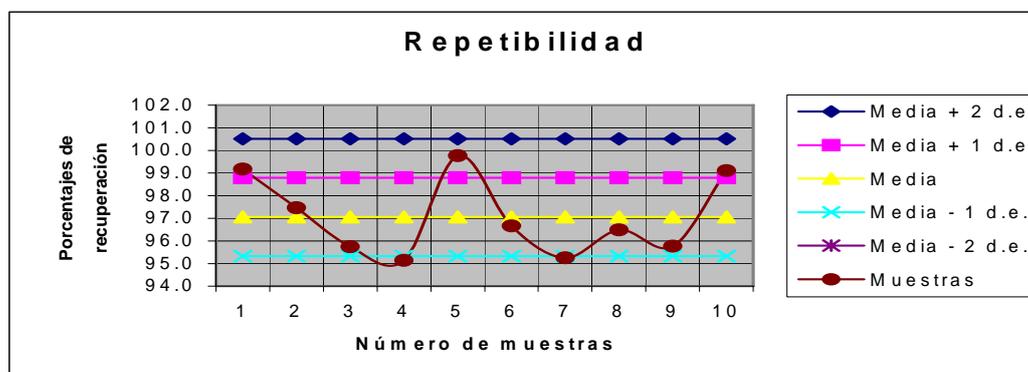


CUADRO No. 4
 REPETIBILIDAD 2, LABORATORIO "A"
 METODO DE ANALISIS DE AMOXICILINA TRIHIDRATO

Muestra	Concentración detectada	Concentración obtenida	Concentración teórica	% de recuperación
1	8.5527	8.6417	8.7136	99.17
2	8.4055	8.4928	8.7136	97.47
3	8.2569	8.3426	8.7136	95.64
4	8.2054	8.2905	8.7136	95.14
5	8.6034	8.6930	8.7136	99.76
6	8.3367	8.4033	8.7136	96.67
7	8.2154	8.3006	8.7136	95.26
8	8.3215	8.4079	8.7136	96.49
9	8.2587	8.3444	8.7136	95.76
10	8.5462	8.6351	8.7136	99.10

N	10
Media	97.03
D.estándar (d.e.)	1.73
Límite confianza 95%	0.37
Media real	97.03
CV	1.78
D.estándar (d.e.) x 2	3.46

Gráfico No. 3
 REPETIBILIDAD 2, LABORATORIO "A"
 METODO DE ANALISIS DE AMOXICILINA TRIHIDRATO



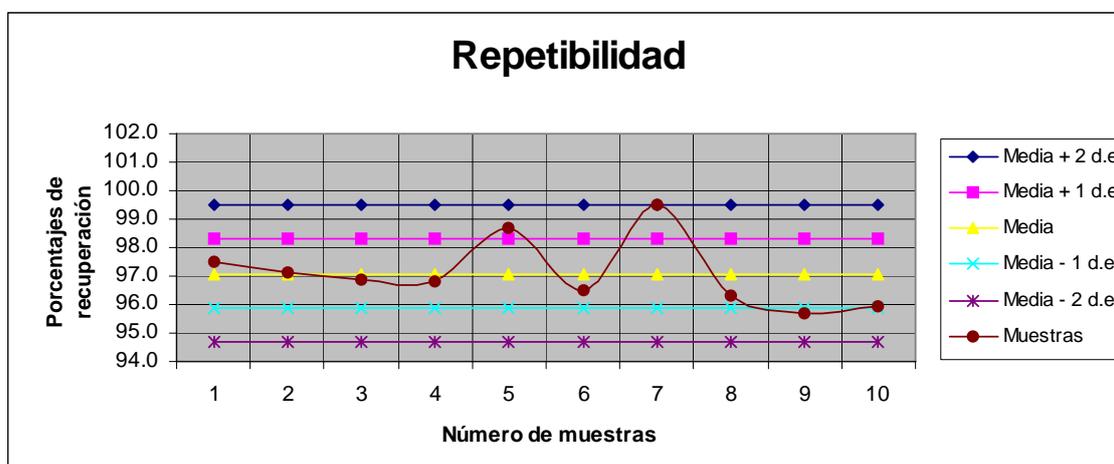
CUADRO No. 5
REPETIBILIDAD 1, LABORATORIO “B”
METODO DE ANALISIS DE AMOXICILINA TRIHIDRATO

Muestra	Concentración detectada	Concentración obtenida	Concentración teórica	% de recuperación
1	8.1547	8.2392	8.4528	97.47
2	8.1264	8.2106	8.4528	97.13
3	8.1023	8.1862	8.4528	96.85
4	8.0997	8.1836	8.4528	96.82
5	8.2548	8.3404	8.4528	98.67
6	8.0741	8.1577	8.4528	96.50
7	8.3256	8.4120	8.4528	99.52
8	8.0587	8.1422	8.4528	96.32
9	8.0042	8.0870	8.4528	95.67
10	8.0257	8.1088	8.4528	95.93

N	10
Media	97.09
D.estándar (d.e.)	1.20
Límite confianza 95%	0.26
Media real	97.09
CV	1.24
D.estándar (d.e.) x 2	2.40

Gráfico No. 4

REPETIBILIDAD 1, LABORATORIO “B”
METODO DE ANALISIS DE AMOXICILINA TRIHIDRATO

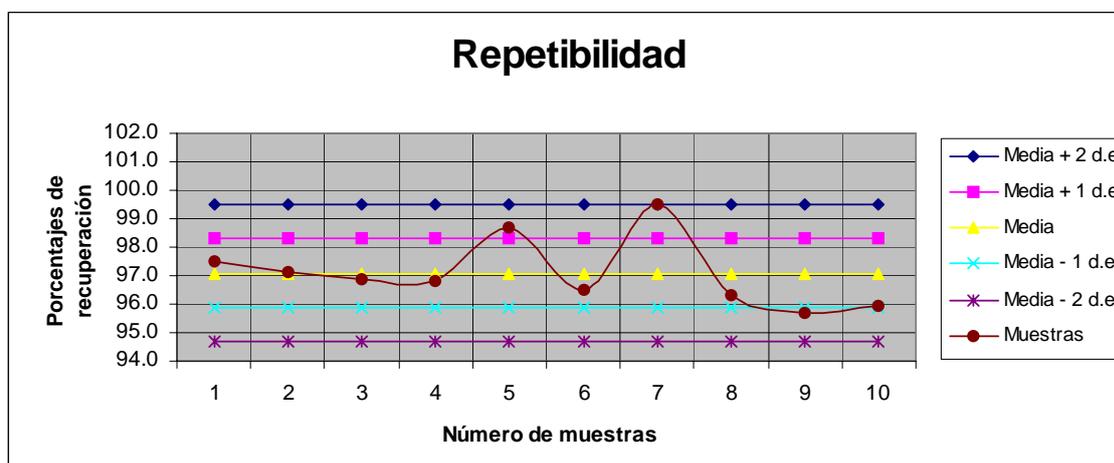


CUADRO No. 6
REPETIBILIDAD 2, LABORATORIO “B”
METODO DE ANALISIS DE AMOXICILINA TRIHIDRATO

Muestra	Concentración detectada	Concentración obtenida	Concentración teórica	% de recuperación
1	8.5428	8.6317	8.8524	96.77
2	8.6213	8.7111	8.8524	96.89
3	8.3367	8.4233	8.8524	98.35
4	8.3897	8.4769	8.8524	98.53
5	8.5794	8.6687	8.8524	95.89
6	8.4527	8.5406	8.8524	99.25
7	8.3415	8.4281	8.8524	96.40
8	8.4695	8.5576	8.8524	96.66
9	8.4923	8.5806	8.8524	97.70
10	8.4715	8.5596	8.8524	99.09

N	10
Media	97.55
D.estándar (d.e.)	1.19
Límite confianza 95%	0.25
Media real	97.55
CV	1.22
D.estándar (d.e.) x 2	2.39

GRAFICA No. 5
REPETIBILIDAD 2, LABORATORIO “B”
METODO DE ANALISIS DE AMOXICILINA TRIHIDRATO

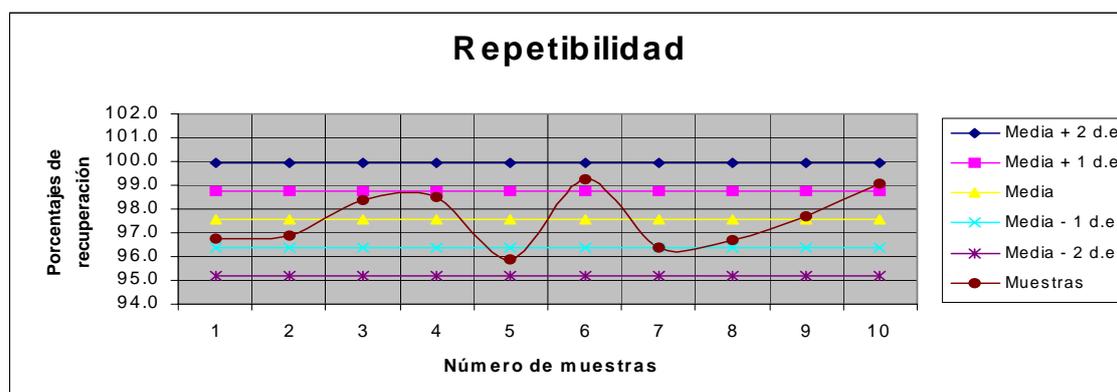


CUADRO No. 7
REPETIBILIDAD 1, LABORATORIO “C”
MÉTODO DE ANALISIS AMOXICILINA TRIHIDRATO

Muestra	Concentración detectada	Concentración obtenida	Concentración teórica	% de recuperación
1	8.1265	8.2107	8.4851	96.77
2	8.1367	8.2210	8.4851	96.89
3	8.2597	8.3454	8.4851	98.35
4	8.2742	8.3601	8.4851	98.53
5	8.0528	8.1362	8.4851	95.89
6	8.3349	8.4214	8.4851	99.25
7	8.0957	8.1796	8.4851	96.40
8	8.1174	8.2015	8.4851	96.66
9	8.2045	8.2896	8.4851	97.70
10	8.3218	8.4082	8.4851	99.09

N	10
Media	97.55
D.estándar (d.e.)	1.19
Límite confianza 95%	0.25
Media real	97.55
CV	1.22
D.estándar (d.e.) x 2	2.39

Gráfico No. 6
REPETIBILIDAD 1, LABORATORIO “C”
METODO DE ANALISIS DE AMOXICILINA TRIHIDRATO

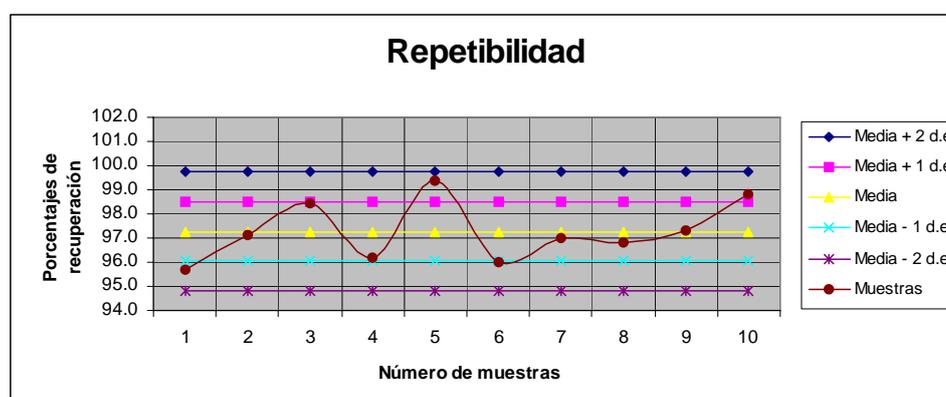


CUADRO No. 8
REPETIBILIDAD 2, LABORATORIO “C”
MÉTODO DE ANALISIS AMOXICILINA TRIHIDRATO

Muestra	Concentración detectada	Concentración obtenida	Concentración teórica	% de recuperación
1	8.4518	8.5397	8.9217	95.72
2	8.5745	8.6637	8.9217	97.11
3	8.6924	8.7830	8.9217	98.44
4	8.4934	8.5817	8.9217	96.19
5	8.7759	8.6874	8.9217	99.39
6	8.4752	8.5633	8.9217	95.98
7	8.5627	8.6518	8.9217	96.97
8	8.5461	8.6350	8.9217	96.79
9	8.5928	8.6822	8.9217	97.32
10	8.7247	8.8156	8.9217	98.81

N	10
Media	97.27
D.estándar (d.e.)	1.24
Límite confianza 95%	0.25
Media real	97.27
CV	1.27
D.estándar (d.e.) x 2	2.48

Gráfico No. 7
REPETIBILIDAD 2, LABORATORIO “C”
METODO DE ANALISIS DE AMOXICILINA TRIHIDRATO



✓ **Perfil de precisión:****CUADRO No. 9****MÉTODO DE ANALISIS AMOXICILINA TRIHIDRATO**

No.	Concentración Teórica	Concentracion Detectada	Desviacion	Coef var.	%r
1	4.5961	4.3879	0.2082	4.745	95.47
2	6.8709	6.6752	0.1957	2.932	97.15
3	8.5886	8.2552	0.3334	4.039	96.12
4	10.3063	10.0598	0.2465	2.450	97.61
5	13.2549	12.8957	0.3592	2.785	97.29
6	4.2752	4.1173	0.1579	3.835	96.31
7	6.9935	6.6457	0.3478	10.447	95.03
8	8.7419	8.4360	0.3059	3.626	96.50
9	10.4902	10.1153	0.3749	3.706	96.43
10	12.7547	12.5871	0.1676	1.332	98.69
11	4.2478	4.0369	0.2109	5.224	95.04
12	6.5222	6.3927	0.1295	2.026	98.01
13	8.1527	7.9547	0.1980	5.947	97.57
14	9.7832	9.4058	0.3774	4.012	96.14
15	11.9218	11.7368	0.1850	1.576	98.45

✓ **Exactitud**

CUADRO No. 10
EXACTITUD PARA EL MÉTODO DE AMOXICILINA TRIHIDRATO
DEL LABORATORIO “A”

% con respecto a la concentración de la solución a trabajar	Concentración original en % de Amoxicilina trihidrato	Concentración obtenida en % de Amoxicilina trihidrato	Concentración detectada	% recuperación
80.00	6.8709	6.8144	6.7457	99.18
80.00	6.8709	6.8533	6.7841	99.74
80.00	6.8709	6.7432	6.6752	98.14
100.00	8.5886	8.3237	8.4354	99.24
100.00	8.5886	8.4930	8.4057	98.89
100.00	8.5886	8.5595	8.4714	99.66
120.00	10.3063	10.2648	10.1578	99.60
120.00	10.3063	10.2115	10.1051	99.08
120.00	10.3063	10.1966	10.0904	98.94

N	9
Media	99.16
D.estándar (d.e.)	0.49
Límite confianza 95%	0.11
Media real	99.16
C.V.	1.9368
D.estándar (d.e.) * 2	0.99
T student	1.3011

CUADRO No. 11
EXACTITUD PARA EL MÉTODO DE AMOXICILINA TRIHIDRATO
DEL LABORATORIO “B”

% con respecto a la concentración de la solución a trabajar	Concentración original en % de Amoxicilina trihidrato	Concentración obtenida en % de Amoxicilina trihidrato	Concentración detectada	% recuperación
80.00	6.9935	6.9156	6.8457	99.00
80.00	6.9935	6.9544	6.8841	98.70
80.00	6.9935	6.9220	6.8521	98.85
100.00	8.7419	8.7253	8.6354	98.90
100.00	8.7419	8.6953	8.6057	98.74
100.00	8.7419	8.6606	8.5714	98.63
120.00	10.4902	10.4670	10.3578	99.22
120.00	10.4902	10.4137	10.3051	99.35
120.00	10.4902	10.3989	10.2904	99.45

N	9
Media	99.31
D.estándar (d.e.)	0.33
Límite confianza 95%	0.08
Media real	99.31
C.V.	2.0148
D.estándar (d.e.) * 2	0.67
T student	1.0273

CUADRO No. 12
EXACTITUD PARA EL MÉTODO DE AMOXICILINA TRIHIDRATO
DEL LABORATORIO “C”

% con respecto a la concentración de la solución a trabajar	Concentración original en % de Amoxicilina trihidrato	Concentración obtenida en % de Amoxicilina trihidrato	Concentración detectada	% recuperación
80.00	6.5222	6.4599	6.3951	99.04
80.00	6.5222	6.4474	6.3827	98.85
80.00	6.5222	6.4701	6.4052	99.20
100.00	8.1527	8.1290	8.0457	98.71
100.00	8.1527	8.0852	8.0027	99.17
100.00	8.1527	8.0540	7.9715	98.79
120.00	9.7832	9.7335	9.6324	99.49
120.00	9.7832	9.6994	9.5987	99.14
120.00	9.7832	9.6409	9.5408	98.55

N	9
Media	99.11
D.estándar (d.e.)	0.36
Límite confianza 95%	0.08
Media real	99.11
C.V.	1.7372
D.estándar (d.e.) * 2	0.71
T student	1.5370

ANEXO No. 2

A) PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA AMOXICILINA:

1. Nombre químico:

Acido 6-[alfa-D-(4-Hidroxifenil) glycyclamino] penicilánico.

2. Formula Molecular: C₁₆H₁₉N₃O₅S

3. Peso Molecular: 365.4

4. Pka: 2.8

5. Descripción: Polvos blancos cristalinos, con propiedades higroscópicas, con un olor leve amoniacal. Muy soluble en agua, y ligeramente soluble en alcohol deshidratado y considerablemente soluble en acetona.

6. Requerimientos USP: Preservar en recipientes cerrados, conteniendo no menos de 90.0% y no más de 110.0% y que se mantengan a una temperatura entre 15 y 30 grados centígrados. (1)

B) DESCRIPCION DEL METODO INFRARROJO, VENTAJAS Y DESVENTAJAS, USOS DEL INFRARROJO EN ANALISIS:

La región infrarroja del espectro incluye la radiación con números de onda comprendidos entre los 12800 y los 10 cm⁻¹, lo que corresponde a longitudes de onda de 0.78 a 1000um₁. Tanto desde el punto de vista de

las aplicaciones como el de los instrumentos, es conveniente subdividir el espectro infrarrojo en tres regiones denominadas infrarrojo cercano, medio y lejano. Hasta la fecha, la gran mayoría de las aplicaciones analíticas se han restringido al uso de una parte de la región del infrarrojo medio comprendida entre los 4000 y los 400 cm^{-1} (de 2.5 a 25 μm). Sin embargo en la literatura analítica actual se van encontrando un número creciente de aplicaciones de la espectroscopia infrarroja cercana y lejana.

La espectroscopia infrarroja tiene una gran aplicación en el análisis cualitativo y cuantitativo. En el análisis cuantitativo, su elevada selectividad a menudo hace posible la cuantificación de una sustancia en una mezcla compleja, no siendo necesaria una separación previa. El principal campo de aplicación de este tipo de análisis se halla en la cuantificación de contaminantes atmosféricos que provienen de procesos industriales.

Otra utilización importante de la espectroscopia de absorción en el infrarrojo es como sistema de detección en cromatografía de gases, donde su potencial para la identificación de compuestos se combina con la notable capacidad de separación de los componentes de mezclas complejas que presentan la cromatografía de gases. También cabe destacar que en las aplicaciones cuantitativas los métodos cuantitativos de absorción en el infrarrojo difieren algo de los métodos espectroscópicos moleculares de ultravioleta/visible debido a la mayor complejidad de los espectros, a la estrechez de las bandas de absorción y a las limitaciones instrumentales de los instrumentos de infrarrojo. Los datos cuantitativos que se obtienen con los instrumentos de infrarrojo

son más exactos que los proporcionados por los espectrofotómetros de ultravioleta/visible.

Con excepción de las moléculas homonucleares, todas las especies moleculares orgánicas e inorgánicas absorben en la región infrarroja; de esta forma, la espectrofotometría infrarroja ofrece posibilidad de determinar un número extraordinariamente grande de sustancias.

Entre las ventajas de este método tenemos la singularidad del espectro infrarrojo que conduce a un grado de especificidad igualado o superado por relativamente pocos métodos analíticos. Esta especificidad ha encontrado una particular aplicación en el análisis de mezclas de compuestos orgánicos estrechamente relacionados así como de compuestos orgánicos simples.

Entre las desventajas tenemos que la aplicación de los métodos de infrarrojo al análisis cuantitativo tiene varios inconvenientes, entre ellos figura el frecuente incumplimiento de la ley de Beer y la complejidad de los espectros; esto último aumenta la probabilidad de superposición parcial de los picos y los efectos de la radiación parásita hacen que la mediciones de absorbancia dependan de una forma crítica de la anchura de la rendija y del ajuste de la longitud de onda. Además cabe destacar que el costo de este aparato es elevado lo que dificulta su obtención para realizar los análisis. (10)

C) CARACTERISTICAS DEL ESPECTROFOTOMETRO QUE SE EMPLEARA:

El espectrofotómetro que se empleará en el estudio es PROTEGE FT-IR con OMNIC TurboQuant, fabricado por Nicolet; con sistema de memoria de análisis cuantitativo, el cual puede realizar análisis de tipo cualitativo y de tipo cuantitativo, sus celdas son de menor grosor de 12 micrómetros comparado con las celdas típicas de 15 micrómetros de grosor lo cual aumenta el grado de transmisión, mejorando así la exactitud con que se obtienen los datos del análisis, siendo las celdas de seleniuro de zinc y de germanio. Este espectrofotómetro puede analizar muestras líquidas, semilíquidas, y polvos en un espectro que abarca de 700 a los 4000 nanómetros. Es fabricado por Nicolet, empresa que ha sido pionera en desarrollar análisis por el espectro infrarrojo por más de 20 años.

La interpretación del análisis se realiza por medio de un sistema computarizado el cual da el espectro del compuesto a estudiar, pudiéndose realizar análisis cuantitativos así como cualitativos. Este sistema tiene incorporado un análisis de correlación lineal el cual nos indicara cual región del espectro nos da el pico más representativo para analizar el compuesto. Hay que tener precaución sobre el tipo de solvente se va a utilizar ya que por ejemplo la acetona deteriora la celda de selenio. Cabe mencionar que el sistema computarizado es el que realiza la cuantificación lo cual favorece al analista ya que le provee de resultados rápidos y confiables. El espectrofotómetro de Nicolet un factor muy costoso que puede limitar su implementación en laboratorios. (15), (16) y (17).

D) DESCRIPCIÓN DE LA VALIDACION DE UN METODO SEGÚN USP 24

Las pruebas establecidas para comprobar la calidad de un producto farmacéutico están sujetas a varios requerimientos. De acuerdo a la sección 501 de la Federal Food, Drug and Cosmetic Act, los ensayos y especificaciones en las monografías de la Farmacopea de los Estados Unidos y The National Formulary constituyen los estándares legales. Las actuales regulaciones de Buenas Prácticas de Manufactura requieren que los productos farmacéuticos así como sus especificaciones establecidas deben cumplir con los datos de referencia de un estándar. Para obtener estos datos confiables se deben basar en suficientes datos de estudios de laboratorio para documentar su validez. Las características típicas utilizadas para validar un método son: (5)

- Exactitud
- Presición
- Especificidad
- Limite de detección
- Límite de cuantificación
- Linealidad
- Rango

Rafael Estuardo Cerna Vasquez

Autor

Licda. Lorena Cerna Vásquez

Asesora

Lic. Oscar Monzón

Coasesor

Lic. Estuardo Serrano

Revisor

M.A. Lilian Irving Antillón

Directora

M.S.c. Gerardo Leonel Arroyo Catalán

Decano