



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE VALORACIÓN DE
AMOXICILINA EN POLVO PARA SUSPENSIÓN ORAL PRODUCIDO POR
BETAPHARMA S.A. MEDIANTE HPLC”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR

JORGE GONZALO VELASTEGUÍ BARRENO

RIOBAMBA – ECUADOR

2011

DEDICATORIA

A mi madre por su abnegación y lucha diaria.

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme éste excelente día.

A mi Madre por su sacrificio y por la confianza que depositó en mí.

A mis hermanos que son el incentivo para seguir adelante.

A ti Adriana por ser mi apoyo y felicidad.

Al BQF. Fausto Contero, BQF. Diego Vinuesa, Dr. Carlos Pilamunga y de forma especial al Dr. Germánico Silva por su valioso aporte en la elaboración de este trabajo

A la empresa BETAPHARMA S.A. que abrió la puerta para mi formación profesional.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: **“VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE VALORACIÓN DE AMOXICILINA EN POLVO PARA SUSPENSIÓN ORAL PRODUCIDO POR BETAPHARMA S.A.”**, de responsabilidad del señor egresado JORGE GONZALO VELASTEGUÍ BARRENO, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Yolanda Díaz

DECANA FACULTAD DE CIENCIAS

Dr. Luis Guevara

DIRECTOR DE LA ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

BQF. Fausto Contero

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Carlos Pilamunga

MIEMBRO DE TRIBUNAL

Tlgo. Carlos Rodríguez

DIRECTOR DEL CENTRO DE DOCUMENTACIÓN

NOTA DE TESIS ESCRITA _____

Yo, Jorge Gonzalo Velasteguí Barreno, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO y a la EMPRESA FARMACÉUTICA BETAPHARMA S.A.

JORGE GONZALO VELASTEGUÍ BARRENO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| AOAC | Asociación de Química Analítica |
| ASTM | Sociedad americana de pruebas y materiales |
| Am | Área de la solución problema para el pico de amoxicilina |
| Ast | Área de solución estándar para el pico de amoxicilina |
| CLAR | Cromatografía líquida de alta resolución |
| Cst | Concentración de la solución estándar |
| Cm | Concentración de la solución muestra en mg/ml |
| d | Densidad e la solución |
| FDA | Administración de drogas y alimentos |
| G | Gramos |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta resolución |
| ICH | Conferencia Internacional de Armonización |
| IT | Instructivo de trabajo |
| MDD | Dosis Máxima Diaria |
| ML/MIN | Mililitros Por Minuto |
| p.a. | Principio activo |
| ppm | Partes por Millón |
| R | Responsable |
| RC | Responsabilidad Compartida |
| RSD | Desviación estándar relativa |
| SD | Desviación relativa |
| SI | Suministra Información |
| uL | Microlitros |

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FOTOGRAFIAS

ÍNDICE DE ANEXOS

INTRODUCCIÓN

| | | |
|---------|--|-----------|
| | PARTE TEÓRICA | 22 |
| 1 | Validación..... | 22 |
| 1.1.1 | Definiciones..... | 23 |
| 1.1.2 | La validación como requisito de la norma COVENIN 2534:2000.... | 23 |
| 1.1.3 | Tipos de validación..... | 25 |
| 1.1.3.1 | Validación prospectiva..... | 25 |
| 1.1.3.2 | Validación de la competencia..... | 25 |
| 1.1.3.3 | Validación retrospectiva | 26 |
| 1.2 | Validación del método analítico..... | 26 |
| 1.2.1 | Responsabilidades en el proceso de validación..... | 27 |
| 1.2.2 | Características de un estudio de validación de métodos..... | 27 |
| 1.2.3 | Alcance de los estudios de validación..... | 29 |
| 1.2.3.1 | El laboratorio debe utilizar un método “totalmente” validado..... | 29 |
| 1.2.3.2 | El laboratorio debe utilizar un método totalmente validado, pero con una nueva matriz..... | 30 |
| 1.2.3.3 | El método ha sido publicado en la literatura científica junto con algunas características analíticas..... | 30 |
| 1.2.3.4 | El método ha sido publicado en la literatura científica sin especificación de sus características o ha sido desarrollado internamente..... | 30 |
| 1.2.3.5 | El método es Empírico..... | 30 |

| | | |
|-------------|---|----|
| 1.2.3.6 | Cambios en el personal o el equipo..... | 31 |
| 1.2.4 | Categoría del método..... | 31 |
| 1.2.4.1 | Categoría I..... | 31 |
| 1.2.4.2 | Categoría II..... | 31 |
| 1.2.4.3 | Categoría III..... | 32 |
| 1.2.4.4 | Categoría IV..... | 32 |
| 1.2.5 | Proceso de validación del método analítico..... | 33 |
| 1.2.5.1 | Especificidad..... | 33 |
| 1.2.5.2 | Precisión..... | 34 |
| 1.2.5.3 | Repetibilidad..... | 35 |
| 1.2.5.4 | Reproducibilidad..... | 35 |
| 1.2.5.5 | Linealidad..... | 36 |
| 1.2.5.6 | Recuperación..... | 36 |
| 1.2.5.7 | Robustez..... | 37 |
| 1.2.6 | HPLC..... | 39 |
| 1.2.6.1 | Fases y Columnas..... | 41 |
| 1.2.6.1.1 | Fase móvil..... | 41 |
| 1.2.6.1.2 | Columnas..... | 41 |
| 1.2.6.1.2.1 | Fuentes de daño de una columna de HPLC..... | 41 |
| 1.2.6.2 | Detección..... | 41 |
| 1.2.6.2.1 | Tipos de detectores en HPLC..... | 42 |
| 1.2.6.2.2 | Detectores más utilizados en HPLC..... | 42 |
| 1.2.7 | Principio activo Amoxicilina..... | 43 |
| 1.2.7.1 | Mecanismo de acción..... | 44 |
| 1.2.7.2 | Farmacocinética..... | 44 |
| 1.2.7.3 | Indicaciones y Posología..... | 45 |
| 1.2.7.4 | Contraindicaciones..... | 46 |
| 1.2.7.5 | Interacciones..... | 47 |
| 1.2.7.6 | Reacciones Adversas | 50 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2 | Parte experimental..... | 52 |
| 2.1 | Diseño experimental..... | 52 |
| 2.1.1 | Características del diseño experimental..... | 52 |
| 2.1.2 | Factores del estudio..... | 53 |
| 2.1.3 | Manejo específico del experimento..... | 53 |
| 2.1.3.1 | Lugar y pruebas de ensayo..... | 53 |
| 2.2 | Protocolo..... | 54 |
| 2.2.1 | Objetivo..... | 54 |
| 2.2.2 | Alcance..... | 54 |
| 2.2.3 | Motivo de la validación..... | 55 |
| 2.2.4 | Responsabilidades..... | 55 |
| 2.2.5 | Parámetros de validación..... | 56 |
| 2.2.6 | Procedimiento de análisis..... | 56 |
| 2.2.7 | Proceso De Validación..... | 58 |
| 2.2.8 | Métodos de análisis | 59 |
| 2.2.8.1 | Análisis Químico..... | 59 |
| 2.2.9 | Criterios de aceptación..... | 59 |
| 2.2.9.1 | Especificidad..... | 59 |
| 2.2.9.2 | Precisión del sistema..... | 59 |
| 2.2.9.3 | Precisión del método..... | 59 |
| 2.2.9.4 | Precisión entre Analistas..... | 60 |
| 2.2.9.5 | Precisión entre días de análisis..... | 60 |
| 2.2.9.6 | Linealidad..... | 60 |
| 2.2.9.7 | Recuperación..... | 60 |
| 2.2.9.8 | Robustez..... | 60 |
| 2.2.10 | Acciones para valores fuera de límites..... | 61 |
| 2.2.11 | Resultados..... | 61 |
| 2.3 | Técnicas a seguir para validación del Método Analítico..... | 62 |
| 2.3.1 | Especificidad..... | 62 |

| | | |
|-------|--------------------------------|----|
| 1 | Objetivo | 62 |
| 2 | Alcance..... | 62 |
| 3 | Responsabilidades | 62 |
| 4 | Procedimiento..... | 63 |
| 5 | Especificaciones..... | 65 |
| 6 | Registros..... | 65 |
| 7 | Referencias..... | 65 |
| 2.3.2 | Precisión del sistema..... | 66 |
| 1 | Objetivo..... | 66 |
| 2 | Alcance..... | 66 |
| 3 | Responsabilidades..... | 66 |
| 4 | Requerimientos..... | 66 |
| 5 | Procedimiento..... | 67 |
| 6 | Especificaciones..... | 68 |
| 7 | Registros..... | 68 |
| 8 | Referencias..... | 68 |
| 2.3.3 | Precisión del método..... | 69 |
| 1 | Objetivo..... | 69 |
| 2 | Alcance..... | 69 |
| 3 | Responsabilidades..... | 69 |
| 4 | Requerimientos..... | 69 |
| 5 | Procedimiento..... | 70 |
| 6 | Especificaciones..... | 71 |
| 7 | Registros..... | 71 |
| 8 | Referencias..... | 71 |
| 2.3.4 | Precisión entre analistas..... | 72 |
| 1 | Objetivo..... | 72 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2 | Alcance..... | 72 |
| 3 | Responsabilidades..... | 72 |
| 4 | Requerimientos..... | 72 |
| 5 | Procedimiento..... | 73 |
| 6 | Especificaciones..... | 74 |
| 7 | Registros..... | 74 |
| 8 | Referencias..... | 75 |
| 2.3.5 | Precisión entre días..... | 76 |
| 1 | Objetivo..... | 76 |
| 2 | Alcance..... | 76 |
| 3 | Responsabilidades..... | 76 |
| 4 | Requerimientos..... | 76 |
| 5 | Procedimiento..... | 77 |
| 6 | Especificaciones..... | 78 |
| 7 | Registros..... | 79 |
| 8 | Referencias..... | 79 |
| 2.3.6 | Exactitud / Porcentaje de recuperación..... | 80 |
| 1 | Objetivo..... | 80 |
| 2 | Alcance..... | 80 |
| 3 | Responsabilidades..... | 80 |
| 4 | Requerimientos..... | 80 |
| 5 | Procedimiento..... | 81 |
| 6 | Especificaciones..... | 82 |
| 7 | Registros..... | 82 |
| 8 | Referencias..... | 83 |
| 2.3.7 | Linealidad..... | 84 |
| 1 | Objetivo..... | 84 |

| | | |
|-------|-----------------------------|-----|
| 2 | Alcance..... | 84 |
| 3 | Responsabilidades..... | 84 |
| 4 | Requerimientos..... | 84 |
| 5 | Procedimiento..... | 85 |
| 6 | Especificaciones..... | 86 |
| 7 | Registros..... | 86 |
| 8 | Referencias..... | 86 |
| 2.3.8 | Robustez..... | 87 |
| 1 | Objetivo..... | 87 |
| 2 | Alcance..... | 87 |
| 3 | Responsabilidades..... | 87 |
| 4 | Requerimientos..... | 87 |
| 5 | Procedimiento..... | 88 |
| 6 | Especificaciones..... | 89 |
| 7 | Registros..... | 89 |
| 8 | Referencias..... | 89 |
| 3 | Resultados y Discusión..... | 90 |
| 4 | Conclusiones..... | 102 |
| 5 | Recomendaciones..... | 104 |
| 6 | Resumen..... | 106 |
| 7 | Bibliografía..... | 107 |
| 8 | Anexos..... | 112 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | | |
|---------------|--|-----|
| Cuadro no. 1. | Análisis de la especificidad del método frente a los parámetros evaluados..... | 90 |
| Cuadro no. 2. | Análisis de la precisión del sistema, muestra de estándar utilizado en el análisis de amoxicilina en polvo para suspensión. Realizado en el laboratorio de control de calidad, empresa farmacéutica Betapharma, quito, 2010..... | 91 |
| Cuadro no. 3. | Análisis de la precisión del método utilizado para la valoración de amoxicilina en polvo para suspensión oral, realizada en el laboratorio de control de calidad, empresa farmacéutica Betapharma, quito, 2010..... | 92 |
| Cuadro no. 4. | Análisis de la precisión entre analistas en la valoración de amoxicilina para suspensión oral, realizado en el laboratorio de control de calidad, empresa farmacéutica Betapharma, quito, 2010..... | 94 |
| Cuadro no. 5. | Análisis de la precisión entre analistas en la valoración de amoxicilina para suspensión oral, realizado en el laboratorio de control de calidad, empresa farmacéutica Betapharma, quito, 2010..... | 96 |
| Cuadro no. 6. | Análisis de la linealidad que presenta el método en cuanto al porcentaje de estándar añadido y la respuesta que éste presenta en la valoración de amoxicilina para suspensión oral, realizado en el laboratorio de control de calidad, empresa farmacéutica Betapharma, quito, 2010..... | 97 |
| Cuadro no. 7. | Análisis de la recuperación del método utilizado en la valoración de amoxicilina para suspensión oral, realizado en el laboratorio de control de calidad, empresa farmacéutica Betapharma, quito, 2010..... | 99 |
| Cuadro no. 8. | Análisis de la robustez que presenta el método utilizado en la valoración de amoxicilina para suspensión oral frente a un cambio deliberado en alguno de sus parámetros, en éste caso hemos aumentado el flujo en un 10%. Realizado en el laboratorio de control de calidad, empresa farmacéutica Betapharma, quito, 2010..... | 100 |

INDICE DE TABLAS

| | | |
|--------------|--|----|
| TABLA No. 1. | Elementos para la validación de métodos analíticos en función del análisis de categoría..... | 32 |
| TABLA No. 2. | Responsabilidades del proceso de validación del método analítico.. | 55 |
| TABLA N° 3 | Formula maestra de amoxicilina en polvo para suspensión oral..... | 63 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | | |
|---------------|---|----|
| GRÁFICO No. 1 | Estructura molecular de Amoxicilina..... | 43 |
| GRÁFICO No. 2 | Linealidad del método entre el porcentaje de estándar adicionado y la respuesta producida | 97 |

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

| | | |
|-----------------|---|-----|
| FOTOGRAFÍA N° 1 | Amoxicilina en polvo para suspensión oral fabricado por Betapharma S.A. | 131 |
| FOTOGRAFÍA N° 2 | Equipo de HPLC..... | 131 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | | |
|---------------|---|-----|
| ANEXO NO. 1. | Cromatograma del estándar de amoxicilina..... | 112 |
| ANEXO NO. 2. | Cromatograma de análisis de sensibilidad frente a degradación a temperatura ambiente..... | 113 |
| ANEXO NO. 3. | Cromatograma de análisis de sensibilidad frente a degradación con calor..... | 114 |
| ANEXO NO. 4. | Cromatograma de análisis de sensibilidad frente a degradación por hidrólisis básica. | 115 |
| ANEXO NO. 5. | Cromatograma de análisis de sensibilidad frente al diluyente y fase móvil utilizada..... | 116 |
| ANEXO NO. 6. | Cromatograma de análisis de amoxicilina en polvo para suspensión oral, preparado por analista 1 en el día de análisis 1..... | 117 |
| ANEXO NO. 7. | Cromatograma de análisis de amoxicilina en polvo para suspensión oral, preparado por analista 2 en el día de análisis 1. | 118 |
| ANEXO NO. 8. | Cromatograma de análisis de amoxicilina en polvo para suspensión oral, preparado por analista 1 en el segundo día de análisis. | 119 |
| ANEXO NO. 9. | Cromatograma de análisis de recuperación frente al porcentaje de principio activo adicionado en cada frasco de amoxicilina en polvo para suspensión oral al 50% de principio activo..... | 120 |
| ANEXO NO. 10. | Cromatograma de análisis de recuperación frente al porcentaje de principio activo adicionado en cada frasco de amoxicilina en polvo para suspensión oral al 75% de principio activo..... | 121 |
| ANEXO NO. 11. | Cromatograma de análisis de recuperación frente al porcentaje de principio activo adicionado en cada frasco de amoxicilina en polvo para suspensión oral al 100% de principio activo..... | 122 |
| ANEXO NO. 12. | Cromatograma de análisis de recuperación frente al porcentaje de principio activo adicionado en cada frasco de amoxicilina en polvo para suspensión oral al 125% de principio activo..... | 123 |
| ANEXO NO. 13. | Cromatograma de análisis de recuperación frente al porcentaje de principio activo adicionado en cada frasco de amoxicilina en polvo para suspensión oral al 150% de principio activo..... | 124 |

| | | |
|---------------|--|-----|
| ANEXO NO. 14. | Cromatograma de linealidad a concentración de estándar al 50%..... | 125 |
| ANEXO NO. 15. | Cromatograma de linealidad a concentración de estándar al 75%..... | 126 |
| ANEXO NO. 16. | Cromatograma de linealidad a concentración de estándar al 100%..... | 127 |
| ANEXO NO. 17. | Cromatograma de linealidad a concentración de estándar al 125%..... | 128 |
| ANEXO NO. 18. | Cromatograma de linealidad a concentración de estándar al 150%..... | 129 |
| ANEXO NO.19 | Cromatograma de análisis de robustez con un flujo aumentado en 10%.... | 130 |

INTRODUCCIÓN

El análisis se considera hoy en día un proceso mediante el cual obtenemos información. Se realiza millones de análisis cada día en los ámbitos más variados: análisis de productos manufacturados, análisis medioambientales, análisis clínicos, forenses, químicos y físicos, en todos ellos se requiere una confianza en los resultados obtenidos. La validación de las metodologías analíticas, junto con otras actividades englobadas en el área de aseguramiento de la calidad, permiten conseguir calidad, otorgando la confianza necesaria a la vez que confieren un grado elevado de comparabilidad entre los resultados de los análisis químicos.

El costo de realizar estas mediciones es elevado y surgen costos adicionales de las decisiones tomadas en base a los resultados. Por ejemplo, las pruebas que muestran que algún alimento no es adecuado para su consumo pueden resultar en demandas por compensación; pruebas que confirmen la presencia de drogas prohibidas podrían ocasionar multas, encarcelamiento o más aún, la ejecución en algunos países. Claramente es importante determinar el resultado correcto y ser capaz de demostrar que lo es.

Si el resultado de una prueba no es confiable entonces tiene poco valor y la prueba no debió haberse realizado así. Si un “cliente” encarga un trabajo analítico a un laboratorio, se supone que el laboratorio tiene un nivel de conocimiento experto que el cliente no tiene por sí mismo. El cliente espera poder confiar en los resultados reportados y por lo general sólo los cuestiona cuando surge una controversia. De este modo, el laboratorio y su personal tienen una clara responsabilidad de corresponder a la confianza del cliente proporcionando la

respuesta correcta a la parte analítica del problema, en otras palabras, proporcionando resultados que han demostrado ser “adecuados a su propósito”.

En este afán de proporcionar productos de calidad para el consumidor surge la idea de establecer este proyecto de tesis en la empresa Betapharma S.A. “VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE VALORACIÓN DE AMOXICILINA EN POLVO PARA SUSPENSIÓN ORAL PRODUCIDO POR BETAPHARMA S.A. MEDIANTE HPLC”

Se realizaron varias pruebas para medir los parámetros propuestos, entre estos tenemos la precisión del sistema en el que se realizaron seis inyecciones repetidas de la misma muestra de estándar y se pudo verificar que está dentro de los parámetros establecidos.

Se determinó la precisión del método en el cual se analizaron muestras de acuerdo al protocolo de análisis, inyectándolas por triplicado y analizando el porcentaje de variación de este conjunto de datos se obtuvo que se encuentran dentro de los niveles de aceptación.

En cuanto a la precisión entre días, se realizó el mismo procedimiento anterior variando el día de análisis con lo cual se obtuvo resultados dentro del rango establecido.

Con respecto a la precisión entre analistas se realiza el mismo procedimiento de precisión del método pero realizado por dos analistas diferentes, obteniendo resultados dentro de los niveles de aceptación.

En la determinación de la linealidad, se prepararon muestras de estándar en un rango de 50 a 150 por ciento de la concentración normal del estándar de Amoxicilina utilizado en la determinación de Amoxicilina en polvo para suspensión oral.

En la determinación de la recuperación del método se preparó 15 frascos de Amoxicilina en polvo para suspensión oral tal como indica la ficha de producción del producto, esto se lo hizo en un rango de 50 a 150 por ciento de la cantidad etiquetada y por triplicado.

En cuanto a la robustez del método, se varió deliberadamente el flujo, aumentándolo en un 10 % obteniendo resultados dentro de los niveles de aceptación.

CAPITULO I

1 PARTE TEÓRICA

1.1 VALIDACIÓN

La validación de un método de ensayo es un requisito primordial cuando deseamos obtener resultados técnicamente válidos, exactos y confiables. Sin embargo, el conocimiento de la importancia de validación, de por qué debe hacerse, cuándo debe hacerse, y saber exactamente lo que necesita realizarse parece ser insuficiente. (40)

Muchas orientaciones relacionadas con los métodos de validación son ofrecidas en la literatura científica, especialmente sobre métodos particulares de análisis y medición, pero la mayoría de las veces estas no son utilizadas adecuadamente. Algunos analistas ven el proceso de validación del método como algo que solo puede hacerse de una forma externa al laboratorio. Por consiguiente no desarrollan protocolos internos de validación que son de gran ayuda en numerosas situaciones, además de ser técnicamente factibles. La validación del método es necesaria ya que permite conocer los parámetros de desempeño del método y proporciona un alto grado de confianza y seguridad de los resultados que se obtienen. (40)

1.1.1. DEFINICIONES

La norma COVENIN-ISO 9000:2000 define a la validación como: “la confirmación por examen y el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos particulares para una utilización o aplicación específica prevista”. (11)

Según la norma ISO 8402 “Es la confirmación mediante exámenes y provisión de evidencias objetivas que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico determinado”. (26)

Aplicando el concepto de validación al ensayo podemos definir que la validación de un método de ensayo es el proceso que establece mediante amplios estudios de laboratorio que los parámetros de desempeño del método de ensayo cumplen las especificaciones relacionadas con el uso previsto con los resultados del ensayo.

La calificación de “adecuado para el uso” aplicada a un método de ensayo o calibración, es una garantía de que la influencia del método sobre el resultado de la medición está bajo control, al realizar el análisis del proceso de medición como sistema, único enfoque que evalúa integralmente el proceso de medición.

1.1.2. LA VALIDACIÓN COMO REQUISITO DE LA NORMA COVENIN 2534:2000.

Entre los requisitos técnicos establecidos en la norma COVENIN 2534:2000 (ISO/ICE 17025:1999) se encuentra la validación de métodos, con ellos se garantiza que el laboratorio analice y tenga bajo control unos de los factores que incide en la confiabilidad y exactitud de los resultados que informa. (10)

En el alcance del requisito, para confirmar que los métodos que se utilizan en el laboratorio se ajustan al uso propuesto se establece la validación de:

- Métodos no normalizados.
- Métodos diseñados o desarrollados por el laboratorio
- Métodos normalizados utilizados fuera de su alcance proyectado
- Métodos normalizados que han sido modificados o ampliados. (46)

El requisito establece de forma obligatoria que:

- El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y declarar la conformidad acerca de lo apropiado del método de ensayo para el uso previsto.
- El rango y la exactitud de los valores (parámetros de desempeño) que se obtienen con los métodos validados (límite de detección, selectividad, linealidad, repetibilidad, reproducibilidad, robustez, etc.) tal como fueron evaluados para el uso previsto deben ser pertinentes a las necesidades del cliente. (17)

El requisito sugiere que:

- La validación sea tan extensiva como el propio método de ensayo lo requiera y pueda incluir los procesos relacionados con el muestreo, el manejo y el transporte de la muestra.

- Entre las técnicas disponibles para determinar los parámetros de desempeño del método se aplique la calibración mediante patrones de referencia o materiales de referencia, la comparación de los resultados con otros métodos de análisis, las comparaciones interlaboratorios y la evaluación de la incertidumbre.
- La validación incluya la especificación de los requisitos, la determinación de las características de los métodos, la verificación de que los requisitos pueden cumplirse por el método usado y una declaración sobre la validez.
- La validación sea siempre desde el punto de vista práctico un equilibrio entre costos riesgos y posibilidades técnicas. (42)

1.1.3. TIPOS DE VALIDACIÓN

1.1.3.1. Validación prospectiva

Esta validación es el enfoque defendido en los textos. Se realiza en un proceso fabricación de principio activo o de drogas antes de su comercialización.

1.1.3.2. Validación de la competencia

Esta validación se realiza:

- Cuando todos los datos y parámetros de la producción no está disponible debido a que un número limitado de lotes se produce.
- Cuando los lotes de los principios activos o drogas rara vez se producen, o cuando el ingrediente activo es producido a partir de un proceso validado pero modificado. (27)

1.1.3.3. Validación retrospectiva

Esta validación se puede abordar cuando los procesos se han utilizado sin modificaciones significativas en comparación con la calidad del ingrediente activo. Esta validación se puede encontrar en la llamado "la validación de la historia." la serie o lotes seleccionados para la validación retrospectiva deben ser representativos de todos los lotes fabricados durante el periodo de revisión y debe ser lo suficientemente numerosos para mostrar la consistencia del proceso y reproducibilidad. (11)

1.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANÁLITICO

Se puede interpretar la validación del método analítico como el proceso de definir un requisito (por ejemplo un requisito analítico) y confirmar que el método de ensayo bajo consideración tiene capacidades de desempeño consistentes con lo que la aplicación requiere. De hecho la definición que proporciona la norma ISO 8402 es "Confirmación mediante examen y provisión de evidencias objetivas que se cumplen los requisitos particulares para su uso específico". (26)

Por consiguiente como algo implícito es necesario evaluar la capacidad de desempeño del método, el juicio de la convivencia del método es importante; en el pasado la validación del método se tendió a concentrar en el proceso de evaluación del los parámetros de desempeño. También está implícito en el proceso de validación del método que los estudios para determinar los parámetros de desempeño del método son llevados a cabo utilizando equipos que están trabajando correctamente, dentro de su especificación y adecuadamente calibrados. Igualmente, el analista que lleva a cabo los estudios debe ser competente y tener conocimientos suficientes en el campo de trabajo que facilitar poder tomar decisiones apropiadas a partir de las observaciones realizadas o de los progresos del estudio.

1.2.1. RESPONSABILIDADES EN EL PROCESO DE VALIDACIÓN

El laboratorio que utiliza un método analítico es el responsable por asegurar que el método haya sido validado. En ciertos casos el laboratorio debe llevar a cabo trabajo adicional para complementar los datos existentes sobre la validación. Por ejemplo, cuando un método ha sido validado por organizaciones que publican normas, tales como AOAC (Association of Analytical Chemist) y la ASTM (American society for testing and materials), el usuario sólo necesita establecer datos de desempeño para el uso del método. (48)

Mucho se ha publicado en la literatura acerca de la validación de métodos analíticos mediante comparaciones interlaboratorio. Hay numerosos documentos que relacionan esta tipo de validación. Si se desarrolla un método de ensayo con amplias perspectivas de uso, quizás como un procedimiento normalizado publicado, entonces, una comparación que involucre un grupo de laboratorios es probablemente la manera preferida de llevar a cabo la validación. Sin embargo no siempre es una opción conveniente para los laboratorios de ensayos industriales. La aplicación para la que el método se requiere puede ser secreta, en tal magnitud que ningún otro laboratorio estaría interesado en colaborar. Aquellos que podrían estar interesados serían los competidores. (48)

1.2.2. CARACTERÍSTICAS DE UN ESTUDIO DE VALIDACIÓN DE METODOS

Es esencial que los estudios de validación sean representativos. Esto significa que, en la medida de lo posible, deberían realizarse los estudios necesarios para obtener una estimación realista del número y la gama de efectos que se producen durante el uso normal del método, al tiempo que deben analizar la gama de concentraciones y de tipos de muestra que abarca el método. Por ejemplo, si un factor (la temperatura ambiente) varía sustancialmente durante la

realización de un experimento de fidelidad, los efectos de dicho factor aparecen directamente en la varianza observada y no precisan de un estudio adicional, a menos que se desee mejorar todavía más el método.

En el contexto de la validación de métodos, una “variación representativa” significa que el factor debe tomar una distribución de valores adecuada para el rango previsto del parámetro en cuestión. (46)

Para los parámetros continuos medibles, puede ser un rango permitido, una incertidumbre determinada o un rango esperado; para los factores discontinuos, o factores con efectos impredecibles, como la matriz de la muestra, un rango representativo corresponde a los diferentes tipos o “niveles de factor” permitidos o hallados durante el uso normal del método. Idealmente, la representatividad abarca el rango de valores y también su distribución. Por desgracia, a menudo no es económicamente viable disponer de la variación completa de muchos factores a muchos niveles, no obstante, para propósitos prácticos los ensayos basados en extremos del rango esperado o en cambios mayores de lo previsto son un mínimo aceptable.

Al seleccionar los factores de la variación, es importante asegurarse de "ejercer" al máximo los mayores efectos. Por ejemplo, si la variación diaria (quizás a causa de los efectos del recalibrado) es sustancial comparada con la repetibilidad, dos determinaciones de cada una durante cinco días ofrecerá una mejor estimación de la fidelidad intermedia que cinco determinaciones de cada una durante dos días. Diez determinaciones individuales en días separados sería todavía mejor, aunque no ofrecería información adicional sobre la repetibilidad día a día.

Al planificar comprobaciones de significación, los estudios deben tener suficiente potencia para detectar estos efectos antes de que lleguen a revestir una fuerte importancia práctica (comparable al mayor componente de incertidumbre).

- Además, cabe tener en cuenta las siguientes consideraciones:
- Si se sabe o se sospecha que los factores interactúan, es importante tener en cuenta el efecto de interacción. Esto puede lograrse realizando una selección aleatoria desde diferentes niveles de interacción de los parámetros o mediante un meticuloso diseño sistemático para obtener información de los efectos de ‘interacción’ o de la covarianza.
- Al realizar estudios del sesgo global, es importante que los materiales y los valores de referencia sean relevantes para los materiales objeto de los ensayos rutinarios.

1.2.3. ALCANCE DE LOS ESTUDIOS DE VALIDACIÓN

El alcance de la validación de un método nuevo, modificado o desconocido depende del estatus del método y de la competencia del laboratorio encargado de llevarla a cabo. A continuación se indican algunas sugerencias relativas a la validación y las mediciones de comprobación en diferentes circunstancias. Salvo indicación explícita, se supondrá que el método tendrá un uso periódico. (41)

1.2.3.1. El laboratorio debe utilizar un método “totalmente” validado.

El método ha sido estudiado en un ensayo colectivo y el laboratorio debe comprobar si es capaz de alcanzar su rendimiento publicado (o si es capaz de cumplir los requisitos de las tareas analíticas). (31)

El laboratorio debe realizar estudios de la fidelidad, del sesgo (incluidos estudios de Aparición de la matriz) y posiblemente estudios de la linealidad, aunque puede omitir algunas pruebas, como por ejemplo la de robustez.

1.2.3.2. El laboratorio debe utilizar un método totalmente validado, pero con una nueva matriz.

El método ha sido estudiado en un ensayo colectivo y el laboratorio debe comprobar que la nueva matriz no introduce nuevas fuentes de error en el sistema. Se precisa el mismo rango de validación que anteriormente. (32)

1.2.3.3. El método ha sido publicado en la literatura científica junto con algunas características analíticas

El laboratorio debe realizar estudios de la fidelidad, del sesgo (incluidos estudios de la variación de la matriz), de la robustez y de la linealidad.

1.2.3.4. El método ha sido publicado en la literatura científica sin especificación de sus características o ha sido desarrollado internamente (28)

El laboratorio debe realizar estudios de fidelidad, del sesgo (incluidos estudios de la Aparición de la matriz), de la robustez y de la linealidad.

1.2.3.5. El método es Empírico

Un método empírico se caracteriza porque la cantidad estimada es simplemente el resultado hallado tras aplicar el procedimiento. Esto difiere de las mediciones que valoran cantidades independientes del método, como la concentración de un analito particular en una muestra, en las que el sesgo del método es convencionalmente cero y la variación de la matriz (dentro de la clase definida) es irrelevante. No puede olvidarse el sesgo del laboratorio, pero probablemente sea difícil estimarlo mediante un ensayo en un solo laboratorio. Además, es improbable que haya materiales de referencia disponibles. En ausencia de datos de un Ensayo colectivo, pueden obtenerse algunas estimaciones de la fidelidad interlaboratorio a

partir de estudios de robustez específicamente diseñados o calculadas utilizando la función de Horwitz. (19)

1.2.3.6. Cambios en el personal o el equipo

Cambios en los principales instrumentos, nuevos lotes de reactivos muy variables (por ejemplo, anticuerpos policlonales), cambios realizados en el recinto del laboratorio, métodos utilizados por primera vez por nuevos empleados o un método validado utilizado tras un período de desuso. La acción esencial es demostrar que no se han producido cambios nocivos. La comprobación mínima es realizar una prueba de sesgo y un experimento a priori y a posteriori de los materiales de prueba o de control habituales. En general, las pruebas realizadas deben reflejar el Posible impacto del cambio en el Procedimiento analítico. (20)

1.2.4. CATEGORIA DEL MÉTODO

Según la USP XXII los métodos analíticos se clasifican en varias categorías para su validación. Los parámetros de validación que se deben considerar varían según los requisitos legales exigidos por distintas organizaciones. (17)

1.2.4.1. Categoría I - Métodos analíticos para la cuantificación de los principales componentes de las sustancias activas de medicamentos a granel o ingredientes (incluidos los conservantes) en productos farmacéuticos acabados.

1.2.4.2. Categoría II - Métodos analíticos para la determinación de impurezas y compuestos de degradación a granel sustancias medicinales o productos farmacéuticos acabados. Estos métodos incluyen análisis cuantitativos y los límites de las pruebas.

1.2.4.3. Categoría III - métodos de análisis empleados para la determinación de las características de rendimiento (es decir, la disolución, liberación del fármaco).

1.2.4.4. Categoría IV - las pruebas de identificación o las propiedades físicas. (1)

NOTA: No todos los métodos analíticos fácilmente cabe en una de las cuatro categorías anteriores. Para estos métodos, cada elemento de datos (punto C 3, abajo) tienen que considerarse caso por caso para aplicabilidad a la medida prevista del método. Discusión con RAS-analíticos para orientación puede ser apropiada.

TABLA No. 1. ELEMENTOS PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS EN FUNCIÓN DEL ANÁLISIS DE CATEGORÍA.

| Analytical Performance Characteristics | ASSAY CATEGORY | | | | |
|--|----------------|----------------------------|-------------|-----|-----|
| | I | II | | III | IV |
| | | Quantitative, Area %, wt % | Qualitative | | |
| Precision | Yes | Yes | No | Yes | Yes |
| Accuracy | Yes | Yes ^a | * | * | No |
| Limit of Detection | No | Yes | Yes | * | No |
| Limit of Quantitation | No | Yes | Yes | * | No |
| Reporting Limit ^b | No | Yes | No | * | No |
| Specificity | Yes | Yes | Yes | * | Yes |
| Range | Yes | Yes | * | * | No |
| Linearity | Yes | Yes | No | * | No |
| Ruggedness | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes |
| Robustness | Yes | Yes | * | * | No |

FUENTE: GUIDELINE FOR VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS MARZO 16, 2000

*Puede ser necesario en función de la naturaleza de la prueba específica
a También requiere una determinación del factor de respuesta relativo (RRF) como se describe en el texto.

b Añadido según ICH. (42)

1.2.5. PROCESO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Consiste en un plan experimental que debe contener las siguientes especificaciones:

1.2.5.4. Especificidad

Se define como la capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente el analito sin interferencias de impurezas, productos de degradación o excipientes que pueden estar presentes en la muestra. Se expresa como el grado de inexactitud del método. La evaluación de este parámetro es especialmente importante en el caso de los métodos analíticos diseñados para la cuantificación del analito en formulaciones y en estudios de estabilidad. (2)

Aunque la especificidad y la selectividad se consideran términos equivalente, algunos autores los diferencian, considerando la selectividad como la capacidad de detectar simultánea o separadamente sustancias químicas diferentes presentes en una misma muestra y a la especificidad como la capacidad de detectar el analito sin interferencias de otro compuesto. La selectividad se determina comparando los resultados del análisis de muestras con los resultados del análisis de las muestras en presencia de productos relacionados. *Rampazoo* recomienda el análisis de muestras del analito sometidas a condiciones de degradación artificial hasta el 20 % de degradación, lo cual constituye un criterio de especial interés cuando se desconocen los productos de degradación. (37)

La especificidad sugiere que ningún compuesto excepto el analito contribuye al resultado de un ensayo. Esto se logra casi únicamente con las técnicas acopladas (por ejemplo, generación de hidruros- absorción atómica). Para probar esto hay varias posibilidades.

- Se agrega el componente que interfiere en cantidades sucesivas y se evalúa su influencia.
- Se prueba un estándar certificado de la matriz con cantidades conocidas del analito. Si se encuentra el valor correcto, el procedimiento es específico.
- En el caso de separaciones Cromatográficas puede probarse la pureza del pico por métodos espectroscópicos (espectrometría de masas, infrarroja o ultravioleta- visible.
- Puede también modificarse el sistema de separación (fase móvil y/o fase estacionaria) en el caso de la cromatografía. Es muy baja la probabilidad de que la misma interferencia produzca en ambos casos el mismo error en los resultados.

1.2.5.5. Precisión

Es una medida de cuán cerca están los resultados unos de otros, y generalmente se expresa por medidas como la desviación estándar, que describe la dispersión de los resultados.

La forma más común de medición en los laboratorios involucra el uso de distintos equipos y distintos analistas para obtener resultados de un mismo método. Por ello la evaluación de la precisión del método es mejor que sea validada en términos de su precisión intermedia, es decir como la reproducibilidad intralaboratorio (distintos analistas, días, equipos, etc.).

La precisión refleja la medida en que los valores de una serie repetida de ensayos analíticos que se realizan sobre una muestra homogénea son semejantes entre sí. La USP XXII expresa que la

precisión es la expresión del grado de la reproducibilidad, mientras que la Norma Británica incluye sólo la repetibilidad y la reproducibilidad.

1.2.5.6. Repetibilidad:

Refleja la precisión de un método, cuando se desarrolla bajo las mismas condiciones, utilizando la misma muestra, analizada por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos y durante una misma sesión de trabajo en un período corto. (33)

El parámetro estadístico que caracteriza a este estudio es la desviación estándar o preferiblemente el coeficiente de variación (desviación estándar relativa). Este parámetro permite evaluar la incertidumbre en la estimación de la media, es decir, el error aleatorio que se corresponde con la dispersión de los datos alrededor de la media. (34)

1.2.5.7. Reproducibilidad:

Es la medida de la precisión de los resultados de ensayos realizados sobre la misma muestra homogénea, pero ejecutados por diferentes analistas en días diferentes y se expresa con los mismos parámetros matemáticos que la repetibilidad. El coeficiente de variación en el estudio de la reproducibilidad debe ser igual o mayor que el obtenido en el estudio de repetibilidad para la misma cantidad o concentración debido a la mayor fuente de error que existe en la reproducibilidad.

1.2.5.8. Linealidad

Es la capacidad del método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad del analito en un rango definido. Se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos en el análisis del analito a diferentes cantidades o concentraciones. La selección del rango y del número de puntos experimentales está estrictamente relacionado con la aplicación del método. (29)

Se recomienda en la validación de métodos por CLAR para la cuantificación de un principio activo en forma de materia prima de 80,0 hasta 120,0 % del valor teórico y de 3 a 5 puntos experimentales, mientras que para su aplicación en la determinación del analito como ingrediente activo de una formulación recomienda un rango desde 50,0 hasta 150,0 % y con 5 ó 7 puntos experimentales. Para que el método se considere lineal, el coeficiente de correlación debe ser mayor que 0,99. (43)

1.2.5.9. Recuperación

El porcentaje de recuperación es el cociente entre la cantidad de analito medida y el contenido en la muestra. En el caso ideal, se obtiene un 100%. En mediciones experimentales puede perderse analito especialmente en el caso de tratamientos complejos de muestras con analito en cantidades traza, dando lugar a porcentajes de recuperación menores (importante especialmente en el caso de procedimientos cromatográficos). (18)

Para calcular la recuperación se determina la función de recuperación. Para lo cual se agregan a la muestra antes del tratamiento cantidades sucesivas del analito y se determinan

contra una calibración base. Las cantidades encontradas se grafican contra las agregadas. En este caso de recuperación es del 100% y es suficiente una calibración base, analito en un disolvente.

Si los valores se salen de este marco, debe hacerse una calibración a partir de matriz y analito en un disolvente para eliminar el efecto de la matriz. Variando el tiempo de adición del analito (por ejemplo, antes y después de un paso de concentración) puede determinarse la recuperación para pasos aislados de un procedimiento.

En caso de que la matriz introduzca muchas variaciones debe utilizarse en lugar de una calibración con la matriz de la muestra el método del agregado patrón (o de las adiciones estándar), el cual consiste en agregar concentraciones sucesivas de analito a la muestra. Al graficar el aumento de la señal contra la cantidad adicionada se obtiene una función de calibración, a partir de la cual puede obtenerse la cantidad de analito presente en la muestra original.

Este método conduce a un aumento claro en la concentración del analito. Para mantener el error lo más pequeño posible, las cantidades añadidas deben ser tales que no sobrepasen el intervalo de trabajo. (18)

1.2.5.10. Robustez

La robustez de un método analítico es la resistencia al cambio en los resultados obtenidos por un método analítico cuando se realizan desviaciones menores a partir de las condiciones experimentales descritas en el procedimiento. Los límites de los parámetros experimentales deben especificarse en el protocolo del método, y dichas desviaciones permisibles, por separado o en combinación, no deben producir cambios significativos en los resultados obtenidos (un “cambio significativo” implica que el método no puede funcionar dentro de

los límites de incertidumbre que definen la adecuación al propósito). Deben identificarse los aspectos del método susceptibles de afectar a los resultados y debe evaluarse su influencia en el rendimiento del método mediante pruebas de robustez. (15)

Un método es más robusto entre menos dependan los resultados del ensayo de una modificación en las condiciones de éste. Al desarrollar un nuevo método analítico debe determinarse la modificación de los resultados por el cambio en las condiciones del ensayo.

Las condiciones que afectan el método de medición son por ejemplo, para el caso de cromatografía:

- Laboratorio, lugar de la medición
- Personal.
- Aparatos.
- Reactivos, disolventes, estándares, etc.
- Caudal de la fase móvil.
- pH de la fase móvil (p. ej. en HPLC).
- Gradiente de temperatura (p. ej. en GC).

Modificaciones pequeñas a estas condiciones deben afectar muy poco o nada al resultado del análisis.

Para determinar la robustez de un procedimiento analítico pueden modificarse algunas condiciones del análisis y seguir las afectaciones a los resultados o a los parámetros estadísticos. A menudo se utiliza también la evaluación de espectros o cromatogramas.

Un aspecto importante de la robustez es la estabilidad de todas las muestras, estándares y reactivos, tanto en el almacenamiento como durante las condiciones de ensayo. En este caso pueden ser parámetros a probar:

- Sensibilidad a la temperatura.
- Sensibilidad a la luz.
- Hidrólisis p. ej. por la humedad del aire.
- Facilidad de oxidación.
- Descomposición química.
- Efectos catalíticos, p. ej. por las paredes del contenedor.
- Adsorción, p. ej. durante la filtración de disoluciones con trazas.
- Precipitación, p. ej. al dejar mucho tiempo una disolución. (18)

1.2.6. HPLC

Utilizada como metodología de elección para la cuantificación de droga residual, tiene como sus principales ventajas que es un método de análisis cuantitativo, elevada especificidad y sensibilidad. (36)

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es, dentro de las técnicas Cromatográficas, la más utilizada. El proceso de separación cromatográfica puede definirse como la transferencia de masas entre una fase estacionaria y una móvil. La mezcla que contiene los compuestos a separar es disuelta e inyectada en una columna rellena de fase estacionaria a través de la cual es forzada a pasar por una fase móvil impulsada por la bomba de alta presión. Dentro de la columna la mezcla se separa en sus componentes en función de su interacción entre las dos fases. Esta separación puede ser modificada eligiendo adecuadamente tanto la fase móvil como la estacionaria, el flujo de la fase móvil o la

temperatura de la separación. De esta forma la técnica de HPLC adquiere un alto grado de versatilidad difícil de encontrar en otras técnicas, siendo capaz de separar los componentes de una gran variedad de mezclas.

En la HPLC isocrática el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna.

El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina “tiempo de retención” y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria.

La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayudan a la separación de los compuestos. (14)

1.2.6.4. Fases y Columnas

1.2.6.4.1. Fase móvil: es la fase que se mueve en una dirección definida. Puede ser un líquido (cromatografía de líquidos o CEC), un gas (cromatografía de gases) o un fluido supercrítico (cromatografía de fluidos supercríticos). La fase móvil consiste en la muestra que está siendo separada/analizada y el disolvente, que se mueven por el interior de la columna. En el caso de la cromatografía líquida de alta resolución, HPLC, la fase móvil es un disolvente no-polar como el hexano (fase normal) o bien algún disolvente polar (cromatografía de fase reversa) y la muestra que va a ser separada. La fase móvil se mueve a través de la columna de cromatografía (fase estacionaria) de forma que la muestra interacciona con la fase estacionaria y se separa.

1.2.6.4.2. Columnas: es la sustancia que está fija en una posición en el procedimiento de la cromatografía. Un ejemplo es la capa de sílica en la cromatografía en capa fina.

1.2.6.4.2.1. Fuentes de daño de una columna de HPLC:

- Obstrucción por partículas pequeñas en los solventes o fases móviles
- Obstrucción por materiales no eluidos en las muestras
- Variación de las características de retención por incremento de materiales no eluidos.

(36)

1.2.6.5. Detección

La eficiencia de un detector cromatográfico depende de la relación entre la cantidad física medida y la composición del efluente, así como también de las características de la señal de transferida.

1.2.6.5.1. Tipos de detectores en HPLC:

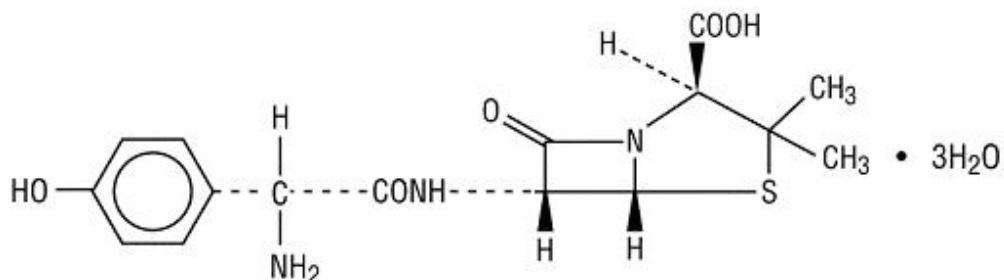
- Detectores basados en una propiedad de la fase móvil. Ejemplo: Detector de Índice de Refracción
- Detectores basados en una propiedad de la sustancia a separar. Ejemplo: Detector de Fluorescencia, Detector Ultravioleta

1.2.6.5.2. Detectores más utilizados en HPLC:

- Detector UV. Hay básicamente tres tipos:
- Detector de Longitud de Onda Fija
- Detector de Longitud de Onda Variable
- Detector de Arreglo de Diodos
- Detector de Índice de Refracción. Existen muchos diseños de estos detectores, pero solamente existen ahora dos tipos:
- Tipo Deflexión
- Tipo Fresnel
- Detector de Fluorescencia. Este detector solamente puede detectar compuestos que tengan fluorescencia nativa o inducida por derivatización.
- Detector de Fluorescencia Inducida por Laser
- Según la Fuente de Excitación
- Según el sistema óptico
- Detectores Electroquímicos. Pueden ser clasificados en tres tipos:
- Detector Amperométrico
- Detector Conductimétrico
- Detector Potenciométrico

1.2.7. PRINCIPIO ACTIVO AMOXICILINA

GRAFICO Nº 1. ESTRUCTURA MOLECULAR DE AMOXICILINA



La amoxicilina es una penicilina semi-sintética similar a la ampicilina, con una mejor biodisponibilidad por vía oral que esta última. Debido a su mejor absorción gastrointestinal, la amoxicilina ocasiona unos mayores niveles de antibiótico en sangre y unos menores efectos gastrointestinales (en particular, diarrea) que la ampicilina. La amoxicilina tiene un espectro de actividad antibacteriana superior al de la penicilina, si bien no es estable frente a las beta-lactamasas. (30)

Los siguientes microorganismos son considerados, por regla general, susceptibles a la amoxicilina: *Actinomyces sp.*; *Bacillus anthracis*; *Prevotella melaninogenica*; *Bifidobacterium sp.*; *Bordetella pertussis*; *Borrelia burgdorferi*; *Brucella sp.*; *Clostridium perfringens*; *Clostridium tetani*; *Corynebacterium diphtheriae*; *Eikenella corrodens*; *Enterococcus faecalis*; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Escherichia coli*; *Eubacterium sp.*; *Haemophilus influenzae* (beta-lactamasa negativa); *Helicobacter pylori*; *Lactobacillus sp.*; *Listeria monocytogenes*; *Neisseria meningitidis*; *Peptococcus sp.*; *Peptostreptococcus sp.*; *Propionibacterium sp.*; *Proteus mirabilis*; *Salmonella enteritidis*; *Salmonella sp.*; *Salmonella typhi*; *Shigella sp.*; *Staphylococcus sp.* (beta-lactamasa negativa y sensible a

meticilina/oxacilina sólo); *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B); *Streptococcus dysgalactiae*; *Streptococcus pneumoniae*; *Streptococcus pyogenes* (grupo A beta-hemolíticos); *Treponema pallidum*; *Vibrio cholerae*; *Viridans streptococci*.(49)

1.2.7.4. Mecanismo de acción

Los antibióticos beta-lactámicos como la amoxicilina son bactericidas. Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana uniéndose a unas proteínas específicas llamadas PBPs (*Penicillin-Binding Proteins*) localizadas en la pared celular. Al impedir que la pared celular se construya correctamente, la amoxicilina ocasiona, en último término, la lisis de la bacteria y su muerte. La amoxicilina no resiste la acción hidrolítica de las beta-lactamasas de muchos estafilococos, por lo que no se usa en el tratamiento de estafilococias.

Aunque la amoxicilina es activa frente a los estreptococos, muchas cepas se están volviendo resistentes mediante mecanismos diferentes de la inducción de b-lactamasas, por lo que la adición de ácido clavulánico no aumenta la actividad de la amoxicilina frente a estas cepas resistentes. Dado que muchos otros gérmenes se están volviendo resistentes a la amoxicilina, se recomienda realizar un antibiograma antes de instaurar un tratamiento con amoxicilina, siempre que ello sea posible

1.2.7.5. Farmacocinética:

La Amoxicilina es estable en medio ácido en presencia de jugos gástricos y puede ser administrada por vía oral in tener en cuenta el ritmo de las comidas. Se absorbe rápidamente después de la administración oral, alcanzando los niveles máximos en 1-2.5 horas. Difunde

adecuadamente en la mayor parte de los tejidos y líquidos orgánicos. No difunde a través de tejido cerebral ni líquido cefalorraquídeo, salvo cuando están las meninges inflamadas. La vida media de Amoxicilina es de 61,3 min. El 75% aproximadamente de la dosis de Amoxicilina administrada se excreta por la orina sin cambios mediante excreción tubular y filtración glomerular; esta excreción puede ser retardada administrando probenecid, y también es mas lenta en los pacientes con insuficiencia renal que requieren un reajuste de las dosis. La amoxicilina no se liga a las proteínas en proporción elevada (17%). La administración de una dosis de 500 mg de amoxicilina alcanza, como promedio, unos niveles séricos pico de 7,5 ug/ml y todavía puede detectarse amoxicilina en suero 8 horas después de su administración. La presencia de alimentos en el estómago no interfiere significativamente la absorción de la amoxicilina.

Una pequeña cantidad de la Amoxicilina se excreta en la leche materna. En cambio, la amoxicilina no cruza la barrera placentaria. (3)

1.2.7.6. Indicaciones y Posología

La amoxicilina está indicada en el tratamiento de infecciones sistémicas o localizadas causadas por microorganismos gram-positivos y gram-negativos sensibles, en el aparato respiratorio, tracto gastrointestinal o genitourinario, de piel y tejidos blandos, neurológicas y odontoestomatológicas. También está indicado en la enfermedad o borreliosis de Lyme, en el tratamiento de la infección precoz localizada (primer estadio o eritema migratorio localizado) y en la infección diseminada o segundo estadio. Tratamiento de erradicación de *H. pylori* en asociación con un inhibidor de la bomba de protones y en su caso a otros antibióticos: úlcera péptica, linfoma gástrico tipo MALT, de bajo grado. Prevención de endocarditis bacterianas (producidas por bacteriemias postmanipulación / extracción dental).

Administración oral:

- Adultos, adolescentes y niños de más de 40 kg: las dosis recomendadas son de 500 mg cada 12 horas o 250 mg cada 8 horas. En el caso de infecciones muy severas o causadas por gérmenes menos susceptibles, las dosis pueden aumentarse a 500 mg cada 8 horas.
- Lactantes y niños de < 40 kg: para infecciones moderadas, las dosis recomendadas sobre 20 mg/kg/día divididos en dosis cada 8 horas o 25 mg/kg/día en dosis cada 12 horas. Estas dosis se pueden aumentar hasta 40 mg/kg/día en tres administraciones o a 45 mg/kg/día en dos administraciones.
- Neonatos y lactantes de < 3 meses de edad: la máxima dosis recomendada es de 30 mg/kg/día en dos dosis al día. (4)

1.2.7.7. Contraindicaciones

La amoxicilina está contraindicada en pacientes con alergias conocidas las penicilinas, cefalosporinas o al imipenem. La incidencia de hipersensibilidad cruzada es del 3 al 5%. Los pacientes con alergias, asma o fiebre del heno son más susceptibles a reacciones alérgicas a las penicilinas. (13)

En los pacientes con insuficiencia renal ($CrCl \leq 30$ ml/min) se deben ajustar las dosis de amoxicilina. La amoxicilina está clasificada en la categoría B de riesgo para el embarazo. Los datos en animales indican que el fármaco no es teratogénico y, en general, las penicilinas son consideradas como fármacos seguros durante el embarazo. La amoxicilina se excreta en la leche materna en pequeñas cantidades y puede producir rash, diarrea o

superinfecciones en los lactantes. Se deberán considerar estos riesgos para el lactante cuando se prescriba un tratamiento con amoxicilina a la madre.

La amoxicilina se debe usar con precaución en pacientes con leucemia linfática que son más susceptibles a los rash. Lo mismo ocurre en los pacientes con SIDA, otras infecciones virales y especialmente en los pacientes con mononucleosis

1.2.7.8. Interacciones

La administración de amiloride antes de la Amoxicilina reduce la biodisponibilidad del antibiótico en un 27% y la Cmax en un 25%. No se observaron variaciones en el aclaramiento renal de la Amoxicilina. Aunque se desconoce la significancia clínica de esta interacción se recomienda no administrar ambos fármacos simultáneamente, dejando transcurrir unas dos horas como mínimo entre uno y otro fármaco.

El probenecid inhibe la excreción tubular de la Amoxicilina, aumentando los niveles plasmáticos del antibiótico. En la práctica clínica estos dos fármacos se suelen asociar para el tratamiento de la gonorrea. Por regla general, esta interacción no ocasiona problemas clínicos excepto en pacientes con insuficiencia renal.

En muchas ocasiones, los antibióticos aminoglucósidos de muestran sinérgicos con la amoxicilina frente a enterococos y estreptococos del grupo B. Sin embargo, por existir una incompatibilidad química, ambos antibióticos no se deben mezclar ni administrar al mismo

tiempo. Algunas penicilinas inactivan los antibióticos aminoglucósidos cuando se mezclan en infusiones intravenosas. (1)

La neomicina inhibe parcialmente la absorción oral de la amoxicilina

El uso concomitante de la amoxicilina y el ácido clavulánico mejora la actividad antibacteriana de la amoxicilina frente a las bacterias que producen beta-lactamasas como la *H. influenzae*. Esta interacción es aprovechada y existen asociaciones de amoxicilina + ácido clavulánico.

La Amoxicilina en grandes dosis inhibe la excreción tubular renal de metotrexato, aumentando las concentraciones plasmáticas de este último y, por consiguiente, su potencial toxicidad. De igual forma, se ha observado que la administración concomitante de amoxicilina y alopurinol aumenta la incidencia del rash inducido por este último.

La Amoxicilina puede reducir la eficacia de los anticonceptivos orales que contienen estrógenos debido, bien a una estimulación del metabolismo de estos, bien a una reducción de su circulación enterohepática al reducirse la flora gastrointestinal por acción del antibiótico. Se han documentado casos de fracasos anticonceptivos en pacientes tratadas con amoxicilina, aunque se desconoce la naturaleza de esta interacción. Por lo tanto, se recomienda advertir a las pacientes que se encuentre bajo anticonceptivos orales de la posibilidad de un fallo anticonceptivos para que tomen medidas alternativas durante el tratamiento con amoxicilina

La nifedipina parece aumentar la absorción de la amoxicilina estimulando el transporte activo del antibiótico a través del epitelio intestinal. Sin embargo esta interacción parece no tener ninguna significancia clínica

La bromelaína aumenta la absorción de la amoxicilina. Se observó que 80 mg de bromelaina administrados conjuntamente con la amoxicilina aumentaba los niveles plasmáticos del antibiótico, aunque se desconoce el mecanismo de esta interacción. Una antigua publicación también informa que la bromelaína mejora la acción antibacteriana de algunos antibióticos como la penicilina, el cloramfenicol y la eritromicina en el tratamiento de una serie de infecciones, y pacientes que no habían respondido al tratamiento previamente, fueron curados al añadir bromelaína 4 veces al día. Algunos médicos prescriben dosis de bromelaína de 2.400 u.d.g (unidades disolventes de gelatina).

Probióticos : la levadura *Saccharomyces boulardii* ha mostrado reducir la frecuencia de la diarrea en pacientes tratados con amoxicilina, aunque el estudio que describe esta interacción consta de pocos casos. Las dosis de *Saccharomyces boulardii* eran de 1 g/día.

Por el contrario, niños que fueron tratados con una combinación de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, y amoxicilina no mostraron una reducción en la incidencia de la diarrea. De esta manera, no parece que el yogurt proteja significativamente de la diarrea inducida por la amoxicilina.

Se han observado falsos positivos en los tests de glucosa en orina de pacientes tratados con penicilinas, en las pruebas que usan solución de Benedict o de Fehling o Clinitest®. Sin

embargo, esta interacción no se produce con las tiras reactivas basadas en la glucosa-oxidasa. (13)

1.2.7.9. Reacciones Adversas

Los efectos secundarios más frecuentes son los asociados a reacciones de hipersensibilidad y pueden ir desde rash sin importancia a serias reacciones anafilácticas. Se ha descrito eritema multiforme, dermatitis exfoliativa, rash maculopapular con eritema, necrosis epidérmica tóxica, síndrome de Stevens-Johnson, vasculitis y urticaria.

En alguna rara ocasión se observado nefritis intersticial con necrosis tubular renal y síndrome nefrótico.

Los efectos secundarios más comunes, asociados al tracto digestivo son similares a los de otros antibióticos y se deben a la reducción de la flora: Náusea/vómitos, anorexia, diarrea, gastritis, y dolor abdominal. En algún caso puede producirse colitis pseudomembranosa durante el tratamiento o después, si bien este efecto suele ser bastante raro.

Pueden producirse superinfecciones durante un tratamiento con amoxicilina, en particular si es de larga duración. Se han comunicado candidiasis orales y vaginales.

Los efectos adversos sobre el sistema nervioso central incluyen cefaleas, agitación, insomnio, y confusión, aunque no son muy frecuentes. Se han comunicado convulsiones en

pacientes con insuficiencia renal a los que se administraron penicilinas en grandes dosis y por lo tanto las dosis de amoxicilina deben reajustarse convenientemente en estos pacientes.

Los efectos hematológicos son poco frecuentes y suelen ir asociados a reacciones de hipersensibilidad: se han descrito eosinofilia y hemolisis anemia (incluyendo anemia hemolítica) trombocitopenia, púrpura trombocitopénica, neutropenia, agranulocitosis, y leucopenia. Estas reacciones adversas son reversibles al discontinuar el tratamiento. (30)

CAPITULO II

2 PARTE EXPERIMENTAL

- Diseño experimental
- Protocolo
- Técnicas para validación del método de análisis.

El presente capítulo tiene por objeto describir un programa experimental empleado como base de trabajo para ejecutar la validación del procedimiento de análisis de Amoxicilina en polvo para suspensión oral. Ciertas partes que conforman el protocolo expuesto a continuación están estructuradas como Instructivo de Trabajo (IT).

2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

2.1.1 CARACTERISTICAS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

- **LUGAR:** Industria Farmacéutica Betapharma

- **CANTÓN:** Quito
- **PROVINCIA:** Pichincha

2.1.2 FACTORES DEL ESTUDIO

POBLACIÓN

Se tomará como población las muestras de retención de Amoxicilina en polvo para suspensión fabricado por Betapharma S.A.

MUESTRA

Las muestras que se tomarán para el estudio son muestras de retención de Amoxicilina en polvo para suspensión oral fabricado por Betapharma S.A. Las muestras de retención se toman en un número de 10 las cuales provienen del principio, medio y final en el proceso de producción. Para éste estudio de validación se han tomado tres muestras de cada uno de los lotes: 0810094, 0810095 y 0810096

2.1.3 MANEJO ESPECIFICO DEL EXPERIMENTO

2.1.3.1 Lugar y Pruebas De Ensayo

- **Industria Farmacéutica Betapharma S.A. QUITO-ECUADOR**

Las pruebas a realizarse son:

- Precisión del sistema
- Precisión del método
- Precisión entre analistas
- Precisión entre días
- Linealidad
- Recuperación
- Robustez.

2.2 PROTOCOLO

TITULO: “VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE VALORACIÓN DE AMOXICILINA EN POLVO PARA SUSPENSIÓN ORAL PRODUCIDO POR BETAPHARMA S.A. MEDIANTE HPLC”

2.2.1 OBJETIVO

Demostrar que el método analítico de valoración de Amoxicilina en polvo para suspensión oral es efectivo para obtener un producto 100% dentro de los parámetros establecidos.

2.2.2 ALCANCE

El presente protocolo está dirigido a la validación del método analítico de valoración de Amoxicilina en polvo para suspensión oral, el estudio se llevara a cabo tomando en cuenta los siguientes parámetros: Precisión del sistema, Precisión del método, Precisión entre

analistas, Precisión entre días de análisis, Linealidad, Recuperación del método y Robustez del método

2.2.3 MOTIVO DE LA VALIDACIÓN

No se ha establecido una validación documentada del método analítico para la valoración de Amoxicilina en polvo para suspensión.

2.2.4 RESPONSABILIDADES

TABLA No. 2. RESPONSABILIDADES DEL PROCESO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

| Acción Responsable | Jefe de Control de Calidad | Analista de Validación | Comité de Validación |
|----------------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------|
| Elaborar el Protocolo | | R | |
| Revisar el Protocolo | R | | |
| Autorizar el Protocolo | R | | R |
| Análisis de muestra | | R | |
| Preparar Informe Técnico | R | R | |
| Emitir Certificado de Validación | RC | | RC |

R Responsable "RC" Responsabilidad Compartida

JEFE DE CONTROL DE CALIDAD: Dra. Jeannette Checa

COMITÉ DE VALIDACIÓN: Dra. Jeannette Checa

Jorge Velasteguí B.

ANALISTA DE VALIDACIÓN: Jorge Velasteguí B.

2.2.5 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

- Principio Activo (AMOXICILINA)

2.2.6 PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

Se utilizará el método de análisis descrito en el Instructivo de trabajo “N: BA01PPS002.2”.

Condiciones Cromatográficas:

Fase móvil: Diluyente: Acetonitrilo (96: 40)

Columna: Lichrospher 100 RP 18, 12.5 cm, 5 μ

Flujo: 1,5 ml/min

Detector: 230 nm

Vol. Inyección: 20 μ l

La desviación estándar relativa para inyecciones sucesivas del estándar (5) no debe ser mayor que el 2.0%.

Diluyente—Disolver 13.6 g de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) en 2000 mL de agua, y ajuste con una solución de hidróxido de potasio al 45% (w/w) a pH de 5.0 ± 0.1 .

Fase móvil—Prepare una adecuada fase filtrada y desgasificada de la mezcla de Diluyente.

Acetonitrilo (96:4). Realice los ajustes de ser necesarios. Disminuya la concentración de Acetonitrilo para incrementar el tiempo de retención de la Amoxicilina.

Preparación de la solución estándar— Pesar 30 mg de estándar de referencia de Amoxicilina en un balón aforado de 25 ml, (o el equivalente de Amoxicilina trihidrato), adicionar 15 ml de diluyente, agitar y sonicar hasta completa disolución. Tomar 1,0 ml de la solución anterior y llevar a un balón aforado de 100 ml, disolver y aforar con diluyente. Filtre las soluciones por tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$

Concentración aproximada: 0.01 mg/ml

Solución problema (Preparar por triplicado)

- Reconstituir la suspensión, homogenizar la muestra y pesar 5 ml de suspensión en un balón aforado de 200 ml, adicionar 150 ml de diluyente, agitar y sonicar por 20 minutos, enfriar y aforar.
- Tomar 1,0 ml de la solución anterior y llevar a un balón aforado de 100 ml, disolver y aforar con diluyente.
- Filtrar las muestras por $0,45 \mu\text{l}$.

Procedimiento— Inyectar separadamente volúmenes iguales (20 µL) de la preparación del estándar y solución problema, registre los cromatogramas y mida la respuesta del pico principal

Calcule la cantidad, en mg, de Amoxicilina (C₁₆H₁₉N₃O₅S) en cada vial considerando la fórmula:

$$\text{mg Amoxicilina} / 5\text{mL} = \frac{A_m}{A_{st}} \times \frac{C_{st}}{C_m} \times 5 \times d$$

Donde:

A_m = Área de la solución problema para el pico de Amoxicilina.

A_{st} = Área de la solución estándar para el pico de Amoxicilina.

C_{st} = Concentración de la solución st en mg/ml

C_m = Concentración de la solución muestra en mg/ml

d = Densidad de la suspensión en mg/ml

$$\% = \frac{\text{mg Amoxicilina} / 5\text{ml} \times 100}{250}$$

2.2.7 PROCESO DE VALIDACIÓN

Se realizará el análisis de los parámetros antes mencionados

2.2.8 MÉTODOS DE ANÁLISIS

2.2.8.1 Análisis Químico:

La cromatografía líquida de alta eficiencia será empleada en la determinación cuantitativa de cada uno de los parámetros de control.

2.2.9 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

Cada uno de los parámetros tiene su criterio de aceptación, así tenemos:

2.2.9.1. Especificidad: Los excipientes que se utilizan en la fabricación de los productos, la fase móvil, diluyente y productos de degradación, no deben presentar picos con el mismo tiempo de retención en el que aparece. (24)

2.2.9.2. Precisión del sistema: se analizan 6 muestras de estándar a una concentración del 100% de lo que describe el método de análisis, ésta desviación estándar relativa debe ser menor a 2,8. (24)

2.2.9.3. Precisión del método: se analizan 6 muestras provenientes de la misma muestra madre o solución homogénea, cada una por triplicado, la desviación estándar relativa no debe ser superior al 3.9. (24)

2.2.9.4. Precisión entre analistas: se analizan 6 muestras provenientes de la misma muestra madre o solución homogénea, cada una por triplicado, por diferentes analistas en el mismo día, la desviación estándar relativa global no debe ser superior al 3,9. (24)

2.2.9.5. Precisión entre días de análisis: se analizan 6 muestras provenientes de la misma muestra madre o solución homogénea, cada una por triplicado, en diferentes días de análisis y realizadas por un mismo analista, la desviación estándar relativa global no debe ser superior al 3,9. (24)

2.2.9.6. Linealidad: se evalúa por medio de la respuesta que se obtiene variando el porcentaje de concentración del estándar entre un 50 y 150%, el coeficiente de correlación debe ser mayor a 0,99. (24)

2.2.9.7. Recuperación: se prepara 15 frascos variando la concentración de principio activo entre un 50 y 150% del valor etiquetado. El porcentaje de recuperación debe variar hasta un 2,5% con relación a la concentración de principio activo etiquetado, es decir debe estar entre un 97.5 y 102.5%. (24)

2.2.9.8. Robustez: se analizan 6 muestras provenientes de la misma muestra madre o solución homogénea, cada una por triplicado, variando deliberadamente uno de los parámetros de análisis con respecto a las condiciones normales, la desviación estándar relativa global no debe ser superior al 3,9. (24)

2.2.9. ACCIONES PARA VALORES FUERA DE LÍMITES

Muestras químicas fuera de especificaciones.

Si los resultados se encuentran fuera de los límites predefinidos, se informará inmediatamente al departamento de control de calidad y en coordinación con validación se tomarán las siguientes acciones:

- a) Revisar el correspondiente IT de análisis de Amoxicilina en polvo para suspensión oral.
- b) Detectar la falla y realizar las correcciones que sean necesarias ya sea en el método de análisis o en el proceso de producción.

2.2.10 RESULTADOS

Se reportará los resultados en Hojas de Reporte de Análisis de Validación del método analítico de Amoxicilina en polvo para suspensión oral. Se elaborara un informe y posteriormente se emitirá el Certificado de Validación del método analítico de Amoxicilina en polvo para suspensión oral.

2.3 TECNICAS A SEGUIR PARA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

2.3.1 ESPECIFICIDAD

1. OBJETIVO

Evaluar la capacidad que el método analítico tiene para ser específico frente a diluyente, fase móvil, excipientes, etc. (24)

2. ALCANCE

El presente IT debe ser aplicado a cualquier principio activo que vaya a ser evaluado para descartar la interferencia de compuestos que se espera que estén presentes como excipientes, productos de degradación, fase móvil y diluyente.

3. RESPONSABILIDADES

El analista de validación es el responsable de realizar las pruebas del principio activo con respecto a cada una de las sustancias antes mencionadas. (24)

4. PROCEDIMIENTO

- Preparar una cantidad determinada de placebo según el procedimiento de manufactura tomando como referencia la fórmula maestra del producto. (24)

TABLA Nº 3 FORMULA MAESTRA DE AMOXICILINA EN POLVO PARA SUSPENSIÓN ORAL

| COMPONENTE | PESO (g) |
|-----------------------------------|-----------------|
| Amoxicilina 3H ₂ O 85% | 6,18 |
| Benzoato de sodio | 0,10 |
| Colorante rojo 40 FDC | 0,00 |
| Goma Xanthan | 0,30 |
| Syloid 64 FP | 0,22 |
| Sabor fresa polvo | 0,16 |
| Citrato trisódico trihidratado | 0,36 |
| Azúcar Micropulverizada | 30,67 |

- Analizar una muestra del solvente empleado para la preparación de las soluciones, como se indica en el procedimiento de análisis.
- Preparar una muestra del placebo y analizarla como indica el procedimiento de análisis.
- Analizar un estándar en una concentración correspondiente al 100% de la especificada.
- Analizar muestras de placebo con un 100% del principio activo, como lo indica el procedimiento de análisis.

- En caso de conocer los productos de degradación o impurezas presentes en el producto preparar una muestra con ellas y analizarla de acuerdo al procedimiento de análisis.

Especificidad con respecto a los productos de degradación en medio ácido

- Someter una muestra de peso equivalente a 25mg de Amoxicilina a calentamiento con 5 ml de HCL 3N hasta sequedad, después disolver, diluir y analizar de acuerdo al procedimiento.

Degradación en medio básico

- Someter una muestra de peso equivalente a 25 mg de Amoxicilina a calentamiento con 5 ml de NaOH 3N hasta sequedad, después disolver, diluir y analizar de acuerdo al procedimiento.

Degradación térmica.

- Colocar en la balanza infrarroja una cantidad equivalente a 25mg de Amoxicilina y someterla a 115°C por 2 horas, después, disolver y analizar según el procedimiento de análisis.

Degradación a temperatura ambiente.

- Preparar una solución estándar de Amoxicilina, dejarla a temperatura ambiente y analizarla luego de 48 horas.

5. ESPECIFICACIONES

No deberá observarse picos Significativos en tiempos de retención diferentes a los de la Amoxicilina en ninguno de los casos de especificidad analizados.

6. REGISTROS

Documente los resultados del análisis y archive en la respectiva carpeta de validación para su posterior revisión y aprobación.

7. REFERENCIAS

Guía Para Validación De Métodos De Ensayo 26-09-2003 ICH

2.3.2 PRECISIÓN DEL SISTEMA

1. OBJETIVO

Establecer la repetitividad midiendo la precisión del sistema. (24)

2. ALCANCE

Este procedimiento debe ser empleado por cualquier departamento de control de calidad para verificar que existe reproducibilidad en lo que se refiere al equipo utilizado para el análisis.

3. RESPONSABILIDADES

Analista de validación: es responsable de preparar el estándar que será inyectado en un mínimo de 6 veces. Con los resultados obtenidos calcular el RSD y verificar si está dentro de los parámetros. (24)

4. REQUERIMIENTOS

Equipos

- HPLC

- Balanza Analítica

Materiales

- Balón aforado 25mL
- Balón aforado 100mL
- Pipetas volumétricas
- Viales para inyección.

Sustancias

- Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)
- Hidróxido de potasio
- Acetonitrilo

5. PROCEDIMIENTO

Establecer la precisión del sistema analizando repetidamente una solución de estándar, en un mismo laboratorio, por un mismo analista, usando el mismo equipo y en el mismo día. Se determinará en éste caso solamente las diferencias producidas por el equipo.

Preparar una solución estándar como lo indica el procedimiento de análisis y realizar 6 determinaciones.

- Peso del estándar: 25mg
- Primera dilución: 25ml
- Segunda dilución: 100ml (24)

6. ESPECIFICACIONES

- Tomar en cuenta la humedad y pureza de estándar para tener un peso del principio activo equivalente a 25mg.
- Condición Cromatográfica:

| | |
|----------------|--|
| Fase móvil | Diluyente: Acetonitrilo (96: 40) |
| Columna | Lichrospher 100 RP 18, 12.5 cm, 5 μ |
| Flujo | 1,5 mL/min |
| Detector | 230 nm |
| Vol. Inyección | 20 μ l |

7. REGISTROS

El analista deberá codificar las muestras, deberá indicar cualquier desviación durante el análisis. Documentar los resultados y archivar en la respectiva carpeta de validación para su posterior revisión y aprobación.

8. REFERENCIAS

2.3.3 PRECISIÓN DEL MÉTODO

1. OBJETIVO

Establecer la repetitibilidad midiendo la precisión del método empleado. (24)

2. ALCANCE

El presente IT debe ser aplicado cuando se requiera analizar la variación producida por el método de análisis utilizado.

3. RESPONSABILIDADES

Analista de validación: valoraciones de las muestras preparadas como indica el procedimiento de análisis.

4. REQUERIMIENTOS

Equipos

- HPLC
- Balanza Analítica

Materiales

- Balón aforado 25mL
- Balón aforado 100 mL
- Balón aforado 200 mL
- Pipetas volumétricas.

Sustancias

- Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)
- hidróxido de potasio
- Acetonitrilo

5. PROCEDIMIENTO

Establecer la precisión del método, analizando 6 muestras (principio activo + placebo) provenientes de una misma mezcla homogénea o de la misma solución madre. Realizar el análisis en un mismo laboratorio, por un mismo analista, usando el mismo equipo en un mismo día. se determina en este caso solamente las diferencias producidas por el método empleado.

- Preparar las 6 muestras de acuerdo al procedimiento de análisis y determinar la respuesta de cada una (3 inyecciones de cada muestra por HPLC).
- Obtener las respuestas y determinar la concentración de activo presente en cada muestra. (24) (25)

6. ESPECIFICACIONES

- Usar la solución estándar tan pronto sea preparada.
- **Condiciones Cromatográfica:**

| | |
|----------------|---|
| Fase móvil | Diluyente: Acetonitrilo (96: 40) Lichrospher 100 RP 18, 12.5 cm, |
| Columna | 5 μ |
| Flujo | 1,5 ml/min |
| Detector | 230 nm |
| Vol. Inyección | 20 μ l |

7. REGISTRO

El analista deberá codificar las muestras, deberá indicar cualquier desviación durante el análisis. Documentar los resultados y archivar en la respectiva carpeta de validación para su posterior revisión y aprobación.

8. REFERENCIAS

USP 28 -NF 23; Brithish Pharmacopoeia 2002 (BP 2002); Ph. Eur. 3; Método General (MG)

2.3.4 PRECISIÓN ENTRE ANALISTAS

1. OBJETIVO

Establecer la repetitibilidad midiendo la precisión entre analistas. (24)

2. ALCANCE

El presente IT debe ser aplicado cuando se requiera analizar la variación producida entre analistas.

3. RESPONSABILIDADES

Analistas de validación: valoraciones de las muestras homogéneas provenientes de la misma muestra madre y preparadas como indica el procedimiento de análisis, cada uno por separado, en un mismo equipo, en el mismo laboratorio y el mismo día de análisis.

4. REQUERIMIENTOS

Equipos

- HPLC
- Balanza Analítica

Materiales

- Balón aforado 25mL
- Balón aforado 100 mL
- Balón aforado 200 mL
- Pipetas volumétricas.

Sustancias

- Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)
- hidróxido de potasio
- Acetonitrilo

5. PROCEDIMIENTO

Establecer la precisión intermedia, analizando 6 muestras provenientes de una misma mezcla homogénea o de la misma solución madre, en un mismo laboratorio, el mismo día, usando el mismo equipo y entre 2 analistas diferentes.

Se determina en este caso solamente las diferencias producidas por los analistas.

A partir de una muestra homogénea o de la misma solución madre, preparar 6 muestras como lo indica el procedimiento de análisis. De cada muestra realizar como mínimo 3 inyecciones HPLC.

Las respuestas obtenidas corresponderán a los datos para el analista 1.

El mismo día repetir el procedimiento anterior pero realizado por otro analista.

Los dos analistas deben preparar las diluciones el mismo día y a partir de la misma muestra homogénea o de la misma solución madre.

Calcular un coeficiente de variación global para todos los datos.

Cantidad a pesar (24)

6. ESPECIFICACIONES

- Usar la solución estándar tan pronto sea preparada.
- Condiciones Cromatográfica:

| | |
|----------------|---|
| Fase móvil | Diluyente: Acetonitrilo (96: 40) Lichrospher 100 RP 18, 12.5 cm, |
| Columna | 5µ |
| Flujo | 1,5 mL/min |
| Detector | 230 nm |
| Vol. Inyección | 20 µl |

7. REGISTRO

El analista deberá codificar las muestras, deberá indicar cualquier desviación durante el análisis. Documentar los resultados y archivar en la respectiva carpeta de validación para su posterior revisión y aprobación.

8. REFERENCIAS

USP 28 -NF 23; Brithish Pharmacopoeia 2002 (BP 2002); Ph. Eur. 3; Método General (MG)

2.3.5 PRECISIÓN ENTRE DÍAS

1. OBJETIVO

Establecer la repetitibilidad midiendo la precisión entre días de análisis.

2. ALCANCE

El presente IT debe ser aplicado cuando se requiera analizar la variación producida entre días de análisis.

3. RESPONSABILIDADES

Analistas de validación: valoraciones de las muestras homogéneas provenientes de la misma muestra madre y preparadas como indica el procedimiento de análisis, en un mismo equipo, en el mismo laboratorio, pero en diferentes días de análisis.

4. REQUERIMIENTOS

Equipos

- HPLC
- Balanza Analítica

Materiales

- Balón aforado 25mL
- Balón aforado 100 mL
- Balón aforado 200 mL
- Pipetas volumétricas.

Sustancias

- Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)
- hidróxido de potasio
- Acetonitrilo

5. PROCEDIMIENTO

Establecer la precisión intermedia, analizando 6 muestras provenientes de una misma mezcla homogénea o de la misma solución madre, en un mismo laboratorio, el mismo día, usando el mismo equipo. Se determina en este caso solamente las diferencias producidas en los días de análisis.

A partir de una muestra homogénea o de la misma solución madre, preparar 6 muestras como lo indica el procedimiento de análisis. De cada muestra realizar como mínimo 3 inyecciones HPLC.

Las respuestas obtenidas corresponderán a los datos para el día de análisis 1.

Repetir el mismo procedimiento pero en el día de análisis 2.

Los dos días de análisis no deben ser necesariamente consecutivos, pero el procedimiento debe ser seguido por un solo analista y a partir de la misma muestra homogénea y a partir de la misma solución madre.

Calcular un coeficiente de variación global para todos los datos.

Cantidad a pesar: 250mg (p.a.)

peso del estándar: 25mg

Primera dilución: 200ml

primera dilución: 25ml

Segunda dilución: 10/100ml

segunda dilución: 10/100

6. ESPECIFICACIONES

- Usar la solución estándar tan pronto sea preparada.
- Condiciones Cromatográfica:

| | |
|----------------|----------------------------------|
| Fase móvil | Diluyente: Acetonitrilo (96: 40) |
| Columna | Lichrospher 100 RP 18, 12.5 cm, |
| Flujo | 5 μ |
| Detector | 1,5 mL/min |
| Vol. Inyección | 230 nm |
| | 20 μ l |

7. REGISTRO

El analista deberá codificar las muestras, deberá indicar cualquier desviación durante el análisis. Documentar los resultados y archivar en la respectiva carpeta de validación para su posterior revisión y aprobación.

8. REFERENCIAS

GUIA PARA VALIDACION DE METODOS DE ENSAYO 26-09-2003 ICH

2.3.6 EXACTITUD / PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN:

1. OBJETIVO

Determinar la capacidad el procedimiento de análisis para presentar valores de concentración del principio activo muy cercanos al valor teórico o real.

2. ALCANCE

El presente IT debe ser aplicado cuando se requiera analizar la relación que existe entre el valor teórico y real.

3. RESPONSABILIDADES

Analista de validación: preparar frascos de Amoxicilina en polvo para suspensión oral como consta en el procedimiento de elaboración del producto, variando la concentración etiquetada entre un 50 a un 150%.

4. REQUERIMIENTOS

Equipos

- HPLC
- Balanza Analítica

Materiales

- Balón aforado 25mL
- Balón aforado 100 mL
- Balón aforado 200 mL
- Pipetas volumétricas.
- Frascos ámbar
- Espátula.

Sustancias

- Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)
- hidróxido de potasio
- Acetonitrilo
- Excipientes

5. PROCEDIMIENTO

- Preparar una muestra homogénea de placebo.
- Preparar 5 muestras adicionando cantidades conocidas de principio activo dentro del rango de concentración, comprendido generalmente entre el 50% y el 150% de la cantidad rotulada.
- Variar la concentración del placebo proporcionalmente en cada muestra.

- Analizar cada muestra realizando como mínimo 3 inyecciones de cada muestra (HPLC).
- Preparar un estándar de concentración correspondiente al 100% y analizarlo de acuerdo al procedimiento.
- Calcular el porcentaje de recuperación como base en la comparación entre las concentraciones halladas y las concentraciones adicionadas.
- Con base en los resultados obtenidos calcular el promedio del porcentaje de recuperación para todos los niveles de concentración, la desviación estándar de los datos y el coeficiente de variación.

6. ESPECIFICACIONES

- Usar la solución estándar tan pronto sea preparada.
- Realizar un pesaje lo más exacto posible para minimizar los errores.
- Condiciones Cromatográfica:

| | |
|----------------|--|
| Fase móvil | Diluyente: Acetonitrilo (96: 40) |
| Columna | Lichrospher 100 RP 18, 12.5 cm, 5 μ |
| Flujo | 1,5 mL/min |
| Detector | 230 nm |
| Vol. Inyección | 20 μ l |

7. REGISTRO

El analista deberá codificar las muestras, deberá indicar cualquier desviación durante el análisis.

Elaborar las muestras tal como consta en el protocolo de manufactura del producto.

Documentar los resultados y archivar en la respectiva carpeta de validación para su posterior revisión y aprobación.

8. REFERENCIAS

GUIA PARA VALIDACION DE METODOS DE ENSAYO 26-09-2003 ICH

2.3.7 LINEALIDAD.

1. OBJETIVO

Determinar si existe proporcionalidad entre las concentraciones del estándar y su respuesta.

2. ALCANCE

El presente IT debe ser aplicado cuando se requiera verificar la proporcionalidad entre concentraciones añadidas y su respuesta.

3. RESPONSABILIDADES

Analista de validación: preparar las muestras a analizar variando su concentración entre u 50 y 150% del estándar.

4. REQUERIMIENTOS

Equipos

- HPLC
- Balanza Analítica

Materiales

- Balón aforado 25mL
- Balón aforado 100 mL
- Balón aforado 200 mL
- Pipetas volumétricas.

Sustancias

- Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)
- Hidróxido de potasio
- Acetonitrilo

5. PROCEDIMIENTO

- Determinar la respuesta por triplicado de una serie de 5 diluciones del estándar, cuyas concentraciones estén entre 50 y 150% de la cantidad establecida en el procedimiento de análisis.
- Analizarlas de acuerdo al procedimiento de análisis y determinar las respuestas respectivas.
- Determinar la curva de regresión de áreas versus concentración.
- Determinar la pendiente (b) y el intercepto (a) y el coeficiente de correlación.
- Definir la ecuación de la recta. $y = mx + b$

6. ESPECIFICACIONES

- Usar la solución estándar tan pronto sea preparada.
- Realizar un pesaje lo más exacto posible para minimizar los errores.
- Condiciones Cromatográfica:

| | |
|----------------|---|
| Fase móvil | Diluyente: Acetonitrilo (96: 40) Lichrospher 100 RP 18, 12.5 cm, |
| Columna | 5µ |
| Flujo | 1,5 mL/min |
| Detector | 230 nm |
| Vol. Inyección | 20 µl |

7. REGISTRO

El analista deberá codificar las muestras, deberá indicar cualquier desviación durante el análisis.

Documentar los resultados y archivar en la respectiva carpeta de validación para su posterior revisión y aprobación.

8. REFERENCIAS

GUIA PARA VALIDACION DE METODOS DE ENSAYO 26-09-2003 ICH

2.3.8 ROBUSTEZ

1. OBJETIVO

Investigar la influencia de algún cambio en las condiciones analíticas sobre la fiabilidad del método analítico, localizando factores que originan fluctuaciones menores y lo que necesitan una atención especial por cuanto son origen de variaciones significativas.

2. ALCANCE

El presente IT debe ser aplicado cuando se requiera verificar posibles puntos críticos dentro del proceso de análisis.

3. RESPONSABILIDADES

Analista de validación: tomar la decisión sobre cual es el factor a modificar en la verificación de la robustez del método.

4. REQUERIMIENTOS

Equipos

- HPLC
- Balanza Analítica

Materiales

- Balón aforado 25mL
- Balón aforado 100 mL
- Balón aforado 200 mL
- Pipetas volumétricas.

Sustancias

- Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)
- Hidróxido de potasio
- Acetonitrilo

5. PROCEDIMIENTO

- Especificar la variable con la cual se probará la robustez del método. Se variará el flujo (pasando de un flujo de 1,5 ml /min a uno de 1,65ml /min).
- Determinar la respuesta de 6 muestras (3 inyecciones de cada muestra) como lo indica el procedimiento en condiciones normales y de manera similar determinar la respuesta de la misma muestra aplicando el cambio a ser evaluado (condición alternativa).
- Hallar el coeficiente de variación global entre las respuestas obtenidas en las condiciones normales y las medidas obtenidas con la condición alterna.
- Con base a los resultados obtenidos establecer si la variable es crítica en el desarrollo de la metodología.

6. ESPECIFICACIONES

- Usar la solución estándar tan pronto sea preparada.
- Tener cuidado con la nueva presión, monitorearla hasta que esta se estabilice.
- Condiciones Cromatográfica:

| | |
|----------------|---|
| Fase móvil | Diluyente: Acetonitrilo (96: 40) Lichrospher 100 RP 18, 12.5 cm, |
| Columna | 5µ |
| Flujo | 1,5 mL/min a 1.65mL/min |
| Detector | 230 nm |
| Vol. Inyección | 20 µl |

7. REGISTRO

El analista deberá codificar las muestras, deberá indicar la desviación deliberada durante el análisis y monitorear que la presión sea estable.

Documentar los resultados y archivar en la respectiva carpeta de validación para su posterior revisión y aprobación.

8. REFERENCIAS

USP 28 -NF 23; British Pharmacopoeia 2002 (BP 2002); Ph. Eur. 3; Método General (MG)

CAPITULO III**3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN****CUADRO No. 1. ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO FRENTE A LOS PARÁMETROS EVALUADOS.**

| PARÁMETRO EVALUADO | RESULTADOS |
|---|----------------------------|
| Interferencias encontradas con fase móvil | No presenta Interferencias |
| Interferencias encontradas con el solvente | No presenta Interferencias |
| Interferencias encontradas con el placebo | No presenta Interferencias |
| Interferencias encontradas por degradación ácida | No presenta Interferencias |
| Interferencias encontradas por degradación básica. | No presenta Interferencias |
| Interferencias encontradas por degradación térmica | No presenta Interferencias |
| Interferencias encontradas por degradación a T ambiente | No presenta Interferencias |

Los parámetros evaluados en especificidad no muestran ninguna interferencia con el pico normal de amoxicilina, por ejemplo el solvente, fase móvil, diluyente y placebo no muestran ningún pico en el corrido de la muestra, en cuanto a la degradación por calor y en medios ácido y básico los picos obtenidos no son significativos en relación al estándar de amoxicilina.

CUADRO No. 2. ANÁLISIS DE LA PRECISIÓN DEL SISTEMA, MUESTRA DE ESTÁNDAR UTILIZADO EN EL ANÁLISIS DE AMOXICILINA EN POLVO PARA SUSPENSIÓN. REALIZADO EN EL LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD, EMPRESA FARMACEUTICA BETAPHARMA, QUITO, 2010.

| MUESTRA | RESPUESTA |
|------------------------|-----------|
| 1 | 434660 |
| 2 | 446433 |
| 3 | 435107 |
| 4 | 434202 |
| 5 | 434234 |
| 6 | 434656 |
| PROMEDIO | 436548,66 |
| SD | 4853,70 |
| RSD | 1,11 |
| CRITERIO DE ACEPTACIÓN | RSD < 2,8 |

Como podemos ver en el cuadro número 2 hemos realizado 6 inyecciones consecutivas del estándar utilizado para la valoración de Amoxicilina en polvo para suspensión. Se tomó un peso de 30.1mg de estándar, con humedad de 13.22% y 99.1% de pureza. Obtuvimos un promedio de las áreas, la desviación estándar SD y la desviación estándar relativa RSD con la que comparamos el criterio de aceptación que en éste caso es de 2.8. El RSD resultante del análisis es 1.11 que está dentro del valor de referencia.

CUADRO No. 3. ANÁLISIS DE LA PRECISIÓN DEL MÉTODO UTILIZADO PARA LA VALORACIÓN DE AMOXICILINA EN POLVO PARA SUSPENSIÓN ORAL, REALIZADA EN EL LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD, EMPRESA FARMACEUTICA BETAPHARMA, QUITO, 2010.

| MUESTRA | PESO ACTIVO mg | RESPUESTA | PROMEDIO | CONCENTRACIÓN mg/5ml | PORCENTAJE de p.a. en la muestra |
|---------|----------------|------------------------|-------------|----------------------|----------------------------------|
| 1 | 250 | 622038 | 659838,6667 | 237,89 | 95,16 |
| | | 681250 | | | |
| | | 676228 | | | |
| 2 | 250 | 626427 | 659320,6667 | 237,67 | 95,07 |
| | | 675479 | | | |
| | | 676056 | | | |
| 3 | 250 | 676551 | 668704,6667 | 241,08 | 96,43 |
| | | 675906 | | | |
| | | 653657 | | | |
| 4 | 250 | 655116 | 661296 | 238,41 | 95,36 |
| | | 664143 | | | |
| | | 664629 | | | |
| 5 | 250 | 613285 | 642874 | 231,76 | 92,7 |
| | | 639570 | | | |
| | | 675767 | | | |
| 6 | 250 | 653125 | 652992,6667 | 235,41 | 94,16 |
| | | 654189 | | | |
| | | 651664 | | | |
| | | PROMEDIO CONCENTRACIÓN | | 237,036 | |
| | | SD CONCENTRACIÓN | | 3,15 | |
| | | RSD CONCENTRACIÓN | | 1,33 | |
| | | CRITERIO DE ACEPTACIÓN | | RSD < 3,9 | |

En el cuadro número 3 vemos un proceso detallado donde se analizaron 6 muestras provenientes de la misma muestra madre, cada una se inyectó por triplicado obteniendo un promedio de áreas con las cuales calculamos la concentración de cada una con respecto a un estándar. Hallamos un promedio, SD y RSD. El valor obtenido fue de 1.33 el cual está por debajo del valor de referencia para éste análisis.

CUADRO No. 4. ANÁLISIS DE LA PRECISIÓN ENTRE ANALISTAS EN LA VALORACIÓN DE AMOXICILINA PARA SUSPENSIÓN ORAL, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD, EMPRESA FARMACEUTICA BETAPHARMA, QUITO, 2010

| ANALISTA 1 | | ANALISTA 2 | | | |
|------------|-----------|-------------------------|-----------|-----------|-------------------------------------|
| | | CONCENTRACIÓN mg/5ml | | | CONCENTRACIÓN mg/5ml |
| RESPUESTA | PROMEDIO | PORCENTAJE | RESPUESTA | PROMEDIO | PORCENTAJE de p.a. en la muestra |
| 622038 | 659838,67 | 237,89 95,16 | 623203 | 623503 | 224,79 90 |
| 681250 | | | 626642 | | |
| 676228 | | | 620664 | | |
| 626427 | 659320,67 | 237,669 95,07 | 652102 | 645734,33 | 232,8 93,12 |
| 675479 | | | 610905 | | |
| 676056 | | | 674196 | | |
| 676551 | 668704,67 | 241,08 96,43 | 643028 | 647153,33 | 233,31 93,32 |
| 675906 | | | 656669 | | |
| 653657 | | | 641763 | | |
| 655116 | 661296 | 238,41 95,36 | 669185 | 671677,67 | 242,15 96,81 |
| 664143 | | | 674789 | | |
| 664629 | | | 671059 | | |
| 613285 | 642874 | 231,76 92,7 | 666479 | 665797,33 | 240,03 96,01 |
| 639570 | | | 662623 | | |
| 675767 | | | 668290 | | |
| 653125 | 652992,67 | 235,41 94,16 | 635759 | 650880,33 | 234,66 93,86 |
| 654189 | | | 686090 | | |
| 651664 | | | 630792 | | |
| PROM | | 237,03 | PROM | | 234,62 |
| SD | | 3,15 | SD | | 2,41 |
| RSD | | 1,33 | RSD | | 1,02 |

| | |
|------------------------|-----------|
| PROM CONCENTRACIÓN | 235,82 |
| SD GLOBAL | 4,81 |
| RSD GLOBAL | 2,04 |
| CRITERIO DE ACEPTACIÓN | RSD < 3,9 |

Como podemos ver en el cuadro numero 4 se presenta el mismo procedimiento de análisis de 6 muestras preparadas y analizadas por diferentes analistas en un mismo día, en este caso

se toma en cuenta la desviación estándar relativa RSD Global la cual es 2.041 para este análisis, el criterio de aceptación es menor a 3.9 así que cumple en cuanto a la precisión entre analistas.

CUADRO No. 5. ANÁLISIS DE LA PRECISIÓN ENTRE ANALISTAS EN LA VALORACIÓN DE AMOXICILINA PARA SUSPENSIÓN ORAL, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD, EMPRESA FARMACEUTICA BETAPHARMA, QUITO, 2010.

| ANALISTA 1 DIA 1 | | | ANALISTA 1 DIA 2 | | |
|------------------|-----------------------|---------------------------------------|------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| RESPUESTA | PROMEDIO | CONCENTRACIÓN mg/5ml PORCENTAJE | RESPUESTA | PROMEDIO | CONCENTRACIÓN mg/5ml PORCENTAJE |
| 622038 | 659838,67 | 237,89 | 635100 | 635651,33 | 230,89 |
| 681250 | | 95,16% | 634531 | | 92,36% |
| 676228 | | | 637323 | | |
| 626427 | 659320,67 | 237,669 | 670295 | 667879,33 | 242,6 |
| 675479 | | 95,07% | 670063 | | 97,04% |
| 676056 | | | 663280 | | |
| 676551 | 668704,67 | 241,08 | 669402 | 669516,67 | 243,2 |
| 675906 | | 96,43% | 671322 | | 97,28% |
| 653657 | | | 667826 | | |
| 655116 | | | 665333 | | |
| 664143 | 661296 | 238,41 | 655950 | 654119,33 | 237,6 |
| 664629 | | 95,36% | 641075 | | 95,04% |
| 613285 | 642874 | 231,76 | 661603 | 661828,33 | 240,4 |
| 639570 | | 92,70% | 657146 | | 96,16% |
| 675767 | | | 666736 | | |
| 653125 | 652992,67 | 235,41 | 661636 | 664949,67 | 241,54 |
| 654189 | | 94,16% | 662422 | | 96,62% |
| 651664 | | | 670791 | | |
| | PROM CONCENTRACIÓN | 237,03 | | PROM CONCENTRACIÓN | 239,37 |
| | SD | 3,15 | | SD | 4,6 |
| | RSD | 1,33 | | RSD | 1,92 |

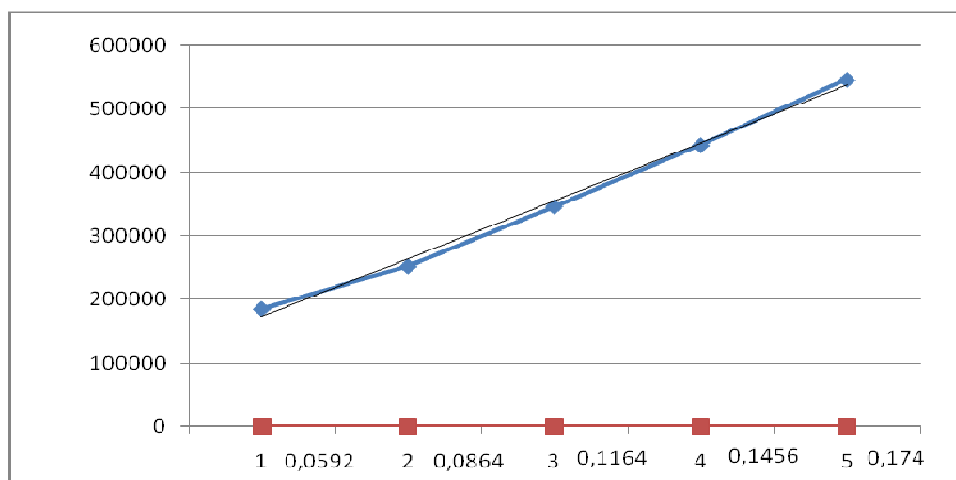
| | |
|------------------------|-----------|
| PROM DÍAS | 238,20 |
| SD GLOBAL DÍAS | 3,95 |
| RSD GLOBAL DÍAS | 1,66 |
| CRITERIO DE ACEPTACIÓN | RSD < 3,9 |

El cuadro número 5 muestra el mismo procedimiento de análisis de 6 muestras preparadas desde una misma muestra homogénea y analizadas por un mismo analista pero en diferentes días, con lo que se busca verificar que el método es preciso entre días de análisis, en este caso la desviación estándar relativa RSD Global es 1.66, el criterio de aceptación es menor a 3.9 así que cumple con el parámetro de control.

CUADRO No. 6. ANÁLISIS DE LA LINEALIDAD QUE PRESENTA EL MÉTODO EN CUANTO AL PORCENTAJE DE ESTÁNDAR AÑADIDO Y LA RESPUESTA QUE ÉSTE PRESENTA EN LA VALORACIÓN DE AMOXICILINA PARA SUSPENSIÓN ORAL, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD, EMPRESA FARMACEUTICA BETAPHARMA, QUITO, 2010

| % DE ESTÁNDAR | CONCENTRACIÓN mg/ml | PROMEDIO | RESP (Y) | PROMEDIO |
|---------------|------------------------|----------|----------|-------------|
| 50 | 0,0585 | 0,0592 | 187532 | 185803,6667 |
| | 0,0593 | | 185333 | |
| | 0,0597 | | 184546 | |
| 75 | 0,0863 | 0,0864 | 250869 | 252786,3333 |
| | 0,0863 | | 253900 | |
| | 0,0867 | | 253590 | |
| 100 | 0,1173 | 0,1164 | 347494 | 346812 |
| | 0,116 | | 346749 | |
| | 0,116 | | 346193 | |
| 125 | 0,145 | 0,1456 | 443101 | 443092,3333 |
| | 0,1457 | | 441696 | |
| | 0,1459 | | 444480 | |
| 150 | 0,1744 | 0,174 | 546289 | 545849,6667 |
| | 0,174 | | 546031 | |
| | 0,174 | | 545229 | |

GRAFICO N: 2 Linealidad del método entre el porcentaje de estándar adicionado y la respuesta producida.



La ecuación que presenta la recta es: $y = 91040x + 81749$

Y su $R^2 = 0,994$

El cuadro número 6 muestra la preparación de soluciones estándar a diferentes concentraciones, inyectadas por triplicado, los datos de la curva de regresión lineal permite concluir que el sistema es lineal en un rango de concentración entre 0,0592mg/ml y 0,174 mg/ml, correspondientes al rango de concentración del 50% al 150% de la cantidad propuesta.

CUADRO No. 7. ANALISIS DE LA RECUPERACIÓN DEL MÉTODO UTILIZADO EN LA VALORACIÓN DE AMOXICILINA PARA SUSPENSIÓN ORAL, REALIZADO EN EL LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD, EMPRESA FARMACEUTICA BETAPHARMA, QUITO, 2010.

| P.A. EN LA MUESTRA (%) | RESPUESTA | PROMEDIO | CONCENT HALLADA (mg/ml) | % de RECUPERACIÓN |
|------------------------|-----------|-------------|-------------------------|-------------------|
| 50 | 309323 | 317359 | 122,76 | 98,2 |
| | 318377 | | | |
| | 324377 | | | |
| 75 | 440774 | 457626 | 177,01 | 94,4 |
| | 483709 | | | |
| | 448395 | | | |
| 100 | 650926 | 648693,6667 | 250,92 | 100,3 |
| | 637298 | | | |
| | 657857 | | | |
| 125 | 825404 | 806821,3333 | 312,09 | 99,9 |
| | 838420 | | | |
| | 756640 | | | |
| 150 | 878540 | 939246,6667 | 363,31 | 96,88 |
| | 997580 | | | |
| | 941620 | | | |
| PROM RECUPERACIÓN | | | | 97,93 |
| SD | | | | 2,40 |
| RSD | | | | 2,45 |
| CRITERIO DE ACEPTACIÓN | | | | < 2,5 |

El cuadro número 7 muestra la preparación de 15 frascos de Amoxicilina en polvo para suspensión siguiendo el protocolo de fabricación, variando en éste el porcentaje de Amoxicilina, el procedimiento se lo hace por triplicado y se hace una inyección por cada uno. Con base en los resultados obtenidos en cuanto a promedio y coeficiente de variación, se concluye que el método es exacto dentro de las concentraciones evaluadas (122,76 mg/ml - 363,31mg/ml) del producto.

CUADRO No. 8. ANÁLISIS DE LA ROBUSTEZ QUE PRESENTA EL MÉTODO UTILIZADO EN LA VALORACIÓN DE AMOXICILINA PARA SUSPENSIÓN ORAL FRENTE A UN CAMBIO DELIBERADO EN ALGUNO DE SUS PARÁMETROS, EN ÉSTE CASO HEMOS AUMENTADO EL FLUJO EN UN 10%. REALIZADO EN EL LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD, EMPRESA FARMACEUTICA BETAPHARMA, QUITO, 2010

| CONDICIÓN NORMAL | | CONCENTRACIÓN mg/5ml | FLUJO + 10% | | CONCENTRACIÓN mg/5ml |
|------------------|------------|----------------------|-------------|-------------|----------------------------------|
| RESPUESTA | PROMEDIO | PORCENTAJE | RESPUESTA | PROMEDIO | PORCENTAJE de p.a. en la muestra |
| 635100 | 635651,333 | 230,89 | 561259 | 562442,6667 | 239,22 |
| 634531 | | 92,36% | 561830 | | 95,70% |
| 637323 | | | 564239 | | |
| 670295 | 667879,333 | 242,6 | 570564 | 571415,6667 | 243,04 |
| 670063 | | 97,04% | 569310 | | 97,22% |
| 663280 | | | 574373 | | |
| 669402 | 669516,667 | 243,2 | 574412 | 574370,3333 | 244,3 |
| 671322 | | 97,28% | 574472 | | 97,72% |
| 667826 | | | 574227 | | |
| 665333 | 654119,333 | 237,6 | 566249 | 568323 | 241,72 |
| 655950 | | 95,04% | 568391 | | 96,69% |
| 641075 | | | 570329 | | |
| 661603 | 661828,333 | 240,4 | 570291 | 570487 | 242,65 |
| 657146 | | 96,16% | 570450 | | 97,06% |
| 666736 | | | 570720 | | |
| 661636 | 664949,667 | 241,54 | 569320 | 569450 | 242,2 |
| 662422 | | 96,62% | 569418 | | 96,88% |
| 670791 | | | 569612 | | |
| | PROM | 239,37 | | PROM | 242,18 |
| | SD | 4,60 | | SD | 1,69 |
| | RSD | 1,92 | | RSD | 0,70 |

| | |
|---------------------------|-----------|
| PROM CONCENTRACIÓN GLOBAL | 240,78 |
| DESV EST GLOBAL | 3,61 |
| RSD GLOBAL | 1,5 |
| CRITERIO DE ACEPTACIÓN | RSD < 3,9 |

En el cuadro número 8 podemos ver la respuesta que presentan en condición normal de flujo 6 muestras inyectadas cada una por triplicado y su respectiva concentración en miligramos por mililitro, su promedio, variación estándar y variación estándar relativa, la cual es de 1.92. En la parte derecha vemos las mismas muestras analizadas con un flujo aumentado en un 10%, las áreas, incluyendo las del estándar disminuyen, las concentraciones varían y se produce una menor RSD de 0,7. La RSD GLOBAL que es la que debemos tomar en cuenta es de 1,5 la cual está por debajo del límite establecido de 3,9 para éste análisis.

CAPITULO IV

4. CONCLUSIONES

Se logró:

1. Validar el Método Analítico de valoración de Amoxicilina en polvo para suspensión oral fabricado por Betapharma S.A. mediante HPLC
2. Verificar que el método analítico utilizado para la valoración de Amoxicilina en polvo para suspensión oral mediante HPLC, cumple con los requerimientos para los que fue diseñado, esto fue establecido gracias a diferentes parámetros y los resultados fueron satisfactorios para todos los análisis para la precisión del método se obtuvo un RSD de 1,33 por debajo del límite de 3,9 permitido. En cuanto a la precisión entre días, se obtuvo un RSD de 2,04 por debajo de 3,9 que es el límite permitido. Con respecto a la precisión entre analistas se obtuvo un RSD de 1,66 que está por debajo del límite permitido que es de 3,9. En la determinación de la linealidad se obtuvo un R2 de 0,994 que está por arriba del 0,99 planteado inicialmente. En la determinación de la recuperación del método se obtuvo un porcentaje de 97,94% que está dentro de los parámetros establecidos entre 97,5% y 102,5%. En cuanto a la robustez del método se obtuvo un RSD de 1,5 que se encuentra por debajo de 3,9 que es el límite permitido.

3. Documentar los procedimientos de validación para la implementación clara e inequívoca del método.
4. Demostrar mediante estudios de laboratorio que los parámetros de desempeño de los equipos están dentro de su especificación, ya que el resultado obtenido para la precisión del sistema fue de $RSD = 1,11$ por debajo de 2,8 que es el límite permitido.
5. Establecer un instructivo escrito para la empresa Betapharma referente a la validación del método analítico en la manufactura de Amoxicilina en polvo para suspensión oral, para asegurar que los resultados sean confiables, reproducibles y que se encuentren dentro del rango de trabajo establecido. El instructivo constó de un protocolo de validación y las respectivas técnicas, para asegurar que los resultados sean confiables, reproducibles y que se encuentren dentro del rango de trabajo establecido

CAPITULO V

5. RECOMENDACIONES

1. Bajo ninguna circunstancia refrigerar la muestra antes de analizar ya que podría producirse una degradación de principio activo, ya que la molécula es inestable frente a la temperatura y conllevaría a una lectura errónea.
2. Inyectar las muestras lo más pronto posible ya que si se dejan a la intemperie podrían sufrir degradaciones por la luz, ya que es una molécula fotosensible.
3. Tener extremo cuidado en el pesaje de principio activo o estándar utilizado ya que el equipo de HPLC tiene una gran sensibilidad y cualquier error por pequeño que parezca tendrá su efecto en la concentración calculada.
4. Es sumamente importante que las columnas tengan un buen proceso de lavado antes de su almacenaje o posterior uso, ya que cuando éste no realiza por un tiempo ideal los picos cromatográficos tienen una distorsión que hace imposible realizar un análisis correcto y el posterior cálculo de concentración.

5. El proceso de análisis debe ser documentado en forma minuciosa para que no exista ambigüedades y otro analista sea capaz de reproducir el método con facilidad.

6. El instructivo de validación debe ser elaborado conjuntamente con el departamento de control de calidad, el de aseguramiento de calidad y el analista que realizó la validación para que se tomen en cuenta todos los criterios.

CAPITULO VI

6 RESUMEN

El objetivo de la investigación es, validar el método analítico usado en la valoración de Amoxicilina en polvo para suspensión oral fabricado por la Empresa Farmacéutica Betapharma S.A. de la ciudad de Quito, usando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, con el fin de verificar la calidad en lo referente a dosis de principio activo, para lo cual se analizaron varios parámetros establecidos por organismos internacionales, como precisión del sistema, obteniendo una RSD de 1.11 por debajo del límite de 2.8 para la precisión del método se obtuvo un RSD de 1,33 por debajo del límite de 3,9 permitido. Referente a la precisión entre días, se obtuvo un RSD de 2,04 por debajo de 3,9 que es el límite permitido. Referente a la precisión entre analistas se obtuvo un RSD de 1,66 por debajo del límite permitido de 3,9. En la determinación de la linealidad se obtuvo un R² de 0,994 por arriba del 0,99 planteado inicialmente. En la determinación de la recuperación del método se obtuvo un porcentaje de 97,94% que está dentro de los parámetros establecidos entre 97,5% y 102,5%. En cuanto a la robustez del método se obtuvo un RSD de 1,5 por debajo de 3,9 que es el límite permitido. Los resultados encontrados se encuentran dentro de los parámetros establecidos. En conclusión el método analítico usado en la valoración de Amoxicilina en polvo para suspensión oral fabricado por la Empresa Farmacéutica Betapharma S.A. fue validado. Por lo tanto se recomienda su aplicación para garantizar la calidad de sus medicamentos.

CAPITULO VII

7. BIBLIOGRAFIA

1. **ALBU, R.** 1998. Amoxicillin: a pharmacologic description 3ra.ed. Canada. Bioline. pp 26-32
2. **THE OFFICE PUBLICATIONS OF THE EUROPEAN COMMUNITY INFORMATION SERVICE**, 1990. The Rules of Governing Medicinal Products in the European Community. Washington D.C.. volumen 3A. pp. 1-16.
3. **BLOCK, S.** 1999 Strategies for dealing with amoxicillin failure in acute otitis media. **Arch Fam Med.** Boston. pp. 68-78
4. **BRUNTON L, PARKER K.** 2006. ISBN 9701057392. (Folleto)
5. **CALPENA, A.** et al. 1991. Validación de los métodos analíticos. Buenos Aires Farm Clin. pp.749-758.
6. **CAMACHO, M.**et al. 1993 Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products. ATP Pharma Practique. Suecia. pp.197-202.
7. **COMELLAS L.** 1994. Desarrollo de métodos en HPLC. Instituto Químico de Sarria, 2da Ed. Barcelona. BIS. pp. 68- 89.
8. **COMISIÓN PERMANENTE DE LA FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS.** 1991. Métodos Analíticos Validación. México: Secretaría de Salud. pp. 73-123 (Folleto)

9. **COUNCIL DIRECTIVE EEC ON THE SUBJECT OF ADDITIONAL**
1993 Measures Concerning the Official Control of Foodstuffs, pp.290-312 (Folleto).
10. **COVENIN 2534:2000** (iso/iec 17025:1999. Requisites generals para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Washington DC. Norma
11. **COVENIN ISO 9000:2000**. Sistemas de gestión de la calidad. Fundamentos vocabulario. Washington DC. Norma.
12. **DESAIN, C.** 1992. Master method validation protocols. Suecia. Biopharm. pp 30-48
13. **DOWELL, S.** et al. 1999. Acute otitis media: management and surveillance in an era of pneumococcal resistance--a report from the drug-resistant streptococcus pneumoniae therapeutic working group. **Pedía Dis.** pp.1-19.
14. **EURACHEM/CITAC GUIDE.** 1998. The fitness for purpose of analytical methods. Ginebra. (Folleto)
15. **FARMACOPEIA EUROPEA** 1991. Ministerio de Sanidad y Consumo. 2ed. Madrid. pp. 1241 1255
16. **FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** 1987. Center for Drugs and Biologics, Department of Health and Human Service. Guideline for Submitting Samples and Analytical Data for Method Validation. Norma
17. **GELWICKS, J.** 2003. **Guideline for Validation of Analytical Methods** (Folleto)
18. **GUIA PARA VALIDACION DE METODOS DE ENSAYO** 26-09-2003. Colorado.
www.eurachem.org
02-12-2010
19. **HARMONISED GUIDELINES** For Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories”2000, Oslo (Folleto)

20. **HARMONISED GUIDELINES** for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement”2001 Hannover. (Folleto).
21. **HORTWITZ W.** 1982. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs.2da ED. Bonn. Anal Chem pp. 54. 67
22. **HORWITZ,** 1995. Pure Appl. Chem.2da Ed.Washington. Mc.graw. pp. 855 864.
23. **HORWITZ, P.** 1988. Appl. Chem. pp 855 864, revisado W. Horwitz, Pure Appl. Chem., 3ra Ed.Washington. Mc.graw 795-855
24. **INSTRUCTIVO DE TRABAJO 0501-02-01.1 Betapharma. Quito. 2010.**
25. **INSTRUCTIVO DE TRABAJO 0503-02-01.1 Betapharma. Quito. 2010.**
26. **ISO GUIDE 88402.** ISO, International Organization for Standarization: Quality-Vocabulary, Ginebra, 1994. (Folleto).
27. **KIRSCH, B.** 1998. Validation of Analytical Methods used in Pharmaceutical Cleaning Assessment and Validation. Pharma Technol. Misisipi. BIOLIB. pp. 11-22, 41-67.
28. **M THOMPSON Y R WOOD, P.** 1993. Laboratories, Appl. Chem. Mc Graw. pp .2123-2144.
29. **MARTIN-SMITH M, RUDD DR.** 1990. The importance of proper validation of the analytical methods employed in the quality control of pharmaceuticals. Acta Pharm Jugosl. pp. 7-19.
30. **MENSA J, GATELL J M^a, AZANZA J R,** et al. 2008. Guía de terapéutica antimicrobiana Elsevier Doyma. ISBN 978-984.
31. **MICHAEL THOMPSON Y ROGER WOOD, J.** 1995. Pure & Applied Chemistry. Boston. Julius. pp. 49-56.
32. **MICHAEL THOMPSON, STEPHEN ELLISON, ALES FAJGELJ, PAUL WILLETTS Y ROGER WOOD, J.** 2004. Pure & Applied Chemistry. Huber. pp. 68. 75

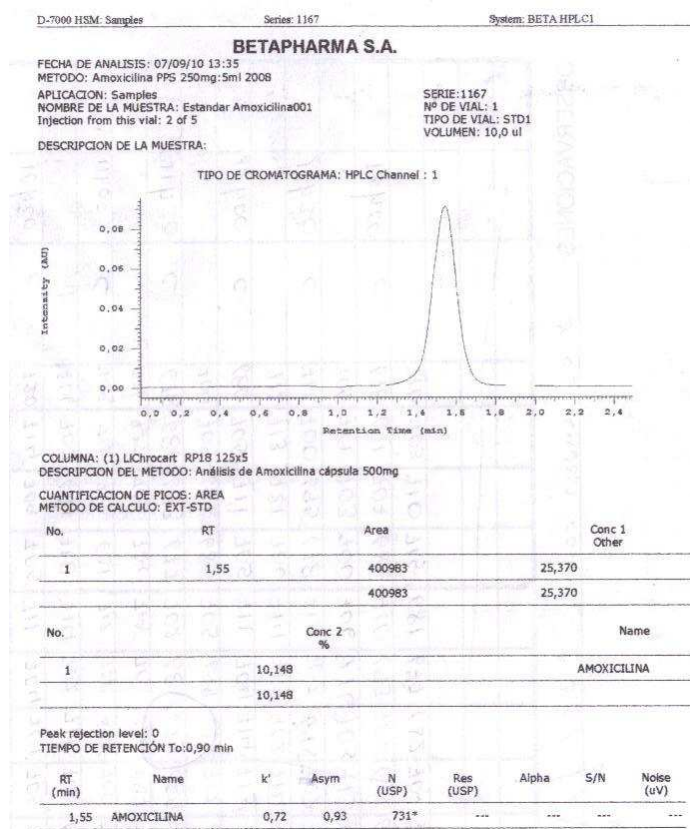
33. **MURILLO, J. LEMUS, J. GARCÍA, L.** 1991. Simultaneous determination of 7-ACA and 7-ADCA by second derivative spectrophotometry. Anal Lett. pp. 683-699.
34. **NORMA CUBANA NC: 26-212.** 1992. Evaluación de características y validación de métodos de ensayo. Buenas prácticas de laboratorio. Comité Estatal de Normalización. La Habana: Ministerio de Salud Pública. (Folleto).
35. **PRECISION OF TEST METHODS** 1994. ISO 5725. Ginebra. (Folleto).
36. **QUE ES LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA. 2004.**
www.quimnet.com
04-12-2010
37. **RAMPAZOO P.** 1990. Standardisation and validation of analytical methods in the pharmaceutical industry. Imola. Farma. pp. 807-815.
38. **RECOMENDACIONES ARMONIZADAS PARA LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS EN UN SOLO LABORATORIO (informe técnico) 20-07-2005**
39. **ROSSO, A. ÁLVAREZ, P.** 2002. Criterios de validación en métodos analíticos instrumentales para industria farmacéutica. Libertad. pp 11-57
40. **THE FITNESS FOR PURPOSE OF ANALYTICAL METHODS. A LABORATORY GUIDE TO METHOD VALIDATION AND RELATED TOPICS.**1998. Hannover. Eurachem. (Folleto)
41. **THE INTERNATIONAL HARMONISED PROTOCOL FOR THE PROFICIENCY TESTING OF (CHEMICAL) ANALYTICAL.**2005. Mississippi. (Folleto)
42. **THOMPSON, M. WOOD, R.** 1993. Pure Appl. Chem “The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories”. 6ta Ed. Brown. pp. 2123-2144.
43. **TORRES, A. CAMACHO, M.** 1992. Validation of two analytical methods applied to two new cytostatic drugs. 2Ed. Bonn.STP Pharma. pp. 93-99.

44. **UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION USP XXII.** 1990.
United States Pharmacopeia. 22ed. Easton: Mack Printing. 1086,1682.
45. **UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION USP XXII.** 1990.
United States Pharmacopeia. 22ed. Easton: Mack Printing. pp. 1225,1710.
46. **USP 28 -NF 23; BRITHISH PHARMACOPOEIA 2002** (BP 2002); Ph. Eur. 3;
Método General (MG).
47. **VADEMECUM AMOXICILINA**
<http://www.iqb.es/cbasicas/farma>
13-12-2010
48. **VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO NOTA TÉCNICA NT 004/03.**
2006. Hannover. (Folleto)
49. **WISE, P. NEU, H.** 1974. Experience with amoxicillin: an overall summary of
clinical trials in the United States. Massachussets. Spring. **pp.** 266-271.

CAPITULO VIII

8 Anexos

ANEXO No. 1. CROMATOGRAMA DEL ESTÁNDAR DE AMOXICILINA



ANEXO No. 2. CROMATOGRAMA DE ANALISIS DE SENSIBILIDAD FRENTE A DEGRADACIÓN A TEMPERATURA AMBIENTE

D-7000 HSM: Samples

Series: 1149

System: BETA HPLC1

BETAPHARMA S.A.

FECHA DE ANALISIS: 19/08/10 18:45

METODO: Amoxicilina PPS 250mg:5ml 2008

APLICACION: Samples

NOMBRE DE LA MUESTRA: Muestra 2 sensibilidad Ambient

Injection from this vial: 2 of 2

SERIE: 1149

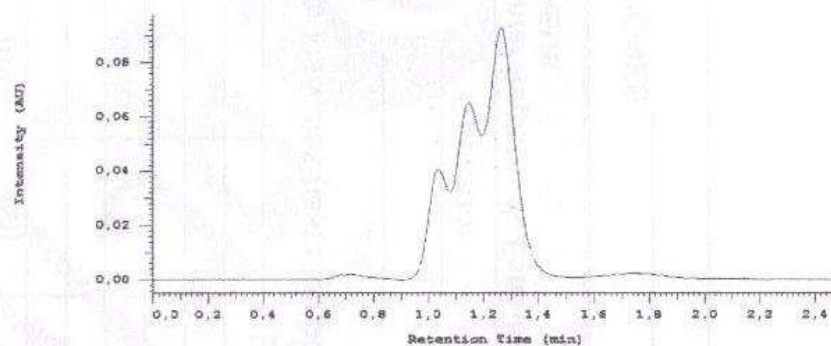
Nº DE VIAL: 15

TIPO DE VIAL: UNK

VOLUMEN: 10,0 ul

DESCRIPCION DE LA MUESTRA:

TIPO DE CROMATOGRAMA: HPLC Channel : 1



COLUMNA: (1) Lichroart RP18 125x5

DESCRIPCION DEL METODO: Análisis de Amoxicilina PPS 250mg/5ml

CUANTIFICACION DE PICOS: AREA

METODO DE CALCULO: EXT-STD

CANTIDAD DE MUESTRA: 1

| No. | RT | Area | Conc 1 mg |
|-----|------|--------|--------------|
| 3 | 1,26 | 141972 | 73,384 |
| | | 141972 | 73,384 |

| No. | Conc 2 % | Name |
|-----|-------------|-------------|
| 3 | 29,354 | AMOXICILINA |
| | 29,354 | |

Peak rejection level: 0

TIEMPO DE RETENCIÓN To: 0,90 min

| RT (min) | Name | k' | Asym | N (USP) | Res (USP) | Alpha | S/N | Noise (uV) |
|-------------|-------------|------|------|------------|--------------|-------|-----|---------------|
| 1,26 | AMOXICILINA | 0,40 | --- | --- | --- | --- | --- | --- |

ANEXO No. 3. CROMATOGRAMA DE ANALISIS DE SENSIBILIDAD FRENTE A DEGRADACIÓN CON CALOR.

D-7000 HSM: Samples Series: 1153 System: BETA HPLC1

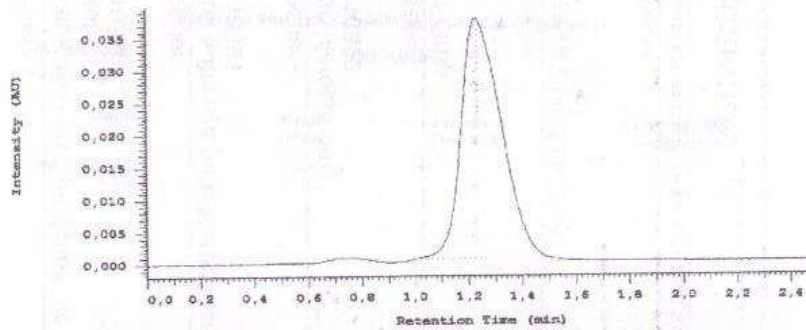
BETAPHARMA S.A.

FECHA DE ANALISIS: 20/08/10 17:25
 METODO: Amoxicilina PPS 250mg:5ml 2008
 APLICACION: Samples
 NOMBRE DE LA MUESTRA: Muestra sensib T alta
 Injection from this vial: 2 of 2

SERIE: 1153
 Nº DE VIAL: 14
 TIPO DE VIAL: UNK
 VOLUMEN: 10,0 ul

DESCRIPCION DE LA MUESTRA:

TIPO DE CROMATOGRAMA: HPLC Channel : 1



COLUMNA: (1) Lichrocart RP18 125x5
 DESCRIPCION DEL METODO: Analisis de Amoxicilina PPS 250mg/5ml

CUANTIFICACION DE PICOS: AREA
 METODO DE CALCULO: EXT-STD

CANTIDAD DE MUESTRA: 1

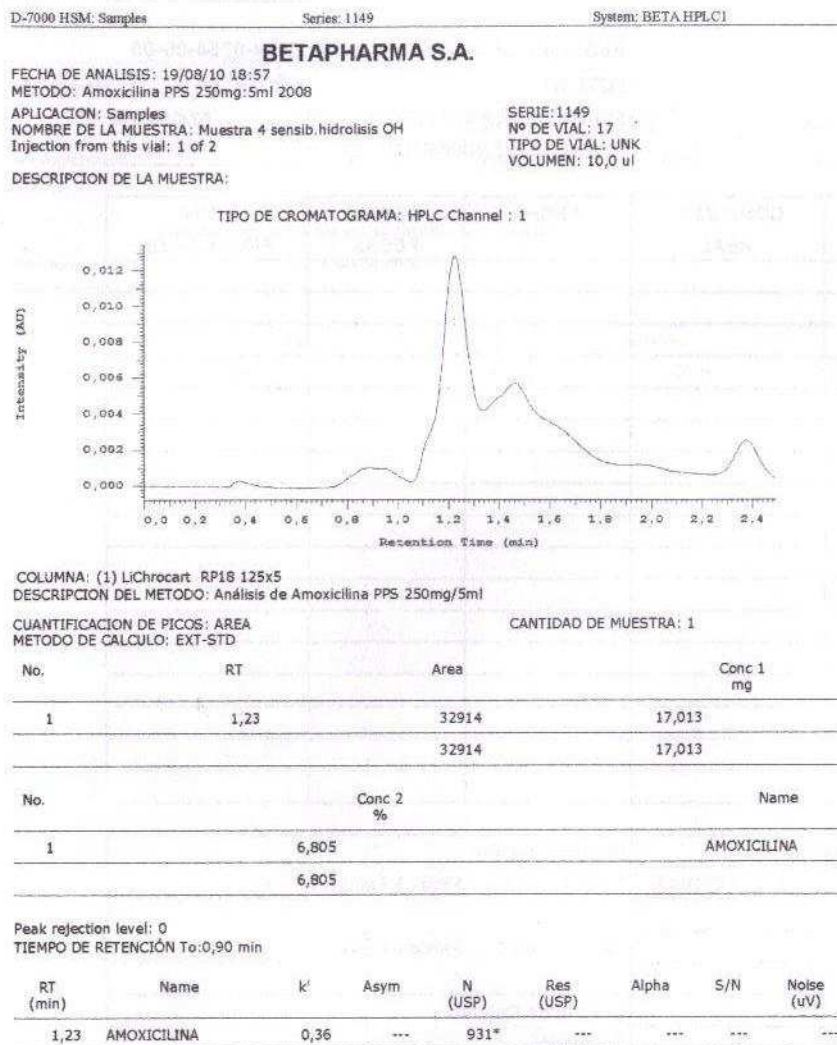
| No. | RT | Area | Conc 1 mg |
|-----|------|--------|-----------|
| 1 | 1,23 | 194927 | 79,671 |
| | | 194927 | 79,671 |

| No. | Conc 2 % | Name |
|-----|----------|-------------|
| 1 | 31,869 | AMOXICILINA |
| | 31,869 | |

Peak rejection level: 0
 TIEMPO DE RETENCIÓN To: 0,90 min

| RT (min) | Name | k' | Asym | N (USP) | Res (USP) | Alpha | S/N | Noise (uV) |
|----------|-------------|------|------|---------|-----------|-------|-----|------------|
| 1,23 | AMOXICILINA | 0,37 | 1,32 | 318* | --- | --- | --- | --- |

ANEXO No. 4. CROMATOGRAMA DE ANALISIS DE SENSIBILIDAD FRENTE A DEGRADACIÓN POR HIDRÓLISIS BASICA.



ANEXO No. 5. CROMATOGRAMA DE ANALISIS DE SENSIBILIDAD FRENTE AL DILUYENTE Y FASE MÓVIL UTILIZADA

D-7000 HSM: Samples

Series: 1149

System: BETA HPLC1

BETAPHARMA S.A.

FECHA DE ANALISIS: 19/08/10 19:04

METODO: Amoxicilina PPS 250mg/5ml 2008

APLICACION: Samples

NOMBRE DE LA MUESTRA: Muestra 5 sensib. diluyente

Injection from this vial: 1 of 2

SERIE: 1149

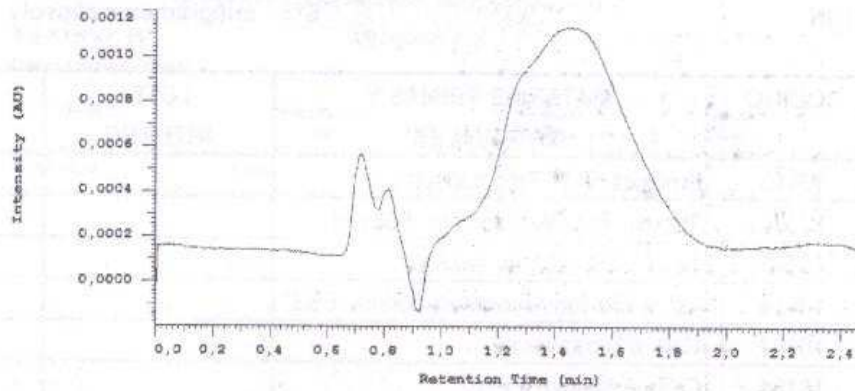
Nº DE VIAL: 18

TIPO DE VIAL: UNK

VOLUMEN: 10,0 ul

DESCRIPCION DE LA MUESTRA:

TIPO DE CROMATOGRAMA: HPLC Channel : 1



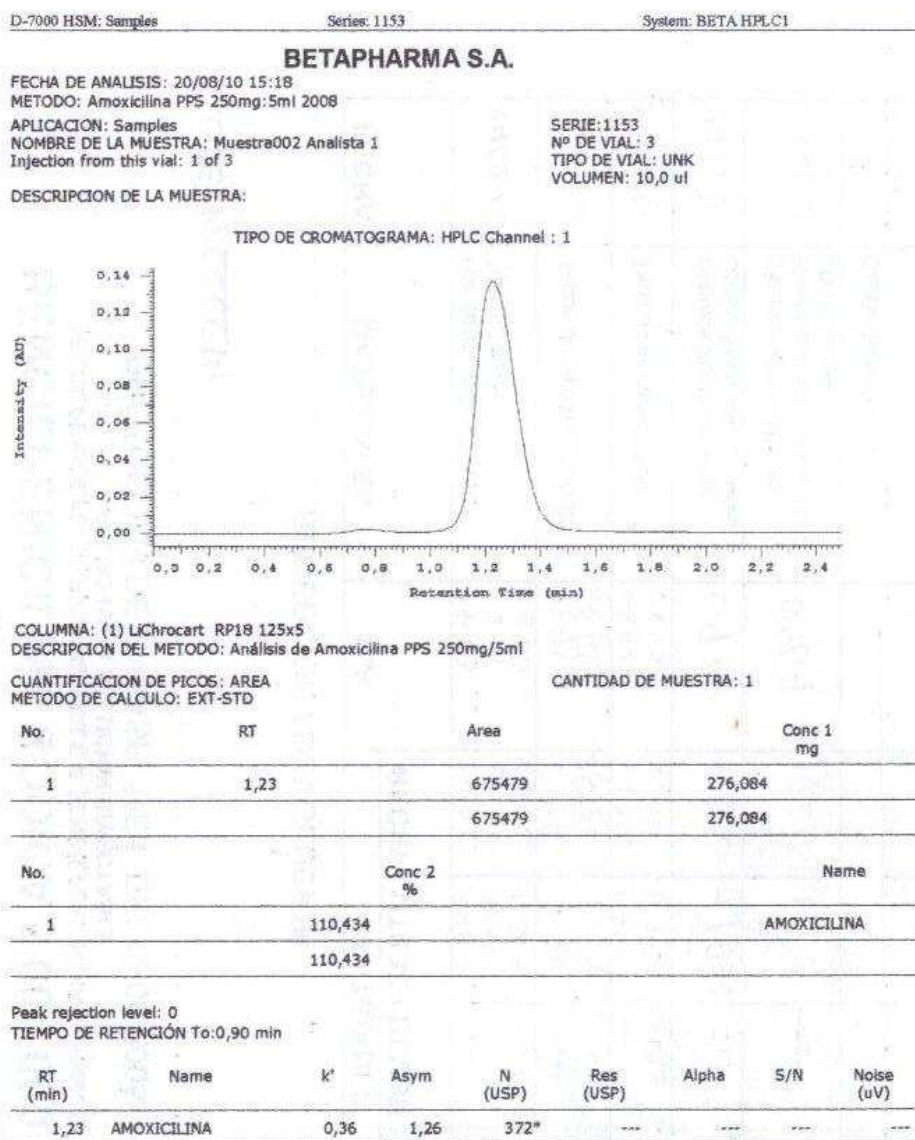
COLUMNA: (1) Lichrocart RP18 125x5

DESCRIPCION DEL METODO: Análisis de Amoxicilina PPS 250mg/5ml

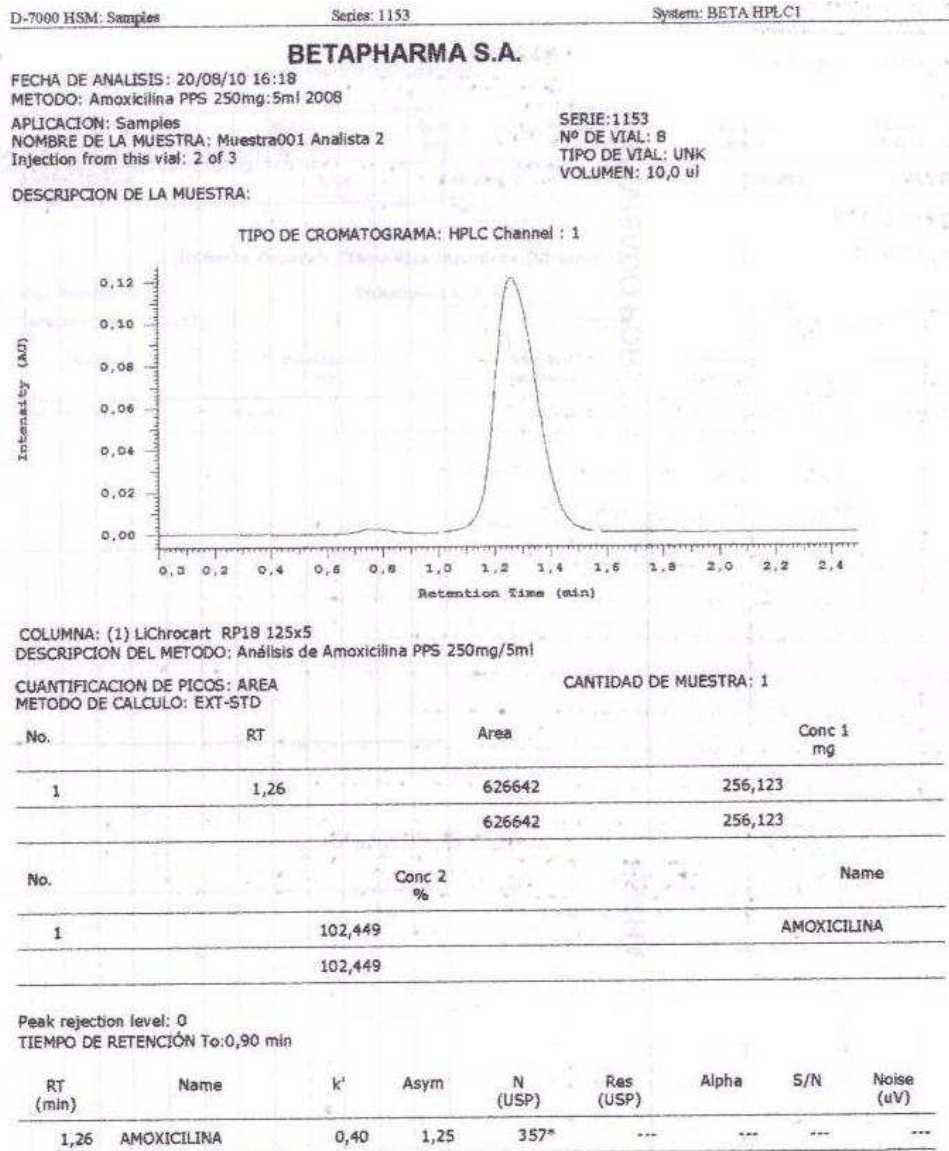
| No. | RT | Area | Conc 1 mg | Conc 2 % | Name |
|-----|----|------|--------------|-------------|------|
| | | 0 | 0,000 | 0,000 | |

Peak rejection level: 0

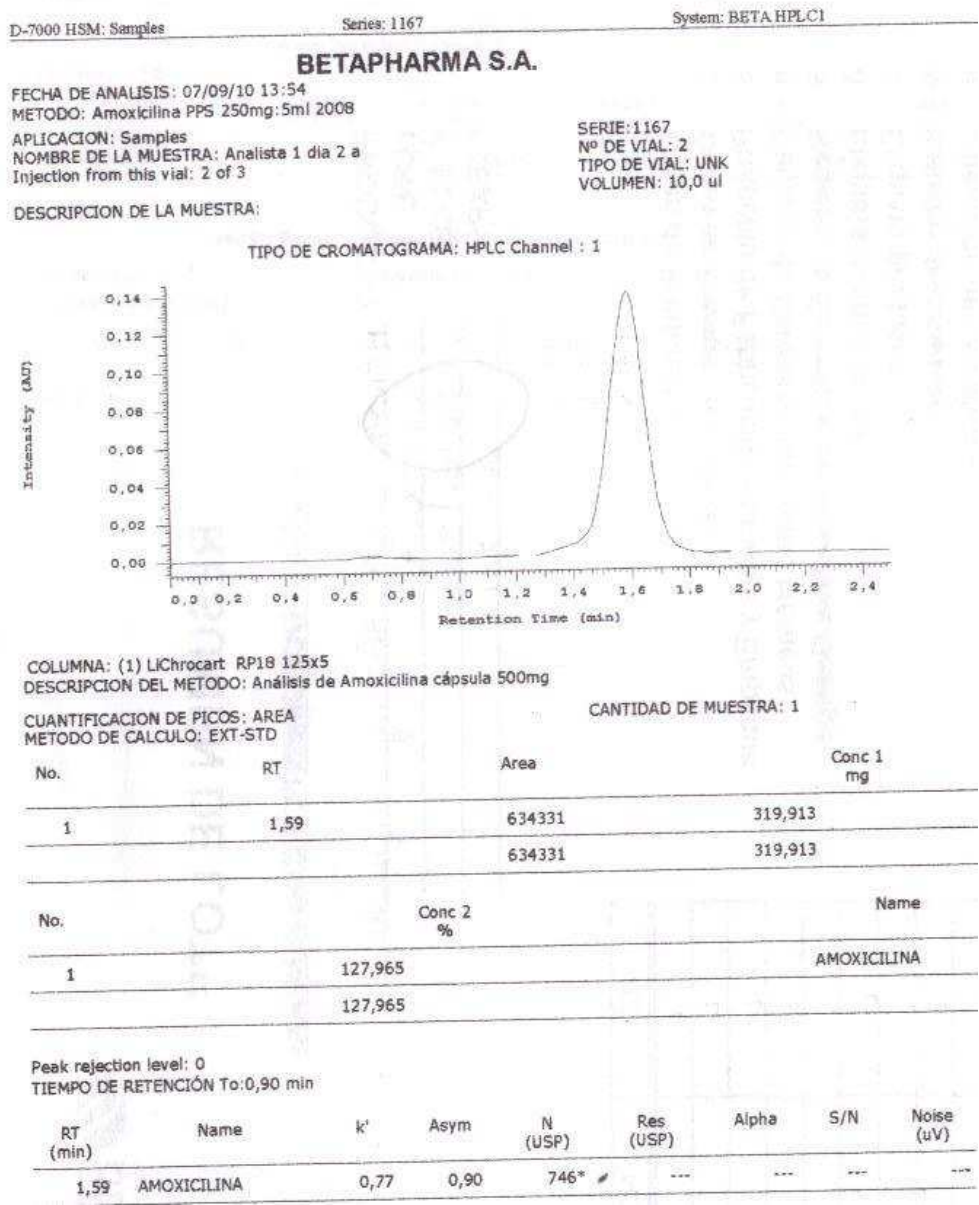
ANEXO No. 6. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE AMOXICILINA EN POLVO PARA SUSPENSIÓN ORAL, PERPARADO POR ANALISTA 1 EN EL DÍA DE ANÁLISIS 1.



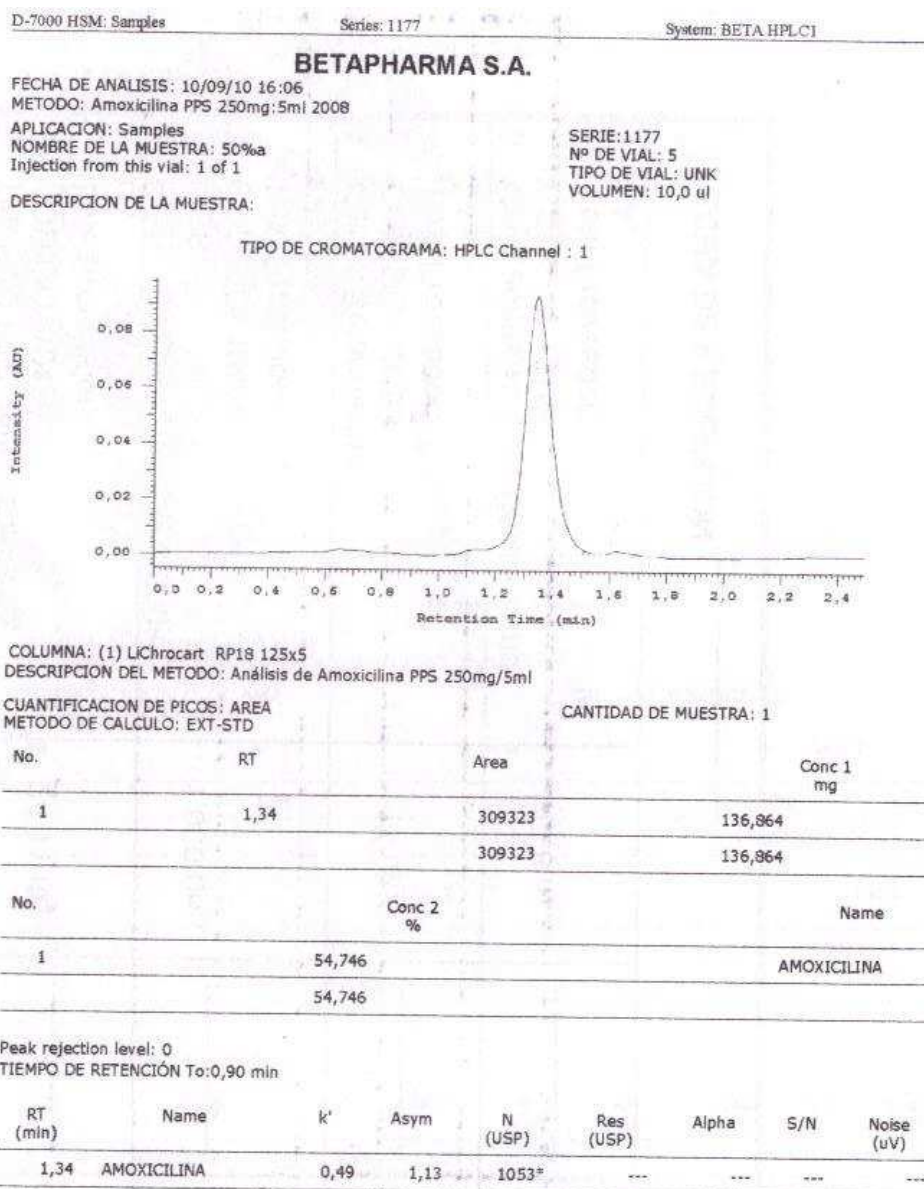
ANEXO No. 7. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE AMOXICILINA EN POLVO PARA SUSPENSIÓN ORAL, PERPARADO POR ANALISTA 2 EN EL DÍA DE ANÁLISIS 1.



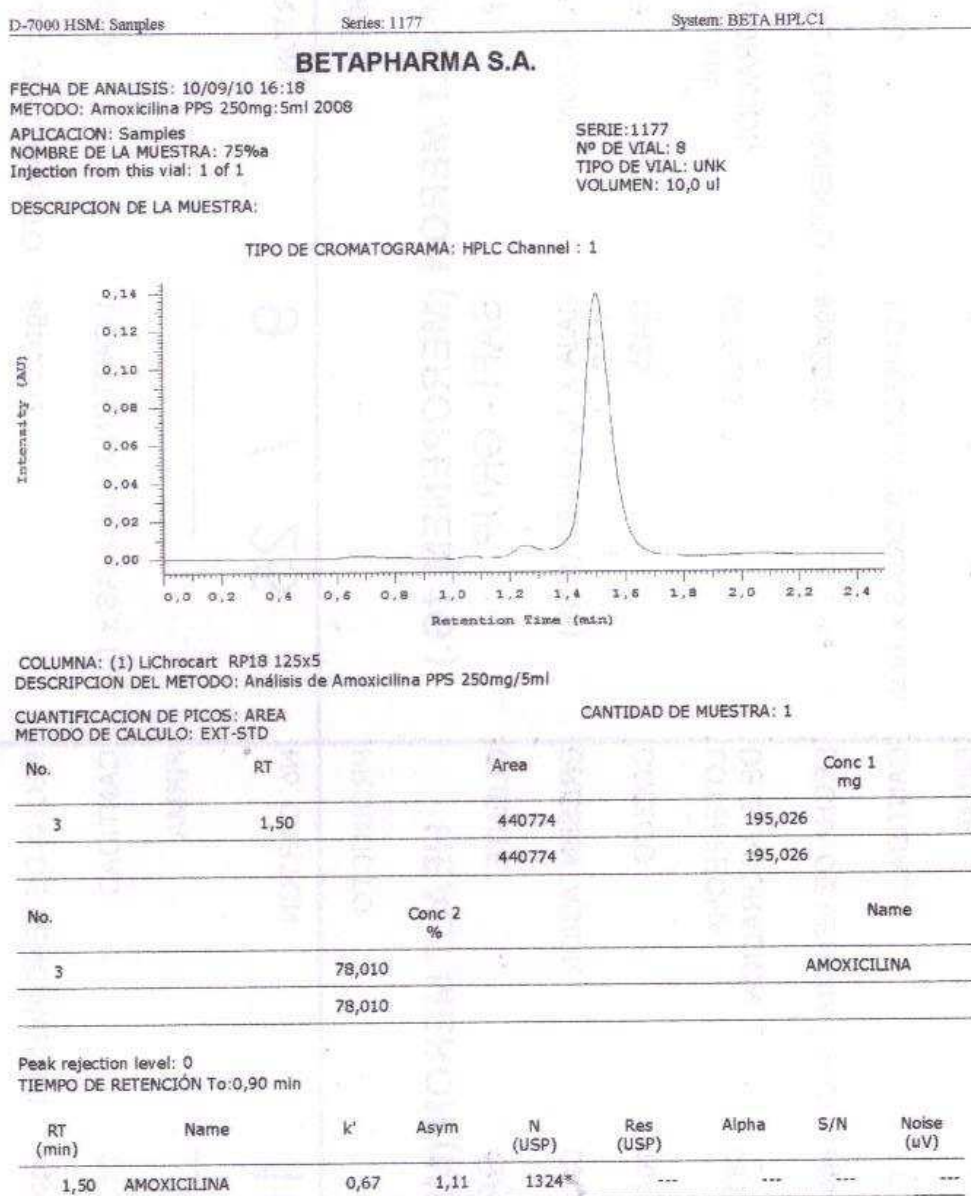
ANEXO No. 8. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE AMOXICILINA EN POLVO PARA SUSPENSIÓN ORAL, PERPARADO POR ANALISTA 1 EN EL SEGUNDO DÍA DE ANÁLISIS.



ANEXO No. 9. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE RECUPERACIÓN FRENTE AL PORCENTAJE DE PRINCIPIO ACTIVO ADICIONADO EN CADA FRASCO DE AMOXICILINA EN POLVO PARA SUSPENSIÓN ORAL AL 50% DE PRINCIPIO ACTIVO



ANEXO No. 10. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE RECUPERACIÓN FRENTE AL PORCENTAJE DE PRINCIPIO ACTIVO ADICIONADO EN CADA FRASCO DE AMOXICILINA EN POLVO PARA SUSPENSIÓN ORAL AL 75% DE PRINCIPIO ACTIVO



ANEXO No. 11. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE RECUPERACIÓN FRENTE AL PORCENTAJE DE PRINCIPIO ACTIVO ADICIONADO EN CADA FRASCO DE AMOXICILINA EN POLVO PARA SUSPENSIÓN ORAL AL 100% DE PRINCIPIO ACTIVO

D-7069 HSM: Samples

Series: 1177

System: BETA.HPLC1

BETAPHARMA S.A.

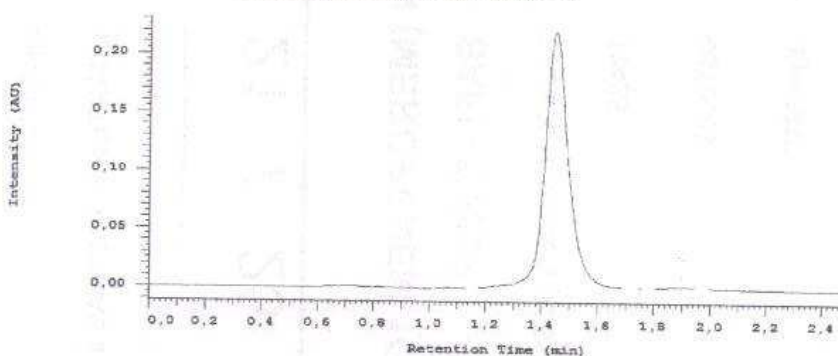
FECHA DE ANALISIS: 10/09/10 16:29
 METODO: Amoxicilina PPS 250mg:5ml 2008

APLICACION: Samples
 NOMBRE DE LA MUESTRA: 100%a
 Injection from this vial: 1 of 1

SERIE:1177
 Nº DE VIAL: 11
 TIPO DE VIAL: UNK
 VOLUMEN: 10,0 ul

DESCRIPCION DE LA MUESTRA:

TIPO DE CROMATOGRAMA: HPLC Channel : 1



COLUMNA: (1) Lichrocart RP18 125x5

DESCRIPCION DEL METODO: Análisis de Amoxicilina PPS 250mg/5ml

CUANTIFICACION DE PICOS: AREA
 METODO DE CALCULO: EXT-STD

CANTIDAD DE MUESTRA: 1

| No. | RT | Area | Conc 1 mg |
|-----|------|--------|-----------|
| 1 | 1,45 | 650926 | 288,010 |
| | | 650926 | 288,010 |

| No. | Conc 2 % | Name |
|-----|----------|-------------|
| 1 | 115,204 | AMOXICILINA |
| | 115,204 | |

Peak rejection level: 0

TIEMPO DE RETENCIÓN To: 0,90 min

| RT (min) | Name | k' | Asym | N (USP) | Res (USP) | Alpha | S/N | Noise (uV) |
|----------|-------------|------|------|---------|-----------|-------|-----|------------|
| 1,45 | AMOXICILINA | 0,61 | 1,17 | 1600* | --- | --- | --- | --- |

ANEXO No. 12. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE RECUPERACIÓN FRENTE AL PORCENTAJE DE PRINCIPIO ACTIVO ADICIONADO EN CADA FRASCO DE AMOXICILINA EN POLVO PARA SUSPENSIÓN ORAL AL 125% DE PRINCIPIO ACTIVO

D-7000 HSM: Samples

Series: 1177

System: BETA HPLC1

BETAPHARMA S.A.

FECHA DE ANALISIS: 10/09/10 16:40

METODO: Amoxicilina PPS 250mg:5ml 2008

APLICACION: Samples

NOMBRE DE LA MUESTRA: 125%a

Injection from this vial: 1 of 1

SERIE: 1177

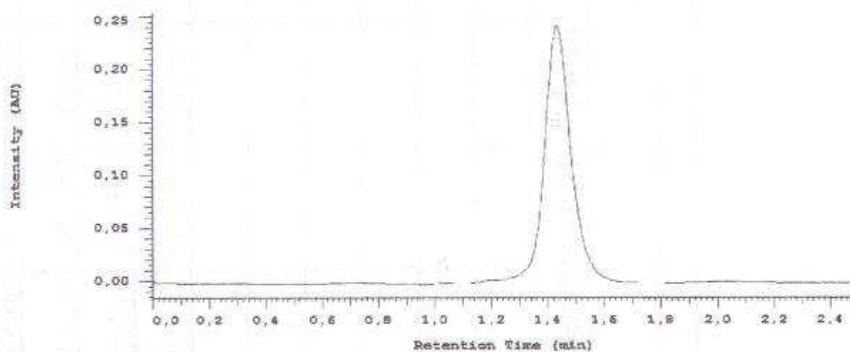
Nº DE VIAL: 14

TIPO DE VIAL: UNK

VOLUMEN: 10,0 ul

DESCRIPCION DE LA MUESTRA:

TIPO DE CROMATOGRAMA: HPLC Channel : 1



COLUMNA: (1) Lichrocart RP18 125x5

DESCRIPCION DEL METODO: Análisis de Amoxicilina PPS 250mg/5ml

QUANTIFICACION DE PICOS: AREA
METODO DE CALCULO: EXT-STD

CANTIDAD DE MUESTRA: 1

| No. | RT | Area | Conc 1 mg |
|-----|------|--------|--------------|
| 2 | 1,43 | 825404 | 365,210 |
| | | 825404 | 365,210 |

| No. | Conc 2 % | Name |
|-----|-------------|-------------|
| 2 | 146,084 | AMOXICILINA |
| | 146,084 | |

Peak rejection level: 0

TIEMPO DE RETENCIÓN To: 0,90 min

| RT (min) | Name | k' | Asym | N (USP) | Res (USP) | Alpha | S/N | Noise (uV) |
|-------------|-------------|------|------|------------|--------------|-------|-----|---------------|
| 1,43 | AMOXICILINA | 0,59 | 1,09 | 1196* | --- | --- | --- | --- |

ANEXO No. 13. CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE RECUPERACIÓN FRENTE AL PORCENTAJE DE PRINCIPIO ACTIVO ADICIONADO EN CADA FRASCO DE AMOXICILINA EN POLVO PARA SUSPENSIÓN ORAL AL 150% DE PRINCIPIO ACTIVO

D-7000 HSM: Samples

Series: 1177

System: BETA HPLCI

BETAPHARMA S.A.

FECHA DE ANALISIS: 10/09/10 16:55

METODO: Amoxicilina PPS 250mg:5ml 2008

APLICACION: Samples

NOMBRE DE LA MUESTRA: 150%b

Injection from this vial: 1 of 1

SERIE:1177

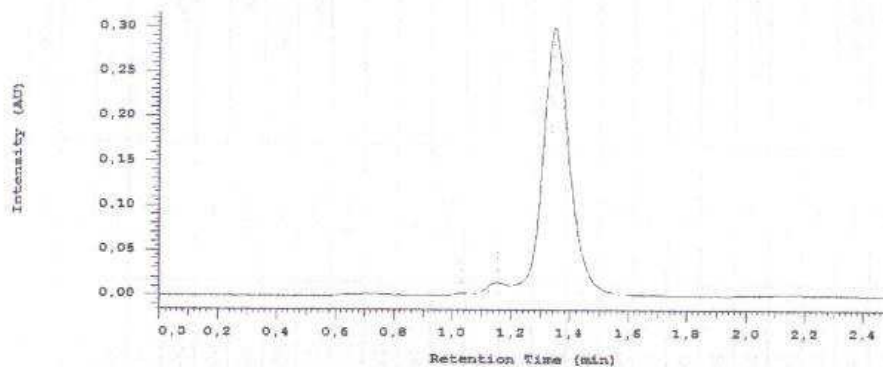
Nº DE VIAL: 18

TIPO DE VIAL: UNK

VOLUMEN: 10,0 ul

DESCRIPCION DE LA MUESTRA:

TIPO DE CROMATOGRAMA: HPLC Channel : 1



COLUMNA: (1) Lichrocart RP18 125x5

DESCRIPCION DEL METODO: Análisis de Amoxicilina PPS 250mg/5ml

CUANTIFICACION DE PICOS: AREA

CANTIDAD DE MUESTRA: 1

METODO DE CALCULO: EXT-STD

| No. | RT | Area | Conc 1 mg |
|-----|------|--------|--------------|
| 3 | 1,35 | 878540 | 388,721 |
| | | 878540 | 388,721 |

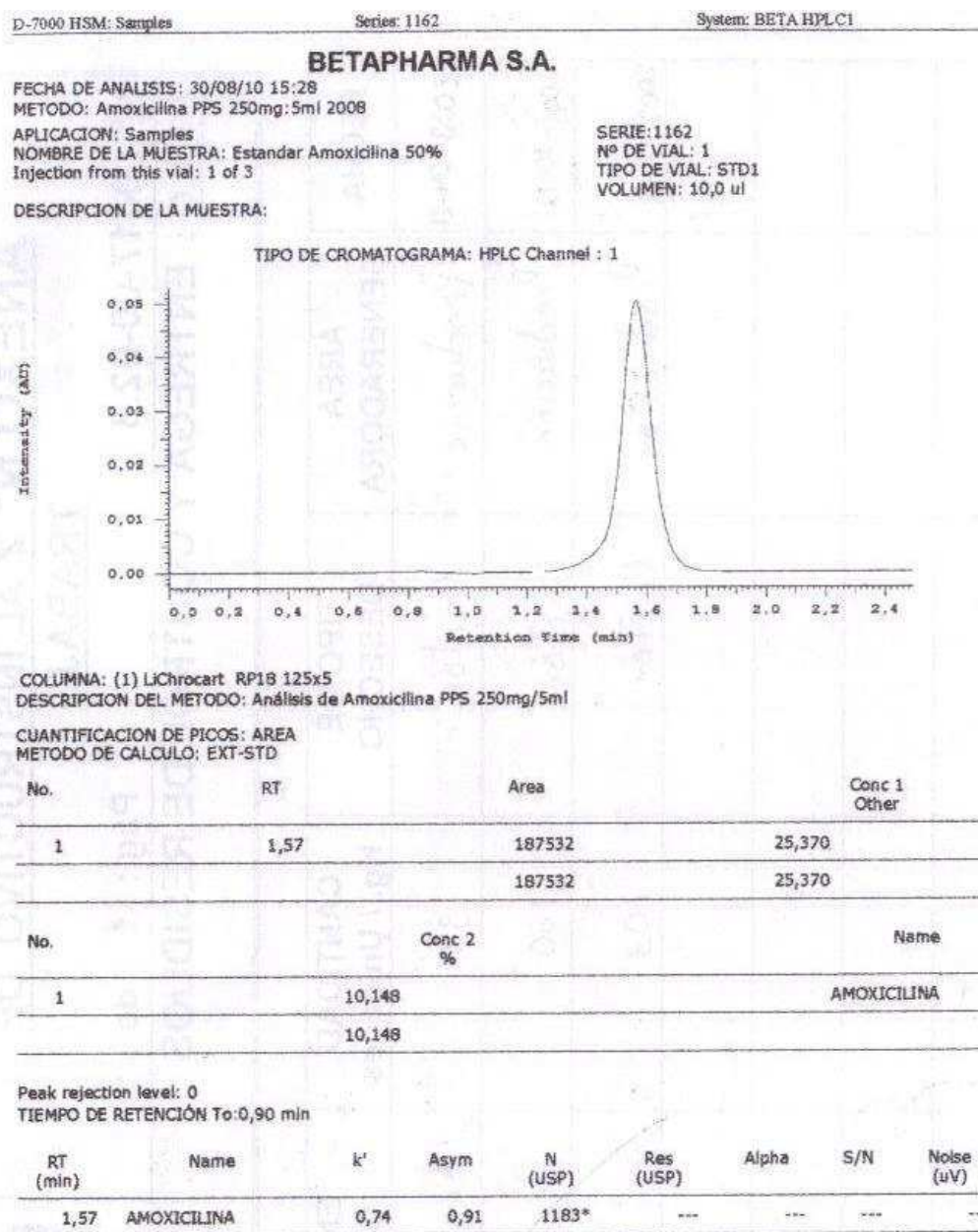
| No. | Conc 2 % | Name |
|-----|-------------|-------------|
| 3 | 155,488 | AMOXICILINA |
| | 155,488 | |

Peak rejection level: 0

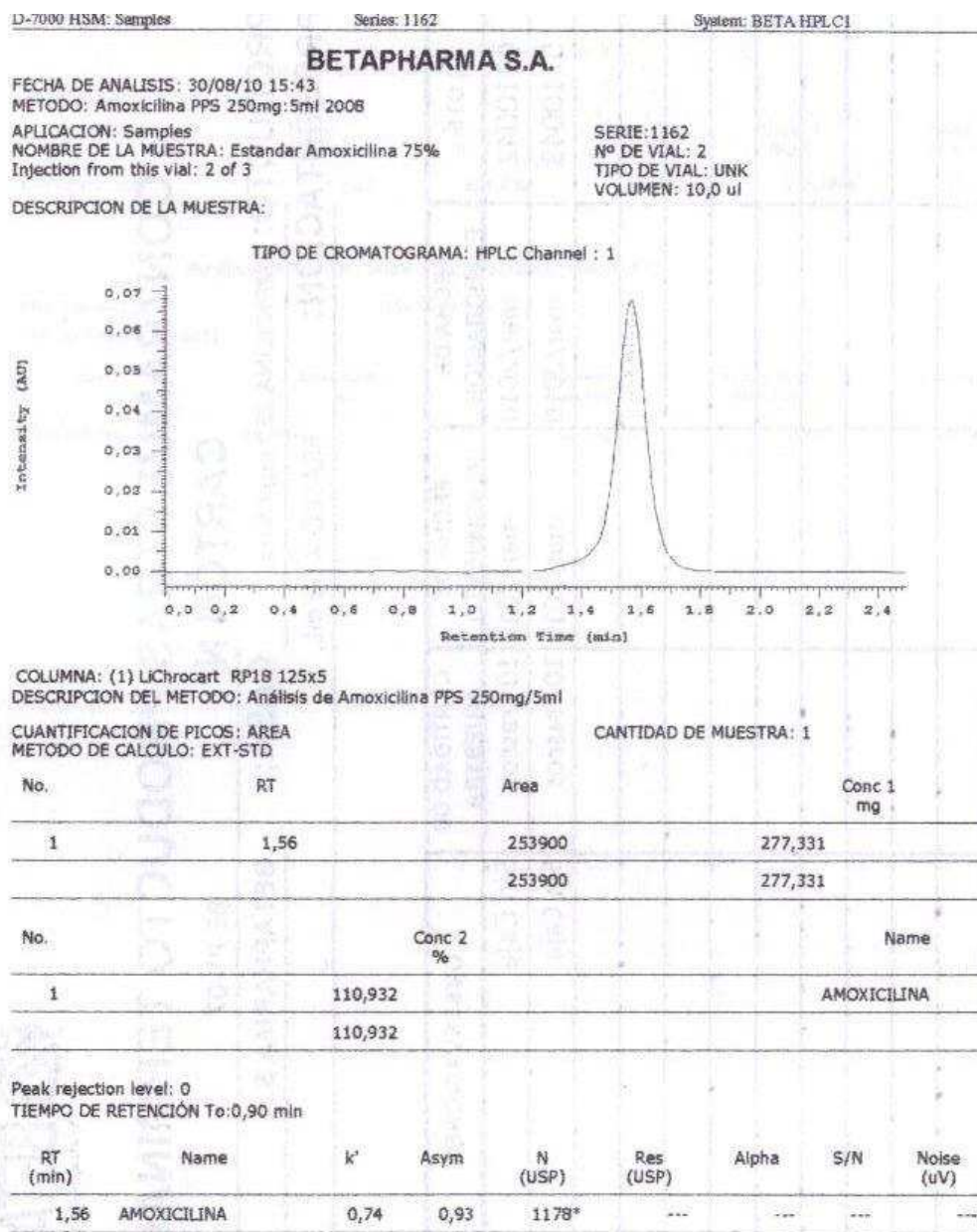
TIEMPO DE RETENCIÓN To:0,90 min

| RT (min) | Name | k' | Asym | N (USP) | Res (USP) | Alpha | S/N | Noise (uV) |
|-------------|-------------|------|------|------------|--------------|-------|-----|---------------|
| 1,35 | AMOXICILINA | 0,50 | 1,17 | 1215* | --- | --- | --- | --- |

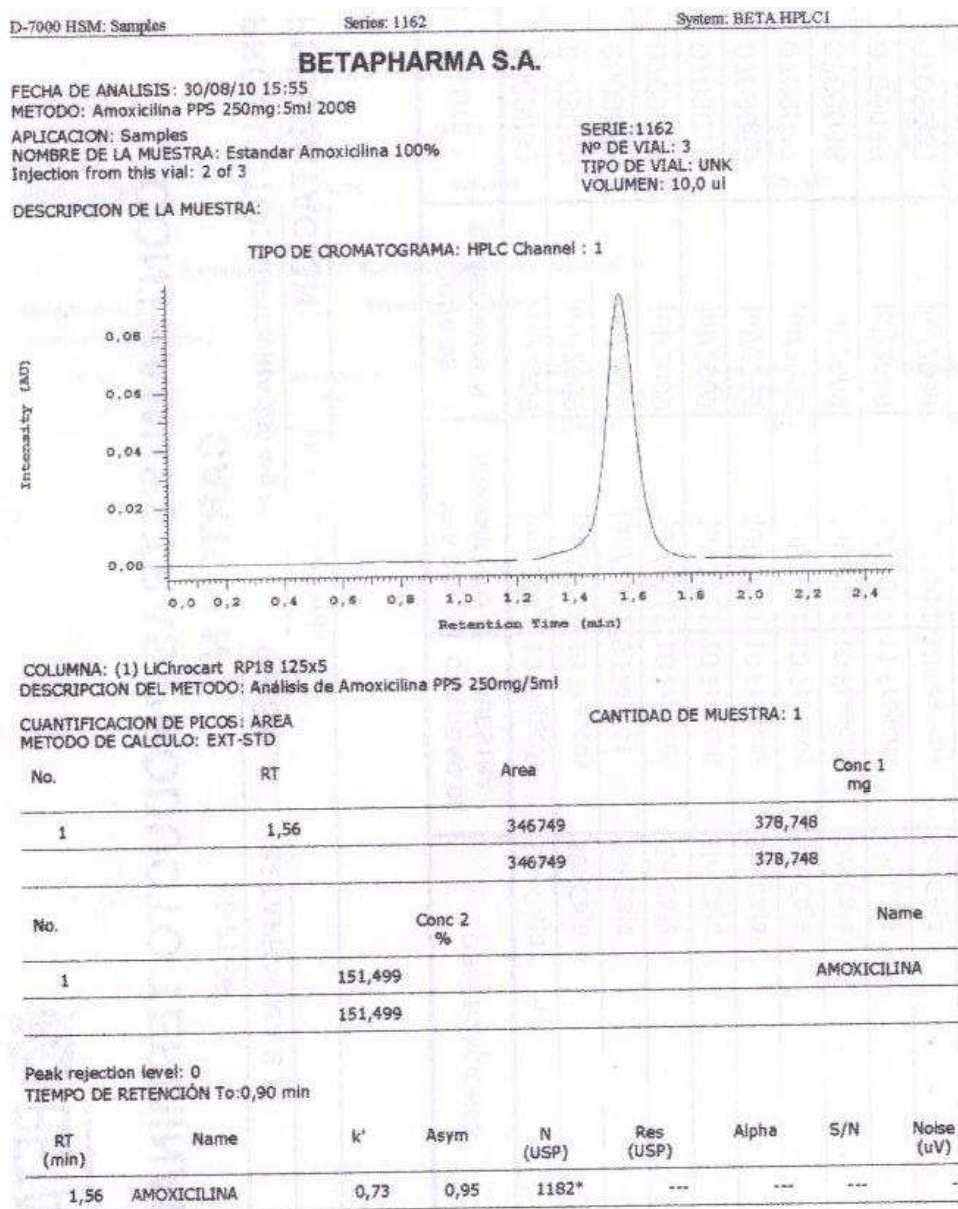
ANEXO No. 14. CROMATOGRAMA DE LINEALIDAD A CONCENTRACION DE ESTÁNDAR AL 50%



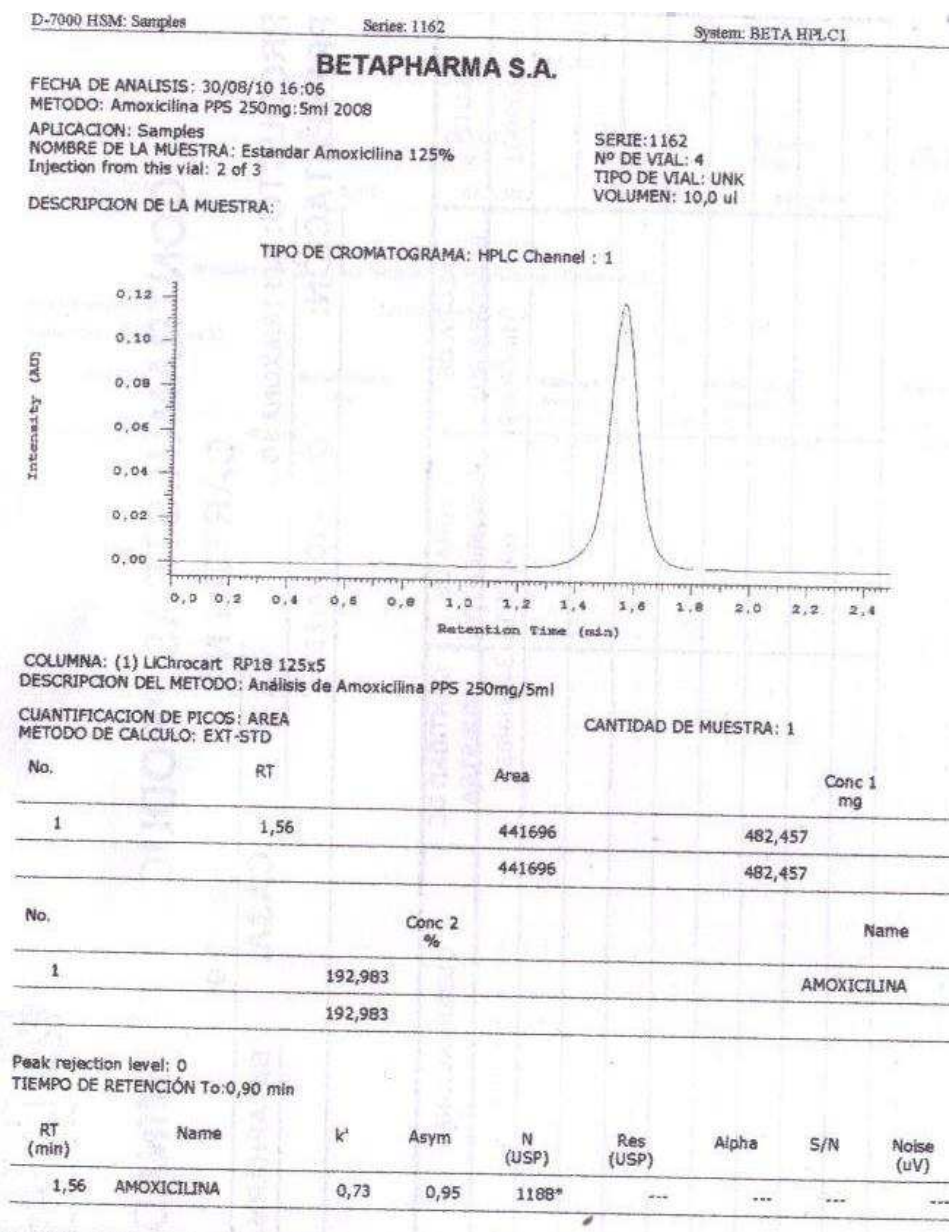
ANEXO No. 15. CROMATOGRAMA DE LINEALIDAD A CONCENTRACION DE ESTÁNDAR AL 75%



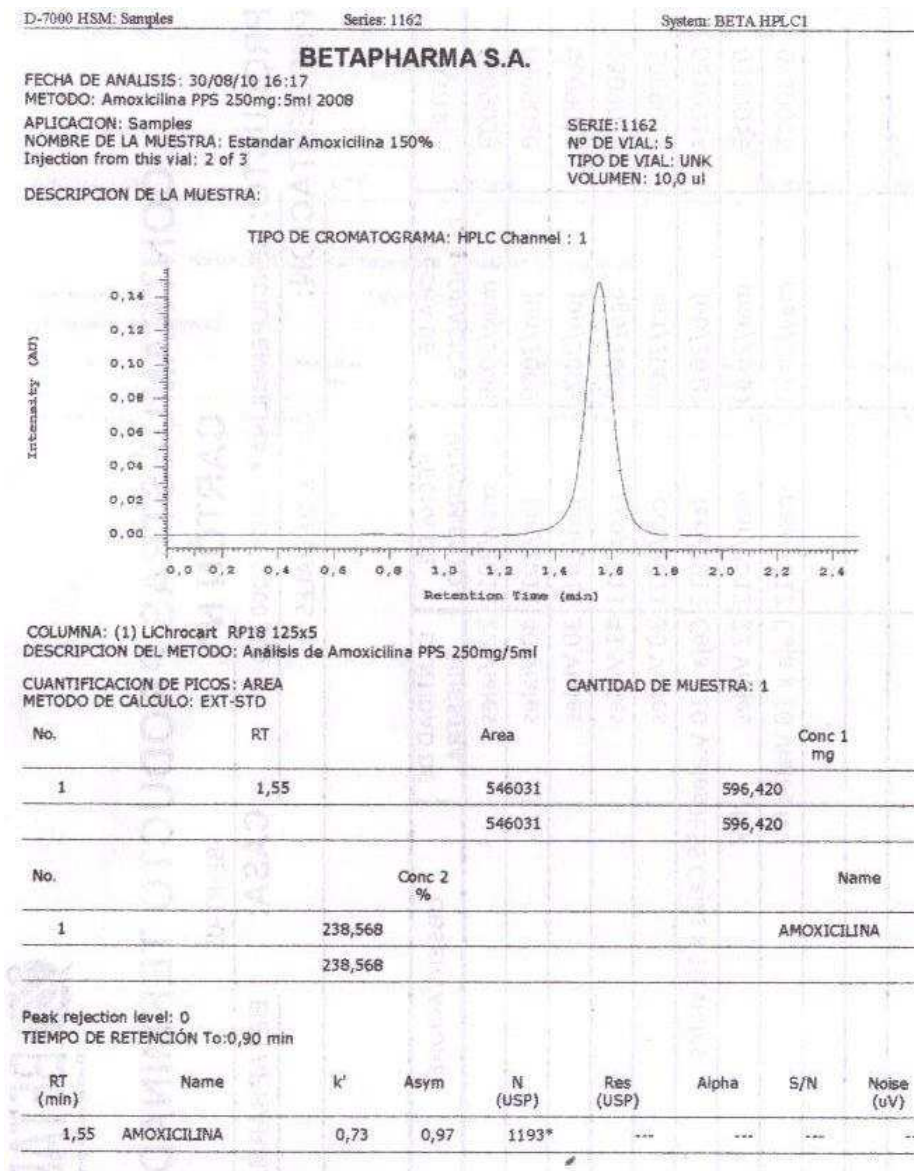
ANEXO No. 16. CROMATOGRAMA DE LINEALIDAD A CONCENTRACION DE ESTÁNDAR AL 100%



ANEXO No. 17. CROMATOGRAMA DE LINEALIDAD A CONCENTRACION DE ESTÁNDAR AL 125%



ANEXO No. 18. CROMATOGRAMA DE LINEALIDAD A CONCENTRACION DE ESTÁNDAR AL 150%



ANEXO No.19 CROMATOGRAMA DE ANÁLISIS DE ROBUSTEZ CON UN FLUJO AUMENTADO EN 10%

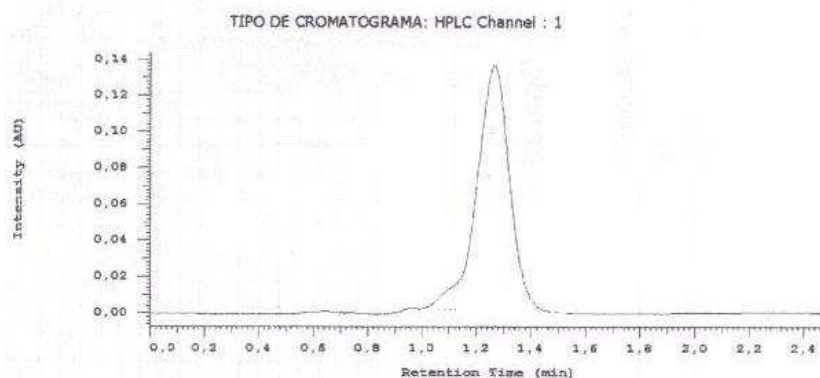
D-7000 HSM: Samples Series: 1170 System: BETA HPLCI

BETAPHARMA S.A.

FECHA DE ANALISIS: 07/09/10 16:24
 METODO: Amoxicilina PPS 250mg/5ml 2008
 APLICACION: Samples
 NOMBRE DE LA MUESTRA: Muestra 1 robustez 2
 Inyection from this vial: 2 of 3

SERIE: 1170
 Nº DE VIAL: 3
 TIPO DE VIAL: UNK
 VOLUMEN: 10,0 ul

DESCRIPCION DE LA MUESTRA:



COLUMNA: (1) Lichrocart RP18 125x5
 DESCRIPCION DEL METODO: Análisis de Amoxicilina PPS 250mg/5ml

CUANTIFICACION DE PICOS: AREA
 METODO DE CALCULO: EXT-STD

CANTIDAD DE MUESTRA: 1

| No. | RT | Area | Conc 1 mg |
|-----|------|--------|--------------|
| 1 | 1,26 | 569310 | 322,925 |
| | | 569310 | 322,925 |

| No. | Conc 2 % | Name |
|-----|-------------|-------------|
| 1 | 129,170 | AMOXICILINA |
| | 129,170 | |

Peak rejection level: 0
 TIEMPO DE RETENCIÓN To: 0,90 min

| RT (min) | Name | k' | Asym | N (USP) | Res (USP) | Alpha | S/N | Noise (uV) |
|-------------|-------------|------|------|------------------|--------------|-------|-----|---------------|
| 1,26 | AMOXICILINA | 0,40 | 0,84 | 563 ⁺ | --- | --- | --- | --- |

FOTOGRAFÍA Nº 1 AMOXICILINA EN POLVO PARA SUSPENSIÓN ORAL FABRICADO POR BETAPHARMA S.A.



FOTOGRAFÍA Nº 2 EQUIPO DE HPLC

