



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE CEFTRIAXONA SOLUCIÓN
INYECTABLE (1g) EN LA INDUSTRIA BETAPHARMA S.A”**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: SALGUERO CEVALLOS EBELYN NATALY

TUTOR: DR. CARLOS PILAMUNGA CAPUS

Riobamba – Ecuador

2016

©2016, Ebelyn Nataly Salguero Cevallos

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de investigación: “**VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CEFTRIAXONA SOLUCIÓN INYECTABLE (1g) EN LA INDUSTRIA BETAPHARMA S.A**”, de responsabilidad de la señorita Ebelyn Nataly Salguero Cevallos, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Carlos Pilamunga Capus

**DIRECTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Dr. Julio Idrovo

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

BQF. Fausto Contero

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DOCUMENTALISTA

SISBID ESPOCH

NOTA DEL TRABAJO DE

TITULACIÓN

Yo, **Ebelyn Nataly Salguero Cevallos**, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

EBELYN NATALY SALGUERO CEVALLOS

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, **Ebelyn Nataly Salguero Cevallos**, declaro que el presente Trabajo de Titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Titulación.

Riobamba, 11 de febrero de 2016

Ebelyn Nataly Salguero Cevallos

CI: 050380326-4

DEDICATORIA

A Dios

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado la sabiduría, salud y fortaleza necesaria para cumplir mis metas profesionales, además de su infinita bondad y amor.

A mis padres

Quienes han sido mi principal cimiento para la construcción de mi vida profesional, que en el transcurso de mi existencia me han enseñado las bases de la responsabilidad, el respeto, la perseverancia, la dedicación; para ser una persona llena de virtud, humildad y sencillez. De manera especial a mi querido padre Iván Salguero por su ejemplo de abnegación y lucha diaria. Ustedes Iván y Yolanda son la razón de mi triunfo, ¡los quiero!

A mi hermana

Aunque en la mayoría de las veces parece que estuviéramos en una batalla, hay ocasiones en las que la guerra cesa y nos unimos para lograr nuestras metas y ser excelentes personas. Gracias por no solo ayudarme en gran medida a concluir mi trabajo de titulación, sino por todos los bonitos momentos que hemos pasado en las aulas desde pequeñas, muchas gracias Cristina.

A mis seres queridos

Por sus palabras bondadosas de superación y fortaleza, los cuales nunca dudaron que lograría este triunfo.

AGRADECIMIENTO

A Dios por su bondad y bendiciones recibidas todo el tiempo de mi vida universitaria, este trabajo de titulación es el reflejo del esfuerzo constante y no cesan mis ganas de decir que es gracias a ti que esta meta está cumplida.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por haberme aceptado ser parte de ella y abierto puertas de su seno científico para poder realizarme como Bioquímica Farmacéutica, así como también a los diferentes docentes que me brindaron sus conocimientos y su apoyo para seguir adelante día a día.

A mis padres por los recursos económicos y humanos que me han permitido llegar a ser una profesional.

Agradezco a mi director Dr. Carlos Pilamunga y colaborador Dr. Julio Idrovo por haberme brindado sus conocimientos, así como también por su apoyo, comprensión y ser mis guías durante todo el proceso de desarrollo del trabajo de titulación.

Mi agradecimiento especial al Dr. Guillermo Vaca y a la Dra. Rita Sánchez por darme la apertura para realizarme como profesional, por sus consejos sabios y sus conocimientos brindados durante mi estadía en la empresa Betapharma S.A.

Agradezco a la empresa Betapharma S.A y a su gerente general Ing. Roberto Aldana por haberme dado la apertura de realizar el trabajo de titulación en su prestigiosa entidad y haberme brindado todos los recursos necesarios.

CONTENIDO

	Páginas
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	4
1.1. Antecedentes de la investigación.....	4
1.2. Marco teórico.....	6
1.2.1. Validación de métodos analíticos.....	6
1.2.2. Fundamentos Cromatográficos.....	32
1.2.3. Cefalosporinas	45
CAPÍTULO II	
2. MARCO METODOLÓGICO.....	49
2.1. Diseño Experimental.....	49
2.1.1. Características del Diseño Experimental	49
2.1.2. Factores de estudio	49
2.2. Materiales, reactivos y equipos	50
2.2.1. Materiales	50
2.2.2. Reactivos	50
2.2.3. Equipos.....	51
2.3. Técnica y método de análisis	52

<i>Fase 1: Optimización de Sistema Cromatográfico</i>	52
<i>Fase 2: Validación del método analítico</i>	58
<i>Fase 3: Valoración del estándar secundario del lote: 140822013 por el método validado de ceftriaxona 1g polvo para inyección, realizado en la empresa Betapharma S.A</i>	64

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
3.1. Optimización de la aptitud del Sistema Cromatográfico	65
3.2. Validación del método Analítico	71
3.2.1. <i>Especificidad</i>	71
3.2.1. <i>Linealidad y rango</i>	76
3.2.2. <i>Precisión</i>	81
3.2.3. <i>Exactitud</i>	83
3.2.4. <i>Límite de cuantificación</i>	85
3.2.5. <i>Robustez</i>	86
3.3. Valoración del estándar secundario lote: 140822013 por el método validado de ceftriaxona 1g polvo para inyección, realizado en la empresa Betapharma	88
CONCLUSIONES	90
RECOMENDACIONES	92
ABREVIATURAS	93

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1	Datos requeridos para la validación.....	14
Tabla 2-1	Variación de factores en el estudio de la precisión.....	25
Tabla 3-1	Clasificación de los métodos cromatográficos	34
Tabla 4-1	Aplicación de la HPLC.....	37
Tabla 1-2	Características de la Ceftriaxona sódica	49
Tabla 2-2	Ensayos preliminares y experimentales para la valoración de ceftriaxona por la técnica HPLC	54
Tabla. 3-2	Preparación de las soluciones de la fase móvil, realizadas en el laboratorio de Control de Calidad, empresa Betapharma S.A, Quito, 2015.....	55
Tabla 4-2	Parámetros de idoneidad del sistema cromatográfico, descripción, especificación y determinación.....	57
Tabla 5-2	Criterios de aceptación de la linealidad del método y análisis estadístico	59
Tabla 6-1	Descripción de las diluciones a partir de muestras de ceftriaxona del lote 0515063 para el factor de linealidad, realizadas en el laboratorio de Control de Calidad, empresa Betapharma S.A, Quito, 2015	60
Tabla 1-3	Resultados de los factores de Idoneidad del Sistema Cromatográfico (Sistem Suitability).....	65
Tabla 2-3	Rango de las concentraciones del método utilizado para la cuantificación de ceftriaxona 1g, realizado en el laboratorio de Control de Calidad, empresa farmacéutica Betapharma, Quito, 2015	76
Tabla 3-3	Datos analíticos de la linealidad a partir del rango de 60 a 200%, determinados en el equipo Ultimate 3000 realizado en el laboratorio de Control de Calidad, empresa Betapharma, Quito,2015.....	77
Tabla 4-3	Resumen de los datos de los resultados de linealidad realizados por el método general en el equipo Ultimate 300 desarrollado en el laboratorio de Control de Calidad de la empresa Betapharma, Quito,2015	79
Tabla 5-3	Datos de la Repetibilidad del método determinado en el equipo Ultimate 3000, realizado en el laboratorio de Control de Calidad, empresa Betapharma, Quito, 2015	81

Tabla 6-3	Datos del análisis de la precisión intermedia de la valoración de ceftriaxona 1g a la concentración 0.1mg/mL, realizado en los equipos Ultimate 3000 y Merck Hitachi D-6000® en el laboratorio de Control de Calidad, empresa Betapharma, Quito, 2015.....	82
Tabla 7-3	Datos analíticos y análisis estadístico de la exactitud, realizado en el laboratorio de Control de Calidad, empresa Betapharma, Quito 2015.....	84
Tabla 8-3	Resultados del análisis del límite de cuantificación de la ceftriaxona 1g por HPLC, realizado en la empresa Betapharma, Quito, 2015.....	86
Tabla 9-3	Resultados de la prueba de robustez del factor nominal pH de la fase móvil, bajo las condiciones de pH Ác. 6,48; 4,44 y un pH. OH 11,68; 12,54, para la cuantificación del principio activo ceftriaxona 1g, realizado en el laboratorio de Control de Calidad, empresa Betapharma, Quito 2015.....	87
Tabla 10-3	Resultados de la valoración del estándar secundario de ceftriaxona sódica, realizado en la empresa Betapharma, Quito, 2015.....	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1	Elección, desarrollo y evaluación del método.....	10
Figura 2-1	Proceso general para realizar la validación de métodos analíticos.....	16
Figura 3-1	Secuencia de la documentación del proceso de validación.....	17
Figura 3-1	Ensayos preparativos para la determinación de la selectividad.....	20
Figura 4-1	Cromatografía en fase normal.....	35
Figura 5-1	Cromatografía en fase reversa.....	35
Figura 6-1	Esquema fundamental de los componentes de un equipo característico de CLAR.....	41
Figura 7-1	Cromatograma con la elución de dos sustancias.....	42
Figura 8-1	Esquema de Triangulación de un pico Gaussiano.....	43
Figura 9-1	Estructura desarrollada Ceftriaxona.....	46
Figura 10-1	Mecanismo de acción de betalactámicos.....	47
Figura 1-3	Cromatograma ensayo A.....	66
Figura 2-3	Cromatograma ensayo B.....	67
Figura 3-3	Cromatograma ensayo C.....	67
Figura 4-3	Cromatograma ensayo D.....	68
Figura 5-3	Cromatograma ensayo E.....	68
Figura 6-3	Cromatograma ensayo F.....	69
Figura 7-3	Cromatograma ensayo G.....	70
Figura 8-3	Cromatograma estándar USP de ceftriaxona inyección 1.....	72
Figura 9-3	Cromatograma estándar USP de ceftriaxona inyección 2.....	73
Figura 10-3	Cromatograma estándar USP de ceftriaxona inyección 3.....	73
Figura 11-3	Cromatograma estándar USP de ceftriaxona inyección 4.....	74
Figura 12-3	Cromatograma estándar USP de ceftriaxona inyección 5.....	74
Figura 13-3	Cromatograma estándar USP de ceftriaxona inyección 5.....	75
Figura 14-3	Cromatograma a escala del estándar USP de ceftriaxona.....	75
Figura 15-3	Gráfica de la relación lineal de las Áreas con la concentración de ceftriaxona por el método de regresión lineal, calculado por el programa SPSS.....	78

Figura 16-3	Análisis estadístico del Test de Pearson (correlación) calculado en el programa SPSS.....	79
Figura 17-3	Resultados del análisis estadístico Anova de un factor, calculado por el programa SPSS.....	83
Figura 18-3	Gráfica de la exactitud de la relación del Área detectada por el HPLC con la concentración porcentual.	84
Figura 19-3	Gráfico del análisis de robustez de la relación de las Áreas cuantificadas de ceftriaxona a pH ácido y básico con base al estándar de referencia USP	88

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo A Linealidad del método analítico para la cuantificación de ceftriaxona polvo para solución inyectable 1g a 5 niveles de concentración, desarrollado en el equipo ULTIMATE 3000
- Anexo B Cromatogramas del estudio de Precisión, del factor Repetibilidad del lote 0515063 de ceftriaxona, desarrollado en el equipo ULTIMATE 3000
- Anexo C Certificado del estándar USP de ceftriaxona sódica
- Anexo D Certificado del producto ceftriaxona
- Anexo E Evidencia fotográfica de la validación del método analítico para la cuantificación de ceftriaxona polvo para inyección 1g, desarrollado en el laboratorio de Control de Calidad, empresa Betapharma S.A, Quito. 2015

RESUMEN

El presente trabajo investigativo tiene como objetivo desarrollar la validación del método analítico por Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para la cuantificación de ceftriaxona 1g polvo para solución inyectable, para su implementación en el laboratorio de Control de Calidad de la Industria Betapharma S.A, de la ciudad de Quito. La industria Farmacéutica se caracteriza por la calidez de sus procesos, gracias a la validación de métodos analíticos permite conocer los parámetros de desempeño del método y proporcionar un grado de confianza y seguridad en los resultados. En la primera etapa se optimizó el método analítico con la aplicación de un diseño experimental, las condiciones óptimas que cumplieron con el Sistema Sustainability USP35(2012) fueron una fase móvil de hidróxido de tetrabutilamonio (1,75g): buffer fosfato pH7 (66mL): metanol (20mL): acetonitrilo (14mL), flujo 1,6ml/min, longitud de onda 270nm; empleando una columna Lichrospher®100RP-18(5µm) de 25cm, un volumen de inyección de 10µL, y bajo estas condiciones se validó el método. De acuerdo a los criterios de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH), la Pharmacopea Convention de los Estados Unidos (USP) y el manual de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) los parámetros de validación corresponden a la categoría I que son: Especificidad, Linealidad, Precisión, Exactitud, Límite de cuantificación y Robustez. Se demostró mediante pruebas estadísticas que el método propuesto es específico con tiempos de retención constantes; lineal ($r = 0.9993$) ($t_{exp} = 99.93 > t_{tab} = 1.771$); preciso (repetibilidad del método %CV 0,979; precisión intermedia %CV 0.267%); exacto (recuperación máx. 160.519% y mín. 81.080%; Referencia 90-115%), cuantificable a la concentración de 0.0183 y robusto (pH básico factor limitate, pH ácido determinante). Por lo tanto el método es confiable, práctico, ágil y ahorra costos en los reactivos, que garantiza la calidad del fármaco ceftriaxona a sus proveedores y consumidores.

Palabras clave: <VALIDACIÓN>, <MÉTODO ANALÍTICO>, < CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA [HPLC]>, <CEFTRIAXONA>, <OPTIMIZACIÓN DE MÉTODO>, <CUANTIFICACIÓN>, <FARMACIA>

ABSTRACT

This research work aims to develop the validation of the analytical method by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) to quantify ceftriaxone 1g powder for injectable solution for implementation in the laboratory of Quality Control Industry Betapharma S.A., Quito city. The pharmaceutical industry is characterized by the warmth of its processes. Thanks to the validation of analytical methods enable to know the performance parameters of the method and provide a degree of trust and confidence in the results. In the first stage the analytical method with the application of an experimental design was optimized. The optimal conditions met the system suitability USP35 (2012). They were a mobile phase of tetrabutylammonium hydroxide (1,75g), phosphate buffer pH7 (66mL): methanol (20mL): acetonitrile (14mL), flow 1.6mL/min, wavelength 270nm; using a Lichrospher®100RP-18 (5µm) 25cm, an injection volume of 10µL. So, under these conditions the method was validated. According to the criteria of the International Conference on Harmonization (ICH), the Convention of the United States Pharmacopeia (USP) and the manual of the Spanish Association of Industrial Pharmacists (AEFI), the validation parameters correspond to Category I they are: specificity, linearity, precision, accuracy, quantification limited (LOQ) and robustness. It was demonstrated by statistical evidence that the proposed method is specific with constant retention times; linear ($r = 0,9993$) ($t_{exp} = 99,93 > t_{tab} = 1,771$); accurate (repeatability method of %CV 0.979, intermediate precision %CV 0.267%); accurate (recovery max 160.519% and min. 81.080%; the reference 90-115%), quantifiable concentration of 0.0183 and robust (pH limit basic factor, pH determining acid). Therefore the method is reliable, practical, flexible and cost saving in reagents, which guarantees the quality of ceftriaxone their drug suppliers and consumers.

Keywords: <VALIDATION>, <ANALYTICAL METHOD>, <HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY [HPLC]>, <CEFTRIAZONE>, <OPTIMIZATION THE METHOD>, <QUANTIFICATION>, <PHARMACY>

INTRODUCCIÓN

En el transcurso del tiempo la evolución de los antibióticos tuvo su elevada importancia y se radico la era antibiótica, con la expectativa de reducir la mortalidad y morbilidad. En los años 50 se manifestó la existencia de cepas con mecanismos de resistencia como el *Staphilococcus Aureus* el cual es resistente a la penicilina. Actualmente el problema de más relevancia que afecta la salud pública de la mayoría de los países del mundo, es la creciente resistencia bacteriana. El incremento en la utilización de los antibióticos, su inadecuada prescripción en el medio extra hospitalario, la aparición de cepas resistentes, el abuso de los mismos tiene un efecto negativo no sólo para el paciente sino para la comunidad, tanto por la generación de resistencias bacterianas y el costo que conlleva a nivel hospitalario. (González A., 2001, pp.6, 13)

Lo anterior explica la creciente exigencia de la calidad de los productos Farmacéuticos y la necesidad de optimización del proceso productivo hacen que sea necesario disponer de métodos de análisis rápidos y fiables. En el Ecuador constituye una exigencia legal por parte del ARCSA (Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria) y a nivel mundial las comisiones de Farmacopeas la validación, no sólo de los procesos sino también de los métodos de análisis como punto esencial que posibilita su desarrollo y puesta a punto. (Romero Á, España, 2001, pp. 8-9)

Los métodos analíticos son ampliamente utilizados en la Industria Farmacéutica para la identificación y cuantificación de los principios activos, impurezas y productos de degradación en materias primas y producto terminado. El requerimiento principal de los métodos analíticos es la certeza y fiabilidad de obtener resultados trazables con un nivel apropiado de confianza; dichos resultados comúnmente son usados como base para la toma de decisiones financieras, regulatorias, etc; relacionadas con la innovación de productos farmacéuticos, así como con la prestación de servicios y otras actividades de importancia en las economías nacionales, regionales e internacionales. (OGA-GEC-016, 2007)

Se analiza que la ceftriaxona actualmente es uno de los antibiótico cefalosporínico de tercera generación que reúne los requisitos que caracterizan a un antibacteriano ideal, es decir su farmacodinámica es buena con difusión hacia diversos órganos y tejidos, incluyendo su difusión a la barrera hematoencefálica, su utilización es parenteral por vía endovenosa, además

presenta un amplio espectro antibacteriano, tiene escasa resistencia y pueda ser utilizado incluso como profilaxis peri operatoria, con una vida media prolongada. Además, su nefrotoxicidad es mínima y se puede asociar con otros antibióticos incluyendo aminoglucósidos. (Cuesta EC, 1988, pp. 57-65)

La Industria Farmacéutica Betapharma S.A con más de 10 años de experiencia en la elaboración de betalactámicos, es reconocida en el mercado por sus productos certificados de alta calidad y bajo costo. Para asegurar confiabilidad, los métodos analíticos se someten a un proceso de validación que tiene un impacto directo en la calidad de estos. La necesidad del laboratorio de Control de Calidad de la empresa Betapharma S.A, para cuantificar y certificar el proceso productivo de la ceftriaxona (1g) polvo para solución inyectable, con la obtención de resultados rápidos, precisos, específicos, exactos; ha permitido desarrollar la validación del método analítico idóneo para el producto farmacológico, de igual forma cubre el otro inconveniente que es la escasa disponibilidad comercial del bromuro de tetraheptilamonio empleado en el método oficial establecido por la USP35 (2012) para la cuantificación de ceftriaxona; para lo cual el método propuesto sustituye el reactivo referenciado por el hidróxido de tetrabutilamonio, el cual es empleado comúnmente en la mayoría de determinaciones analíticas dentro de la empresa; cuyo propósito es agilizar el proceso de análisis en el departamento de Control de Calidad y asegurar la calidad del producto farmacéutico.

Objetivos

Objetivo General

Desarrollar el método analítico de validación para la determinación y cuantificación de ceftriaxona 1g polvo para solución inyectable por Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), para la implementación en el laboratorio de control de calidad de la Industria Farmacéutica Betapharma S.A.

Objetivos Específicos

1. Optimizar el sistema cromatográfico del método analítico con el empleo del compuesto hidróxido de tetrabutilamonio mediante la aplicación de un diseño experimental.
2. Determinar las condiciones de idoneidad del sistema cromatográfico utilizando la fase móvil optimizada.
3. Evaluar los parámetros de desempeño analítico del método implementado para la cuantificación de ceftriaxona fabricada por Betapharma S.A como: especificidad, linealidad y rango, precisión (repetibilidad, precisión intermedia), exactitud, límite de cuantificación y robustez.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Antecedentes de la investigación

En base a las revisiones bibliográficas realizadas en bases de datos virtuales de investigación, revistas científicas (Science Direct) se encontraron los siguientes estudios vinculados a la determinación y validación de ceftriaxona, que se describen a continuación:

En el trabajo investigativo de (Péhourcq y Jarryb, 1998, pp. 159-177) sobre la determinación de cefalosporinas de tercera generación por cromatografía líquida de alto rendimiento en relación con estudios farmacocinéticos, explican una metodología por HPLC de fase inversa para la cuantificación de ceftriaxona; que se fundamenta en las condiciones del sistema cromatográfico (columna analítica, fase móvil y detección). Emplearon diferentes ensayos dentro de los cuales tenemos: 1. Columna cromatográfica LiChrosorb RP-18 (15 cm x 3.2 mm), una fase móvil compuesta de ACN 20mM: buffer de fosfato pH 7: TPAB (200:800:3.89, v/v/w), con un detector UV a 274nm y para el pre tratamiento de la muestra D-etanol, 2. Columna cromatográfica ODS, 10 mm (25 cm³4.6 mm), fase móvil de MeOH: buffer de fosfato: THBS (20:80:1.75 g, v/v/w), con un detector ED 1.15 V y el pre tratamiento de la muestra con D: MeOH. La sensibilidad y especificidad del método analítico se evaluó en base a las propiedades farmacocinéticas del fármaco en estudio. La ceftriaxona al igual que un ácido es capaz de formar pares de iones lipófilos con sales de amonio cuaternario. En consecuencia, la técnica de cromatografía de fase inversa de par iónico se elige generalmente para el desarrollo de nuevos métodos por HPLC, y los iones de amonio cuaternario se utilizan como contra iones ya que presentan buenas propiedades lipófilas.

Rawithi Hussein et al, (2000, pp. 281, 285) en su trabajo investigativo publicado en la revista *Pharmaceutical and Biomedical analysis*, describen una técnica analítica rápida, específica y sensible por cromatografía líquida (CL) con detección UV para la cuantificación de cefazolina y ceftriaxona en muestras de plasma, aplicando como patrón interno cualquiera de las dos cefalosporinas. El ensayo fue diseñado para comparar la eficacia terapéutica de cefazolina y ceftriaxona en el tratamiento preventivo de infecciones postoperatorias en cesáreas. El sistema cromatográfico consistió en una columna Nova-Pak C18 de 4mm de diámetro, fase móvil compuesta de una solución acuosa que contiene 10mM de fosfato di básico de potasio y 10 mM bromuro de cetiltrimetilamonio (pH 6,5) más acetonitrilo (73:27 v / v), un detector UV ajustado a una longitud de onda de 274nm. La velocidad de flujo programada fue de 1,5 mL / min de 0 a 12 min. Los resultados del ensayo se relacionan linealmente con la concentración ($r = 0,997$).

En el trabajo investigativo desarrollado por (Magda A. Akl, et al, 2011, pp. 247, 252) publicado en la revista *Pharmaceutical and Biomedical Analysis* desarrollaron la validación de un método por HPLC-UV para la determinación de residuos de ceftriaxona sódica en la superficie de acero inoxidable de equipos de fabricación farmacéuticos. Las condiciones cromatográficas que establecieron para la valoración de ceftriaxona consistió de una fase móvil preparada a partir de 3,2 g de bromuro de tetraheptilamonio, 390 mL de acetonitrilo, 55 mL de tampón de pH 7 más 5 mL de buffer pH 5 y 550 mL de agua. Las determinaciones cromatográficas las efectuaron en el modo isocrático. El flujo de elución fue de 1,5 mL / min, con un volumen de inyección de 20 μ L a 50°C de temperatura en la columna y la detección UV se realizó a 254 nm. Los estudios de validación mostraron que el método por HPLC-UV es selectivo, lineal, preciso y exacto; por lo tanto el método analítico es eficaz y reproducible.

Un método de HPLC para la separación de siete cefalosporinas que incluye la ceftriaxona en el plasma humano y el líquido amniótico fue desarrollado por (Emirhan Nemitlu et al , 2009, pp. 117, 125). La optimización del método cromatográfico lo realizaron en tres etapas: diseños experimentales iniciales definieron los requisitos analíticos básicos de la técnica. Posteriormente aplicaron un diseño experimental factorial fraccional para disminuir el número de parámetros que tienen efecto insignificante en las respuestas. Los parámetros significativos los optimizaron a través de un diseño factorial completo; después de haber estudiado dos respuestas (tiempos de retención y resoluciones). La valoración del activo de interés se obtuvo con una columna XTerra C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m), una fase móvil de 40mM buffer de fosfato (pH 3,2);

18% de Metanol, a un flujo de 0,85 mL / min a 32°C de temperatura en la columna. Los parámetros de validación del método fueron evaluados de acuerdo con la directriz ICH.

Según lo establece la USP 35(2012, pp.2847, 2848) en su volumen II, la valoración de la ceftriaxona sódica se cuantifica bajo las siguientes condiciones: una fase móvil compuesta de bromuro de tetraheptilamonio (3,2g): acetonitrilo (400mL): solución amortiguadora de pH7 (44mL): solución amortiguadora pH5 (4mL) y agua para completar los 100mL. Para la preparación del estándar se pesa con exactitud, para obtener una concentración ~0.2mg/mL. La preparación de la muestra a valorar se procede a pesar 40mg de ceftriaxona sódica en un matraz volumétrico de 200mL, diluido con fase móvil. El sistema cromatográfico que establece la normativa consiste de un equipo de CL con detector a 270nm, una columna de 4.0mm x 15cm con relleno de material L1 de 5µm. La velocidad de flujo es de ~2mL/min. La evaluación de la eficacia de la columna se determina a partir del pico del analito, para lo cual el número de platos teóricos es mayor a 1500, el factor de asimetría menor a 2 y la desviación estándar relativa para inyecciones consecutivas no es más que el 2%.

1.2. Marco teórico

1.2.1. Validación de métodos analíticos

Los estatutos sobre Buenas Prácticas de Fabricación vigentes en los Estados Unidos (Código de Reglamentos Federales, Administración de Alimentos y Drogas), la Pharmacopea Convention de los Estados Unidos, la Asociación de Salud Pública Americana y la Conferencia Internacional de Armonización (ICH), solicitan que los métodos analíticos de prueba, empleados para evaluar el cumplimiento de los artículos farmacéuticos, cumplan con normas adecuadas de precisión y exactitud; es decir que sus procesos sean confiables, a través de la validación, considerado parte primordial del sistema de garantía de calidad.

El concepto de validación, en correlación con la fabricación de fármacos, surgió hace 20 años, cuando la FDA (Food and Drug Administration) estudió las normas relevantes al control en la fabricación de productos farmacéuticos; que son conocidas como las GMP (Good Manufacturing Practices) o cGMP (current Good Manufacturing Practices). Es así que en el año de 1978 en un documento interno de la FDA se define la validación de manera sencilla: “*Un*

proceso de fabricación validado es uno que ha sido comprobado que hace lo que se planteaba o pretendía hacer". Hoy en día el concepto ha sido mejorado con palabras sublimes acopladas a los avances científicos y tecnológicos. (García E, 2001, pp.3-17)

1.2.1.1. Definiciones

La normativa oficial (USP 35, 2012, p. 967), precisa que la validación de una técnica analítica es el proceso que establece, mediante estudios en el laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen con los requisitos para las aplicaciones previstas.

Desde el punto de vista analítico la validación, es el establecimiento de la certeza experimental y documentada de que un procedimiento analítico conducirá, con un elevado grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos. (Aguirre et al, 2001, pp.23-118)

La Validación de procedimientos analíticos se define como el proceso para determinar por medio de estudios de laboratorio que una base de datos demuestren científicamente que un método analítico dispone de las características de desempeño necesarias para cumplir las exigencias analíticas. A su vez implica la demostración de los principios de variabilidad y del error sistemático, no solo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales. (Taylor y Jhon K, 1993, pp. 302-313)

1.2.1.2. Términos relacionados con la validación

Calibración: grupo de operaciones que establecen bajo condiciones delimitadas, la relación entre los valores exteriorizados por el sistema de medición y los valores correspondientes a un estándar de referencia.

Cualificación: proceso por el cual se evidencia que un equipo funciona correctamente y genera los resultados previstos. (Aguirre et al, 2001, pp.23-118)

Por deducción se puede decir que los métodos analíticos deben ser validados y los equipos deben ser cualificados.

1.2.1.3. Métodos analíticos

Dentro del esquema de calidad los métodos de análisis son considerados principios generales; que para su uso deben estar claramente definidos y documentados, incluso en un “manual de métodos” a disposición de todo el personal; que a su vez son autorizados por la Dirección del Laboratorio competente. Por tal razón el desempeño del Jefe de Laboratorio es definir el método analítico a ejecutarse en los análisis de rutina; que serán consistentes con la concentración de los analitos y con la clase de matriz que se pretende analizar. Para lo cual es ideal considerar los siguientes factores:

- Disponibilidad y calificación de los instrumentos y equipos.
- Rapidez de precisión de los resultados analíticos.
- Conveniencia
- Coste
- Factores de seguridad y garantía del proceso
- Exactitud y precisión

1.2.1.4. Tipos de métodos analíticos

Se pueden agrupar de la siguiente forma:

- De acuerdo a la calidad de los reactivos empleados:

Absolutos, fundamentados en el uso exclusivo de estándares primarios

Relativos, basados en el uso de estándares químicos (sustancias patrón)

- Según la calidad del propio método:

De referencia, para la cual la exactitud es conocida y comprobada

Estándar, de precisión conocida y verificada por un organismo normalizado y certificado.

Estándar de referencia, que concierne a un método estándar con exactitud demostrada.

Validado, que demuestra formalmente poseer características analíticas definidas por parámetros de exactitud, sensibilidad, precisión, selectividad, rango de linealidad y robustez. (Valcárcel M. I, 2002, pp. 127-131)

1.2.1.5. Categorización de los métodos analíticos para su selección a ser validados:

Para favorecer la selección apropiada de los procesos a ser validados los laboratorios y analistas deben orientarse por las siguientes categorías:

- Métodos normalizados: son aquellos métodos descritos por organismos oficiales tales como la Farmacopea (USP, BP, Farmacopea Europea), Norma ICH, Manuales de Métodos de la OMS y otras normas de aceptación internacional.
- Métodos estandarizados: son aquellos métodos derivados de estudios colaborativos internacionales cuyos resultados han sido generalizados y se encuentran en fase de aceptación por entidades regulares internacionales y nacionales.
- Métodos modificados: se considerarán aquellos métodos normalizados o estandarizados con variaciones de mayor o menor grado (cambios en su ejecución, utilización fuera de alcance, etc.)
- Métodos desarrollados en el laboratorio: son aquellos métodos desarrollados por el propio laboratorio como alternativa de las metodologías normalizadas y estandarizadas.
- Métodos alternativos: categoría exclusiva de los métodos de ensayo diseñados con la finalidad de sustituir, reducir, refinar el empleo de animales de experimentación.

No se considera como régimen de cumplimiento obligatorio la utilización de métodos descritos por Farmacopeas. El empleo de métodos estandarizados y desarrollados en el laboratorio es aceptable siempre que se compruebe su equivalencia y relevancia. (Regulación N°41, 2007, pp. 2-6)

1.2.1.6. Requisitos analíticos

Ante un problema analítico trascendente el laboratorio de análisis debe proceder primeramente a definir la necesidad analítica, que abarcan a los requisitos de desempeño que un método debe poseer para resolver el problema. El proceso precisa que el analista o químico farmacéutico evalúe continuamente el comportamiento del método y garantice el cumplimiento de las exigencias; de tal modo que se confirme la validez de la técnica. Se ilustra en la figura 1 el proceso secuencial de la elección, desarrollo y evaluación del desempeño metodológico, descrito anteriormente.

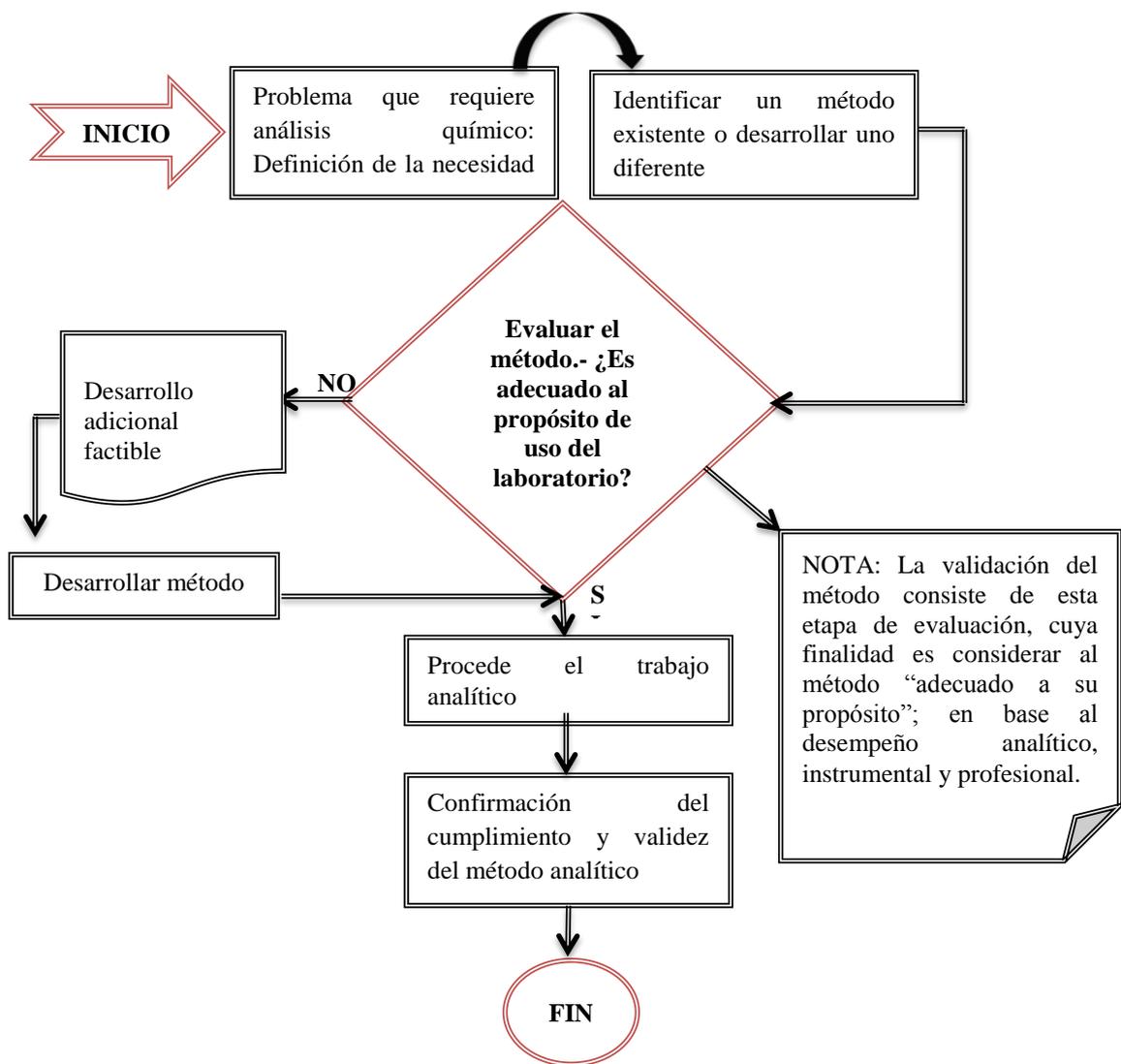


Figura 1-1. Elección, desarrollo y evaluación del método

Fuente: (Eurachem, 2005)

1.2.1.7. Razones que argumentan desarrollar la validación de métodos analíticos

- Garantizar que los métodos son adecuados a los análisis programados en las condiciones descritas.
- Ahorrar costos, con la minimización de errores y repeticiones de análisis.
- Resolver contrariedades específicas que incorporan mejoras y confiabilidad del profesional.
- Cumplir con las exigencias legales tanto del registro de especialidades farmacéuticas, órganos Internacionales, Regionales y Nacionales; a su vez con las Buenas Prácticas de Laboratorio.
- Formalizar la documentación del proceso analítico indica la uniformidad entre lotes, los cuáles cumplen con los criterios de calidad establecidos por órganos oficiales.

1.2.1.8. Antes de comenzar un proceso de validación es necesario previamente

- Garantizar que los equipos disponga de la calibración y/o calificación requerida.
- Caracterizar el analito de interés.
- Definir la composición del activo farmacológico, puesto que modificaciones en su formulación afectarían a la metodología analítica.
- Es preciso llevar a cabo el estudio de robustez, para certificar la bondad del procedimiento que se pretende desarrollar. (García E, 2001, pp.3-17)

1.2.1.9. Métodos susceptibles de ser validados

La USP 35 (2012, pp. 971) clasifica a los métodos analíticos por su rigurosidad y atributos en categorías, como se indica a continuación:

- Categoría I: ensayos analíticos para la cuantificación de los analitos o componentes principales de fármacos a granel o principio activo (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.

-
- Categoría II: procedimientos analíticos que incluyen límite de cuantificación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en manufactura.
- Categoría III: Procedimientos para la valoración de las características farmacotécnicas inherentes (Ej. Test de dilución, liberación de fármacos).
- Categoría IV: ensayos de identificación.

De acuerdo al manual de AEFI (2001) señala la aplicación de la validación para:

- Pruebas de determinación de analitos en fluidos biológicos y en productos naturales.
- Ensayos microbiológicos.

1.2.1.10. Aptitud del sistema- características de idoneidad

Se establece desde los inicios del estudio de análisis con patrones, hasta el empleo del método en muestras reales que certifiquen el buen funcionamiento del sistema en el momento de su práctica y ejecución.

El estudio de robustez se emplea para optimizar las condiciones de funcionamiento del método analítico antes de validarlo. La USP 35 (2012, pp. 971) menciona que las mediciones analíticas son susceptibles a variaciones, para lo cual se establece parámetros de aptitud del sistema con el propósito de asegurar la validez del procedimiento analítico. Las variaciones que se presentan en las etapas iniciales de la investigación son la estabilidad de soluciones analíticas, equipos y diferentes analistas. En cromatografía líquida las variaciones frecuentes son el pH de la fase móvil, la composición de la fase móvil, diferentes proveedores de columnas, la temperatura y la velocidad de flujo. Dichas pruebas de aptitud se basan en el concepto de que el equipo, el sistema electrónico, las operaciones analíticas y las muestras analíticas constituyen un sistema integral que puedan evaluarse como tal.

1.2.1.11. Características de fiabilidad

Se considera la etapa preliminar que permitirá conocer las características de capacidad del método analítico para mantenerse a lo largo del tiempo con base en los criterios fundamentales

de la validación. Las características de fiabilidad comprenden cinco niveles fundamentales de validación:

- Capacidad de una técnica para cuantificar el analito sin interferencias de impurezas, productos de degradación, excipientes o diferentes tipos de sustancias que formen parte de la muestra; término que se conoce como selectividad.
- La proporcionalidad entre la concentración del analito y respuesta del instrumento. Definición que se asocia con el parámetro de linealidad y rango.
- La dispersión de una serie de resultados tras múltiples muestreos homogéneos, en concordancia con el valor medio del procedimiento se denomina precisión.
- La diferencia entre el valor determinado en el análisis y el valor referencial. Terminología relacionada con la exactitud.
- La cantidad mínima de analito requerida para obtener un resultado significativo se relaciona con los términos límite de detección y límite de cuantificación. (Aguirre et al, 2001, pp.23-118)

La evaluación de los parámetros de validación dependerá principalmente del tipo de ensayo, como se indica en la siguiente tabla recomendada por la guía ICH Q2 (2005) y la USP 35 (2012)

Tabla 1-1: Datos requeridos para la validación

Parámetros a evaluar	Características	Categoría I (Identificación)	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
			Análisis cuantitativos	Prueba de Límite		
Exactitud	Sesgo recuperación	NO	SI	*	*	NO
Precisión:	Reproducibilidad	NO	SI	NO	SI	NO
	Repetibilidad	NO	SI	NO	SI	NO
	Precisión intermedia	NO	SI ⁽¹⁾	NO	SI ⁽¹⁾	NO
Especificidad/ Sensibilidad	Pendiente	SI	SI	SI	*	SI
Límite de Detección	----	NO	NO	SI	*	NO
Límite de Cuantificación	----	NO	SI	NO	*	NO
Linealidad	Rango lineal	NO	SI	NO	*	NO
Intervalo (Rango)		NO	SI	*	*	NO

Realizado por: Nataly Salguero 2015

Fuente: ICH Q2, 2005 (Conferencia Internacional sobre la Armonización de Técnicas Requisitos para el registro de productos Farmacéuticos para uso Humano); USP 35,2012 (Validación de procedimientos)

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

(1) En los casos en los que se realiza la reproducibilidad no es necesario efectuar la precisión intermedia.

1.2.1.12. Tipos de validación

- Validación prospectiva: se aplica cuando las condiciones definidas para un proceso analítico se efectúan antes de la comercialización del producto; de forma general este tipo de validación se realiza cuando se desarrolla un nuevo método o proceso analítico. Es característico de los laboratorios de investigación y desarrollo; y se emplea con un protocolo perfectamente planificado. Involucra todos los criterios para garantizar el funcionamiento del método. También se incorporan los procesos que sufren modificaciones que afectan las características del producto. (Sulca et al, 2007, pp. 36-39)

- Validación retrospectiva: estudio que se realiza para demostrar la idoneidad del método analítico, con la garantía constante a través de datos analíticos del fármaco comercializado. Se aplica a métodos no validados y de los que se tiene una base de análisis e información histórica de resultados. (García E., 2001, pp.10-12)

- Validación concurrente o revalidación: se aplica cuando se presentan cambios que alteran la idoneidad del proceso analítico estandarizado por normativas oficiales, que amerita una validación total (caso de cambios) o parcial (periódica). Para la práctica se establecen los motivos que exigen la validación en base a los siguientes cambios:

Materias primas; así como sus proveedores

Procesos analíticos

Formulación del producto, con la adición o sustitución de excipientes

Variación en la etapa productiva (Mata Q. Tania N, 2014, pp.27-33)

Se pueden presentar casos que requieran de una validación menor o verificación cuando se trate de:

Métodos normalizados.

Métodos normalizados empleados fuera de su alcance propuesto.

Modificaciones menores de métodos normalizados. Ejemplo: uso en otros analitos.

Cuando se trate de métodos previamente validados, que haya sufrido alguna alteración significativa para lo cual deben volverse a evaluar. Estas variaciones pueden ser; cambio de equipo, cambio de columnas cromatográficas, detectores, analista, cambio de la matriz que contiene la muestra o el nivel de concentración del analito de interés, entre otros. (Duffau B. et al, 2010, pp.47-52)

El proceso general que encamina a cumplir el objetivo de la validación, se propone la figura 2-1:

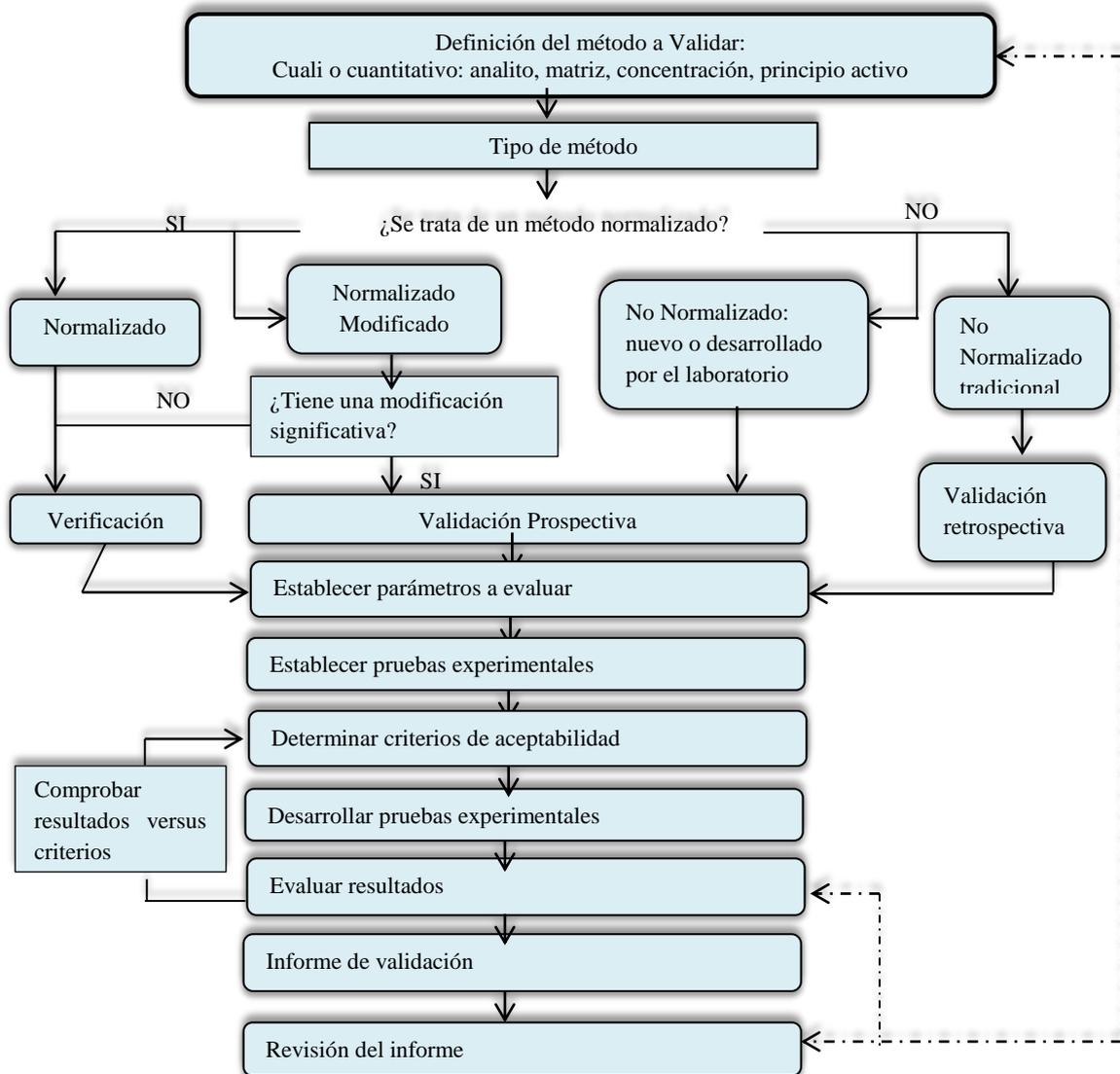


Figura 2-1. Proceso general para realizar la validación de métodos analíticos

Fuente: (Eurachem, 2005)

1.2.1.13. *Etapas de la documentación del proceso de validación:*

Según lo describe la AEFI en su monografía, la validación busca demostrar con pruebas analíticas, que tanto el método de análisis como su sistema analítico acoplados promoverán resultados adecuados a las exigencias preestablecidas. Cuya demostración debe ser documentada como se describe en la figura 3-1:

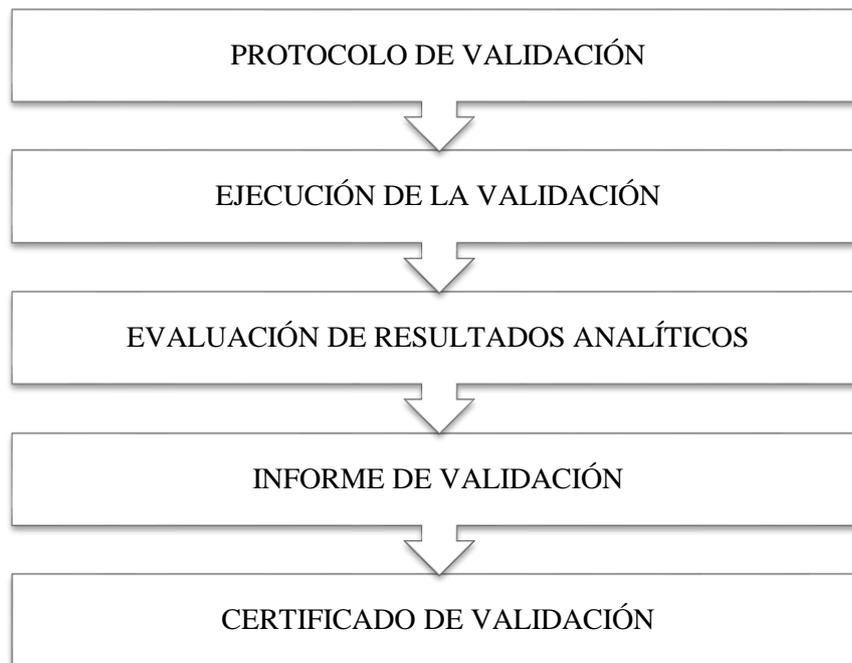


Figura 3-1. Secuencia de la documentación del proceso de validación

Fuente: (Aguirre et al, 2001.pp.23-118)

1.2.1.14. Protocolo de validación

Procedimiento experimental prospectivo que documenta información relacionada con el objetivo, la definición del método a validar, determinación de los parámetros, diseño experimental y los criterios de aceptación. Debe ser específico para cada producto farmacéutico, debiendo ir respaldado por la firma, fecha de los analistas responsables de la validación y aprobación. De acuerdo a la Guía de Inspección de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) para la Industria de Productos Farmacéuticos; capítulo N°1 se describen los parámetros que comprende el protocolo de validación:

- Objetivos de estudio
- Lugar de ejecución del proceso de validación
- Personal responsable
- Parámetros a estudiar (características de la muestra, tipo de método analítico y rango de concentraciones del activo farmacológico)
- Equipos a ser empleados; estándares, definición de los criterios para los procesos y productos relevantes
- Tipo de validación
- Requisitos de muestreo, pruebas y monitoreo

- Criterios de aceptación; se establece a priori para cada parámetro con la finalidad de alcanzar conclusiones veraces. (GMP, 2010)

1.2.1.15. Validación y estimación de los resultados

Es importante monitorizar todos los resultados producto del análisis experimental, conjuntamente con la ejecución del protocolo; para localizar antes o en el mismo tiempo cambios significativos y ejercer una acción correctiva inmediata a modo de mantener el producto bajo control.

- Informe de validación: documento escrito en el cual se incorporan y sintetizan los registros, resultados y la evaluación de un esquema de validación completo. Puede contener además, propuestas para el mejoramiento de los procesos y/o equipamiento. Los informes de validación deben incluir:

Referencia al protocolo en el cual se detalla el procedimiento para la valoración de los parámetros correspondientes al material en estudio.

Resultados de las determinaciones de cada tipo de parámetro a evaluar; que deben cumplir con los criterios de aceptación. Se deben investigar las desviaciones, los resultados fuera de especificaciones “OOS”, si amerita el caso se aplican estudios adicionales.

Certificados de la calibración y cualificación de los equipos empleados y los resultados de la comprobación de los factores de idoneidad antes de iniciar el proceso de validación.

Discusión y conclusiones de los resultados; en el cual manifiesta la aceptación o rechazo de la validación del método analítico y si es considerado exitoso o no.

- Certificado de validación: se considera como un documento formal de aprobación que elabora el laboratorio con los resultados de los parámetros de validación en base a la categorización de la muestra analizada; debe ser firmado por el personal responsable. Dicho certificado puede ser autónomo, que incluya un resumen del protocolo de validación o bien anexarlo al final del informe. (Aguirre et al, 2001.pp.23-118)

1.2.1.16. Parámetros de desempeño analítico

Son aquellos parámetros que reflejan el proceso por el cual un procedimiento analítico puede ser desarrollado y evaluado; que se describen a continuación:

Especificidad/ Selectividad

a) Definición: de acuerdo a la USP35 (2012) y el documento ICH Q2 (2005), la especificidad es la capacidad del método analítico para evaluar, medir y/o identificar simultáneamente e inequívoca el analito de interés, en presencia de componentes interferentes tanto exógenos como endógenos, tales como impurezas, productos de degradación componentes de la matriz. En relación con los métodos cromatográficos, el desarrollo de una separación con buena resolución implica especificidad del método, que demuestra la capacidad de medición del analito en presencia de todos los elementos potenciales de la muestra. La respuesta del mesurando en mezclas de ensayo, se genera por la exposición a condiciones de estrés necesarias para degradar el 80-90% de impurezas. Para los productos farmacéuticos a granel, las condiciones típicas de estrés son el calor, la luz, soluciones ácidas (HCl 0.1N) - básicas (NaOH 0.1N), oxidantes (H₂O₂ 3%); para aquellos productos formulados se utiliza a menudo el calor, la luz y la humedad (85%). Una vez demostrada la resolución de la señal cromatográfica correspondiente al analito de interés y el potencial de la muestra, los parámetros cromatográficos, tales como la composición de la fase móvil, tipo de columna, el flujo y el modo de detección se considera viable para el método a validar. (J. Mark Green, 1996, pp. 3,4)

No obstante la especificidad y selectividad se consideran términos equivalentes, otras autoridades internacionales (IUPAC, AOAC-I) los diferencian, determinando la selectividad como la capacidad de detectar separadamente componentes químicos presente en una muestra y la especificidad como la capacidad de detectar el analito sin interferencias de metabolitos alternos. El uso del término selectividad tiene implicación en los siguientes ámbitos:

- Pruebas de identificación: certifican la identidad del analito con pruebas capaces de discriminar entre compuestos estructurales relacionados con el mesurando.
- Pruebas de pureza: garantizan que todos los procedimientos analíticos desarrollados permitan declarar con exactitud el contenido de impurezas específicas cualitativo o cuantitativo de un analito (por ejemplo prueba de impurezas orgánicas volátiles, límite de metales pesados). En el caso de los procesos cromatográficos se utilizan los cromatogramas para demostrar especificidad con base en la resolución de los componentes que eluyen.

- Valoraciones: establece la riqueza de una materia prima o el contenido del principio activo de un producto formulado; proporcionando un resultado exacto de su contenido o potencia. (USP35, 2012, pp. 971,972)

b) Procedimiento de determinación de la selectividad: En lo común para la prueba de selectividad se analizan un mínimo de 3 testigos reactivos, 3 blancos de matriz y 3 muestras o estándares de concentración conocida del mesurando de interés. Para una forma farmacéutica y una materia prima los ensayos que frecuentemente se preparan son:

ENSAYOS PARA LAS FORMAS FARMACÉUTICAS

- Matriz
- Analito
- Matriz + Analito
- Matriz + Analito + Impurezas (disolventes residuales, Trazas Metálicas) + Productos de degradación)

ENSAYOS PARA LA MATERIA PRIMA

- Blanco
- Analito
- Otras sustancias similares
- Analito + Productos de degradación + Impurezas (Disolventes residuales, Trazas Metálicas, Reactivos de síntesis)

Figura 3-1. Ensayos preparativos para la determinación de la selectividad

Fuente: (Aguirre et al, 2001.pp.23-118)

La USP 35(2012) menciona, que si no se dispone de estándares de impureza o de los productos de degradación, la especificidad se demuestra comparando los resultados de las pruebas que contengan impurezas o productos de degradación con los de un segundo procedimiento caracterizado, se puede ejemplificar la comparación de un procedimiento farmacopéico y otro procedimiento validado. Para una valoración se deben confrontar los resultados; en pruebas de impurezas cromatográficas deben compararse los perfiles de impurezas.

Los documentos ICH Q2 (2005) afirman que cuando se emplean procedimientos cromatográficos, se obtendrán cromatogramas representativos para indicar el grado de selectividad y los picos deberán identificarse adecuadamente. Las pruebas de pureza de picos por lo general emplean arreglo de diodos o espectrometría de masas, resultan adecuadas para

demostrar que el pico cromatográfico del analito no puede atribuirse a más de un solo componente y por ende es selectivo /específico.

Linealidad y rango

a) Definición linealidad: capacidad de un método analítico para obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración del analito en estudio dentro de un intervalo o rango definido. La USP35 (2012) define la “linealidad” a la relación entre la concentración y la medida de valoración. En ciertos casos para lograr la linealidad, se puede transformar la concentración y/o medida; las más posibles e ideales son el logaritmo, la raíz cuadrada o el recíproco. Si no se logra la interpolación e interpretación de los datos analíticos se emplea el modelo no lineal. El objetivo principal es obtener un modelo que describa con precisión la relación entre la concentración y la función de respuesta.

b) Definición de rango: intervalo o amplitud entre las concentraciones superior e inferior del mesurando, para la cual se determina el analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad del procedimiento analítico descrito. (ICH Q2, 2005)

c) **Ámbito de aplicación:**

De acuerdo a la guía ICH Q2A recomienda determinar la linealidad en todos los métodos cuantitativos:

- Estimación del contenido de principio activo
- Uniformidad de contenido
- Disolución del principio activo
- Cuantificación de impurezas

d) **Proceso de evaluación de la linealidad e intervalo:**

Consideraciones generales: para determinar la linealidad se aplican los siguientes criterios:

Dentro del intervalo fijado se estudia al menos 5 niveles de concentración y se analizan por triplicado es decir $K=5$; n° de réplicas=3 con un total de 15 determinaciones ($n=15$). Se puede aplicar las concentraciones porcentuales de 80, 90, 100, 110, 120% del contenido teórico.

Estadísticamente se debe analizar las muestras analíticas de manera aleatoria, en la práctica las concentraciones se desarrolla en sentido creciente para disminuir posibles errores y efectos en la memoria del equipo.

Se recomienda pesar en forma independiente es decir 15 pesos, para eliminar el posible error sistemático que se produce cuando se realiza una sola pesada con sucesivas diluciones.

El principio activo a evaluar debe prepararse a partir de estándares de referencia del analito de concentración conocida, también se utiliza un lote de concentración de la especialidad a estudiar.

El número de repeticiones de cada muestra (por ejemplo el número de inyecciones en el HPLC) dependerá de la precisión del sistema instrumental utilizado.

Con los datos obtenidos se elabora una tabla relacionando las concentraciones X (variable independiente o predictiva) y la respuesta y (variable dependiente, por ejemplo Áreas, absorbancias, alturas, etc.) La relación entre las dos variables se expresa matemáticamente como una regresión lineal de tipo $y = b * x + a$, producto de la aplicación de métodos estadísticos el forma general el de mínimos cuadrados. En ciertos casos es necesario utilizar algún tipo de transformación matemática tales como logaritmo, recíprocos de variables, etc.) Con el fin de obtener una metodología lineal. (Aguirre et al, 2001.pp.23-118)

La ICH Q2A en su apéndice de Validación de Métodos Analíticos establece las especificaciones para los diferentes grupos o tipos de análisis, que se detalla a continuación:

- Valoración de un fármaco o producto terminado: para el producto farmacéutico las especificaciones son del 95-105% a liberación, 90-110% a caducidad, en base al valor nominal. Al tratarse de materia prima los límites son 98-102% o 99-101%; debido a factores exógenos la ICH recomienda un intervalo más amplio del 80-120% de la concentración de prueba.
- Determinación de una impureza: de 50-120% del criterio de aceptación.

- Uniformidad de contenido: las especificaciones generales son 85-115%. En el proceso analítico que se presente la similitud entre el análisis de contenido y uniformidad se emplea el rango de 70-130%.
- Disolución del principio activo: se considera un intervalo con la incertidumbre de $\pm 20\%$ respecto a la especificación, es decir si se trata de fármacos de liberación modificada el rango se determina: $R = (Q + 20\% \text{ ó } Q - 20\%)$; Siendo Q la especificación definida.

Consideraciones estadísticas: la determinación de la linealidad no sólo implica una representación gráfica, requiere de una comprobación estadística. Los test estadísticos de aplicación son: Análisis de la variancia (interpretación de la pendiente y linealidad), comprobando el cumplimiento de homogeneidad de variancias y normalidad de residuales. El test de proporcionalidad indica el sesgo del método, el cual es útil en el análisis de trazas. (ICH Q2, 2005)

Precisión

a) Definición: medida de dispersión de los resultados individuales de pruebas repetidas del mismo analito bajo condiciones previstas. A la vez la precisión expresa el error aleatorio inherente de un método; debido a que los factores susceptibles de intervenir sobre las mediciones analíticas no pueden ser continuamente controlados (analista, equipo, instrumento, reactivos, tiempo, tipo de columna). La precisión se expresa por regla general como el coeficiente de variación, o con el cálculo de la desviación estándar, varianza o desviación estándar relativa. (Sierra I. et al, 2010, pp.5-7)

b) Tipos de estudios que engloba la precisión:

Repetibilidad: grado de variabilidad del método bajo las mismas condiciones operativas, es decir aplicado a la misma muestra repetidas veces por único analista, sin variación del instrumento, en un mismo laboratorio y en un período de tiempo corto. La repetibilidad se expresa por el coeficiente de variación (desviación relativa) de una secuencia de mediciones analíticas. La causa que influye en la repetibilidad del proceso analítico es la concentración del analito, es decir que la desviación estándar es inversamente proporcional a la valoración del principio activo. El documento ICH establece que se evalué la repetibilidad preparando

muestras de 3 concentraciones diferentes (inferior, media y superior del intervalo especificado) y realizar 3 réplicas de cada concentración. Otra alternativa es utilizando un mínimo de 6 determinaciones al 100% de la concentración. (Aguirre et al, 2001.pp.23-118)

Repetibilidad del sistema instrumental: estudia la variabilidad en base al instrumento empleado, se analiza valorando en forma consecutiva de 6 a 10 lecturas de la muestra. En el caso que se pretenda analizar una materia prima o producto farmacéutico se prepara la muestra en base a la concentración nominal cuyo porcentaje de aceptabilidad son valores inferiores al 1-2%. Mientras que para el análisis de impurezas las muestras se preparan a la concentración del límite especificado, sus valores aceptados deben estar comprendidos alrededor del 5%.

Repetibilidad del método: se realiza sobre una serie de alícuotas de muestra homogénea que se evalúa independientemente desde su inicio (preparación de la muestra) hasta el final (lectura de resultados) por el mismo equipo y analista.

Precisión intermedia: también conocido como tolerancia o fortaleza, manifiesta la variación del método tras la evaluación de una serie de muestras, en un mismo laboratorio con condiciones operativas diferentes (variados días, diferentes analistas, equipos). Para estudiar las variaciones en forma aleatoria se recomienda un estudio matricial; de esta forma las muestras deben ser preparadas independientemente por triplicado. A continuación se describe un modelo de un diseño experimental donde se estudia la variabilidad de los factores: analista, análisis e instrumento.

Instrumento	Analista X	Día 1	Día 2	Día 3
A	Analista Y	Día 1	Día 2	Día 3
Instrumento	Analista X	Día 1	Día 2	Día 3
B	Analista Y	Día 1	Día 2	Día 3

La apreciación de la precisión intermedia se realiza con el cálculo del coeficiente de variación global de las lecturas, considerando los resultados en forma independiente. Por lo general se aceptan valores inferiores al doble del coeficiente de variación de la repetibilidad del método. En caso de no cumplir con la especificación se puede determinar el factor responsable de forma eficaz median el diseño aplicado. (Aguirre et al, 2001.pp.23-118)

Reproducibilidad: grado de concordancia de los resultados obtenidos de alícuotas de muestras homogéneas, determinados con el mismo método analítico, en condiciones diferentes ya sea de laboratorio, analista, distintos equipos y diferentes días. A partir de los estudios interlaboratorio se determina la reproducibilidad de 3 a 5 muestras, en un esquema de 2 a 4 concentraciones normal del analito de trabajo; los niveles de concentración por lo general se trabajan a 20, 80, 120% a partir de la concentración normal de trabajo en 3 distintos días. Las muestras se analizan por duplicado. Las condiciones operativas y ambientales que son diferentes para realizar el análisis pueden ser:

- Humedad y temperatura ambiental variada
- Experiencia profesional
- Características diferentes de los equipos (Volumen muerto en el HPLC)
- Variación de las condiciones instrumentales (composición de la fase móvil, pH, flujo)
- Disolventes y reactivos de diferente calidad
- Tipo de columna cromatográfica

Los datos obtenidos del análisis se expresan en términos de CV, el mismo que no excederá el 5% de variabilidad total en los estudios físico-químicos. Normalmente se aceptarán variabilidades menores para ciertos métodos como: cromatográficos $\leq 2\%$ y los espectrofotométricos $\leq 3\%$. (González A. et al, 2015, pp.5-10)

Tabla 2-1: Variación de factores en el estudio de la precisión

Factor	Repetibilidad	Precisión intermedia	Reproducibilidad
Instrumento	Similar	Diferente	Diferente
Día de análisis	Similar	Diferente	Diferente
Analista	Similar	Diferente	Diferente
Condiciones cromatográficas y/o ambientales	Similar	Diferente	Diferente
Laboratorio	Similar	Similar	Diferente

Realizado por: Nataly Salguero, 2015

Fuente: AEFI, 2001 (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria) (Validación de Métodos Analíticos)

Exactitud

a) Definición: veracidad de un procedimiento analítico que expresa la cercanía o proximidad entre el valor aceptado de un ensayo (valor referencial, convencional, verdadero) y el resultado experimental al aplicar el método analítico.

b) Ámbito de aplicación: de acuerdo a la normativa ICH Q2A se debe determinar la veracidad de método analítico en la valoración de una materia prima, producto terminado y en métodos de cuantificación de impurezas. A su vez la USP 24 menciona que la exactitud también se debe evaluar en estudios de disolución.

c) Procedimiento de evaluación de la exactitud: en la valoración de un principio activo la exactitud se demuestra en todo el rango especificado del procedimiento analítico, con respecto al analito de interés el cual posee una pureza conocida, en este caso se trata de un estándar de referencia o a su vez se puede comparar los resultados de la técnica con los de un método caracterizado; cuya exactitud sea comprobada o definida. Los documentos ICH y AEFI recomiendan que se analice la exactitud empleando un mínimo de 9 valoraciones sobre 3 niveles de concentración del mesurando, cubriendo el intervalo especificado (es decir 3 concentraciones y 3 réplicas de cada concentración); que pueden especificarse en base a la concentración media y las concentraciones de los extremos del rango. En función del tipo de método analítico se considera el rango de concentraciones a evaluar tales como:

- Valoración de la riqueza de un principio activo en materia prima o de un producto elaborado: 80-120%.
- Análisis cuantitativo de impurezas: a partir del 50% del rango especificado hasta el 120%.
- Evaluación de la disolución: para los fármacos de liberación controlada, sobre cada límite de disolución en cada período de tiempo, se aplicará en porcentaje de incertidumbre de $\pm 20\%$. (Aguirre et al, 2001.pp.23-118)

La exactitud se expresará matemáticamente por la evaluación de la recuperación del analito (porcentaje de recuperación) en todo el intervalo de la valoración. De igual manera se puede determinar la exactitud mediante el cálculo del sesgo que expresa la diferencia entre la media o expectativa relativa de los resultados del ensayo y el valor verdadero aceptado en base a los

intervalos de confianza. Es decir el sesgo es el error sistemático total en contraposición al error aleatorio. (Duffau B. et al, 2010 pp.47-52)

Para la evaluación práctica de la exactitud se aplican las siguientes ecuaciones basadas en la comprobación de su veracidad:

- Porcentaje de recuperación (R)= $\frac{X_m}{\mu} \times 100$ (Ecuación 1)

- Sesgo (S)= $X_m - \mu$ (Ecuación 2)

Donde:

X_m = Valor medio de las lecturas obtenidas

μ = Valor certificado del material de referencia

Para evaluar la exactitud con mayor certeza se aplica el test t-Student en base a siguiente ecuación:

$t_{exp} = \frac{(100 - \bar{X})\sqrt{n}}{CV}$ (Ecuación 3)

Donde:

100= constante

\bar{X} = promedio de los resultados del porcentaje de recuperación

CV= coeficiente de variación del porcentaje de recuperación

n= número de valores observados o de las lecturas analizadas

La prueba estadística nos permite definir si el valor medio calculado y el valor referencial o verdadero no difieren significativamente, para un grado de libertad n-2 y un grado de significación $\alpha=0,005$. (Fuentes R, 2013, pp.37-38)

Para determinar la exactitud de un método de valoración cuantitativa de un analito en un producto terminado (fármaco), según el caso se emplean las siguientes técnicas:

Método del placebo cargado: se ejecuta a partir de una muestra de concentración conocida; para la cual se prepara un placebo que contiene todos los componentes excepto el analito a valorar. Sobre dicho placebo se agregan cantidades conocidas del patrón (analito) a 3 niveles de concentración comprendidos en el rango de estudio. El ensayo de recuperación se realiza por triplicado para cada nivel. Se calcula el porcentaje de recuperación. La adición del placebo se trata de una aproximación debido a que en el producto original el principio activo se encuentra lijado a los excipientes que lo constituyen; de tal manera que la eficacia de la recuperación calculada con el método del placebo cargado puede llegar a ser más elevada de lo que se espera. Por lo común este diseño de recuperación se aplica para fórmulas de liberación controlada que constan de pellets o de recubrimiento polimérico o a su vez para fórmulas transdérmicas. (Aguirre et al, 2001, pp.23-118)

Método de adición de patrón o del estándar: se aplica para aquellos casos que no es viable preparar el placebo de la matriz sin el analito de estudio. Se basa en la adición sucesiva de cantidades conocidas de estándar a varias muestras, a 3 niveles de concentración comprendidos en el rango a evaluar, para lo cual se determinan como mínimo 3 lecturas de cada nivel. Al graficar el aumento de la señal contra la cantidad adicionada de patrón se obtiene la calibración, por medio de lo cual se determina la cantidad de analito presente en la muestra real. Este método indica el aumento de la concentración del analito, con el propósito de mantener bajo el error sin sobrepasar el intervalo de trabajo. (Velasteguí B. Gonzalo J, 2011, pp.37,38)

Límite de detección (LD)

a) Definición: parámetro analítico que indica la concentración o cantidad mínima de analito que puede ser detectado por el instrumento, con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales señaladas, aunque no necesariamente cuantificar. A la vez el LD es un término cualitativo con un rango de concentraciones en que se detecta el analito sin incurrir falsos positivos. (Mata Q., 2014, pp.27-33)

b) Ámbito de aplicación: la guía ICH establece que es necesario la determinación del LD en métodos de análisis de impurezas o trazas de principio activo.

c) **Determinación:** se base en el enfoque del procedimiento analítico sea este instrumental o no instrumental, de esta manera la guía ICH describe los métodos empleados para la determinación del LD tales como:

Método basado en la evaluación visual: es aplicado para aquellos procedimientos de análisis no instrumentales como es el caso del método de Cromatografía en Capa Fina (CCF o TLC) o de valoraciones volumétricas; se determina a partir de concentraciones conocidas y decrecientes de analito, se establece visualmente el nivel mínimo de concentración que se puede detectar con una razonable precisión y exactitud.

Método sobre la base de la señal/ruido: este método es el más empleado para los procedimientos de análisis instrumentales desarrollados en el campo químico-farmacéutico como la espectrofotometría UV-visible o la Cromatografía de gases o líquida (HPLC), que proporcionan una señal del blanco, un ruido de fondo o una línea de base, es decir una señal residual o concentración cero del analito. Como lo describe la guía ICH la determinación de la señal/ruido se efectúa comparando las señales medidas de las muestras con concentraciones bajas conocidas del analito con las del blanco detectado. Se establece la concentración mínima a la puede detectarse confiablemente el analito de interés. El criterio de aceptación de la relación señal/ruido son de 2:1 ó 3:1.

Método en base a la desviación estándar de la respuesta del blanco y de la pendiente de la recta de calibración: para el trabajo investigativo que trata de un método instrumental (HPLC) que no corrige la señal frente a un blanco, se considera la señal media obtenida de la determinación del placebo, es decir el ruido de fondo o background del sistema. (ICH Q2, 2005)

Límite de cuantificación (LC)

a) **Definición:** término cuantitativo de las valoraciones analíticas que se encuentran a baja concentración en la matriz de la muestra al tratarse de: impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en fármacos elaborados. La guía ICH define al LC como la cantidad más baja de analito presente en una muestra que se puede determinar cuantitativamente con

precisión y exactitud aceptables en las condiciones definidas. Habitualmente el LC se expresa como la concentración de analito interpretado como porcentaje, partes por billón.

b) *Ámbito de aplicación:* se establece el LC únicamente en métodos que determinan impurezas, debido a que actualmente la pureza de los principios activos farmacéuticos se reconoce implícitamente el test Límite de Cuantificación que indica la suma total de las impurezas cuantificadas con suficiente precisión y exactitud. (Aguirre et al, 2001.pp.23-118)

c) *Proceso de determinación:* de acuerdo a la USP se determina el LC en el caso de procedimientos analíticos instrumentales que exhiben ruido de fondo que consiste en comparar las señales medidas a partir de muestras con bajas concentraciones conocidas de analito con las muestras de un blanco. Se establece la concentración mínima a la que se puede cuantificar confiablemente el analito. El criterio habitual de aceptación es de 10:1. Otros enfoques depende de la valoración de la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de las mediciones. (USP35, 2012, pp. 970-974)

Robustez

a) *Definición:* medida de la capacidad o efectividad del método analítico para permanecer inalterado su desempeño ante la presencia de variaciones deliberadas en los parámetros del método; aporta una indicación de la fiabilidad o estabilidad del método durante su uso en rutina. La finalidad del estudio de robustez es optimizar el método analítico desarrollado o implementado por el laboratorio y describir bajo qué condiciones analíticas tales como: analistas, equipos, reactivos, pH, temperatura, tiempo de reacción, estabilidad de la muestra, etc; se ve afectada la confiabilidad de los resultados. (Duffau B. et al, 2010 pp.47-52)

b) *Ámbito de aplicación:* aplica a todos los métodos analíticos, ya que se considera imprescindible establecer la robustez antes de fijar los parámetros analíticos y redactar el método a validar. Se considera que la primera etapa del estudio es analizar todo el método y definir qué factores son los que más alterar los resultados analíticos para evitar romper la cadena de trazabilidad.

c) Procedimiento de determinación: primeramente se inicia con la evaluación de los factores de variación que influyen en el tipo de metodología analítica; al tratarse de métodos cromatográficos por HPLC se presentan los siguientes factores:

- Composición de la fase móvil
- Volumen de inyección
- pH de la fase móvil
- Flujo
- Tipo de columna
- Detector: variación de la longitud de onda (UV) o voltaje (detección electroquímica)
- Sensibilidad de integración

Para la determinación de la robustez se procede a evaluar el efecto de 7 variables con 8 análisis de la muestra de interés. Se inicia identificando los factores más relevantes que alteren la estabilidad de los resultados del método analítico. Dichos parámetros son evaluados simultáneamente con la aplicación de un diseño factorial. (Green J. Mark, 1996, pp.7-9)

Idoneidad del Sistema (System Suitability Test)

El test de idoneidad del sistema controla las posibles variaciones susceptibles que se presentan en el método analítico. Se describe como un conjunto de pruebas cuya finalidad es comprobar en el momento de la utilización del método, que el sistema (analista, reactivos e instrumento) es adecuado para llevar a cabo las valoraciones que se ha establecido y validado.

Parámetros de evaluación:

Se agrupan en 3 categorías:

- Precisión
- Límite de detección o cuantificación
- Parámetros cromatográficos:
 - Factor de capacidad (k')
 - Número del platos teóricos (N)

- Factor de asimetría o de cola
- Resolución

Precisión del test de idoneidad del sistema: se evalúa mediante la determinación del coeficiente de variación, la USP establece como criterio de aceptación igual o inferior al 2% en la inyección de 5 réplicas. La guía FDA establece un coeficiente de variación inferior al 1% para un mínimo de 5 inyecciones cuando se trata de principio activo, mientras que para el análisis de impurezas o productos de degradación es aceptable valores del 5-15%.

Límite de detección o cuantificación: es útil para confirmar la consecuencia de un determinado límite de detección o cuantificación, por ejemplo el análisis de bajos niveles de impurezas. Para ciertas aplicaciones resulta necesario el control de parámetros tales como el ruido de fondo y la derivada de la línea de base, por ejemplo para controlar la estabilidad de la temperatura, la mezcla de la fase móvil o la estabilidad de algunos detectores (índice de refracción). (Aguirre et al, 2001, pp.23-118)

Parámetros cromatográficos: se describe en el apartado de Fundamentos Cromatográficos.

1.2.2. Fundamentos Cromatográficos

La Cromatografía es considerada como un método potencial para la separación, identificación, aislamiento y caracterización de los componentes químicos relacionados en mezclas complejas; que tiene amplia aplicación en todas las ramas de la ciencia, en las industrias farmacéuticas, en la investigación básica o aplicada, en los procesos biotecnológicos, etc. (Skoog y West Holle, 2001, pp.666)

El científico ruso Mikhail Tswett en 1906 postuló la teoría de las separaciones cromatográficas, a través de su trabajo investigativo, que realizó la separación de diferentes pigmentos vegetales como clorofilas y xantofilas, al hacer pasar soluciones del extracto vegetal de hojas por una columna de vidrio rellena con carbonato de calcio, alúmina y sacarosa. En la cual observó bandas de diferentes colores y es así que acuñó el término cromatografía con las palabras

griegas *chroma* que significa “color” y *graphein* que significa “escribir”. Actualmente la cromatografía se define como la separación de componentes de una mezcla al distribuirse entre dos fases: una estacionaria y otra móvil. (Gary D, 2009, pp. 555-609)

En el proceso de separación cromatográfica consiste en que la muestra es diluida y distribuida en la fase móvil que puede ser gaseosa o líquida o un fluido supercrítico, la misma que pasa por la fase estacionaria inmisible, fija, empacada en una columna o en una superficie sólida o gel. De esta manera los componentes de la muestra son fuertemente retenidos por la fase estacionaria al ser eluidos por un bajo flujo de la fase móvil; en el caso de los componentes débilmente ligados a la fase estacionaria su retención es baja y fluyen con rapidez; este comportamiento es debido a las diferentes velocidades de migración. Es así que los componentes de la muestra se separan en bandas interpretados gráficamente por un pico cromatográfico representativo del analito en estudio que se analizan en forma cualitativa y cuantitativa. (Douglas A., et al, 2008, pp. 762-764)

Los tipos de cromatografía más empleados para el análisis químico son la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de líquidos (LC). La cromatografía de gases se fundamenta en la separación de componentes gaseosos con base en su adsorción o fraccionamiento en la fase estacionaria que parte de una fase gaseosa. La cromatografía de líquidos abarca técnicas tales como: exclusión de tamaño (separación que se establece por el tamaño molecular), de intercambio iónico (separación fundamentada en la carga eléctrica) y cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC, High-performance liquid chromatography), basada en la adsorción o dispersión de una fase líquida. Se incluye la cromatografía en capa delgada (TLC, thin-layer chromatography) se interpreta como la forma plan de la LC y la electroforesis, en la cual la separación se realiza por medio de un gradiente eléctrico basado en el signo y la magnitud de la carga del soluto. (Gary D., 2009, pp. 555-609)

1.2.2.1. Clasificación de los métodos cromatográficos

La clasificación más habitual se basa en la naturaleza de la fase estacionaria, y en el tipo de equilibrios implicados de los solutos entre las fases. En la tabla 3-1 se indica las clases generales de cromatografía.

Tabla 3-1: Clasificación de los métodos cromatográficos

Clasificación general	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
a. Cromatografía de gases (CG)	a.1. Cromatografía gas-líquido (CGL) a.2. Gas-sólido	a.1. Líquido adsorbido o unido a una superficie sólida a.2. Sólido	a.1. Distribución entre un gas y un líquido a.2. Adsorción
b. Cromatografía de líquidos (CL)	b.1. Líquido-líquido, o reparto b.2. Líquido-sólido, o adsorción	b.1. Líquido adsorbido o unido a una superficie sólida b.2. Sólido	b.1. Distribución entre líquidos inmiscibles b.2. Adsorción
c. Cromatografía de fluidos supercríticos (CFS: fase móvil: fluido supercrítico)	c.1. Intercambio de iones c.2. Exclusión por tamaño c.3. Afinidad	c.1. Resina de intercambio iónico c.2. Líquido en los intersticios de un sólido polimérico c.3. Grupo de líquidos específicos unido a una superficie sólida Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	c.1. Intercambio iónico c.2. Distribución-exclusión c.3. Distribución entre el líquido de la superficie y el líquido móvil Distribución entre el fluido supercrítico y la superficie enlazada

Realizado por: Nataly Salguero 2015
Fuente: (Douglas A. Skoog et al, 2008)

En la práctica se realiza la clasificación de la CL en base a la polaridad de la fase estacionaria:

- Cromatografía de fase normal: se considera el primer tipo de sistema empleado en el campo de la química, se define por el grado de polaridad de los compuestos presentes en la mezcla. Este proceso emplea una fase estacionaria de alta polaridad o hidrófila por ejemplo sílice o alúmina y una fase móvil de baja polaridad o hidrófoba por ejemplo hexano, cloroformo; se aplica cuando se analizan compuestos altamente polares. El compuesto hidrófilo se asocia y es retenido por la fase estacionaria. La fuerza de adsorción se incrementa a medida que aumenta la polaridad del compuesto y la interacción entre el compuesto polar y la fase estacionaria polar (en relación a la fase móvil) aumenta el tiempo de retención. El uso de disolventes de elevada polaridad en la fase móvil hacen que se reduzca el tiempo de retención de los compuestos; en tanto que los disolventes hidrofóbicos tienden a incrementar el tiempo de retención. En la figura 4-1. se explica el fundamento de la cromatografía de fase normal. (Harris Daniel C, 2001, pp.699)

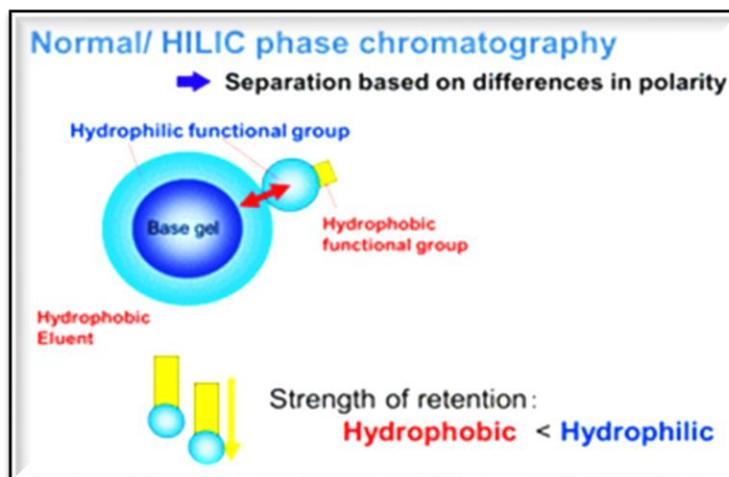


Figura 4-1. Cromatografía en fase normal

Fuente: (Shodex, 2002)

- Cromatografía de fase reversa (inversa): fue establecido por los científicos (Marlin y Howard, 1995, pp.2-4) quienes revirtieron la polaridad de las fases con la finalidad de separar ácidos grasos. Esta técnica cromatográfica se ha convertido en la más empleada en las determinaciones de los métodos analíticos; ya que proporciona retención y selectividad óptima cuando se las muestras son de carácter alifático o aromático. Se caracteriza por presentar una fase estacionaria hidrófoba y una fase móvil moderadamente polar. En tiempo de retención en mayor para las moléculas de carácter polar, en tanto que las de polaridad baja eluyen rápidamente. El comportamiento de la fase reversa se observa en la Figura 5-1.

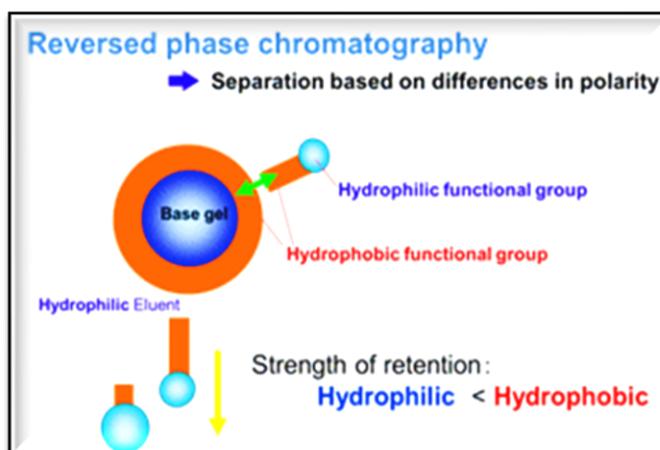


Figura 5-1. Cromatografía en fase reversa

Fuente: (Shodex, 2002)

1.2.2.2. Cromatografía de elución en la columna

La elución es el proceso por el cual los analitos se limpian por medio de una fase estacionaria que es impulsada por la fase móvil o eluyente que se deposita en la columna. La elución se realiza bajo dos tipos: isocrática y en gradiente; que se fundamentan en la composición de la fase móvil.

- Elución isocrática: las moléculas eluyen usando un solvente o mezcla de solventes que conserva la misma concentración y es constante durante todo el tiempo del proceso cromatográfico. Para evaluar las separaciones por elución isocrática se determina el tiempo de retención, factor de capacidad y resolución.

- Elución en gradiente: los analitos son eluidos variando la composición de la fase móvil a lo largo del proceso cromatográfico. Esto depende del tipo de columna, de la modificación de la polaridad del eluyente, del incremento de la fuerza iónica. El resultado es el acortamiento del tiempo de retención, dado que el factor de retención a media que aumenta el flujo de gradiente y el compuesto eluye. (Hernández J, 2005, pp.49-59)

1.2.2.2. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

El primer equipo de HPLC fue fabricado por Csaba Horvath y su colega S. R. Lipsky, de la Universidad de Yale y lo llamaron “Cromatografía de líquidos de alta presión”. En la década de los 70 con el avance tecnológico permitió producir partículas pequeñas de sílice silanizadas, con la gran ventaja de emplear columnas de volumen pequeño y mayor longitud, que garantizaron un rendimiento óptimo con una elevada resolución del pico. En la actualidad la metodología se le llama “Cromatografía de líquidos de alta eficiencia”. (Gary D., 2009, pp. 555-609)

- *Definición:* es un método analítico moderno de separación que se base en la interacción diferencial por partición de los componentes de una muestra a través de la elución, que se distribuyen en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. La importancia de la metodología de HPLC es su grado de polaridad que le otorga rangos amplios de sensibilidad, la idoneidad para automatizar su proceso, su capacidad para especies volátiles o termolábiles y su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas. La diferencia existente entre la CG y la HPLC se define por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra. (Hans K., 2010, pp.14-20)

- *Aplicación:* se emplea como técnica preparativa y método analítico, que permite la purificación, identificación y cuantificación de analitos, apto para separar macromoléculas, especies iónicas, productos naturales lábiles, componentes poliméricos y una diversidad de grupos poli funcionales de alto peso molecular tales como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas. Se describe en la tabla 4-1, las variadas aplicaciones de la HPLC. (Hernández P, 2005, pp.49-59)

Tabla 4-1: Aplicación de la HPLC

Campo	Aplicación
Fármacos	Antibióticos, sedantes esteroides, analgésicos
Bioquímica	Aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos
Productos de alimentación	Edulcorantes artificiales, antioxidantes, aflatoxinas, aditivos
Productos de la industria química	Aromáticos condensados, tenso activos, propulsores, colorantes
Contaminantes	Fenoles, pesticidas, herbicidas
Química forense	Drogas, narcóticos, alcohol en sangre
Medicina clínica	Ácidos biliares, metabolitos de drogas, extracto de orina, estrógenos

Realizado por: Nataly Salguero 2015
Fuente: (Chicharro Manuel, 2012)

- *Equipo para HPLC*

Con la finalidad de alcanzar separaciones más rápidas y eficientes con presiones de hasta 6000psi, con rellenos de partículas entre 3 a 5mm de diámetro, con una longitud de 10 a 30cm, se obtiene una rapidez de flujo de 1 a 2mL/min, para cumplir estos parámetros se aplica la técnica de HPLC. El cromatógrafo de líquidos (HPLC) está constituido de los siguientes componentes:

a. Rack de solventes (Sistema de tratamiento de solventes): el sistema de suministro de eluyentes está equipado con recipientes de vidrio de 500mL o más que contienen la fase móvil. Consta también de un sistema para descartar los gases disueltos y el polvo de los líquidos. Los gases disueltos generan flujos inestables y ensanchamiento de las bandas o picos cromatográficos; de igual forma la presencia de burbujas y el polvo interfieren con el funcionamiento de la mayoría de los detectores. Los desgasificadores forman parte del rack de

solventes que se ubica en la bomba, que radica en un sistema de bombeo por vacío, por destilación o calentamiento; por lo general se emplea el sistema de purga que permite impulsar los gases disueltos fuera de la solución a través de un gas inerte (helio) insoluble en la fase móvil, el cual evapora parte del disolvente volátil. A menudo los sistemas consisten de un dispositivo para filtrar los solventes y eliminar las partículas sólidas suspendidas para evitar daños en la bomba, taponamiento de la columna. Los requisitos que deben cumplir los solventes de la fase móvil para evitar interferencias en la funcionalidad de la bomba y del resto del sistema cromatográfico son las siguientes:

- Utilizar solventes puros de grado HPLC
- Filtrar la fase móvil por un filtro millipore
- Desgasificar la fase móvil

Para la elución de la fase móvil se presentan dos situaciones cuando se emplea un solvente o una mezcla de solventes de composición constante se denomina *elución isocrática*, mientras que en la *elución con gradiente* se usan dos o más sistemas de solventes que difieren en su grado de polaridad y varían en composición durante la separación. (Douglas A., et al, 2008, pp. 762-764)

b. Sistema de bombeo: las características que deben presentar las bombas para cromatografía de líquido corresponden a: generar presiones de hasta 6000psi (lb/in² o 414 bares), salida independiente de pulsos, tasas de flujos de 0,1 a 10mL/min, reproducibilidad del flujo, componentes resistentes a la corrosión. Para la CL se utilizan tipos de bombas, la bomba de desplazamiento y la más comercial es la de tipo reciprocante. Considerando la fuerza motriz los tipos de bomba se clasifican en: bombas neumáticas (bombas de desplazamiento directo y amplificadores de aire) y bombas de motor eléctrico (bombas de jeringa y alternantes de pistón o membrana). (Méndez M, 2008, pp.45-47)

c. Sistema de inyección de la muestra o mezclado de la fase móvil (Autosampler): su finalidad es introducir la muestra sin despresurizar el sistema y sin reforzar la columna a través de micro jeringas capaces de resistir 1500 psi. El inyector consiste de una válvula de inyección y un bucle. Existen tipos de inyectores, los manuales que se categorizan como los de jeringa y de válvula. También están los auto inyectores (Autosampler) que en la actualidad son los que

más se emplean para CL, estos constan de un válvula mecánica, placas microtituladoras, con un muestreador automático basado en los rizos de muestreo y una bomba de jeringa para inyectar volúmenes menos de 1µL hasta más de 1mL. El factor limitante de la CL es la reproducibilidad de inyección de las muestras en el relleno de la columna, que presenta ensanchamiento de banda. Es así que los volúmenes de muestra que se utilizan tienen que ser de pequeñas décimas de micro litros. (Gary D., 2009, pp. 555-609)

d. Columna: considerado el elemento fundamental de un cromatógrafo de líquidos y comumente se lo denomina el corazón del HPLC, puesto que en ella tiene lugar la separación de los compuestos. La USP 35 (2012) establece que el término columna incluye columnas de acero inoxidable, de acero inoxidable con recubrimiento interno y poliméricas, rellanas con una fase estacionaria.

En forma general el diámetro interno de la columna es de 3 a 5mm, con una longitud de 5 a 25cm, frecuentemente se usan columnas rectas. El tamaño de partícula de los rellenos mas comunes son 3 o 5µm. Las columnas de mayor utilidad presentan un diámetro interno de 4.6mm, con un tamaño de partículas de 5 µm y su longitud es 10 a 15 cm. Las cuales generan 40 000 a 70 000 platos/metro (en forma normal alrededor de 10 000 platos/columna). En los últimos años con la evolución tecnológica en el mercado se encuentran columnas microbore de pequeño tamaño, con un diámetro entre 2 y 0.5mm, la longitud de 25 y 100cm. Este tipo de columnas tiene la ventaja de reducir el consumo de disolvente y facilitan el acoplamiento de otras técnicas analíticas (básicamente espectrometría de masas). (Barquero M, 2004, pp.12-14)

Las columnas analíticas son las que generalmente se realizan las separaciones y son de los siguientes tipos:

- Columnas capilares (micro columnas)
- Columnas de micro calibre y calibre estrecho
- Columnas estándar
- Columnas rápidas
- Columnas preparativas

Entre el inyector y la columna se incorpora una pre columna o guarda columna de 3 a 10cm, su finalidad es prolongar la vida la columna analítica y optimizar las separaciones al remover compuestos de muy elevada retención y suspende materia sólida proveniente de la muestra, que si no existiera dicha pre columna los sólidos llegarían a contaminar la columna y modificarían su eficacia y selectividad. (Douglas A., et al, 2008, pp. 762-764)

e. Detectores: es un dispositivo que mide una propiedad física del eluyente causado por la presencia del soluto al salir de la columna. La detección se trabaja bajo condiciones de flujo constante. Por lo general las muestras llegan al detector en cantidades de microgramos y nanogramos. Los detectores de uso extendido que no aportan información estructural tenemos: detector de índice de refracción, detector UV, detector de fluorescencia, detector de conductividad electrónica y detector electroquímico. La característica común que presentan los equipos de HPLC es un detector de serie de diodos. (Santiago R., pp. 191,192)

Propiedades de un detector para CL:

Propiedades que no interfieren en la eficacia de la separación:

- Respuesta (señal ofrecida por el detector debido a una variación de la propiedad física del eluyente)
- Ruido
- Deriva (variación de la señal de base a lo largo del tiempo)
- Sensibilidad (mínima cantidad de analito que pasa por el detector, para que la señal sea 2 veces mayor que la del ruido de fondo)
- Rango dinámico (Rango de concentraciones del soluto)

Propiedades que afectan la eficacia de la respuesta:

- Volumen de la cubeta
- Constante de tiempo

f. Sistema de recolección de datos (Integración): por medio de un dispositivo digital que incorpora un sistema o programa específico para cada instrumento de HPLC, se controlan los

parámetros de composición de la fase móvil, mezcla de diferentes solventes en función del tipo de proceso que se aplique, temperatura, secuencia de inyección, flujo, tiempo, datos del detector (longitud de onda, etc). La mayoría de sistemas operativos incluyen programas que miden el rendimiento del proceso cromatográfico, permiten también la cuantificación de sustancias. Por medio del ordenador se realiza la integración de los datos obtenidos a través del Cromatograma que se genera por la señal detectada de cada analito, como resultado de la separación.

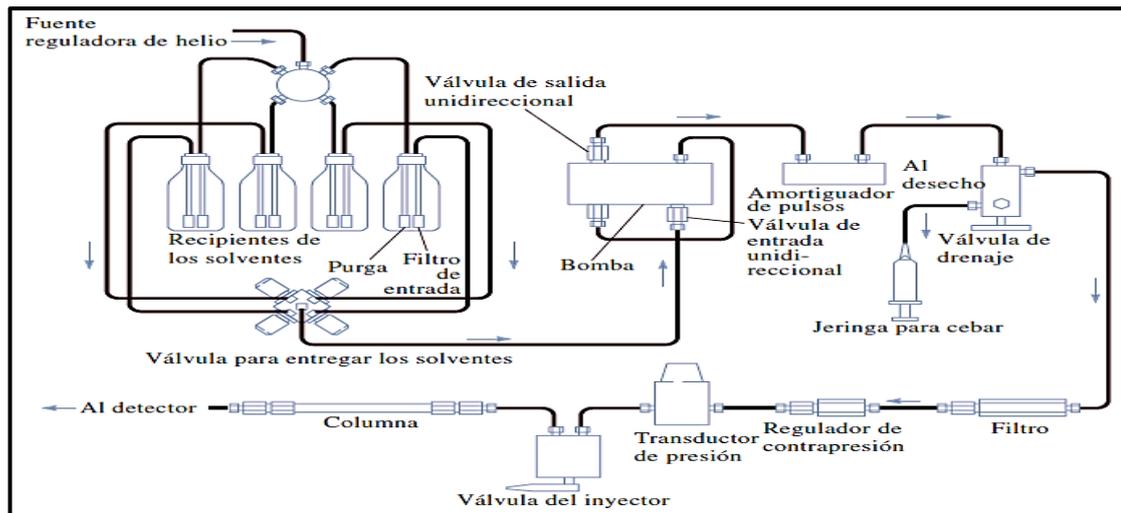


Figura 6-1. Esquema fundamental de los componentes de un equipo característico de CLAR.

Fuente: (Douglas A, et al, 2008, pp. 762-764)

g. Cromatograma: es una representación gráfica de la respuesta del detector, la concentración del analito en función del tiempo o volumen de efluente añadido. Es útil para el análisis cualitativo como cuantitativo. La ubicación de los picos en el eje del tiempo se emplea para identificar los componentes de la muestra, en tanto que las Áreas bajo los picos permiten una medida cuantitativa de cada analito. Los componentes que se encuentran en el cromatograma tenemos:

- Tiempo muerto (T_M): es el tiempo requerido para que la especie no retenida alcance el detector.
- Tiempo de retención (t_R): es el tiempo que transcurre después de la inyección de la muestra, para que el analito alcance el detector. (USP 35, 2012)

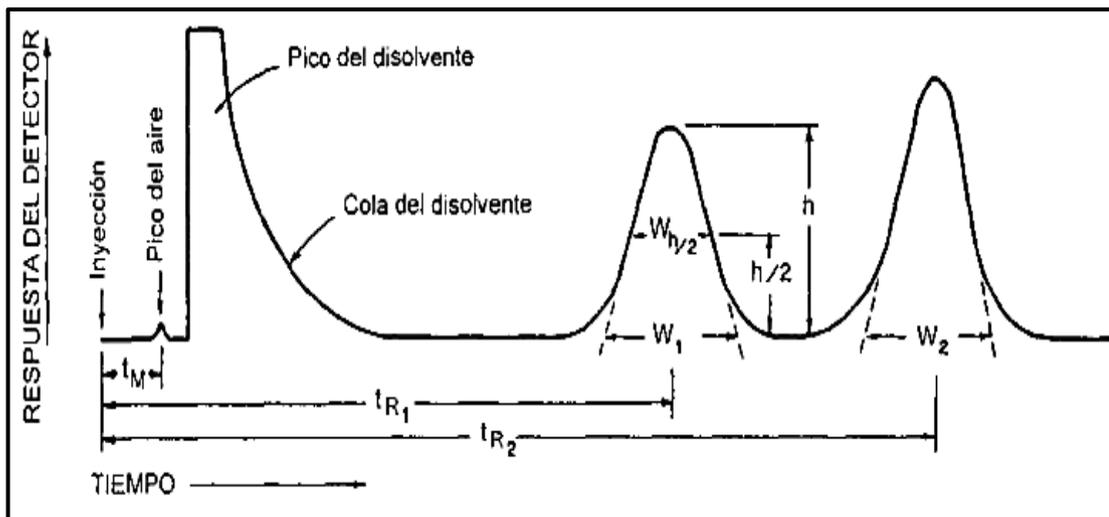


Figura 7-1. Cromatograma con la elución de dos sustancias.

Fuente: (USP 35, 2012)

1.2.2.3. Parámetros Cromatográficos

Los parámetros que precisan una separación cromatográfica, son extrapolables a las separaciones que utilizan técnicas de desarrollo de métodos analíticos.

Retención o factor de capacidad (k')

Se define como el número de moléculas que en equilibrio pasan a la fase estacionaria, con respecto a las que permanecen en la fase móvil. Este factor es adimensional, en la práctica los analitos cuantificados deben presentar valores de k' entre 1 y 10, con el propósito de no incrementar los tiempos de separación. (Douglas A., et al, 2008, pp. 762-764)

Se determina a partir del cromatograma donde:

$$k' = (t_R - t_M) / t_M$$

Eficiencia, número de platos teóricos (N, adimensional)

Se plantea la teoría de platos que consiste en la presencia aparente de un número de zonas adyacentes, en las cuáles hay un espacio para que el soluto se encuentre en equilibrio con las dos fases. Explica la forma Gaussiana de los picos cromatográficos y su velocidad de desplazamiento por la columna. La eficiencia de una columna para separar analitos depende del número de platos teóricos (N); es decir que a mayor valor de N es mejor la separación y cuantificación de los solutos. Para una columna de longitud conocida, la eficiencia es mejor cuando la altura equivalente de plato teórico (HETP) es menor. (Legaz G. María E et al, Madrid, pp.7-18)

La determinación del número de platos teóricos se establece en cada condición de flujo de la fase móvil, para lo cual se triangulo la señal detectada. La triangulación del pico se realiza ampliando la línea base y posteriormente se trazan tangentes al punto de inflexión de acuerdo a la Figura 8-1, en la cual se observa que el segmento de la línea base intersectada por las tangentes en el pico y una altura (h) desde esta base hasta el punto de corte con las tangentes, se obtiene el valor de la anchura en la base ($W_b = 4\sigma$) y a media altura ($W_{1/2} = 2,35\sigma$). La altura a media anchura ($h_{1/2}$) es la mitad del valor de h.

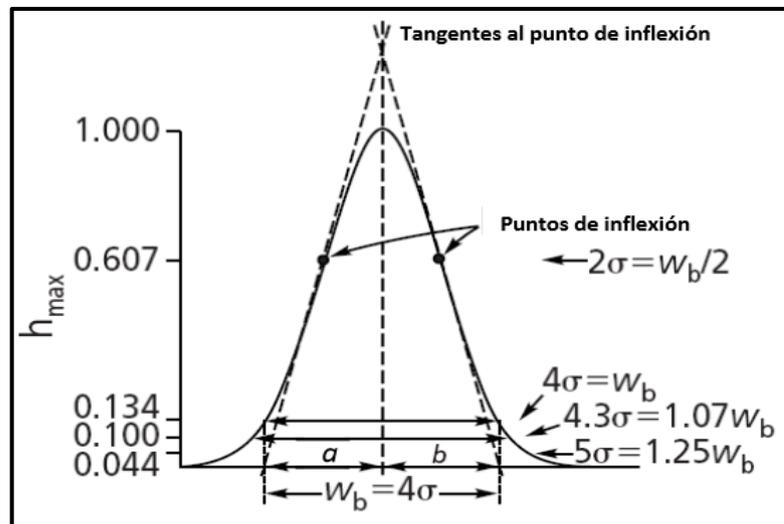


Figura 8-1. Esquema de Triangulación de un pico Gaussiano
Fuente: (Legaz G. María E et al, Madrid, pp. 7-18)

De acuerdo a la USP 35 (2012) los platos teóricos (N) (adimensional) se calculan por la siguiente ecuación: $N = 16 (t_R / W)^2$ (Ecuación 4), en donde t_R es el tiempo de retención del analito y W es el ancho del pico en su base. Cuando se emplean integradores electrónicos, se emplea la siguiente ecuación para determinar el número de platos teóricos efectivos (eficacia):

$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$ (Ecuación 5), donde $W_{1/2}$ es el ancho del pico a la mitad de la altura. El valor de N depende del analito a separar y cuantificar, a su vez de las condiciones operativas tales como la velocidad de flujo, la temperatura de la fase móvil o gas transportador, la calidad del relleno, la uniformidad del relleno dentro de la columna y para columnas capilares el espesor de la película de la fase estacionaria, el diámetro interno y la longitud de la columna. (USP 35, 2012, pp. 975-979)

Factor de separación o selectividad, α (adimensional)

Establece la separación entre picos cromatográficos y su relación relativa de 2 sustancias que eluyen uno a continuación de otro. Cuando el valor calculado de $\alpha = 1$ indica tiempos de retención iguales y por lo tanto no existe separación. Lo ideal es obtener valores mayores a 1 ($\alpha > 1$), que indican buena separación. Se define como el cociente $\alpha = K_B / K_A$, siendo B la especie más fuertemente retenida. También se deduce que $\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$, o bien $\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$, de esta forma se obtiene de los tiempos de retención y muerto. (Buceta J, et al, 2011, pp.245-249)

Factor de asimetría o de cola

También conocido como factor de simetría de un pico, que se representa por el pico Gaussiano. Se determina por la ecuación: $As = W_{0.05} / 2f$, donde $W_{0.05}$ es el ancho del pico al 5% de la altura y f es la distancia del máximo del pico hasta el borde inicial del pico, midiendo la distancia en un punto ubicado al 5% de la altura de la línea base. (Lidia Q, 2015)

Resolución, R_s (adimensional)

Medida cuantitativa del grado de separación de dos picos consecutivos. Cuando el valor calculado es de 1,5 señala una separación hasta la línea base de ambos picos y un valor de 1.00 es indicativo de una resolución del 90%. Es decir para el análisis cuantitativo valores < 1 muestra solapamiento de picos; valores de $R_s \geq 1$ señala separación. Se determina por la

siguiente ecuación: $Rs = 2 (t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2)$; donde t_{R2} y t_{R1} son los tiempos de retención de los dos analitos a cuantificar; y W_1 - W_2 son los anchos en las bases de los picos, obtenidos extrapolando los lados relativamente rectos de los picos hasta la línea base. (Legaz G. María E et al, Madrid, pp. 7-18)

1.2.3. Cefalosporinas

En el año de 1948 el científico italiano Gulseppe Brotzu, aisló el *Cephalosporin acremonium*, como primera fuente de cefalosporinas, del agua de mar cerca de una alcantarilla, ubicada en las costas de Cerdeña. Observó que los cultivos de los hongos de Cerdeña inhibían in vitro la proliferación bacteriana de *S. aureus* y aliviaban la fiebre tifoidea manifestada en el ser humano. Descubrió que el líquido de cultivo de los hongos contenía tres antibióticos diferentes que recibieron el nombre de cefalosporinas P, N y C. Al aislar el núcleo activo de la cefalosporina C, realizó el hallazgo del ácido 7-aminocefalosporánico, y la adición de cadenas laterales, permitió el desarrollo de compuestos semisintéticos con actividad antibacteriana mucho mayor que la de la sustancia original. (Goodman y Gilman, 2012, pp.1493-1499)

En la actualidad las cefalosporinas se clasifican en cuatro generaciones de acuerdo al espectro de acción frente a microorganismos Gram negativos y la estabilidad de la droga a la betalactamasa. Para el desarrollo del trabajo investigativo se hace referencia a las cefalosporinas de tercera generación.

1.2.3.1. Cefalosporinas de tercera generación

Presentan un espectro de actividad mucho más amplio contra bacterias Gram negativas y resisten más a la betalactamasa, estos antibióticos son considerablemente menos activos que las cefalosporinas de primera generación para inhibir bacterias Gram positivas. La actividad antibacteriana de los fármacos de esta generación se establece para microorganismos anaerobios Gram negativos y a menudo contra *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Enterobacter*, *K. pneumoniae*). Las drogas pertenecientes son: cefotaxima, ceftizoxima, ceftriaxona, cefpodoxima, ceftibuteno, moxalactam, ceftazidima, cefoperazona y cefixima. (Mendoza P., 2008, pp.608-610)

1.2.3.2. Ceftriaxona

La ceftriaxona se clasifica como una cefalosporina de tercera generación con un amplio espectro de acción bacteriana contra microorganismos Gram positivas y Gram negativas, comúnmente utilizado en unidades de cuidados intensivos (UCI) para el tratamiento empírico de una amplia gama de infecciones. (Bustos G., 2012, pp. 3-4)

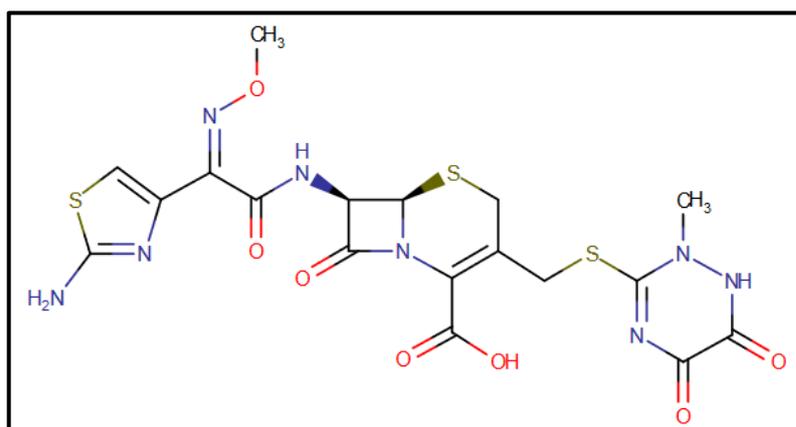


Figura 9-1. Estructura desarrollada Ceftriaxona

Fuente: (USP 35, 2012)

Compuestos que contienen un 1,2-tiazina fusionado a un 2-azetidiona a un oxo-5-Thai-1-azabicyclo [4.2.0] oct-resto de ácido 2-eno-2-carboxílico o un derivado del mismo.

a. Descripción

La ceftriaxona es una sal disódica, se presenta como un polvo cristalino blanco o anaranjado amarillento (Hemiheptahidrato), se funde a más de 115°C con descomposición, su pK es aproximadamente 3 (COOH); 3,2 NH₃; 4,1(OH enólico). El color varía de amarillo claro y ámbar de acuerdo a la concentración y el tiempo de conservación: pH (solución al 1%) alrededor de 6.7. Las características de solubilidad son: muy soluble en agua (unos 40 g/100mL a 25°C), poco soluble en metanol, escasa solubilidad en alcohol. (Gennaro R, 2003, pp. 1795-1797)

c. Mecanismo de acción

La ceftriaxona desarrolla su actividad terapéutica a través de la inhibición de la síntesis de mucopéptido en la pared celular bacteriana. El resto de betalactamasa de ceftriaxona se une a las carboxipeptidasas, endopeptidasas y transpeptidasas en la membrana citoplasmática bacteriana. Cuyas enzimas están implicadas en la síntesis de la pared celular y la división celular. Mediante la unión a estas enzimas, Ceftriaxona inhibe la formación de las paredes celulares e induce la autólisis bacteriana. (Tomberg J et al, 2010, pp. 7-10)

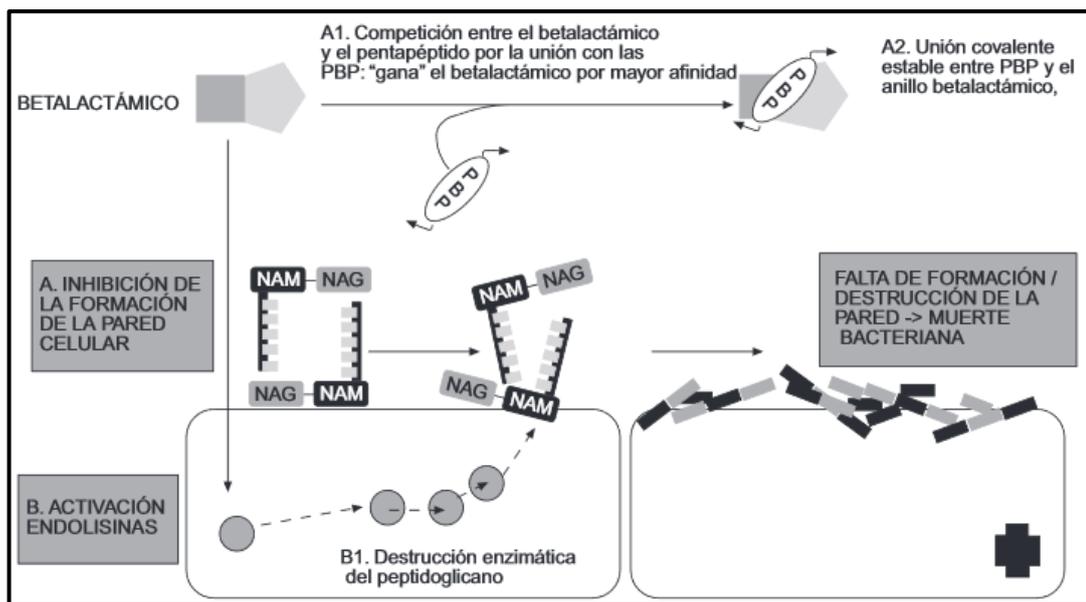


Figura 10-1. Mecanismo de acción de betalactámicos

Fuente: Suárez Cristina y Gudiol Francesc, 2009, pp. 7

NAM: Ácido N-acetilmurámico; NAG: Ácido N-acetilglucosamina; PBP: Penicilina proteína de unión

d. Indicaciones y uso clínico

Antibiótico de elección para el tratamiento de infecciones respiratorias, piel, tejidos blandos, infección del tracto urinario, causada por *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *estafilococos*, *S. pyogenes* (estreptococos del grupo A beta-hemolíticos), *E. coli*, *P. mirabilis*, *Klebsiella sp*, estafilococos coagulasa negativos. La ceftriaxona radica su administración para infecciones intrahospitalarias en el tratamiento de meningitis y Chancroide, gonorrea y otras infecciones causadas por: *Actinomycetos*, *Bartonella*, *Capnocytophaga*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomona aeruginosa*, *shigella*, *Spirochetal*, fiebre tifoidea y *Salmonella sp*. Su acción se

limita en las infecciones por: *Enterobacter sp*, *Citrobacter sp*, *Acinetobacter sp*. (KB Rivas et al, 2002, pp.3-5)

e. Farmacocinética

La ceftriaxona posee actividad in vitro muy similar a la de ceftizoxima y cefotaxima. Presenta un volumen de distribución de 5,78-13,5 L. Se caracteriza por su notable semivida de 5.8-8.7 horas. La administración una o dos veces al día ha sido eficaz en sujetos con meningitis, en tanto que contra otras infecciones ha sido eficaz administrarla una vez al día. La unión proteínas es del 95%. El clearance es de 0.58 - 1.45 L / h (adultos sanos que recibieron 0,15 a 3 g de ceftriaxona) Entre el 33% a un 67% de una dosis de ceftriaxona se excreta en la orina como fármaco inalterado y el resto se excreta en la bilis y en última instancia se elimina en las heces como compuestos microbiológicamente inactivos. Una sola dosis de ceftriaxona (125 a 250 mg) es eficaz en el tratamiento de la gonorrea uretral, cervicouterina, rectal o faríngea, incluida la enfermedad causada por microorganismos productores de penicilinasa. (Goodman y Gilman, 2012, pp.1493-1499)

La ceftriaxona tiene su importancia y su amplia utilidad farmacológica, por las siguientes características:

- Fácil administración
- Amplio espectro de acción bactericida
- Vida media prolongada
- Resistencia elevada a las betalactamasas
- Útil en profilaxis
- Mínimos efectos colaterales (Gimeno B. Vicente, 2001, pp.4)

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Diseño Experimental

2.1.1. Características del Diseño Experimental

Lugar: Laboratorio de Control de Calidad de la empresa Farmacéutica Betapharma S.A

Ubicación: Quito, Av. Manuel Córdova Galarza y Esperanza, sector el Condado, vía a la mitad del Mundo.

2.1.2. Factores de estudio

Población: Para la ejecución del trabajo de titulación se considera la población en estudio a los productos betalactámicos elaborados por la empresa Betapharma S.A, bajo estándares de calidad con certificación de BPM.

Muestra: La muestra en estudio es la Ceftriaxona (DCI: Ceftriaxona sódica), con su forma farmacéutica polvo para solución inyectable de 1g de concentración. Las características de la muestra que se cuantificó se detallan en la tabla 5-2.

Tabla 1-2. Características de la Ceftriaxona sódica

Principio activo	Lote (Batch N°) Proveedor	N° lote producción	Concentración (Base anhidra) (µg/mg)	pH	Humedad (Water)
Ceftriaxone Sodium Sterile	C2101407112	0215060	910	7.0	9.4%
	Q1411143	0415062	932	6.8	9.5%
	140822002	0515063	920	6.6	8.7%
	140822013	1115067	920	6.4	8.8%

Realizado por: Nataly Salguero 2016

2.2. Materiales, reactivos y equipos

2.2.1. Materiales

- Vaso de precipitación de 100mL
- Vaso de precipitación de 250mL
- Probeta de 250mL
- Probeta de 100mL
- Pipeta graduada de 5mL, 10mL
- Pipeta volumétrica de: 1mL, 2mL, 3mL, 5mL, 10mL, 15mL, 20mL
- Balón aforado de: 25mL, 50mL, 100mL, 1000mL
- Embudo de buchner
- Kitasato
- Espátula
- Membranas de filtración de 5µm
- Jeringas de 10mL
- Filtros de 5 µm
- Viales de inyección para HPLC

2.2.2. Reactivos

- Fármaco en estudio: Ceftriaxona 1g polvo para solución inyectable
- Estándar USP ceftriaxone sodium lote H0J296
- Metanol (CH₃OH) grado HPLC
- Acetonitrilo (C₂H₃N) grado HPLC
- Agua grado HPLC
- Hidróxido de tetrabutilamonio (HTBA) al 20%
- Fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄)
- Fosfato di básico de potasio (K₂HPO₄)

- Ácido orto fosfórico (H_3PO_4) grado analítico

2.2.3. Equipos

- *HPLC*: Marca: Merck Hitachi
 - Modelo: Merck AS-200
 - Componentes: Intelligent Pump Merck Hitachi L-6200
 - Column Thermostat Merck L-50 25
 - Auto sampler Merck L-4250
 - Detector UV-VIS
- *UHPLC*: Marca: Ulti mate
 - Modelo: 3000 DIONEX
 - Componentes: Pump DIONEX Ulti mate 3000
 - Autosampler: DIONEX Ulti mate 3000
 - Column: compartment,
 - Detector: Wavelength
- *Columna*: Marca: Merck KGaA
 - Modelo: Lichrospher® 100, RP-18 (5µm), HPLC-CArtridge, 25cm
 - Modelo: Lichrospher® 100, RP-8 (5µm), Sorbent, 12.5cm
- *pHmetro*: Marca: Hanna Instruments
 - Modelo: PHS-3BW Micro processor pH/mV Meter, con electrodo H I 1230, oto 13 pH - 5 to 70°C
- *Ultrasonido*: Marca: Branson
 - Modelo: 8510R-DTH, Ultrasonic-cleaner
- *Balanza analítica*: Marca: Mettler Toledo MS

- Modelo: New Classic MF, modelo MS2045/01, tolerancia máx. 220g; δ . 0.1mg
- *Bomba de vacío*

2.3. Técnica y método de análisis

La validación del método analítico por Cromatografía líquida de alta eficiencia para la cuantificación de ceftriaxona polvo para solución inyectable de 1g se realizó en tres fases experimentales, en la primera se optimizaron las condiciones cromatográficas con la determinación de los parámetros de idoneidad del sistema. La segunda fase se desarrolló el proceso de validación del método propuesto y culminando con la fase tres que consistió en la valoración del estándar secundario de ceftriaxona.

Fase 1: Optimización de Sistema Cromatográfico

Con base en los antecedentes descritos en el marco referencial se empleó los criterios propuestos por Péhourcq y Jarryb (1998, pp. 159-177), para cuantificar ceftriaxona en muestras biológicas, para lo cual se empleó una columna cromatográfica LiChrosorb RP-18 (15 cm x 3.2 mm), una fase móvil compuesta de ACN 20mM: buffer de fosfato pH 7: TPAB (200:800:3.89, v/v/w), con un detector UV a 274nm. De igual forma se inició el estudio de optimización evaluando las condiciones que establece la USP 35(2012) en su compendio II, la valoración de la ceftriaxona sódica se cuantifica bajo las siguientes condiciones: una fase móvil compuesta de bromuro de tetraheptilamonio (3,2g): acetonitrilo (400mL): solución amortiguadora de pH7 (44mL): solución amortiguadora pH5 (4mL) y agua para completar los 100mL.

Preparación de la muestra

Se empleó la técnica de la USP 35 (2012) compendio II. Para lo cual se utilizó varios viales de ceftriaxona. Se pesa con exactitud 25mg de polvo en un balón aforado de 50mL, se realizó un dilución, tomando un volumen de la muestra inicial de 10mL y aforar a 25mL con fase móvil, para obtener una concentración ~0.2mg/mL.

Preparación de la fase móvil

Se aplicó un diseño experimental para definir la composición de la fase móvil con base a los antecedentes mencionados y la referencia de la USP35 (2012). Se inició con ensayos preliminares y posteriormente experimentales. En la tabla 6-2. Se describen los ensayos experimentales que se aplicaron para la valoración de la ceftriaxona por la técnica HPLC.

Tabla 2-2. Ensayos preliminares y experimentales para la valoración de ceftriaxona por la técnica HPLC

	ENSAYOS	TIPO DE EQUIPO	FASE MÓVIL	DETECTOR	COLUMNA	FLUJO (mL/min)	Tiempo de retención (min)	LONGITUD DE ONDA (nm)
PRUEBAS PRELIMINARES	A	MERCK HITACHI D-6000 ^a	HTBA (pH 7.5) : ACN : MeOH 10mL : 54mL: 36mL	MERCK L-4250 UV-VIS	Lichrospher [®] 100, RP-8 (5µm), Sorbent, 12.5cm	1.20	4.63	240
	B		HTBA (pH7.5) : ACN : MeOH 18mL : 50mL: 31mL			1.30	2.06	270
	C		HTBA (pH7) : ACN : MeOH 18,15g(75mL) : 15mL: 10mL			1.30	2.96	
	D		Buffer fosfato (pH7): MeOH: HTBA 80 mL : 20mL : 1,75g			1.40	2.23	
	E		Buffer fosfato (pH7): HTBA : MeOH: ACN 43mL : 1,75g (40mL): 9mL : 8mL			1.08	1.76	
EXPERIMENTAL	F (n=6)	ULTIMA TE 3000	HTBA: Buffer fosfato (pH7): MeOH: ACN 1.75g : 69 mL : 17mL : 14mL	DIONEX-WAVELENGTH	Lichrospher [®] 100, RP-18 (5µm), HPLC-CArtridge, 25cm	2.14	2.15	270
	G (n=6)		HTBA: Buffer fosfato (pH7): MeOH: ACN 1.75g : 66 mL : 20mL : 14mL			2.10	2.10	

Realizado por: Nataly Salguero 2016

HTB: Hidróxido de tetrabutilamonio
MeOH: Metanol
ACN: Acetonitrilo

Preparación de las soluciones que componen la fase móvil:

Tabla. 3-2. Preparación de las soluciones de la fase móvil, realizadas en el laboratorio de Control de Calidad, empresa Betapharma S.A, Quito, 2015

Tenso activo: Hidróxido de tetrabutilamonio (HTBA)	Solución buffer: Fosfato monobásico más fosfato di básico de potasio, de acuerdo a la USP35 (2012)
Pureza: 20%	K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄
Se estableció la relación por factor para determinar el volumen HTBA: $\left(\frac{1.75\text{ g}}{100\text{mL}}\right) \times 20\text{g} = 8.75\text{mL HTBA}$	Pesar 13.6g de K ₂ HPO ₄ más 4g de KH ₂ PO ₄ , llevar a un volumen de 1000mL con agua HPLC.

Realizado por: Nataly Salguero 2016

De acuerdo a lo indicado en la tabla 2-2. Para optimizar las condiciones del sistema cromatográfico se realizó el estudio con una fase preliminar, para lo cual se prepararon 5 ensayos variados de fase móvil. A continuación se describen los pasos desarrollados.

Ensayo A: los componentes de la fase móvil fueron el HTBA, el cual se midió 1,3mL se aforó a 100mL con agua grado HPLC. Se lleva a un pH de 7.5. Se añade en un vaso de precipitación 10mL HTBA preparado, con 54mL ACN y 36 mL de MeOH.

Ensayo B: la fase móvil fue proporcionada por los compuestos HTBA se tomó un volumen de 2.6mL se completa el volumen a 100mL con agua grado HPLC. Se procede la misma forma que la preparación en el ensayo A. Se mezcló en un vaso de precipitación 18mL de la solución de HTBA, más 50mL ACN y MeOH 31mL.

Ensayo C: Se empleó las condiciones propuestas por la USP35 (2012) para la valoración de Meropenem. Se realizó a partir de 18.15 ml de solución de hidróxido de tetrabutilamonio al 20%, llevado a un volumen de 750mL, se ajusta el pH a $7 \pm 0,1$ con ácido fosfórico diluido (1 en 10). La proporción del eluyente fue 750mL de la solución de HTBA, con 15mL ACN y 10mL.

Ensayo D: se consideró el empleo de un buffer de fosfato de acuerdo al criterio propuesto por Péhourcq y Jarryb (1998, pp. 159-177), el cual se preparó pesando 13.6g de K_2HPO_4 más 4g KH_2PO_4 , se aforó a 1000mL con agua HPLC. Se mide 8.75mL de HTBA al 20%, se adiciona a la solución de fosfato y se ajustó la mezcla con una solución de ácido fosfórico diluido (1 en 10) o hidróxido de potasio 10N a un pH de 7. La composición de la fase móvil fue 80mL de buffer fosfato pH 7: 20mL MeOH: HTBA (1.75g).

Ensayo E: se preparó las soluciones como lo indica el ensayo D. La fase móvil fue buffer de fosfato pH7 (43mL), con THBA 1,75g (40mL), una porción de MeOH (9mL) y ACN (8mL).

Con los cromatogramas obtenidos de los ensayos preliminares, se aplicó 2 ensayos experimentales con la denominación G y F; dicha composición del eluyente fue la siguiente:

Ensayo G: Se preparó la solución buffer de la forma que se realizó en el ensayo D. luego de estandarizar la solución con 8.75mL de HTBA se llevó a pH 7, empleando ácido fosfórico diluido (1 en 10) o hidróxido de potasio 10N. Las cantidades empleadas fueron HTBA 1.75g, buffer pH7 69mL, MeOH 17mL y ACN 14mL.

Ensayo F: se preparó la solución buffer y el HTBA de acuerdo al proceso del ensayo D. La fase móvil constó de 1,75g HTBA con 66mL de buffer fosfato pH7, más 20mL de MeOH y 14mL ACN.

Luego de la preparación de cada fase móvil propuesta se realizó los siguientes pasos:

- Filtrar la mezcla de fase móvil de cada ensayo realizado a través de una membrana de 5  m con la ayuda del equipo de filtración (kitasato, embudo de buchner y bomba de vació).
- Desgasificar las diferentes muestras de eluyente

Posteriormente se aplicó el proceso de comprobación y validez de las fases móviles preparadas en cada ensayo, que se detalla a continuación:

- Ajuste del sistema cromatográfico con la fase móvil en el equipo MERCK HITACHI D-6000^a para las pruebas preliminares y el HPLC Ultimate 3000 para los ensayos experimentales.
- Determinación de las condiciones operativas, las que se muestran en la tabla 3.2. que hace referencia al flujo, longitud de onda, detector.
- Adecuación de la columna en cada ensayo, para lo cual se determina como blanco de partida a la línea base de los eluyentes preparados.
- Identificación de las muestras, se colocó la muestra de ceftriaxona en un vial de inyección por medio de un filtro de 5µm.

Una vez identificado el analito se determinó los parámetros de idoneidad del sistema para establecer que mezcla de los ensayos del eluyente cumplen con las especificaciones. En la tabla 4-2. Se explica los factores determinantes de la eficacia del sistema, su valor de referencia y la forma de calcular.

Tabla 4-2. Parámetros de idoneidad del sistema cromatográfico, descripción, especificación y determinación

Parámetro	Determinación	Especificación de acuerdo a:	
		USP35 (2012)	AEFI (2001)
Número de platos teóricos (N)	$N=16 \left(\frac{Rt}{W}\right)^2$; donde Rt= tiempo de retención; W= anchura del pico en la línea determinado por la tangente ajustada a un % de la altura del pico	1500 platos teóricos	>2000
Factor de capacidad (k')	$k' = \frac{Rt-t_0}{t_0}$; donde t ₀ = tiempo en el que un componente no retenido pasa por el interior del sistema; Rt= tiempo de retención del analito en estudio	>2	>2
Factor de asimetría o de cola (As)	$As = \frac{W_{0.5}}{2H}$ donde W _{0.5} = ancho del pico al 5% de la altura del pico; H= distancia entre la perpendicular trazada desde el máximo del pico y el frente al 5% de la altura del pico	<2	0.8 a 1.5
Desviación estándar (%CV)	%CV= $S \times 100 / \bar{X}$ donde S es la desviación estándar de una serie de datos; \bar{X} promedio de las mediciones	Máx. 2%	

Realizado por: Nataly Salguero 2016

De acuerdo a los resultados obtenidos se establece la fase móvil idónea y que cumple con los parámetros descritos se inicia con el proceso de validación del método analítico para la cuantificación de ceftriaxona.

Fase 2: Validación del método analítico

De acuerdo a lo establecido por la USP35 (2012), ICH Q2 y el manual AEFI la validación del método de cuantificación de ceftriaxona se ubica en la categoría I y aplica la determinación de los parámetros de: especificidad, linealidad y rango, precisión (repetibilidad, precisión intermedia) , exactitud, límite de cuantificación y robustez. Se desarrolló el análisis analítico de dichos factores en el equipo Ulti mate 3000, con arreglo de diodos del laboratorio de Control de Calidad de la empresa Betapharma S.A.

Especificidad

La especificidad del método analítico por Cromatografía líquida de alta eficiencia se determinó bajo las condiciones del sistema cromatográfico optimizado y se empleó como fase móvil final HTBA: Buffer fosfato (pH7): MeOH: ACN (1.75g: 66 mL: 20mL: 14mL), flujo 1.6ml/min, longitud de onda 270nm. Bajo estas condiciones se prepararon muestras del estándar de referencia USP de concentración 0,1mg/mL.

Preparación de la muestra de referencia USP: se pesó con exactitud 6 muestras de 25mg de estándar USP de ceftriaxona y se lleva a un volumen de 50mL con fase móvil, se tomó 5mL de la solución y se afora a un volumen final de 25mL. Se debe emplear esta solución inmediatamente después de su preparación. Se procede a la identificación de las muestras por la técnica HPLC, se ubica en el auto sampler 6 viales de muestras consecutivas de ceftriaxona USP, ingresando en el programa Chromeleon Dionex Version 7.2.0.3765 las condiciones del sistema cromatográfico. El ordenador genera las respuestas de elución del analito a través del cromatograma que se describe en el capítulo de resultados y discusión.

Linealidad y rango

Rango: la ICH Q2 establece que el rango para la validación de productos elaborados es de 80 a 120%. El rango de trabajo se estableció en el intervalo de 60 a 200% por la amplitud de la señal que se detectó en las pruebas de optimización y sensibilidad.

Linealidad: dentro del rango establecido se analizaron 5 niveles de concentración de muestras del lote 0515063 de ceftriaxona polvo para solución inyectable y se analizaron por triplicado (K=5; n° de réplicas=3), con un total de 15 determinaciones.

Se establecieron los criterios de aceptación para la linealidad del método analítico que se describe en la tabla 5-2. Criterios de aceptación de la linealidad del método.

Tabla 5-2. Criterios de aceptación de la linealidad del método y análisis estadístico

Especificación	Criterio de aceptación
Supuestos: <ul style="list-style-type: none">• Homogeneidad de variancias• Normalidad de los residuales	P-valor <0.005 (Test de Levene) W exp < Wtab (Test Shapiro-Wilk)
Pendiente (b)	
Intercepto (a)	
Coefficiente de correlación (r)	≥0.999 (Manual AEFI 2001, ICH Q2)
Coefficiente de determinación (r ²)	≥0.998 (Manual AEFI 2001, ICH Q2)
Coefficiente de variación (CV)	>2 (Manual AEFI 2001, ICH Q2)
Ecuación de la recta	
Test t-Student correlación (r)	t _{exp} > t _{tab} , con n-2 gl y p=0.05
Test de linealidad para b	t _{exp} > t _{tab} , con n-1 gl y p=0.05
Test de proporcionalidad a	t _{exp} < t _{tab} , con n-1 gl y p=0.05
Intervalo de confianza b	No incluyen el cero
Intervalo de confianza a	Se incluye el cero

Realizado por: Nataly Salguero 2016

Preparación de las muestras: se preparó 5 pesos de aproximadamente 25mg de muestras de ceftriaxona del lote 0515063, las diluciones que se realizaron son las siguientes:

Tabla 6-1. Descripción de las diluciones a partir de muestras de ceftriaxona del lote 0515063 para el factor de linealidad, realizadas en el laboratorio de Control de Calidad, empresa Betapharma S.A, Quito, 2015

Peso muestra (mg)	Volumen de aforo (mL)	Diluciones (diluyente fase móvil)	
		1 dilución	Volumen de aforo (mL)
26.2	50	3	25
25.7		4	
25.3		5	
25.9		8	
25.8		10	

Realizado por: Nataly Salguero 2016

Para la identificación de las muestras de ceftriaxona se analizó bajo las condiciones de la metodología optimizada con la inyección de 6 estándares USP, seguidamente 3 réplicas de la muestra 1, 2, 3; con 2 estándares intermedios, seguidamente 3 inyecciones de la muestra 4 y 5. Los cromatogramas y su Área de detección se encuentran en el capítulo III, como también el análisis estadístico efectuado.

Precisión

Repetibilidad

Se desarrolló en el equipo ULTIMATE 3000, para la repetibilidad del método se analizó 10 muestras del mismo lote 0515063 de ceftriaxona polvo para solución inyectable.

Criterio de aceptación: la desviación estándar relativa (RSD o CV%) no debe ser superior al 2% de acuerdo al criterio de la USP 35:2012.

Preparación de la muestra: se preparó 10 muestras del lote 0515063, cuyo peso fue de aproximadamente 25mg, llevadas a un volumen de 50mL con fase móvil, se tomó 5mL de la solución y se afora a 25mL.

Determinación del coeficiente de variación (%CV): se empleó la ecuación $CV (\%) = \frac{s}{x} \times 100$; donde s= desviación estándar y x es la media aritmética de los resultados.

Precisión Intermedia

Para la determinación de este parámetro se establecieron las condiciones operativas bajo las cuales se esperaría tener evidencia de variabilidad en las mediciones, las mismas que son analista A y B, analizado en diferentes día 1, 2 y 3 cuantificados en los instrumentos Ulti mate 3000 y MERCK HITACHI D-6000A

Criterio de aceptación: coeficiente de variación: <2%, establecido por la ICH Q2

Se aplicó un diseño matricial que combinó los factores analizados, en los resultados se explica la técnica propuesta.

Para el análisis cada analista preparó muestras de ceftriaxona de 0.1mg/mL independientemente en días diferentes y las mediciones se efectuaron en los 2 equipos que dispone el laboratorio.

Preparación de la muestra: se pesó con exactitud 25mg de ceftriaxona, y se lleva a volumen con fase móvil para obtener una concentración de 0.1mg/mL.

Exactitud

Se aplicó el método analítico para una muestra de riqueza conocida propuesta en el manual AEFI (2001), se trabajó con un intervalo de concentraciones de 80-100-160%.

El criterio de aceptación lo establece la USP35 (2012) en su compendio II que el porcentaje de recuperación o contenido es 90 a 115%.

Preparación de la muestra: se pesó con exactitud 3 muestras de 25mg de ceftriaxona del lote 0415062 se afora a 50mL, a partir de estas soluciones se realizó diluciones para obtener las concentraciones seleccionadas. Para lo cual se midió 4mL, 5mL, 8mL de las 3 soluciones y se obtuvieron las concentraciones de 0.08, 0.10 y 0.16 mg/mL; llevadas cada una a un volumen de 25mL con fase móvil.

Se preparó un estándar de referencia USP para garantizar la cuantificación de los resultados de las muestras. Para lo cual se pesó 25mg de estándar, se llevó a un volumen de 50mL y se toman 5mL aforados a 25mL, obteniendo una concentración de 0.1mg/mL.

Se cuantificó primeramente el estándar de referencia con 6 réplicas; seguido de las 3 muestras con 3 lecturas a cada nivel de concentración. Los resultados generados se explican en el capítulo III.

Para el cálculo de la recuperación se aplicó la ecuación: $\%R = \frac{Xm}{\mu} \times 100$

Dónde:

Xm= valor medio hallado

μ =valor aceptado como verdadero

Límite de cuantificación

Se aplicó el “Método instrumental más habitual para técnicas cromatográficas por HPLC que no corrigen la señal frente a un blanco” de acuerdo al manual AEFI (2001). Se estableció un rango de concentraciones de 0.06; 0.08; 0.1mg/mL. También se preparó un el estándar USP de ceftriaxona de 0.1mg/mL.

Preparación de las muestras: para obtener las concentraciones definidas se pesó 3 muestras de aproximadamente 25mg de ceftriaxona del lote 0415062, se consideró para las diluciones

volúmenes de 3, 4 y 5mL de la solución preparada llevadas a un volumen de 25mL con fase móvil.

Para la valoración de este parámetro se utilizó la ecuación: LC (k=10)

$CL = \frac{Yb + (K \times Sb)}{b \times \sqrt{n}}$; donde: Yb= pendiente de la recta inicial, K= constante definida con el valor 10, Sb= pendiente de la desviación estándar de las mediciones; b= pendiente de la recta; n= número de réplicas

Robustez

Se consideró el factor pH de la fase móvil que determine su influencia en las condiciones del sistema cromatográfico y del método para mantenerse inalterado.

Preparación de la muestra: se pesó 4 muestras de 25mg de ceftriaxona para obtener una concentración de 0.2mg/mL.

Se utilizó una solución de ácido fosfórico diluido (1 en 10). La cual se adicionó a 2 muestras de ceftriaxona preparadas hasta conseguir el pH de 6,48 y 4,44.

La solución básica consistió de hidróxido de potasio 10N, que se adicionó a las 2 muestras preparadas de ceftriaxona hasta conseguir un pH de 11,68 y 12,54. Conjuntamente se preparó el estándar de referencia USP de ceftriaxona a la concentración de 0.2mg/mL.

La lectura en el equipo HPLC Merck se efectuó de la siguiente manera: 6 inyecciones del estándar USP, con la secuencia de 2 determinaciones de las muestras bajo condiciones ácidas y alcalinas.

El criterio de influencia se realizó con la determinación del %CV <2%.

Fase 3: Valoración del estándar secundario del lote: 140822013 por el método validado de ceftriaxona 1g polvo para inyección, realizado en la empresa Betapharma S.A

El proceso se fundamenta en un instructivo interno elaborado por el laboratorio de Control de Calidad, que por políticas de empresa no se puede incorporarlo al desarrollo teórico del presente trabajo; se procede a describir como se realizó la valoración.

La determinación del estándar secundario se fundamentó en la verificación de la calificación y calibración de los instrumentos utilizados; de tal manera que los que dispone el laboratorio están certificados. Se constató la disponibilidad del estándar de referencia USP de ceftriaxona sódica.

La fase móvil se preparó bajo las condiciones descritas en la validación del método.

Como primer paso se preparó el estándar de referencia USP, para lo cual se pesó con exactitud 25mg de polvo, se llevó a un volumen de 50mL con fase móvil. Se realizó una dilución tomando 5mL de la solución preparada y aforando a 25mL con eluyente, para obtener la concentración de 0.1mg/mL.

Se analizaron 3 muestras de ceftriaxona del lote en mención, que se prepararon a la concentración 0.1mg/mL, y se procede de acuerdo al estándar de referencia USP.

Paso 2: se cuantificó de acuerdo a la secuencia 6 inyecciones del estándar USP de ceftriaxona sódica, 3 lecturas de la muestra 1, 6 inyecciones del estándar USP, 3 inyecciones de la muestra 2 y finalmente 6 inyecciones del estándar USP seguido de 3 lecturas de la muestra 3. Con los datos obtenidos de las Áreas se cuantificó la concentración en base anhidra de la ceftriaxona sódica en la base de cálculos del laboratorio de Control de Calidad que se resumen en el capítulo III.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Optimización de la aptitud del Sistema Cromatográfico

Tabla 1-3. Resultados de los factores de Idoneidad del Sistema Cromatográfico (Sistem Suitability)

	ENSAYOS	TIPO DE EQUIPO	FACTORES DE IDONEIDAD			
			N (adimensional)	Asimetría (As) (%)	k' (adimensional)	%RSD
PRUEBAS PRELIMINARES	A	MERCK HITACHI D-6000A	879	4.14	1.83	N/A
	B		954	1.49	1.29	
	C		973	1.06	2.29	
	D		989	1.31	1.47	
	E		1496	1.34	3.53	
EXPERIMENTAL	F (n=6)	ULTIMATE 3000	1141	1.36	4.21	0.498%
	G (n=6)		2327	1.28	5.35	0.395%

Realizado por: Nataly Salguero 2016

Los factores de Idoneidad del Sistema Cromatográfico se fundamentan en la teoría del plato que explica de manera satisfactoria la forma gaussiana de los picos cromatográficos y su velocidad de desplazamiento. Los cuales se indican en la tabla 1-3. En las pruebas preliminares A, B, C y D los valores de platos teóricos son menores (A=879, B= 954, C=973 y D=989) a lo especificado en la USP35:2012 (N=1500), mientras que en el análisis experimental el ensayo G cumple con lo especificado, siendo ideal para la separación y elución de la ceftriaxona. El factor de capacidad en los 7 ensayos (A, B, C, D, E, F y G) se encuentran comprendidos en un rango

de 1.29 a 5.35, valores que están dentro de lo especificado por Douglas A. Skoog de 1 y 10; lo que indica buena retención del analito por la fase estacionaria, independientemente del caudal de la fase móvil, sin presentar tiempos alargados de separación. La asimetría del ensayo preliminar A fue de 4.14, dicho valor no cumple con lo señalado por la USP35: 2012 ($As < 2$); en tanto que los ensayos (B, C, D, E, F y G) se encuentran dentro de especificación, que indican picos perfectamente simétricos. Para los ensayos experimentales F y G el porcentaje de desviación estándar (%RSD) fue de 0.498 y 0.395% y cumplen con la referencia de la USP 35:2012 (%RSD <2%)

En los siguientes cromatogramas se describe el comportamiento de la muestra de ceftriaxona:

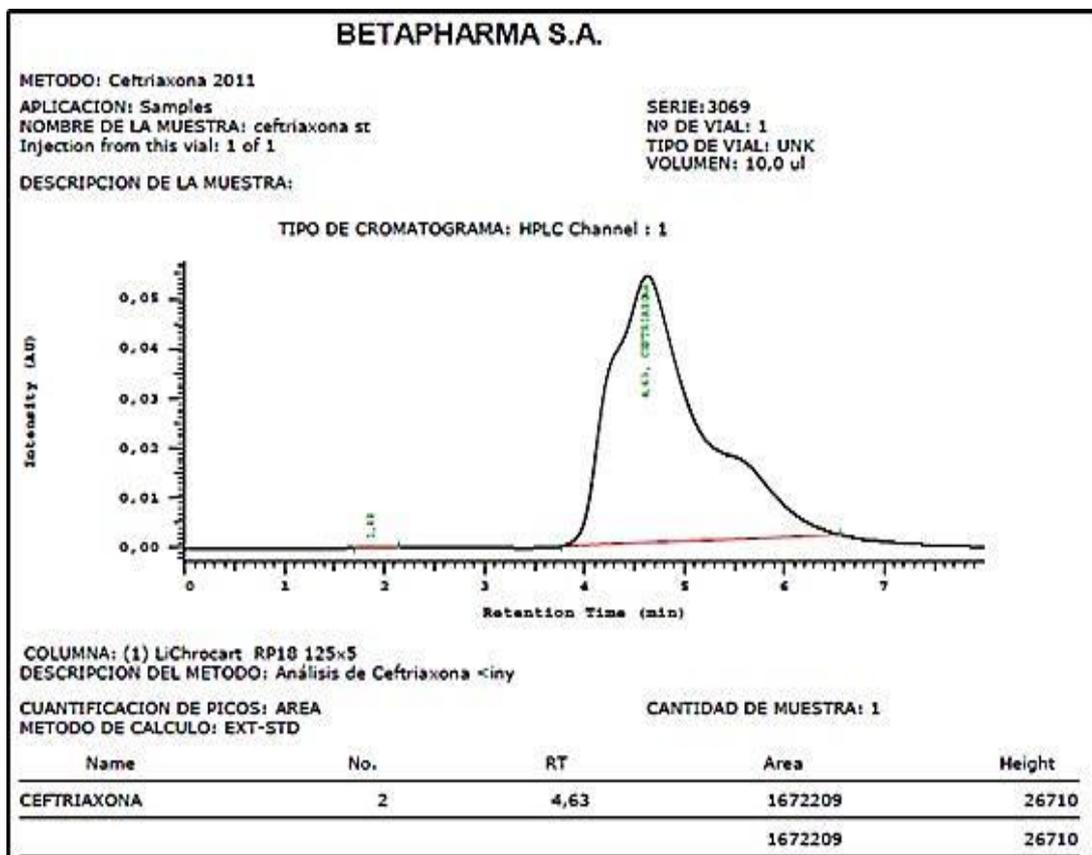


Figura 1-3. Cromatograma ensayo A

Realizado por: Nataly Salguero 2016

En la figura 1-3 se muestra el comportamiento de la muestra bajo las condiciones del ensayo A. El pico de elución fue retenido por la fase estacionaria, se presenta ensanchamiento del pico,

con alargamiento de cola acompañado de deformaciones. No presenta simetría a este comportamiento se denomina fenómeno “tailing”.

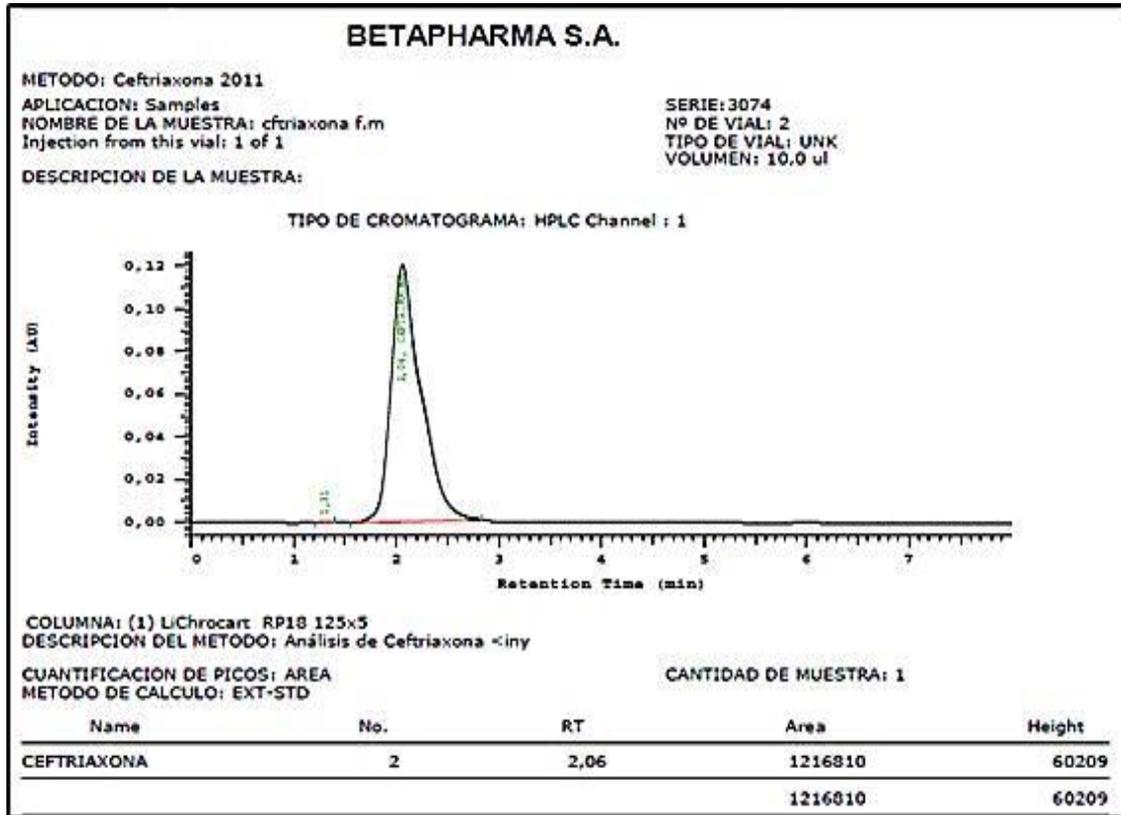


Figura 2-3. Cromatograma ensayo B

Realizado por: Nataly Salguero 2016

El cromatograma del ensayo B que se muestra en la figura 2-3 indica un pico simétrico, con disminución del tiempo de retención e identificación del analito.

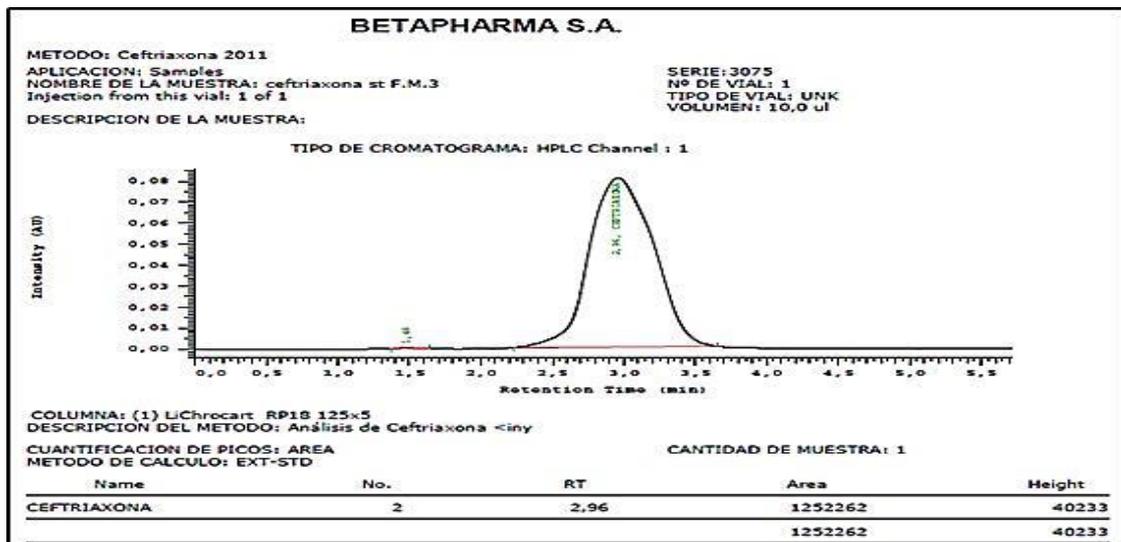


Figura 3-3. Cromatograma ensayo C

Realizado por: Nataly Salguero 2016

En la figura 3-3 se observa el ensanchamiento del pico bajo las condiciones del ensayo C, que indica dispersión del analito en la columna, con adecuada simetría.

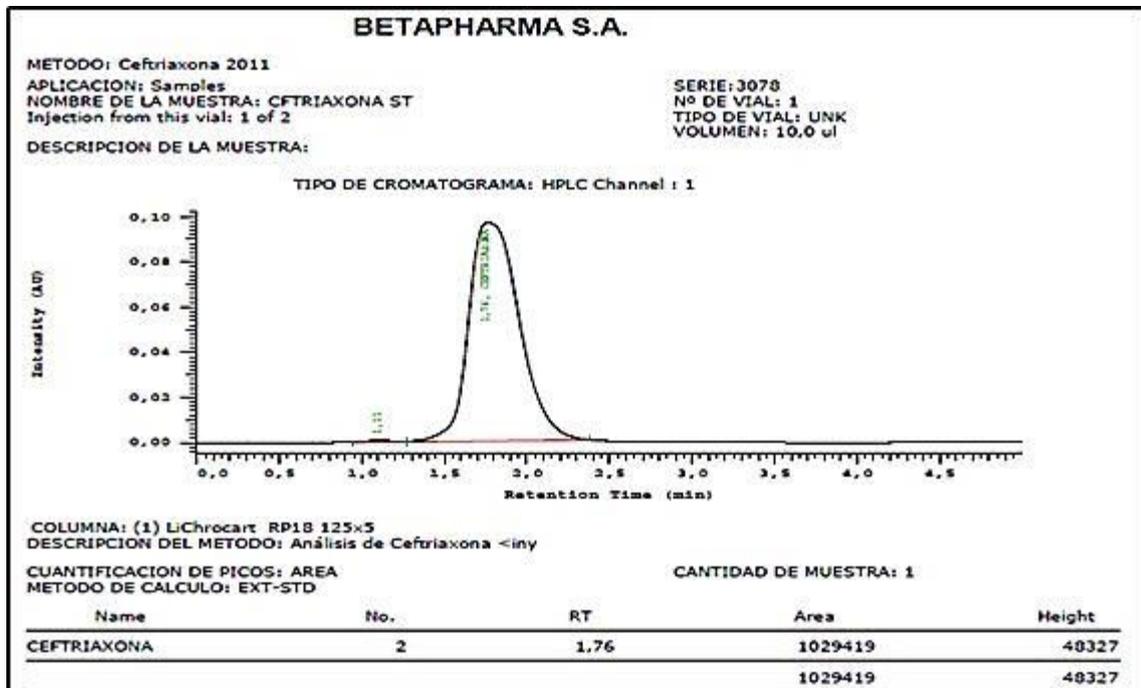


Figura 4-4. Cromatograma ensayo D

Realizado por: Nataly Salguero 2016

En la figura 4-4 se muestra el cromatograma del ensayo D, que indica simetría del pico, menos tiempo de retención, exclusión del ensanchamiento y buena elución del analito.

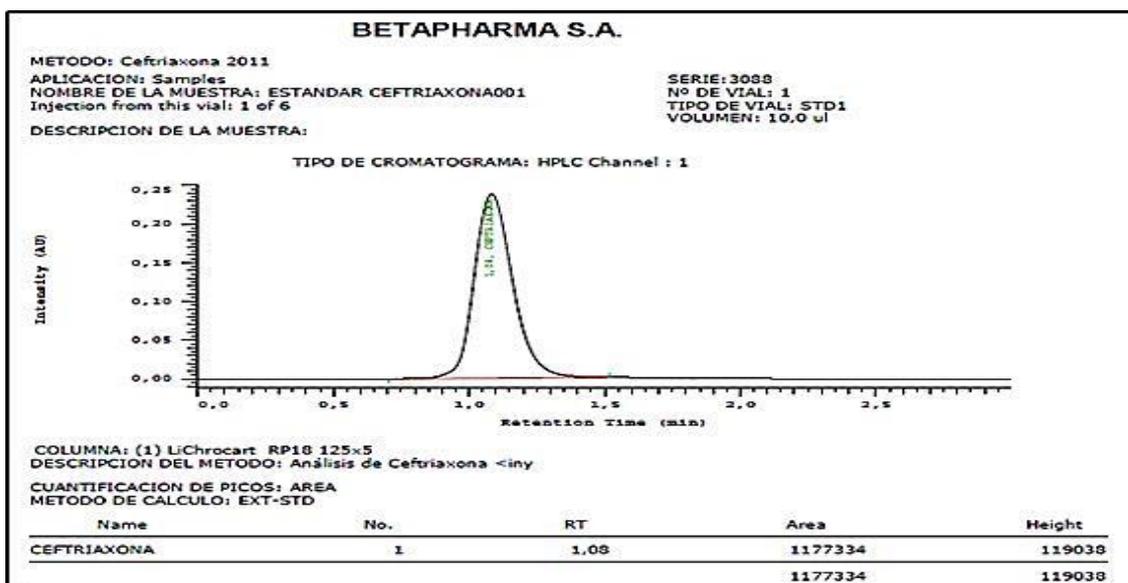


Figura 5-3. Cromatograma ensayo E

Realizado por: Nataly Salguero 2016

El comportamiento del analito bajo las condiciones del ensayo E se muestra en la figura 5-3, se observa un pico simétrico, libre de interferencias y con un tiempo de retención menor.

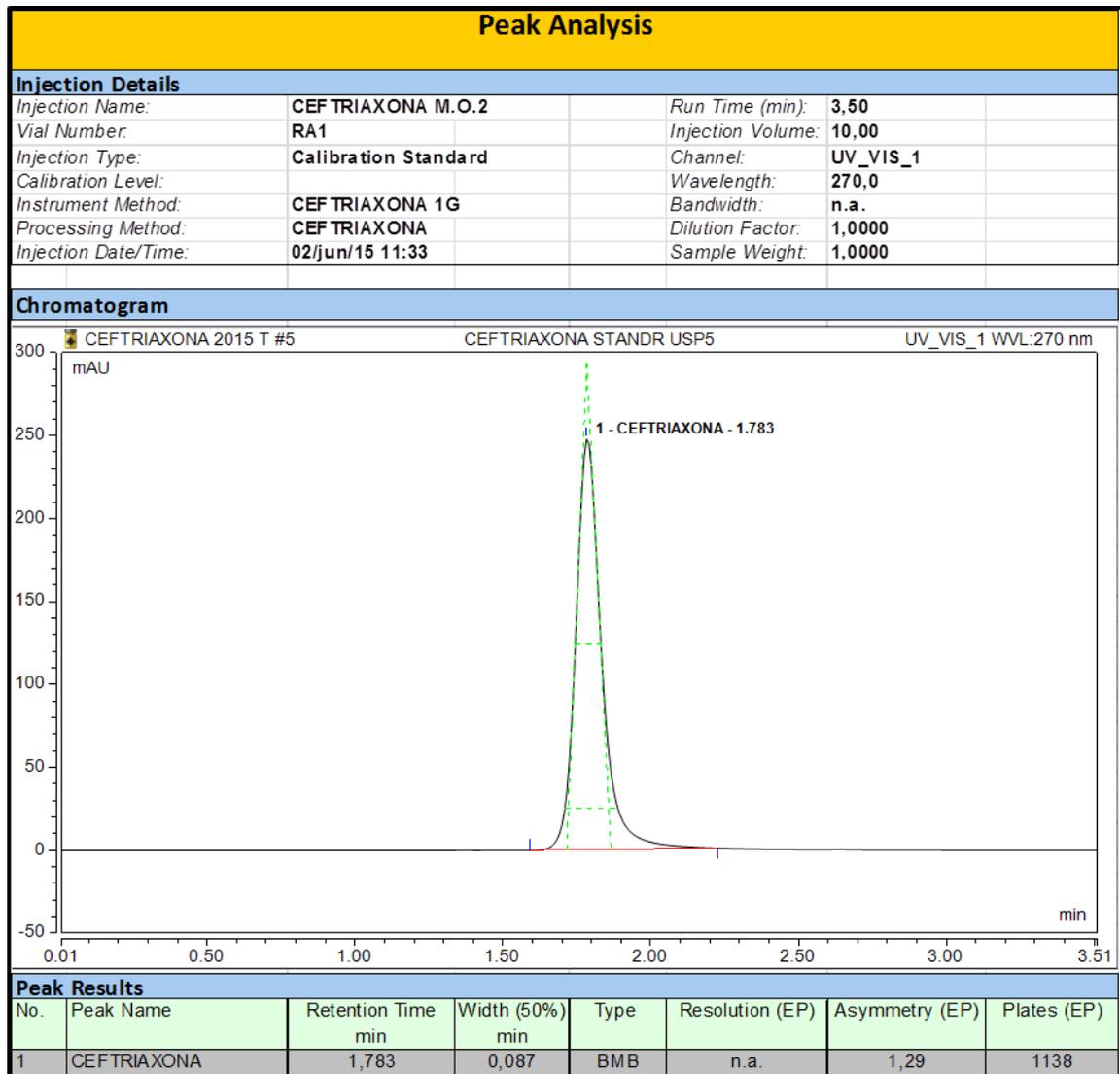


Figura 6-3. Cromatograma ensayo F

Realizado por: Nataly Salguero 2016

La identificación del analito se observa en la figura 6-3 que el pico es simétrico con un valor de 1,29 por lo tanto minimiza las imprecisiones en la detección del inicio y final del pico por parte del sistema de integración. El número de platos teóricos fue 1138, el cual no cumplen con la establecido por la USP35 (2012) 1500, es decir falta ajustar el sistema de elución.

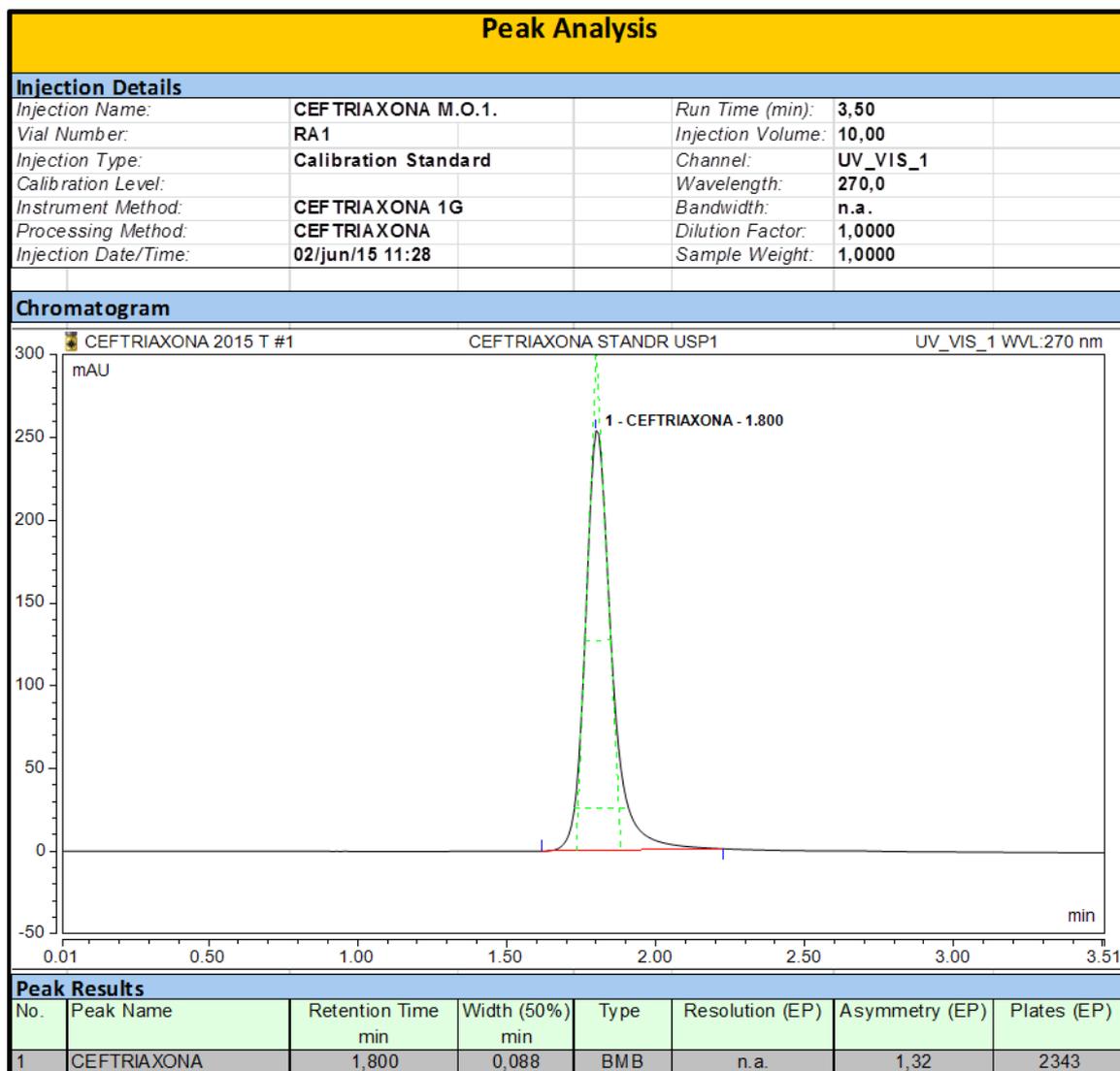


Figura 7-3. Cromatograma ensayo G

Realizado por: Nataly Salguero 2016

En la figura 7-3 se observa el pico característico de la ceftriaxona, el número de platos teóricos de la muestra analizada fue de 2343 que indicó eficacia del sistema cromatográfico, que expresa el número de picos que puede aparecer en el cromatograma por unidad de tiempo y por lo tanto la capacidad del sistema de generar bandas de elución estrechas. La señal detectada es simétrica con un valor de 1.32 que muestra mayor precisión de cuantificación del Área bajo la curva.

Se estableció que los compuestos orgánicos ACN y MeOH influyeron en la elución y detección del analito, para lo cual el ACN favoreció tiempos de retención menores y el incremento de MeOH evitó la propagación de picos eluidos con colas, mejorando la asimetría con señales estrechas. Por lo tanto el ensayo G cumple con el Sistema Sustainability, la composición y

proporción de la fase móvil fue hidróxido de tetrabutilamonio (1,75g): buffer fosfato pH7 (66mL): metanol (20mL): acetonitrilo (14mL), bajo las condiciones operativas de: flujo 1,6ml/min, longitud de onda 270nm; empleando una columna Lichrospher®100RP-18(5µm) de 25cm, un volumen de inyección de 10µL. Cuya fase móvil está optimizada y permitió el desarrollo de la validación del método analítico.

3.2. Validación del método Analítico

3.2.1. Especificidad

La especificidad del método analítico por Cromatografía líquida de alta eficiencia se determinó después de optimizar las condiciones del sistema cromatográfico, para lo cual se utilizó como fase móvil final HTBA: Buffer fosfato (pH7): MeOH: ACN (1.75g: 66 mL: 20mL: 14mL), flujo 1.6ml/min, longitud de onda 270nm. Bajo estas condiciones se prepararon muestras del estándar de referencia USP de concentración 0,1mg/mL. Con la finalidad de estudiar la capacidad del método analítico para cuantificar el principio activo de ceftriaxona por medio del ensayo separativo.

La identificación de la molécula de ceftriaxona y su especificidad se observan en los siguientes cromatogramas.

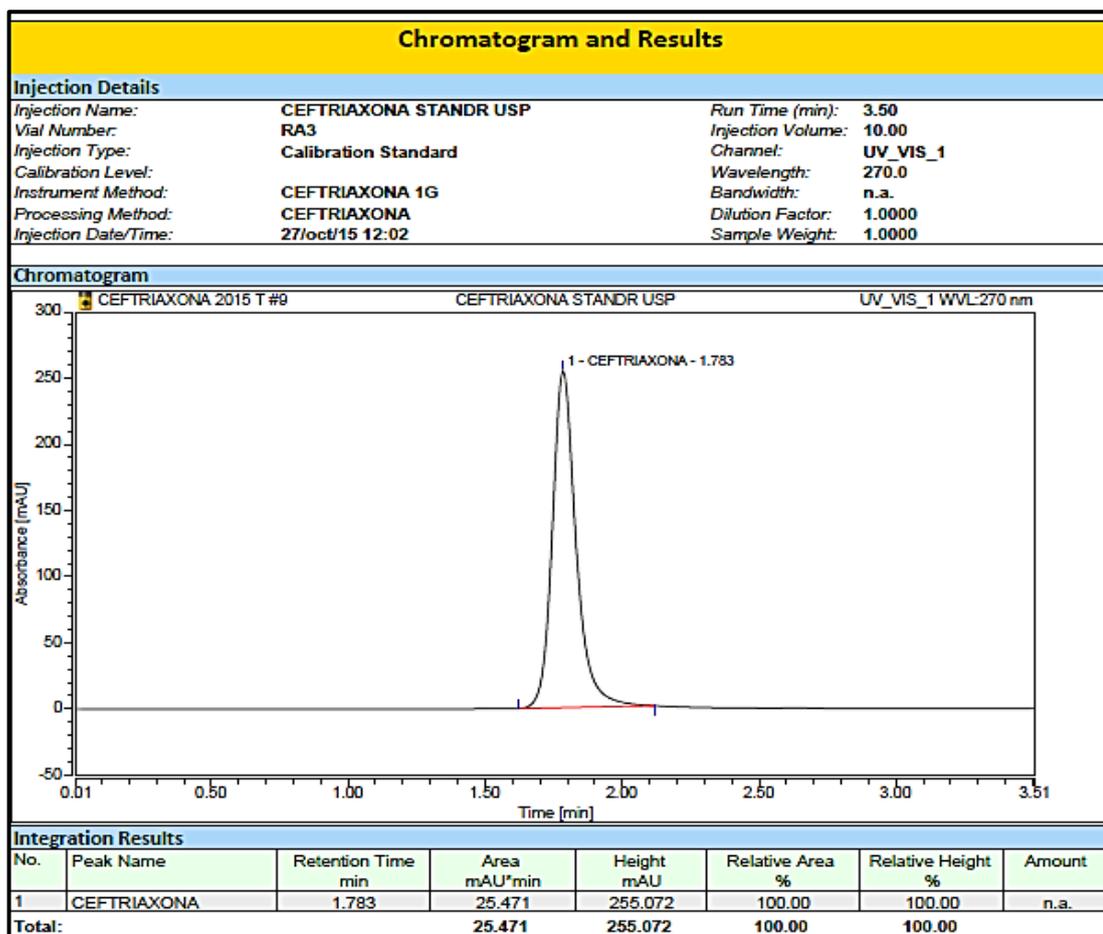


Figura 8-3. Cromatograma estándar USP de ceftriaxona inyección 1.

Realizado por: Nataly Salguero 2016

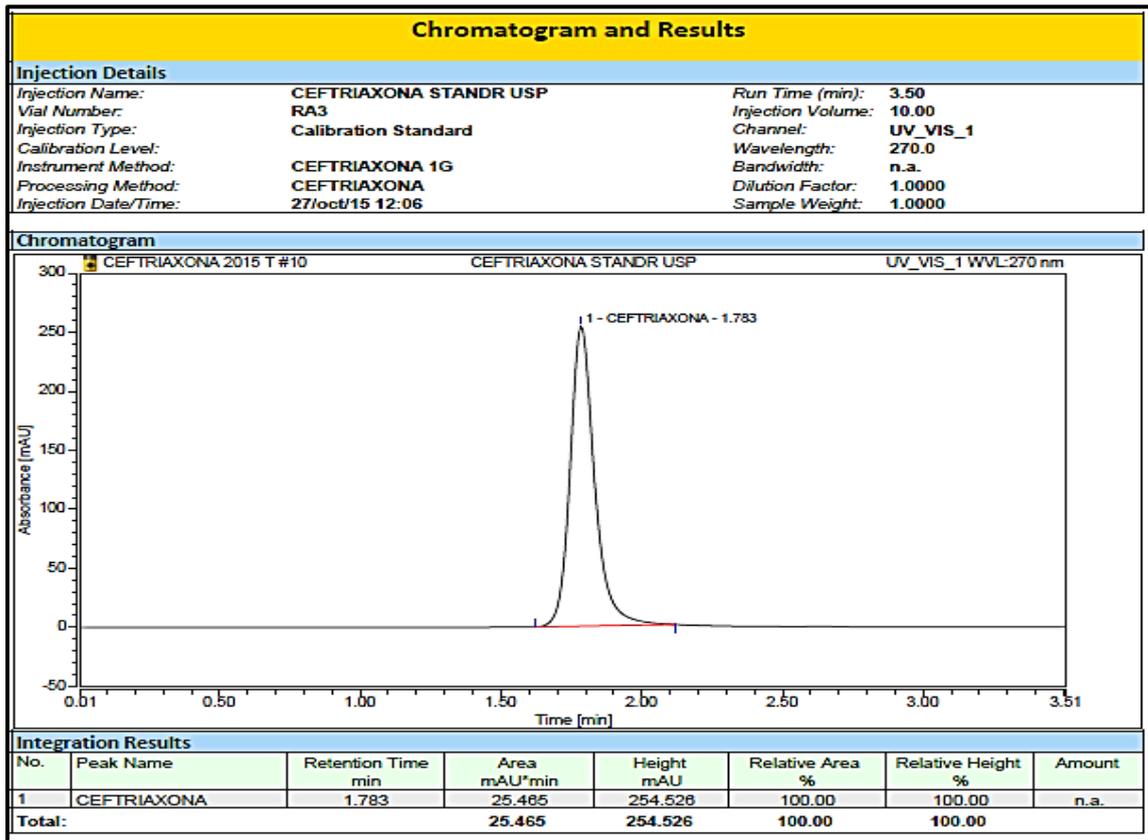


Figura 9-3. Cromatograma estándar USP de ceftriaxona inyección 2.

Realizado por: Nataly Salguero 2016

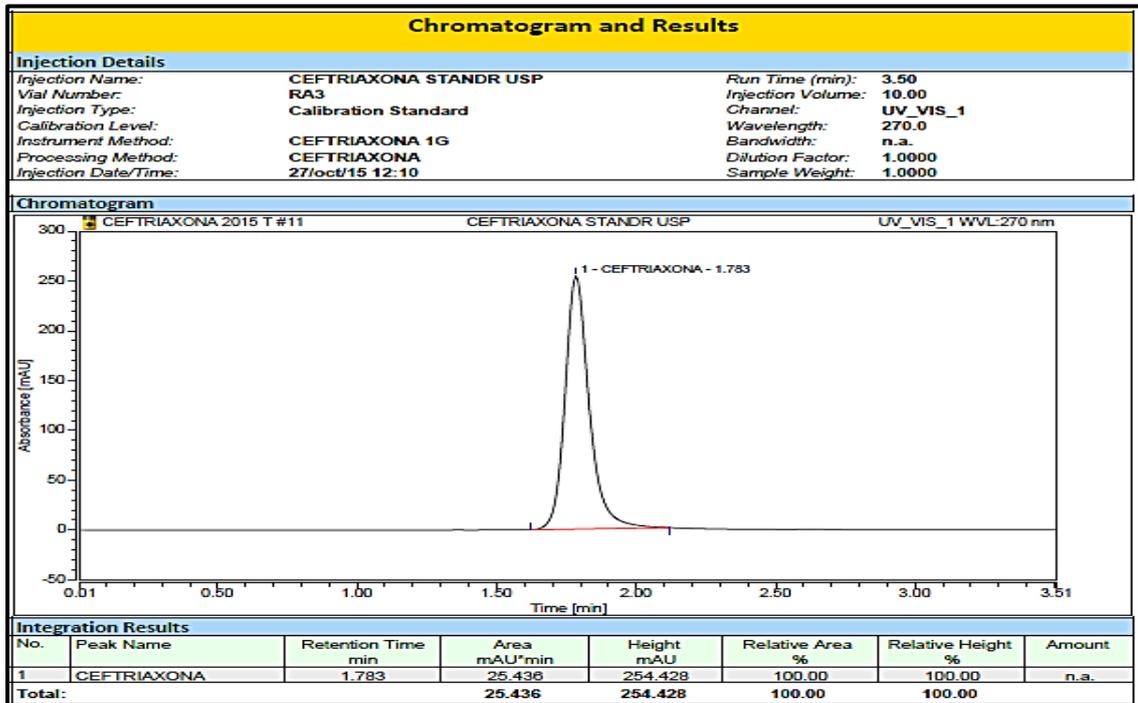


Figura 10-3. Cromatograma estándar USP de ceftriaxona inyección 3.

Realizado por: Nataly Salguero 2016

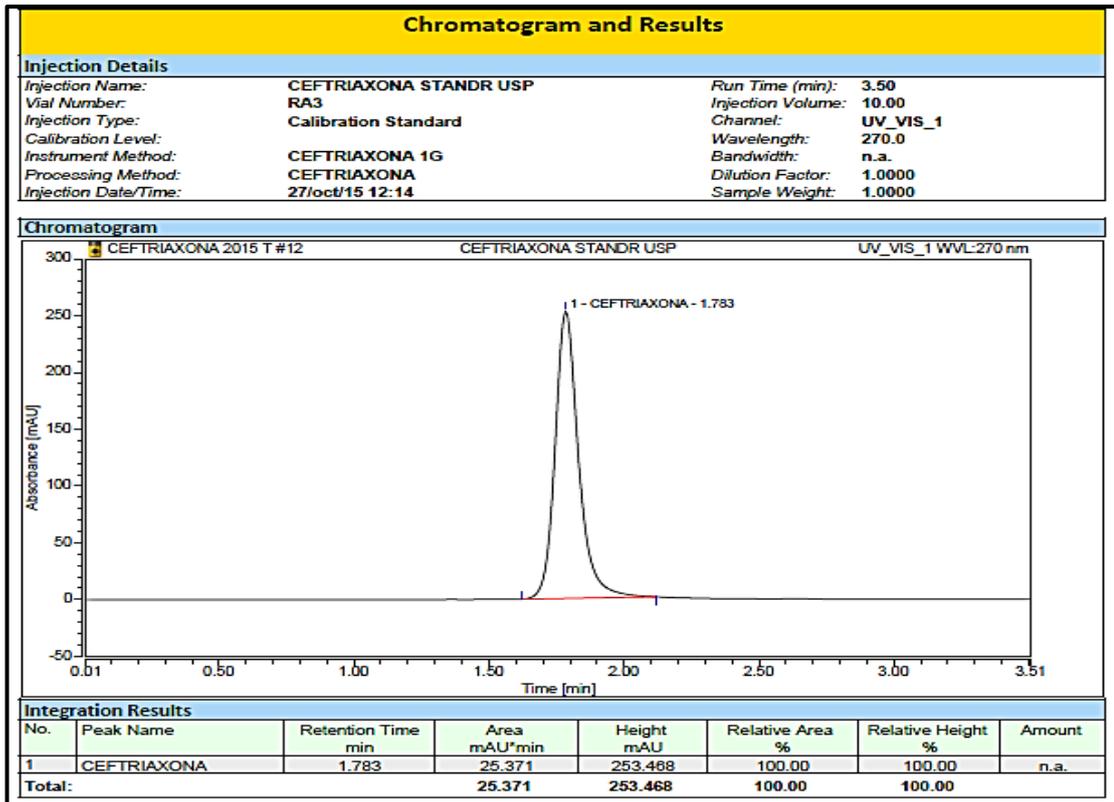


Figura 11-3. Cromatograma estándar USP de ceftriaxona inyección 4.

Realizado por: Nataly Salguero 2016

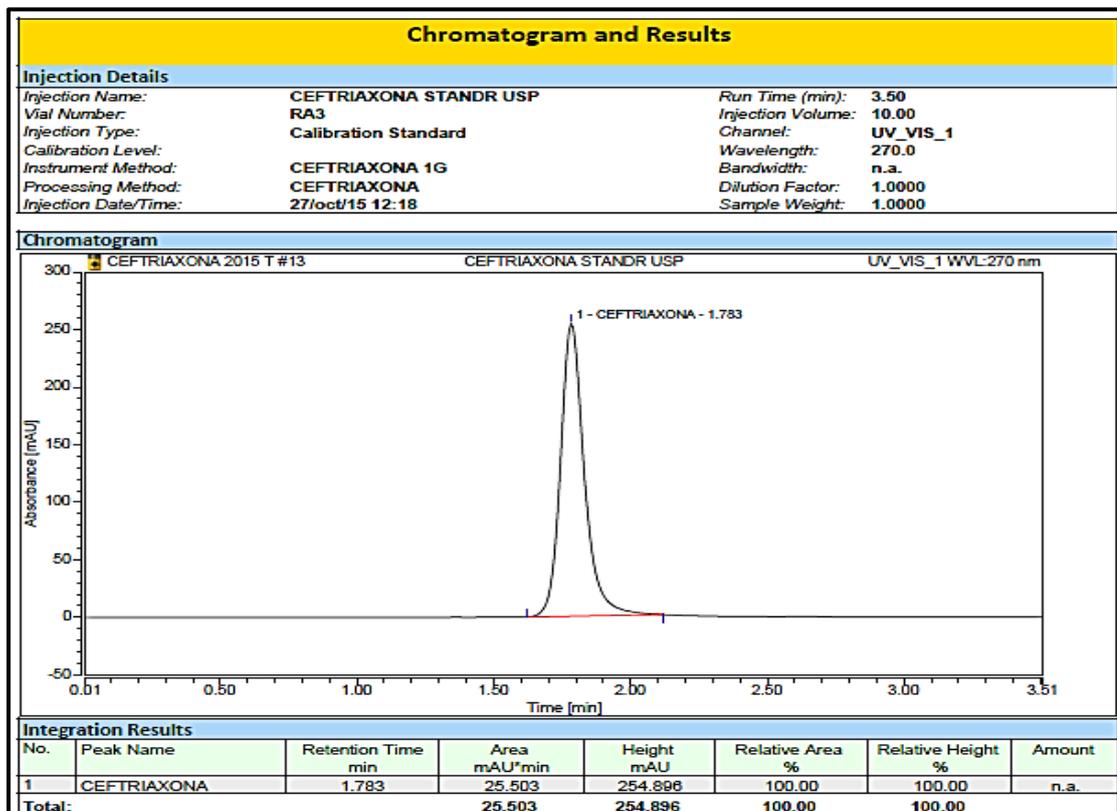


Figura 12-3. Cromatograma estándar USP de ceftriaxona inyección 5.

Realizado por: Nataly Salguero 2016

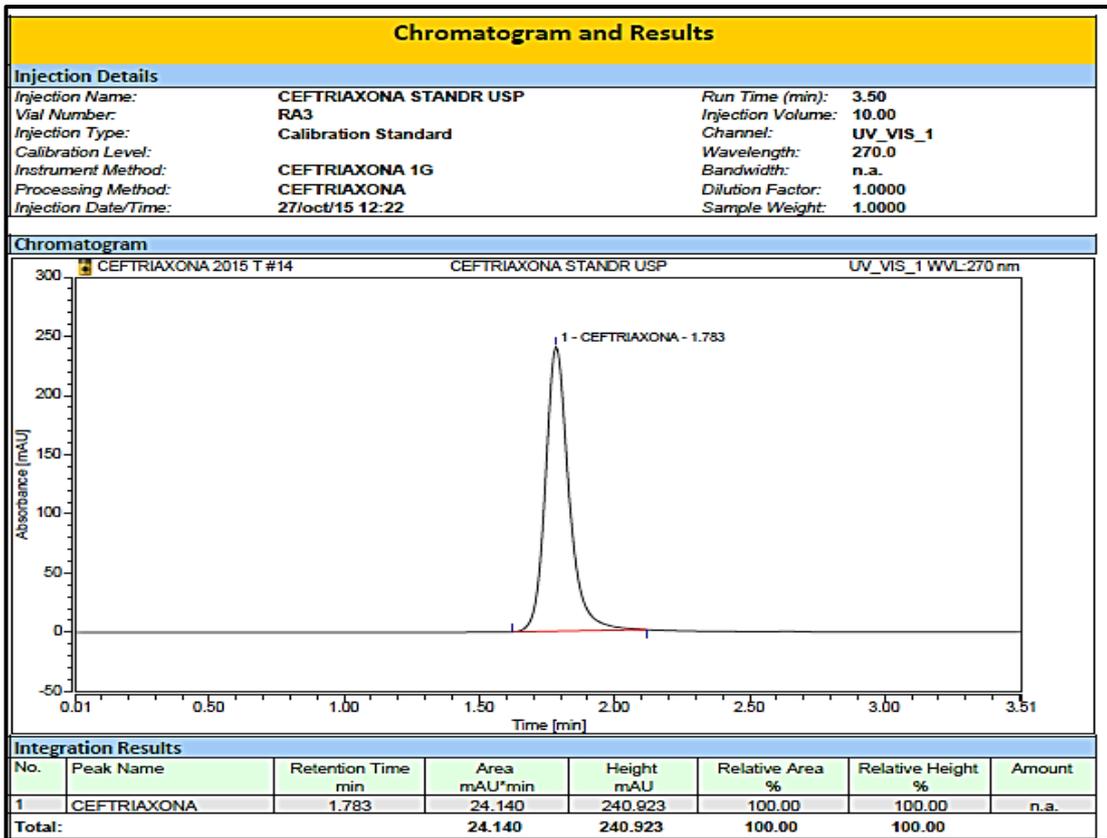


Figura 13-3. Cromatograma estándar USP de ceftriaxona inyección 5.

Realizado por: Nataly 2016

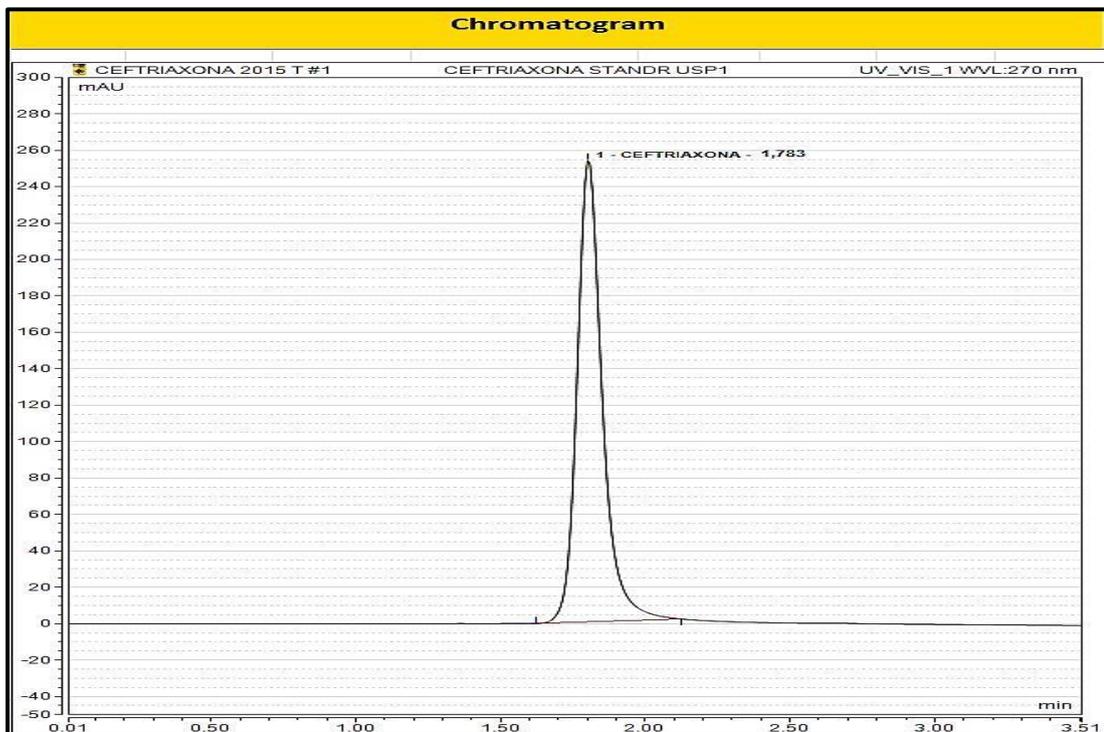


Figura 14-3. Cromatograma a escala del estándar USP de ceftriaxona.

Realizado por: Nataly Salguero 2016

De acuerdo a los cromatogramas de las figuras 8-3 a 13-3 muestra que el tiempo de retención se mantiene constante en las inyecciones realizadas del estándar USP de ceftriaxona, de igual manera se observa que los picos son asimétricos, con amplitud del Área de cuantificación. En la figura 14.3 se visualiza el cromatograma a escala de la lectura de un estándar, cuyo pico es representativo y cumple con los parámetros del Sistem Suitability.

3.2.1. Linealidad y rango

Tabla 2-3. Rango de las concentraciones del método utilizado para la cuantificación de ceftriaxona 1g, realizado en el laboratorio de Control de Calidad, empresa farmacéutica Betapharma, Quito, 2015

Rango de medición	Intervalo porcentual (%)					Concentración mg/mL				
	60	80	100	160	200	0.06	0.08	0.1	0.16	0.2

Realizado por: Nataly Salguero 2016

En la tabla 2-3 se indican los intervalos utilizados para evaluar los parámetros de linealidad, precisión y exactitud. La normativa ICH Q2 y la USP35:2012 recomiendan para los productos elaborados un rango de 80 a 120%; en el caso del presente trabajo el intervalo fue de 60-200%. Se consideró un 20% menos al valor referencial para el límite inferior con un mínimo de concentración de 0.06mg/mL y un 80% de variación para el límite superior con una concentración 0.2mg/mL; estos intervalos indicaron que la muestra analizada presentó amplitud de la señal detectada por el equipo HPLC. La concentración teórica de la ceftriaxona es de 0.2mg/mL que lo indica la USP35:2012 en su compendio II, se utilizó la concentración de 0.1mg/mL lo cual cubrió necesidades propias del laboratorio, relacionándose con los estudios de estabilidad del fármaco, en la cual se determina la mínima concentración que el principio activo puede degradarse durante el tiempo de 5 años. El rango determinado cumplió con la ley de Beer; es decir que la señal detectada depende de la concentración de la molécula de ceftriaxona.

Linealidad

Tabla 3-3. Datos analíticos de la linealidad a partir del rango de 60 a 200%, determinados en el equipo Ultimate 3000 realizado en el laboratorio de Control de Calidad, empresa Betapharma, Quito, 2015

Concentración % (X) teórica	Área (y)	Promedio (y)	Factor de respuesta f	Concentración práctica (x)
60	16358	60,000	272,633	62,800
	15887		264,783	
	16348		272,467	
80	20636	80,000	257,950	79,153
	20701		258,763	
	20664		258,300	
100	25518	100,000	255,180	97,030
	25534		255,340	
	25606		256,060	
160	42809	160,000	267,556	160,168
	42829		267,681	
	42787		267,419	
200	53891	200,000	269,455	200,851
	53846		269,230	
	54044		270,220	

Realizado por: Nataly Salguero 2016

En la tabla 3-3 se hace referencia a los valores de las Áreas medidas a partir de 5 niveles de concentración 60, 80, 100, 160, 200 con 3 réplicas (K=5, n=3), se obtuvo resultados proporcionales a la concentración teórica de cada intervalo de respuesta.

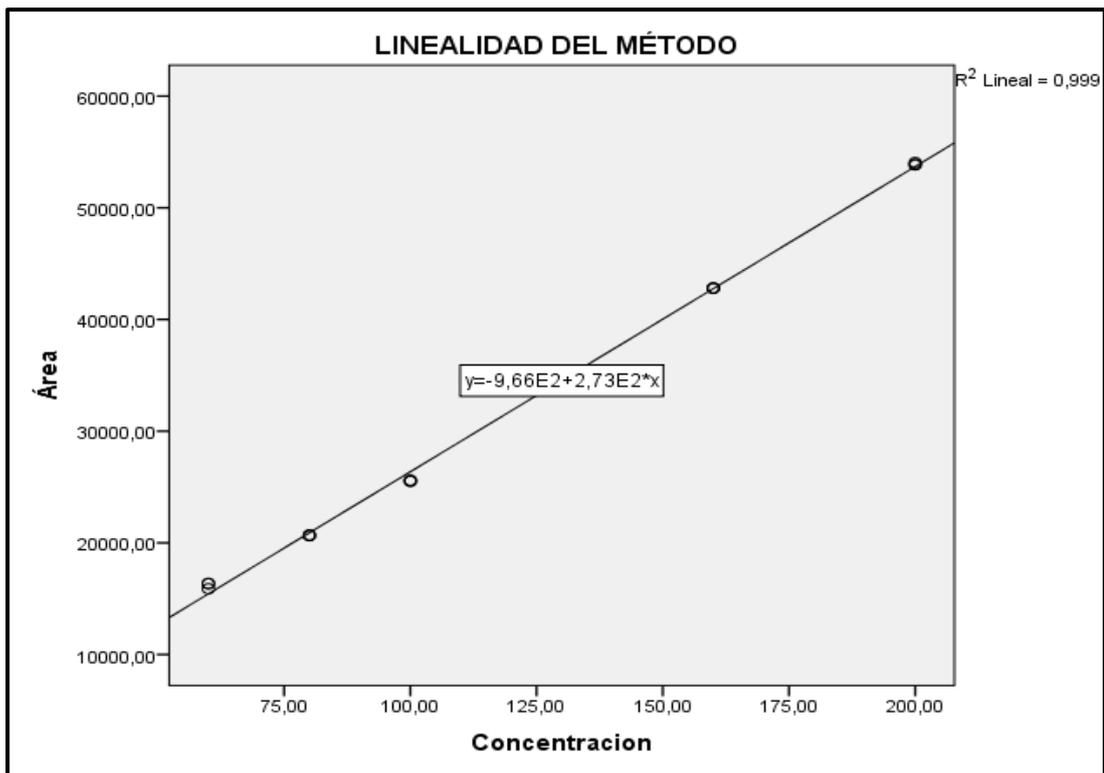


Figura 15-3. Gráfica de la relación lineal de las Áreas con la concentración de ceftriaxona por el método de regresión lineal, calculado por el programa SPSS.

Realizado por: Nataly Salguero 2016

La lineal del método analítico por HPLC para la valoración de ceftriaxona se muestra en la figura 15-3, por medio de la cual se visualiza la bondad del proceso, con una linealidad positiva y proporcionalidad de las Áreas medidas con la concentración de analito en las muestras.

Tabla 4-3. Resumen de los datos de los resultados de linealidad realizados por el método general en el equipo Ultimate 300 desarrollado en el laboratorio de Control de Calidad de la empresa Betapharma, Quito,2015

Especificación	Criterio de aceptación	Resultado
Supuestos: • Homogeneidad de variancias • Normalidad de los residuales	P-valor <0.005 (Test de Levene) W exp < Wtab (Test Shapiro-Wilk)	0.002 Cumple
Pendiente (b)		273.3
Intercepto (a)		-965.64
Coefficiente de correlación (r)	≥0.999 (Manual AEFI 2001, ICH Q2)	0.9993
Coefficiente de determinación (r ²)	≥0.998 (Manual AEFI 2001, ICH Q2)	0,9987
Coefficiente de variación (CV)	>2 (Manual AEFI 2001, ICH Q2)	1,526
Ecuación de la recta		y = 273.3x – 965.64
Test t-Student correlación (r)	t _{exp} > t _{tab} , con n-2 gl y p=0.05	t _{exp} = 99.93 > t _{tab} = 1.771
Test de linealidad para b	t _{exp} > t _{tab} , con n-1 gl y p=0.05	t _{exp} = 15.2334 > t _{tab} = 1.761
Test de proporcionalidad a	t _{exp} < t _{tab} , con n-1 gl y p=0.05	t _{exp} = -0.4114 > t _{tab} = 1.761
Intervalo de confianza b	No incluyen el cero	LCD= 273.30 ±31.7732
Intervalo de confianza a	Se incluye el cero	LCa=965.64 ± 4157.316

Realizado por: Nataly Salguero 2016

Prueba estadística de Pearson complementaria para el análisis de correlación lineal

Correlaciones			
Estadísticos descriptivos			
	Media	Desviación estándar	N
VAR00001	120,0000	53,98412	15
VAR00002	31830,5333	14764,19265	15
Correlaciones			
		VAR00001	VAR00002
VAR00001	Correlación de Pearson	1	,999**
	Sig. (bilateral)		,000
	Suma de cuadrados y productos vectoriales	40800,000	11150700,00
	Covarianza	2914,286	796478,571
	N	15	15
VAR00002	Correlación de Pearson	,999**	1
	Sig. (bilateral)	,000	
	Suma de cuadrados y productos vectoriales	11150700,00	3051739386
	Covarianza	796478,571	217981384,7
	N	15	15

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

Figura 16-3. Análisis estadístico del Test de Pearson (correlación) calculado en el programa SPSS.

Realizado por: Nataly Salguero 2016

En la tabla 4-3 se muestra los resultados del estudio de linealidad del método analítico del rango de 5 concentraciones (60, 80, 100, 160 y 200%), los puntos descritos se interpretan de la siguiente forma:

Se evaluó los supuestos de normalidad y homogeneidad de los datos medidos con el programa SPSS, para lo cual:

La Normalidad se calculó con el Test Shapiro-Wilk, el planteamiento de las hipótesis fue Ho: Las Áreas medidas por CL provienen de una muestra de ceftriaxona normalmente distribuida. Ha: Las Áreas no provienen de una población normal. El valor de la probabilidad fue de 0.002 menor al valor de significancia 0.005. Por lo tanto con el 95% de confianza las Áreas calculadas siguen una distribución normal.

La Homogeneidad se calculó con el Test de Levene, el planteamiento de las hipótesis fue Ho: Las varianzas de los datos analíticos son estadísticamente iguales. Ha: Existe variación entre las mediciones de los datos analíticos. Se analizó en valor del test por intervalo de concentración, las probabilidades fueron 0.335 (60%), 0.848 (80%), 0.328 (100%), 0.948 (160%) y 0.417 (200%) valores mayores al valor de significancia 0.005. Por lo tanto con el 95% de confianza existe variación entre las mediciones de los datos analíticos.

Se determinó la ecuación de la recta por el método de regresión lineal calculado con el programa SPSS que se muestra en la tabla 4-3, cuyo coeficiente de correlación (r) es 0.9993 indica que existe correlación entre las variables dependiente (Áreas) y la concentración (mg/mL), y se encuentran dentro del valor de referencia ≥ 0.999 de acuerdo a la normativa ICH Q2. De igual manera el coeficiente de determinación (r^2) fue 0,9987, que muestra mayor significancia lineal y proporcionalidad de las variables con el método de análisis.

El Test t-Student correlación (r) muestra que el %CV fue 1,526 menor al valor 2 especificado por la ICH Q2 y el manual AEFI, por lo tanto no existe error sistemático y la correlación es lineal.

El test de linealidad de la pendiente fue $15.2334 > 1.761$, por lo tanto la pendiente es significativamente distinta de cero.

El test de proporcionalidad fue $-0.4114 < 1.761$, por lo tanto la variable independiente es significativamente distinta de cero y la recta pasa por el origen de coordenadas.

En el análisis estadístico paramétrico de Pearson determinado por el programa SPSS se muestra en la figura 16-3 que el factor de correlación tanto de la concentración porcentual como de las Áreas medidas son valores positivos y cercanos a la unidad, en concreto 0.999 y 0.999 respectivamente; ambos coeficientes son estadísticamente significativos con $p < 0.001$; dichos valores se asocian a lo especificado en la normativa de validación ICH Q2. Por lo tanto las dos variables están asociadas a la muestra de análisis con una elevada correlación directa. En el Anexo A. Linealidad del método analítico para la cuantificación de ceftriaxona polvo para solución inyectable 1g, se indican los cromatogramas del análisis realizado.

3.2.2. Precisión

Repetibilidad del método

Tabla 5-3. Datos de la Repetibilidad del método determinado en el equipo Ultimate 3000, realizado en el laboratorio de Control de Calidad, empresa Betapharma, Quito, 2015

Número de inyecciones	Áreas
1	26397
2	25995
3	26590
4	26627
5	26693
6	26762
7	26791
8	26819
9	26796
10	26834
Promedio Área	26630,4
DVS	260,625
%CV	0,979

Realizado por: Nataly Salguero 2016

En la tabla 5-3 se muestran los resultados de la Repetibilidad del método cuyo coeficiente de variación es 0.979% por lo tanto las 10 mediciones de muestras diferentes del lote 0515063, analizadas bajo las mismas condiciones operativas (un mismo analista, en el equipo Ultimate

3000, el mismo día) son próximos entre sí y no existe variabilidad metodológica; de hecho el coeficiente de variación cumple con la referencia de la normativa ICH Q2 >2%.

Precisión intermedia

La precisión intermedia se evaluó con la aplicación de un diseño experimental donde se estudió la variación de los factores día de la valoración de muestras de 6 estándares USP de ceftriaxona, analista A y B, para lo cual se emplearon los equipos MERCK HITACHI D-6000^a y ULTIMATE 3000.

Tabla 6-3. Datos del análisis de la precisión intermedia de la valoración de ceftriaxona 1g a la concentración 0.1mg/mL, realizado en los equipos Ultimate 3000 y Merck Hitachi D-6000® en el laboratorio de Control de Calidad, empresa Betapharma, Quito, 2015

Instrumento	Analista	Día 1		Día 2	Día 3	
MERCK HITACHI D-6000^a	Analista A		25555	25518	26743	
			25622	25511	26811	
			25741	25484	26840	
			25679	25418	26869	
			25683	25553	26846	
			25794	25619	26886	
		Promedio	25679,000	25517,167	26832,500	
		Dvs	84,510	67,271	50,805	
		%CV	0,329	0,264	0,189	
ULTIMATE 3000	Analista B		Día 1		Día 2	Día 3
			1137184	1177334	1130188	
			1136296	1185205	1125216	
			1135088	1178557	1127291	
			1129682	1179489	1126879	
			1133247	1182304	1122515	
			1134499	1182737	1119570	
		Promedio	1134332,667	1180937,667	1125276,500	
		Dvs	2660,464	2968,745	3766,769	
		%CV	0,235	0,251	0,335	

Realizado por: Nataly Salguero 2016

De acuerdo al diseño experimental aplicado se muestra en la tabla 6-3 los resultados del coeficiente de variación cuyo promedio fue 0.267%, que cumple con la especificación de la

normativa ICH Q2 (%CV >2). El método analítico no presenta variabilidad en las mediciones ante la modificación de las condiciones operativas.

Se aplicó el análisis estadístico de Anova de un factor para comprobar si al menos una de las condiciones operativas difiere significativamente con la señal detectada del analito en el estudio. Se ilustra en la figura 17-3 los resultados del análisis estadístico, en el cual se muestra que los valores de p valor son menores a $p=0.005$, por lo tanto las condiciones operativas del tipo de instrumento y el día difieren significativamente.

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
DIA1	Entre grupos	3,687E+12	1	3,687E+12	1040854,991	,000
	Dentro de grupos	35426057,33	10	3542605,733		
	Total	3,687E+12	11			
DIA2	Entre grupos	4,005E+12	1	4,005E+12	908369,972	,000
	Dentro de grupos	44089850,17	10	4408985,017		
	Total	4,005E+12	11			
DIA3	Entre grupos	3,620E+12	1	3,620E+12	510140,944	,000
	Dentro de grupos	70955639,00	10	7095563,900		
	Total	3,620E+12	11			

Figura 17-3. Resultados del análisis estadístico Anova de un factor, calculado por el programa SPSS.

Realizado por: Nataly Salguero 2016

3.2.3. Exactitud

La exactitud se determinó en el intervalo de concentraciones de 80-100-160%, con la aplicación del método analítico para muestras de pureza conocida de acuerdo al manual AEFI (2001). El desarrollo del método va acompañado de 6 mediciones con el estándar USP de ceftriaxona.

Tabla 7-3. Datos analíticos y análisis estadístico de la exactitud, realizado en el laboratorio de Control de Calidad, empresa Betapharma, Quito 2015.

ESTÁNDAR USP		MUESTRA LOTE 0415062				
Concentración de trabajo: 0.1mg/mL						
Concentración: 924µg/mg As Is						
N° mediciones	Área	Concentración %	Área	Concentración práctica %	Varianza	%Recuperación
1	27051	80	20909	81,080	0,016	101,350
2	27119		20979	81,327		101,659
3	27147		20937	81,179		101,474
4	27176	100	25855	98,560	0,027	98,560
5	27151		25870	98,613		98,613
6	27190		25942	98,867		98,867
Promedio	27139	160	43342	160,360	0,030	100,225
DVS	49,643		43289	160,172		100,108
%CV	0,183		43387	160,519		100,324
ANÁLISIS ESTADÍSTICO						
Ecuación de la recta		y = 282,96x - 2033,4		Igualdad de varianzas		
Pendiente		282,96		Test Cochran		
Término independiente		2033,4		Máx. S2	0,030	
Test t-Student				suma S2	0,073	
Datos:	Promedio	100,131		G_{exp}	0,414	
	DVS	1,227				
	%CV	1,225				
Texp	-0.962					

Realizado por: Nataly Salguero 2016

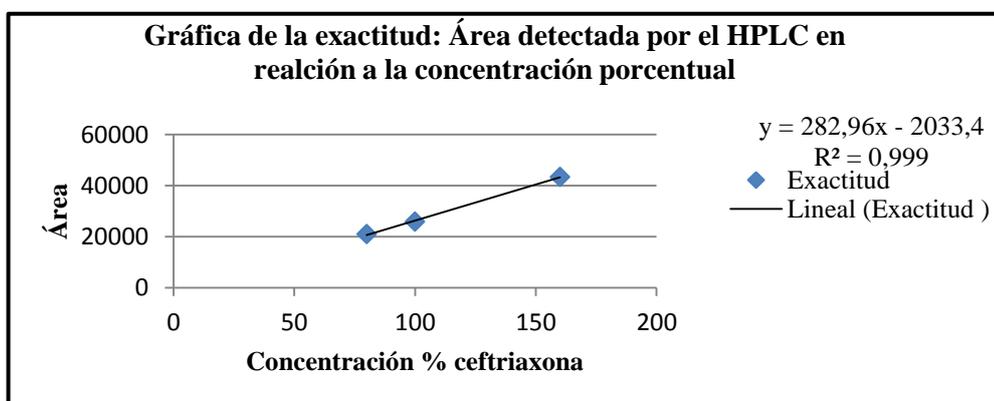


Figura 18-3. Gráfica de la exactitud de la relación del Área detectada por el HPLC con la concentración porcentual.

Realizado por: Nataly Salguero 2016

En la tabla 7-3 se muestra que el porcentaje de recuperación máxima fue de 101.659% y con un mínimo de 98.560%, cumplen con los criterios de la USP35:2012 en su compendio II y lo establecido por la empresa cuyo porcentaje de recuperación se establece entre 90 a 115%; por lo tanto el proceso metodológico cumple con la exactitud establecida. Se aplicó el test de Cochran al ser $G_{exp} = 0.414 < G_{tab} (\alpha=0.05; k=3, n=3) = 0.8709$, se determinó que las varianzas de las tres concentraciones de ceftriaxona en el intervalo utilizado son equivalentes, es decir el factor concentración no influye en la variabilidad de las mediciones analíticas. Se confirmó que la exactitud es satisfactoria con la aplicación del test t-Student, al ser el valor de $t_{exp} = 0.962 < t_{tab} (\alpha=0.05; gl= 9-1=8) = 2.306$, se estableció que no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100%, de tal modo que la exactitud es ideal. Se garantizó la determinación del parámetro de exactitud con la medición conjunta del estándar USP de ceftriaxona el cual presenta un %CV de 0.183 manifestando que no existe error en las determinaciones.

3.2.4. Límite de cuantificación

Se consideró el método instrumental más habitual para técnicas cromatográficas por HPLC que no corrigen la señal frente a un blanco. Las muestras medidas fueron en un rango de concentraciones de 0.06; 0.08; 0.1mg/mL. Se valoró la muestra con el estándar USP de ceftriaxona.

Tabla 8-3. Resultados del análisis del límite de cuantificación de la ceftriaxona 1g por HPLC, realizado en la empresa Betapharma, Quito, 2015

ESTÁNDAR USP Ceftriaxona		DATOS ANALÍTICOS		
Concentración trabajo: 0.1mg/mL		Muestra:	Ceftriaxona polvo para solución inyectable 1g	
Concentración: 924µg/mg As Is		Lote:	0415062	
N° mediciones	Área	Concentración	Área	Desviación estándar
1	25937	60	16578	22,517
2	25850		16539	
3	25843		16539	
4	25812	80	20909	32,604
5	25747		20937	
6	25881		20974	
Promedio	25845	100	25855	46,508
DVS	64,003		25870	
%CV	0,248		25942	
Límite de cuantificación				
Datos	Yb	231,93		
	Sb	0,5998		
Resultado	LC (K=10)	0,0183		

Realizado por: Nataly Salguero 2016

La mínima cantidad de ceftriaxona que el equipo HPLC pudo detectar se muestra en la tabla 8-3 fue de 0.0183. Los valores fueron cuantificados con un estándar USP cuyo %CV es 0.248, por lo tanto no hay variabilidad en las mediciones y hay mayor homogeneidad entre las Áreas detectadas a los intervalos de concentración mínima del principio activo.

3.2.5. Robustez

Se determinó la influencia del factor pH de la fase móvil en las condiciones ácidas de 6,48 y 4,44, un pH básico de 11,68 y 12,54. Los valores se determinaron con base en el estándar de referencia USP para la cuantificación de ceftriaxona polvo para inyección (1g).

Tabla 9-3. Resultados de la prueba de robustez del factor nominal pH de la fase móvil, bajo las condiciones de pH Ác. 6,48; 4,44 y un pH. OH 11,68; 12,54, para la cuantificación del principio activo ceftriaxona 1g, realizado en el laboratorio de Control de Calidad, empresa Betapharma, Quito 2015.

ROBUSTEZ					
Concentración de trabajo=			0.2mg/mL		
ESTÁNDAR REFERENCIA			CEFTRIAXONA POLVO PARA SOLUCIÓN INYECTABLE		
N°	ÁREA	Tiempo retención (min)	pH	ÁREA	Tiempo retención (RT) (min)
			Ácido		
1	965409	1,00	6,48	1044421	1,00
2	963130			1046832	
3	964852		4,44	1034962	
4	963006			1037545	
5	962620		PROMEDIO	1040940,000	
6	965107		DVS	5600,462	
PROMEDIO	964020,667		%CV	0,538	
DVS	1231,536		Básico		
%CV	0,128		11,68	956835	0,98
				948779	0,97
			12,54	881060	0,92
				876850	0,92
			PROMEDIO	915881,000	
			DVS	42799,648	
			%CV	4,673	

Realizado por: Nataly Salguero 2016

La influencia del pH de la fase móvil bajo las condiciones descritas en la tabla 9-3, muestran que a pH ácido de 6.48 y 4.44 el analito incrementa su afinidad por la fase estacionaria y sus grupos silanoles ya que su Área de cuantificación se eleva en un promedio de 1040940.000, cuyo %CV es 0.538 lo que indica que no hay variación en sus medidas grupales. El tiempo de retención del analito hasta su detección se mantiene constante. En tanto que el comportamiento de la elución de la molécula de ceftriaxona en condiciones de pH básico presentó interferencias, como se indica en la tabla 9-3 en primera instancia el analito no es retenido por la fase estacionaria y eluye con rapidez, presentado un RT de 0.98; 0.97 a pH 11.68; y a pH 12.54 el RT fue 0.92. Por lo tanto su Área de identificación decrece en vista que no hay retención en la columna. De acuerdo al trabajo investigativo de (Péhourcq y Jarryb, 1998) señalan que la ceftriaxona mantiene su estabilidad a pH 7 ± 0.5 , en base al estudio en mención se estableció que la condición del factor nominal pH de la fase móvil es a pH 7 ± 0.2 , condición de trabajo del

método analítico para la cuantificación de ceftriaxona polvo para solución inyectable. Las determinaciones se fundamentan en 6 lecturas del estándar de referencia USP, lo que proporciona más confiabilidad de los resultados obtenidos y descritos.

Se interpretó los resultados obtenidos del parámetro de robustez por el método de mínimos cuadrados.

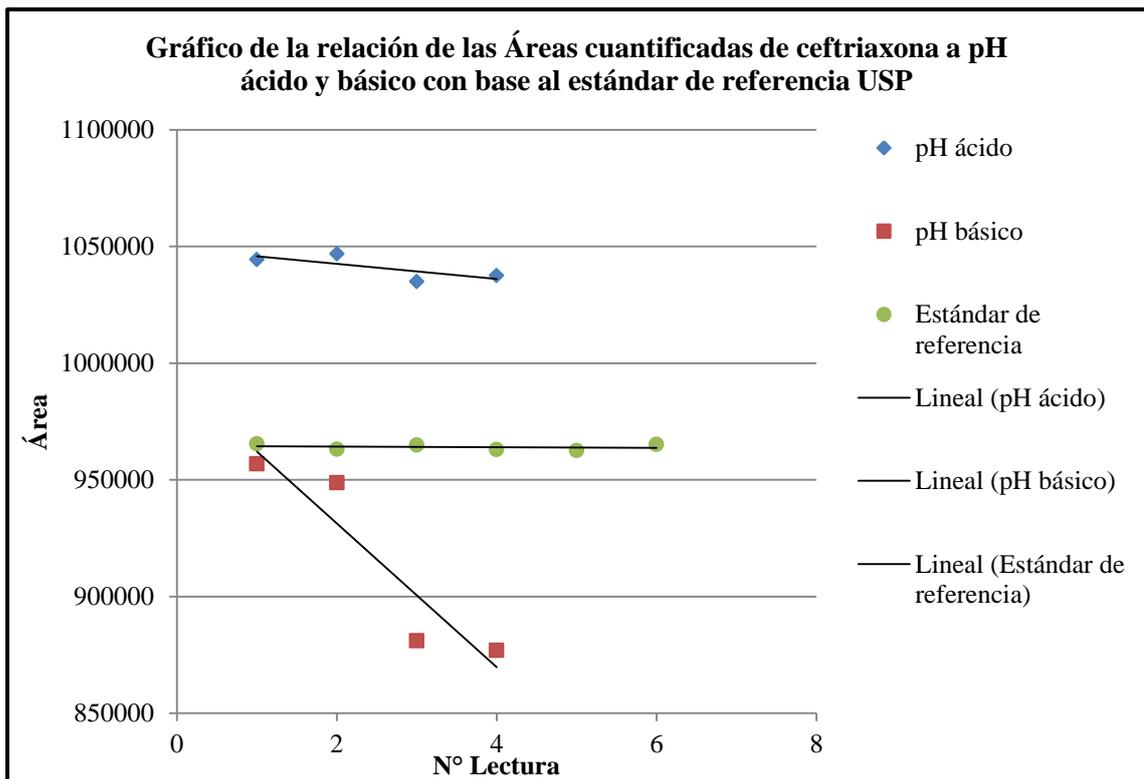


Figura 19-3. Gráfico del análisis de robustez de la relación de las Áreas cuantificadas de ceftriaxona a pH ácido y básico con base al estándar de referencia USP

Realizado por: Nataly Salguero 2016

En la figura 19-3, se muestra el comportamiento lineal de la cuantificación de ceftriaxona en condiciones de pH ácido el cual presenta una tendencia lineal, mientras que a pH básico decrece su pendiente y la linealidad es escasa. Con base al estándar de referencia USP se muestra que el comportamiento básico representa el factor más relevante de variabilidad en la respuesta la detección de la molécula.

3.3. Valoración del estándar secundario lote: 140822013 por el método validado de ceftriaxona 1g polvo para inyección, realizado en la empresa Betapharma.

Se aplicó el método analítico por HPLC validado para la valoración del estándar secundario de ceftriaxona. Los resultados se describen en el certificado de análisis generado por el laboratorio de Control de Calidad de la empresa Betapharma S.A; por políticas internas y motivos de confidencialidad, se describe los datos y los resultados obtenidos.

Para valorar el estándar secundario trazable se verificó que los equipos cumplen con las BPL, los cuales tienen su calificación vigente. La muestra valorada fue ceftriaxona sódica, lote: 140822013. De acuerdo al certificado del proveedor el contenido de la muestra es 920 µg/mg As Is, con un porcentaje de humedad de 8.8%, pH 6.4 y se describe como un polvo cristalino blanco. Las muestras preparadas fueron valoradas con el estándar de referencia USP de ceftriaxona con una pureza de 924 µg/mg As Is.

Tabla 10-3. Resultados de la valoración del estándar secundario de ceftriaxona sódica, realizado en la empresa Betapharma, Quito, 2015

PRODUCTO:	CEFTRIAXONA SÓDICA			
LOTE:	140822013			
CASA:	BETAPHARMA	FECHA DE ANALISIS:	2015-10-27	
CONCENTRACIÓN CEFTRIAXONA				
N°	ug/mg BS	%	ug/mg As Is	%
C1	1012,32	101,23	923,23	92,32
C2	1012,06	101,21	922,99	92,30
C3	1006,75	100,68	918,16	91,82
PROMEDIO	1010,38	101,04	921,46	92,15
DV	3,14		2,86	
%RSD	0,31		0,31	

Realizado por: Nataly Salguero 2016

De acuerdo a los resultados de la tabla 10-3 la riqueza del lote 14082213 fue de 921.46 µg/mg As Is, valor que cumple con las especificaciones de la USP35:2012 en su compendio II, que especifica “Ceftriaxona Sódica contiene el equivalente a no menos de 795 µg de ceftriaxona (C₁₈ H₁₈ N₈ O₇ S₃) por mg, calculado con respecto a la sustancia anhidra”. Por lo tanto queda valorada la muestra y su denominación como estándar secundario de Ceftriaxona sódica.

CONCLUSIONES

- Se optimizó y validó el método analítico para la cuantificación de ceftriaxona polvo para solución inyectable por Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), basándose en el cumplimiento de los criterios definidos por la USP 35 (2012), la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) y el manual AEFI (2001). A la vez la técnica cromatográfica (HPLC) le proporciona al método mayor sensibilidad, en vista que los antibióticos presentan un anillo betalactámico característico que por otras técnicas no favorecen su identificación y cuantificación.

- Se implementó el método analítico en el laboratorio de Control de Calidad de la empresa Betapharma S.A; con la contribución del departamento de Validación en la elaboración del protocolo de validación y el Área de Garantía de la Calidad que certificó la validez del presente trabajo.

- Se aplicó un diseño experimental fiable que permitió comprobar el comportamiento del analito en los ensayos realizados. De tal manera que se optimizó los componentes de la fase móvil y sus proporciones con el empleo del compuesto hidróxido de tetrabutilamonio (HTBA) que es una sal de amonio cuaternario y se caracterizó por sus buenas propiedades lipófilas, operó como contra ión en la elución de la ceftriaxona que formó pares de iones lipófilos. En consecuencia el ensayo G fue el adecuado para la elución del principio activo.

- Las condiciones óptimas que cumplieron con el Sistem Sustainability USP35 (2012) fueron una fase móvil de hidróxido de tetrabutilamonio (1,75g): buffer fosfato pH7 (66mL): metanol (20mL): acetonitrilo (14mL), flujo 1,6ml/min, longitud de onda 270nm; empleando una columna Lichrospher®100RP-18(5µm) de 25cm, un volumen de inyección de 10µL.

- Se evaluaron los parámetros de validación conforme lo establecido por las normativas ICH Q2, USP35 (2012) y el manual EAFI (2001) y el cumplimiento de sus criterios de aceptación conjuntamente con la verificación estadística se concluye que el método fue lineal con un coeficiente de correlación de 0.9993 y de determinación 0.9987, preciso con buena repetibilidad metodológica durante su cuantificación, se comprobó con la precisión intermedia que en el desarrollo del método no hay evidencia variabilidad en las mediciones conforme a las modificaciones de las condiciones operativas (Analista, día y equipo). El método se consideró exacto ya que presentó excelente porcentaje de recuperación para lo cual se obtuvo un mínimo de 81,080% y un máximo de 160.519%. La concentración mínimas que puede ser detectada por

el sistema fue de 0.0183, lo que favorece el desarrollo de estudios propios del laboratorio como es la evaluación de la estabilidad del fármaco valorado. En tanto que la robustez indicó que el factor limitante fue el pH básico de la fase móvil en el rango de 11.7 a 12.5, por lo tanto se debe preparar la fase móvil a un pH 7 ± 0.2 .

RECOMENDACIONES

- El método analítico optimizado y validado se debe aplicar para los análisis de rutina, estudios de estabilidad con especial excepción solo al producto ceftriaxona polvo para solución inyectable.

- La conservación de las columnas cromatográficas que emplea el laboratorio de Control de Calidad de la empresa Betapharma se obtiene con el tratamiento de agua para HPLC por un tiempo estimado de 20min, seguido de una solución de acetonitrilo en las proporciones 20:80 y 50:50, para eluir y erradicar las sales generadas en la interacción de la fase móvil optimizada, la cual emplea un buffer de fosfato y el tenso activo hidróxido de tetrabutilamonio (HTBA).

ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrilo

mM: Unidad de concentración mili molar

TPAB: Bromuro de tetrapentilamonio

MeOH: metanol

THBS: tetrabutilamonio hidrógeno sulfato

ED: detector arreglo de diodos

CL: Cromatografía líquida

UV: Ultravioleta

USP-NF: Farmacopea De Los Estados Unidos, Formulario Nacional

pH: Potencial Hidrógeno, expresa grado de acidez o basicidad de una disolución acuosa

mm: Milímetro

GMP: Buenas prácticas de manufactura

MeOH: Metanol

HETP: altura equivalente de plato teórico

IM: Vía de administración intra muscular

IV: Vía de administración intra venosa

N: número de platos teóricos

n= Número de repeticiones experimentales

N/A= No aplica, de acuerdo el caso

DVS= desviación estándar

As Is= Pureza de la concentración de un principio activo, es la sustancia en base anhidra

RT= Tiempo de retención

ICH= Conferencia Internacional de Armonización

BIBLIOGRAFÍA

Aguirre et al, *Validación de Métodos Analíticos (A.E.F.I)*. España, Gráficas GISPERT, S.A, 2001, pp.23-118

Barquero Q. Miriam, *Mecanismos y aplicaciones de la cromatografía líquida de alto desempeño* [en línea]. San José-Costa Rica, Universidad de Costa Rica, 2004, pp.12-14. [Consulta: 28 de Septiembre de 2015]. Disponible en:

https://books.google.com.ec/books?id=Q6UlxfaxvkIC&pg=PA21&dq=columnas+cromatograficas+hplc&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiG_6a6strKAhXGuB4KHSDUDAwQ6AEILDAD#v=onepage&q=columnas%20cromatograficas%20hplc&f=false

Boris Duffau, et al, *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos”*, Chile, Soraya Sandoval, 2010, pp. 47-52

Buceta Javier et al, *Temas de Biofísica* [en línea]. Madrid-España, Uned, 2011, pp.245-249. [Consulta: 18 de Noviembre de 2015]. Disponible en:

<https://books.google.com.ec/books?id=cw3NIrx4u5AC&pg=PA279&dq=eficiencia+de+la+columna+cromatografica&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj1gJvt8t3KAhWFth4KHeD9B4EQ6AEIJDAC#v=onepage&q=eficiencia%20de%20la%20columna%20cromatografica&f=false>

Bustos G. Álvaro, “*Cefalosporinas parenterales*”, *Enfermedades Infecciosas en Pediatría* [en línea], 2012 (Colombia), 25 (99), pp. 3-4. [Consulta: 06 de Octubre de 2015] Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revenfinfped/eip-2012/eip121h.pdf>

Carlos Hans Kamann, “*Implementación de un sistema de cromatografía HPLC, con columnas de rápida resolución, y su comparación de eficiencia frente a columnas tradicionales*”, (Tesis de pregrado), Universidad Austral de Chile, [en línea], 2010 (Valdivia-Chile), pp.14-20. [Consulta: 23 de Octubre de 2015] Disponible en:

[http://www.implementación de un sistema de cromatografía-HPLC, columnas.com/pdfs/revier/tesis/-2010/fd.pdf](http://www.implementación-de-un-sistema-de-cromatografía-HPLC,columnas.com/pdfs/revier/tesis/-2010/fd.pdf)

Cuesta EC, *Manual de farmacología. Antimicrobianos betalactámicos*, La Habana, Editorial Pueblo y Educación, 1988, pp. 57-65

Douglas A. Skoog et al, *Introducción a las separaciones cromatográficas. Principios de análisis Instrumental*, 6^{ta} ed, México, Edamsa Impresiones S.A de C.V, 2008, pp.762-764

Emirhan Nemetlu et al, Simultaneous multiresponse optimization of an HPLC method to separate seven cephalosporins in plasma and amniotic fluid: Application to validation and quantification of cefepime, cefixime and cefoperazone, *Talanta* [en línea], 2009, (Turkia) 80 (1), pp. 117,125. [Consulta: 11 de febrero de 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914009004585>

Eurachem, *Métodos analíticos adecuados a su propósito*, México , Los Cúes, 2005. pp. 14

F. Pe´hourcq y C. Jarry, Determination of third-generation cephalosporins by highperformance liquid chromatography in connection with pharmacokinetic studies, *Journal of Chromatographya* [en línea], 1998, (Francia) 812 (1-2), pp. 159-177. [Consulta: 10 de febrero de 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967398002659>

Fuentes R. Yennifer, “Validación de la metodología analítica para la identificación y valoración de calcitonina de salmón mediante cromatografía líquida de alta eficiencia” (Tesis de pregrado). Universidad Austral de Chile, Chile, 2013. pp. 37-38

García Encarnación, *Optimización, validación y modelización de un proceso de fabricación de comprimidos. Desarrollo de una aplicación interactiva multimedia*, (tesis doctoral), Universidad de Barcelona, Barcelona, 2001, pp.3-17

Gary D. Christian, *Química Analítica*, 6^{ta} ed, México, Mc GRAW-HILL Interamericana, 2009, pp. 555-609.

Gennaro Alfonso R, *Remington Farmacia* [en línea]. Madrid-España, Médica Panamericana, 2003, pp. 1795-1797. [Consulta: 27 de Octubre de 2015]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=5SGJ4ezraG4C&pg=PA1817&dq=cefalosporinas&hl=es-419&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=cefalosporinas&f=false

Gimeno B. Vicente, *Farmacología de urgencias fármacos. Antibióticos* [en línea], 2001, pp. 4. [Consulta: 17 de Octubre de 2015]. Disponible en:

<http://www.cfnavarra.es/salud/PUBLICACIONES/Libro%20electronico%20de%20temas%20de%20Urgencia/23.Farmacologia%20de%20Urgencias/Farmacologia%20de%20urgencias%20Antibioticos.pdf>

GMP 2010, *Guía de inspección de buenas prácticas de manufactura para la industria de productos farmaceuticos Chile*, Capítulo 1

González Ana María, *“Características del consumo de antibióticos y de la resistencia bacteriana en la ciudad de santa fe. Estimación del gasto en antibióticos en un servicio de salud”* (maestría), Instituto Universitario ISALUD, Santa Fe, Buenos Aires, 2001, pp. 6,13

Goodman y Gilman, *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 12^{va} ed, México, MC GRAW-HILL interamericana, 2012, pp.1493-1499.

Green J. Mark, *Guía práctica para la validación de métodos analíticos*, Estados Unidos, Copyright, 1996, pp.7-9.

Harris Daniel C, *Proceso cromatográfico- Análisis Química cuantitativa*, 2^{da} ed, España, Reverté, 2001, pp.699.

ICH, *Validation of analytical procedures: text and methodology*, apéndice Q2 (R1), pp. 3

Isabel González Álvarez et al, *Metodologías Biofarmacéuticas en el desarrollo de medicamentos*, España, 2015, pp.5-10

Isabel Sierra Alonso et al, *Análisis Instrumental “Algunas herramientas de enseñanza-aprendizaje adaptadas al espacio Europea de Educación Superior”* [en línea], Coruña-España, Netbiblo, 2010. [Consulta: 24 de Mayo de 2015]. Disponible en:

J. Mark Green, *Guía práctica para la validación de métodos analíticos*, Estados Unidos, Copyright Sociedad Americana de Químicos, 1996, pp. 3,4.

José Hernández P, *Cromatografía líquida de alta eficiencia*. 8^{va} ed, Badalona, Coont Lab Clin, 2005, pp.49-59

KB Rivas et al, *“Cefalosporinas, de la primera a la cuarta generación”*, Cielo [en línea], 2002, (Caracas), 25 (2), pp. 3-5. [Consulta: 29 de Octubre de 2015]. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04692002000200003

Legaz G. María E et al, *“Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Prácticas de laboratorio y cuestiones teórico prácticas. Introducción y práctica de laboratorio: cálculo de la eficiencia y representación gráfica de la ecuación de van Deemter”*, Reduca (Biología) Serie Técnicas y Métodos. [En línea] (Madrid) 4(3), pp. 7-18 [Consulta: 17 de Noviembre de 2015]. Disponible en:

<http://pendientedemigracion.ucm.es/info/cvicente/reduca/5.pdf>

Lidia Lea G y Edgar Esquivel S, *Métodos físico químicos en Biotecnología* [en línea], Cuernavaca, Cromatografía en fase reversa, 2004. [Consulta: 14 de Julio de 2015]. Disponible en: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia_de_fase_reversa.pdf

Lidia Q, *Resolución en las columnas cromatográficas* [blog], 2015. [Consulta: 19 de Noviembre de 2015]. Disponible en: <https://lidiakonlaquimica.wordpress.com/tag/factor-de-retencion/>

M. Valcárcel, A. Ríos, *La calidad en los laboratorios analíticos*, España, Reverté, 2002, pp. 127-131

Magda A. Akl et al, Validation of an HPLC-UV method for the determination of ceftriaxone sodium residues on stainless steel surface of pharmaceutical manufacturing equipments, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [en línea], 2011, (Egipto) 55 (2), pp. 247,252. [Consulta: 11 de febrero de 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708511000458>

Manuel Chicharro, *Cromatografía principios y aplicaciones análisis químico* . [En línea]. Cromatografía Líquida de Alta Resolución. HPLC, 2012. [Consulta: 21 de julio de 2015]. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/19050563/Cromatografia-Principios-y-Aplicaciones#scribd>

María del Carmen Méndez, “*Desarrollo de métodos para el aislamiento y la detección de toxinas marinas en productos de la pesca y acuicultura*” [en línea] (Tesis doctoral), Universidad de Santiago de Compostela, Lugo-España, pp.45-47 [Consulta: 22 de septiembre de 2015]. Disponible en:

Marlin y Howard, *Cromatografía de fase reversa*,. México, 1995, pp. 2-4

Mata Q. Tania N, *Determinación de trazas de betalactámicos en la producción de penicilinas por el método de HPLC en una industria farmacéutica*, (Tesis de pregrado), Universidad Central del Ecuador, Ecuador, 2014, pp. 27-33

Mendoza P. Nicandro, *Farmacología médica* [en línea]. México-México, Médica Panamericana UNAN, 2008, pp. 608-610. [Consulta: 26 de Noviembre de 2015]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=EUBNE4Y0v9sC&pg=PA608&dq=cefalosporinas&hl=es-419&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=cefalosporinas&f=false

OGA-GEC-016 (OFICINA DE ACREDITACION GUATEMALA, C.A.) “*Política de Selección y Validación de Métodos de Ensayo*”, 2007, pp. 2-3

Regulación N°41-2007, *Validación de Métodos Analíticos*, parte 1: Generalidades, pp. 2-6

Romero G. Miguel Á, *Desarrollo de nuevas metodologías analíticas en el control de calidad de la industria farmacéutica* (tesis doctoral), Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España, 2001, pp. 8-9.

Sameer Al Rawithi et al, **Sensitive** assay for the determination of cefazolin or ceftriaxone in plasma utilizing LC, *Pharmaceutical and Biomedical analysis* [en línea], 2000, (Arabia) 22(2), pp. 281, 285. [Consulta: 10 de febrero de 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708599002733>

Santiago R. Sandra, “Contribución a la determinación de la fracción de metales traza ligados a las proteínas similares a las metalotioneínas en muestras de mejillón” [en línea], (Tesis doctoral), Universidad de Santiago de Compostela, Coruña-España, pp. 191,192

Shodex, *Introducción Cromatografía*. [En línea], Cromatografía de Partición/Adsorción, 2002. [Consulta: 05 de Enero de 2016.]. Disponible: <http://shodexhplc.com/lessons/leccion-3-cromatografia-de-particionadsorcion/?lang=es>.

Skoog y West Holle, *Química Analítica*, 7^{ma} ed, México, Mc GRAW-HILL Interamericana, 2001, pp.666.

Suárez Cristina y Gudiol Francesc, “*Antibióticos betalactámicos*”, Elsevier- Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica [en línea], 2009, 27 (2), pp. 7. [Consulta: 21 de Setiembre de 2015]. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-antibioticos-betalactamicos-13133636>

Sulca et al, *Desarrollo y validación de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para cuantificar clonixinato de lisina 125 mg y pargeverina clorhidrato 10 mg en tabletas recubiertas*, (tesis de pregrado), Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Lima-Perú, 2007, pp. 36-39

Taylor y Jhon K, *Validation of Analytical Methods. Analytical Chemistry*, EE.UU, First English, 1993, pp. 302-313

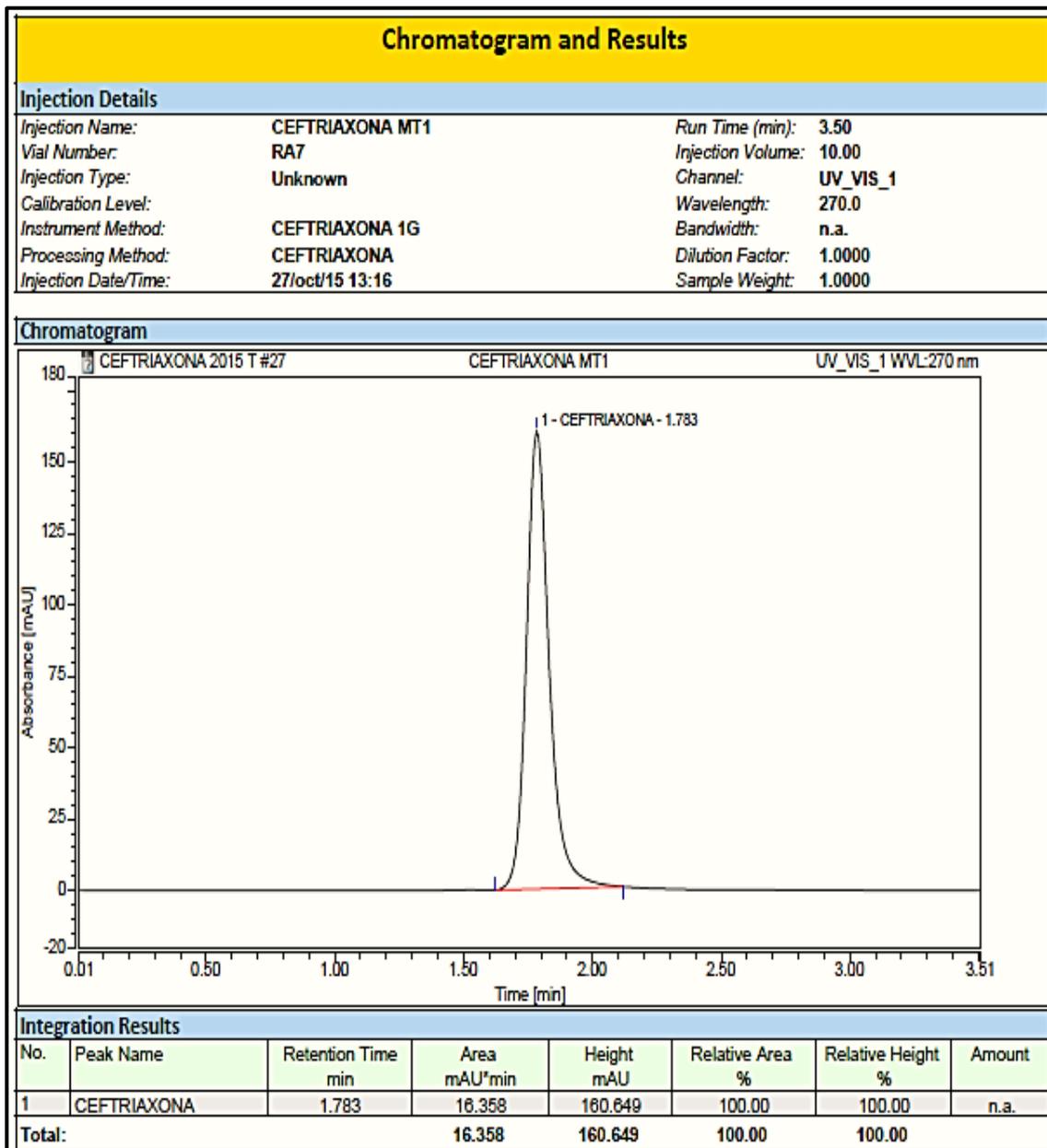
Tomberg J et al, “*Molecular and structural analysis of mosaic variants of penicillin-binding protein 2 conferring decreased susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins in Neisseria gonorrhoeae: role of epistatic mutations*”, Pubmed [en línea], 2010, 49 (37), pp. 7-10. [Consulta: 12 de Septiembre de 2015]. Disponible en: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01212>

USP 35, *Validación de procedimientos Farmacopéicos*, Apéndice 1225: Validación, pp. 967

Velasteguí B. Gonzalo J, *“Validación del método analítico de valoración de amoxicilina en polvo para suspensión oral producido por betapharma s.a. mediante HPLC”,* (Tesis de pregrado), Ecuador, 2011. pp.37-38

ANEXOS

Anexo A. Linealidad del método analítico para la cuantificación de ceftriaxona polvo para solución inyectable 1g a 5 niveles de concentración, desarrollado en el equipo ULTIMATE 3000

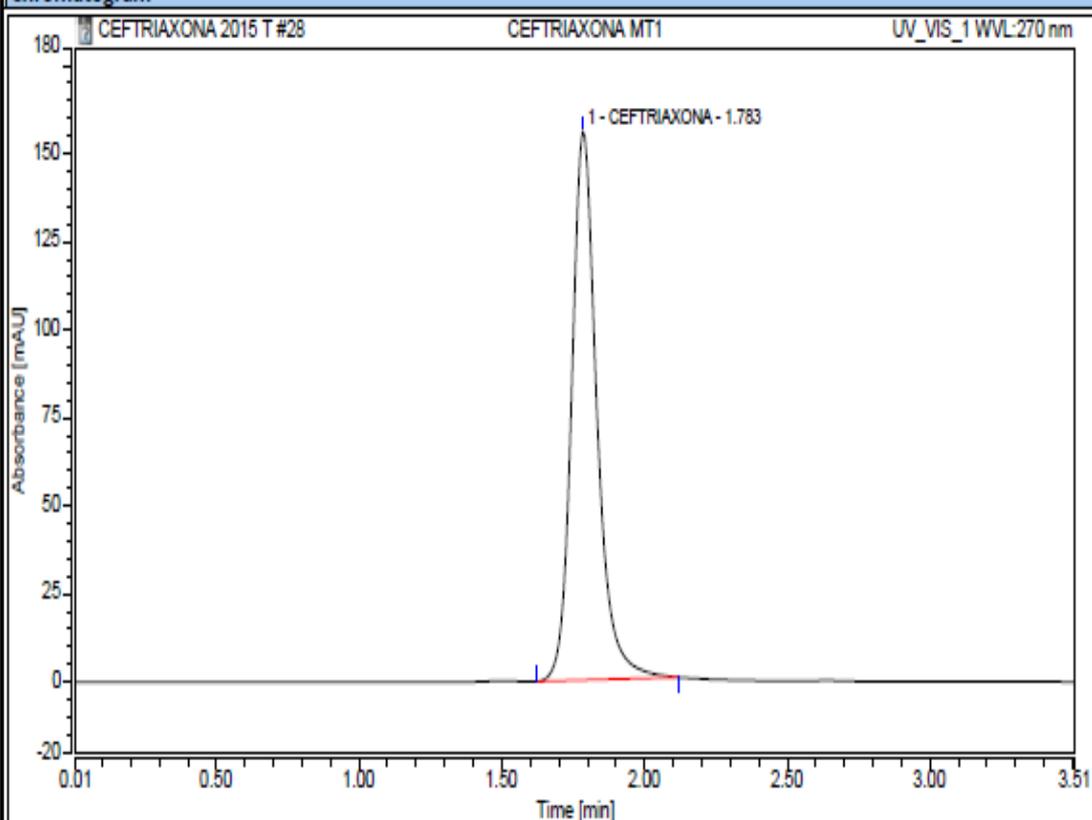


Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	CEFTRIAXONA MT1	Run Time (min):	3.50
Vial Number:	RA7	Injection Volume:	10.00
Injection Type:	Unknown	Channel:	UV_VIS_1
Calibration Level:		Wavelength:	270.0
Instrument Method:	CEFTRIAXONA 1G	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	CEFTRIAXONA	Dilution Factor:	1.0000
Injection Date/Time:	27/oct/15 13:21	Sample Weight:	1.0000

Chromatogram



Integration Results

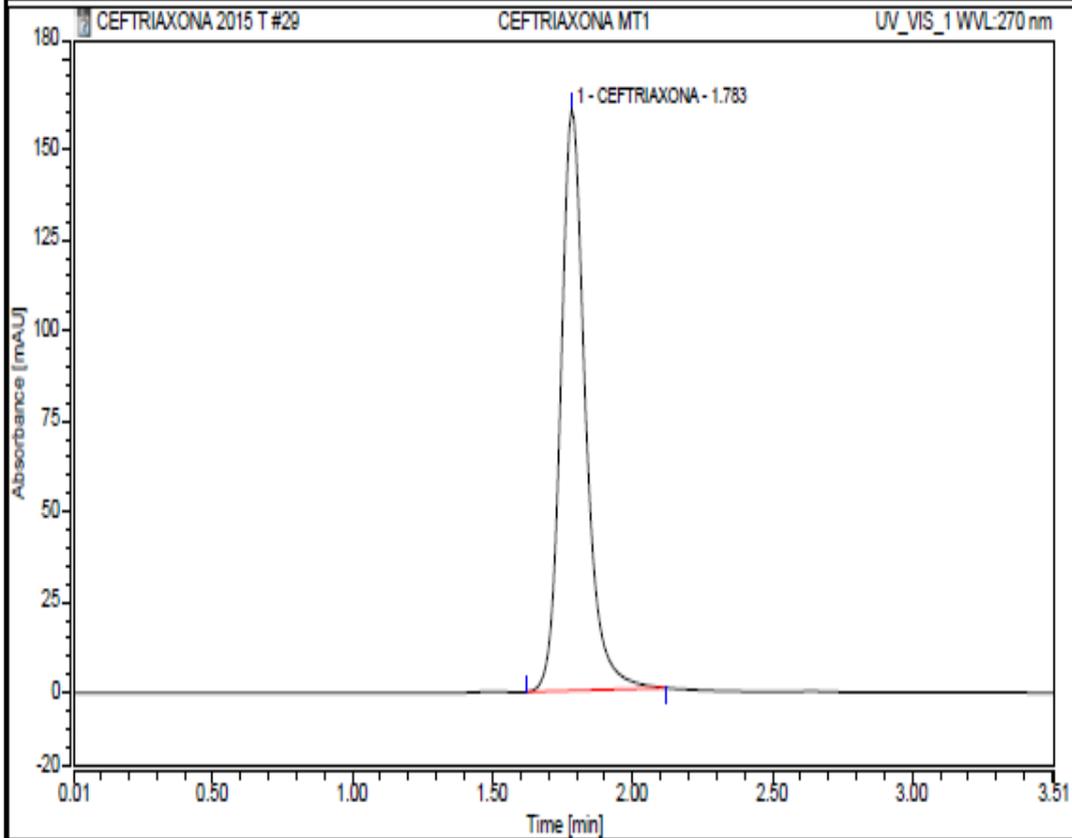
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	CEFTRIAXONA	1.783	15.887	155.766	100.00	100.00	n.a.
Total:			15.887	155.766	100.00	100.00	

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	CEFTRIAXONA MT1	Run Time (min):	3.50
Vial Number:	RA7	Injection Volume:	10.00
Injection Type:	Unknown	Channel:	UV_VIS_1
Calibration Level:		Wavelength:	270.0
Instrument Method:	CEFTRIAXONA 1G	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	CEFTRIAXONA	Dilution Factor:	1.0000
Injection Date/Time:	27/oct/15 13:25	Sample Weight:	1.0000

Chromatogram



Integration Results

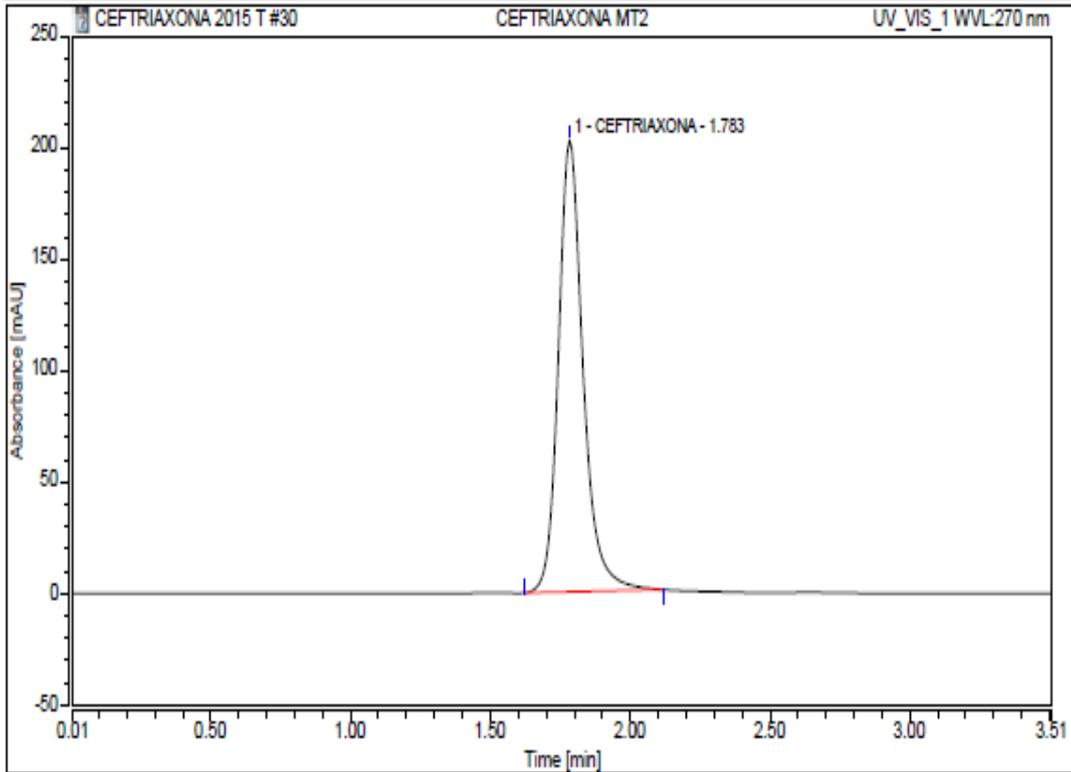
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	CEFTRIAXONA	1.783	16.348	160.419	100.00	100.00	n.a.
Total:			16.348	160.419	100.00	100.00	

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	CEFTRIAXONA MT2	Run Time (min):	3.50
Vial Number:	RA8	Injection Volume:	10.00
Injection Type:	Unknown	Channel:	UV_VIS_1
Calibration Level:		Wavelength:	270.0
Instrument Method:	CEFTRIAXONA 1G	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	CEFTRIAXONA	Dilution Factor:	1.0000
Injection Date/Time:	27/oct/15 13:29	Sample Weight:	1.0000

Chromatogram



Integration Results

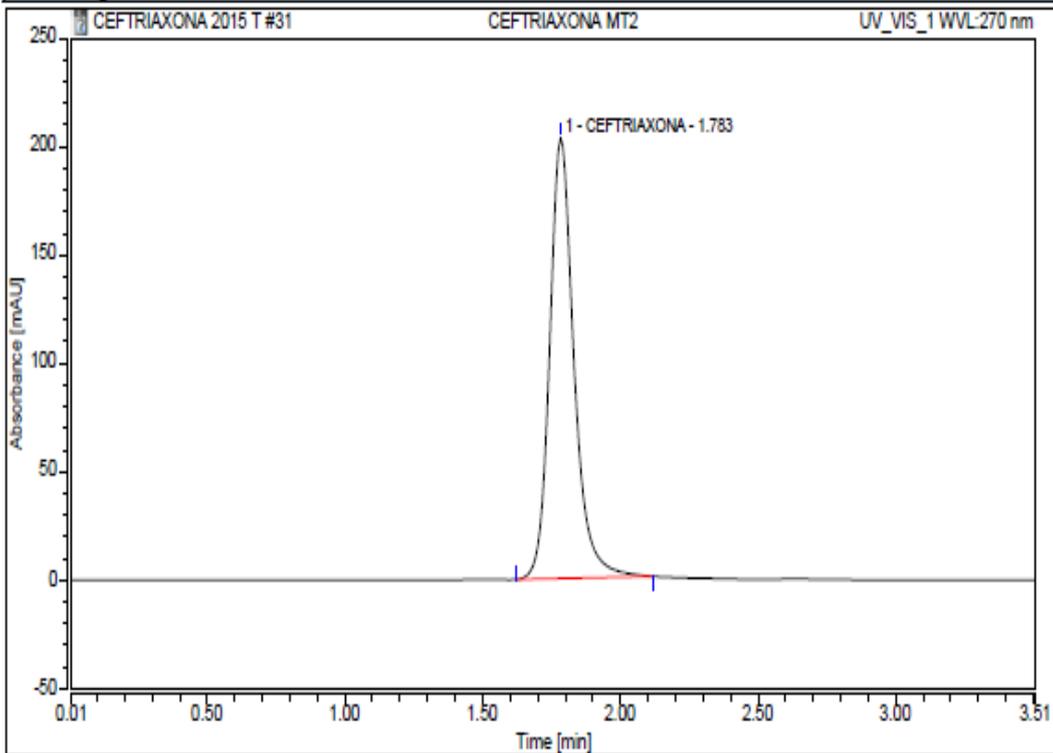
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	CEFTRIAXONA	1.783	20.636	202.624	100.00	100.00	n.a.
Total:			20.636	202.624	100.00	100.00	

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	CEFTRIAXONA MT2	Run Time (min):	3.50
Vial Number:	RA8	Injection Volume:	10.00
Injection Type:	Unknown	Channel:	UV_VIS_1
Calibration Level:		Wavelength:	270.0
Instrument Method:	CEFTRIAXONA 1G	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	CEFTRIAXONA	Dilution Factor:	1.0000
Injection Date/Time:	27/oct/15 13:33	Sample Weight:	1.0000

Chromatogram



Integration Results

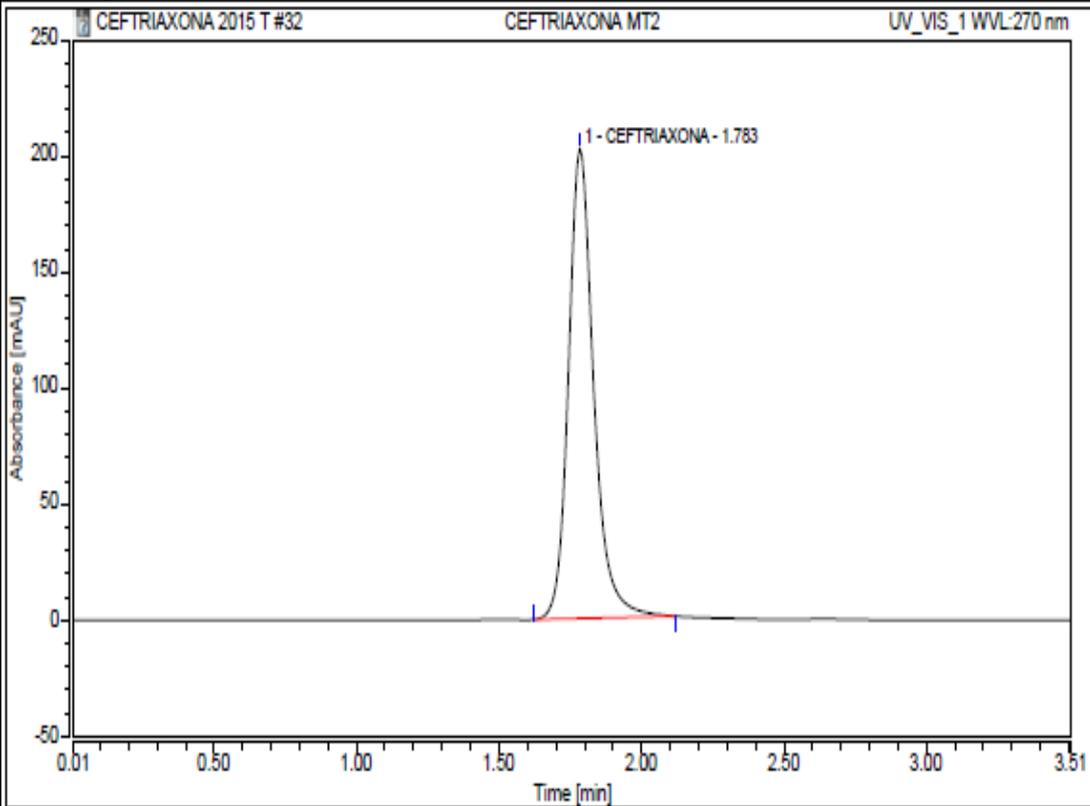
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	CEFTRIAXONA	1.783	20.701	203.427	100.00	100.00	n.a.
Total:			20.701	203.427	100.00	100.00	

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	CEFTRIAXONA MT2	Run Time (min):	3.50
Vial Number:	RA8	Injection Volume:	10.00
Injection Type:	Unknown	Channel:	UV_VIS_1
Calibration Level:		Wavelength:	270.0
Instrument Method:	CEFTRIAXONA 1G	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	CEFTRIAXONA	Dilution Factor:	1.0000
Injection Date/Time:	27/oct/15 13:37	Sample Weight:	1.0000

Chromatogram



Integration Results

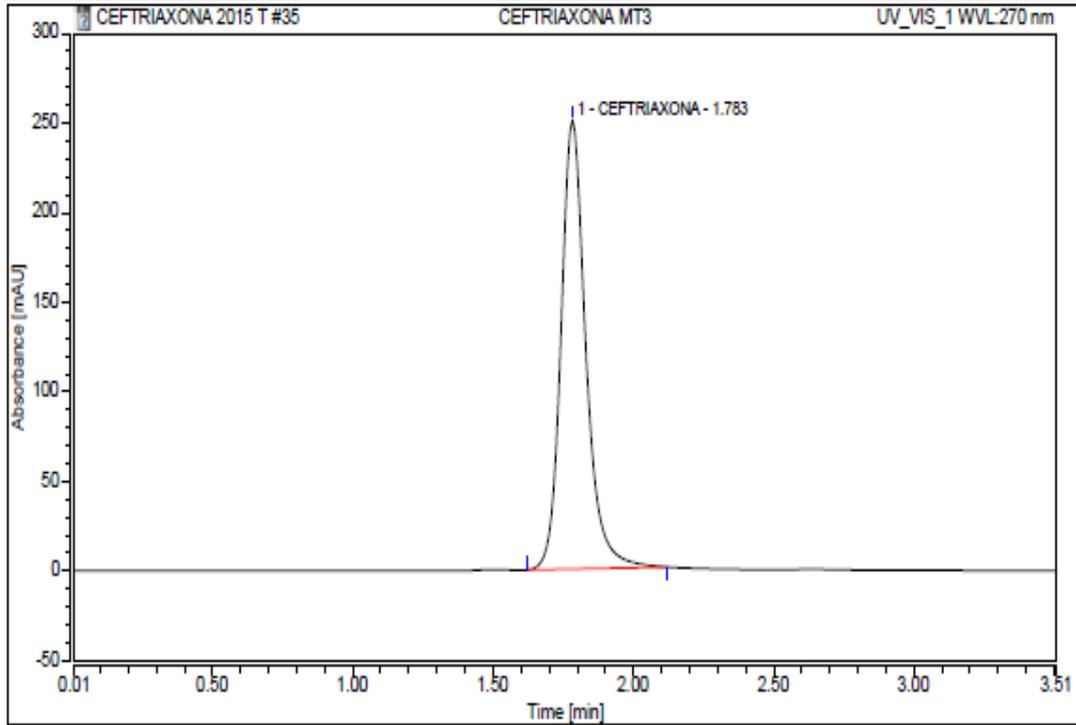
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	CEFTRIAXONA	1.783	20.664	202.613	100.00	100.00	n.a.
Total:			20.664	202.613	100.00	100.00	

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	CEFTRIAXONA MT3	Run Time (min):	3.50
Vial Number:	RB1	Injection Volume:	10.00
Injection Type:	Unknown	Channel:	UV_VIS_1
Calibration Level:		Wavelength:	270.0
Instrument Method:	CEFTRIAXONA 1G	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	CEFTRIAXONA	Dilution Factor:	1.0000
Injection Date/Time:	27/oct/15 13:50	Sample Weight:	1.0000

Chromatogram



Integration Results

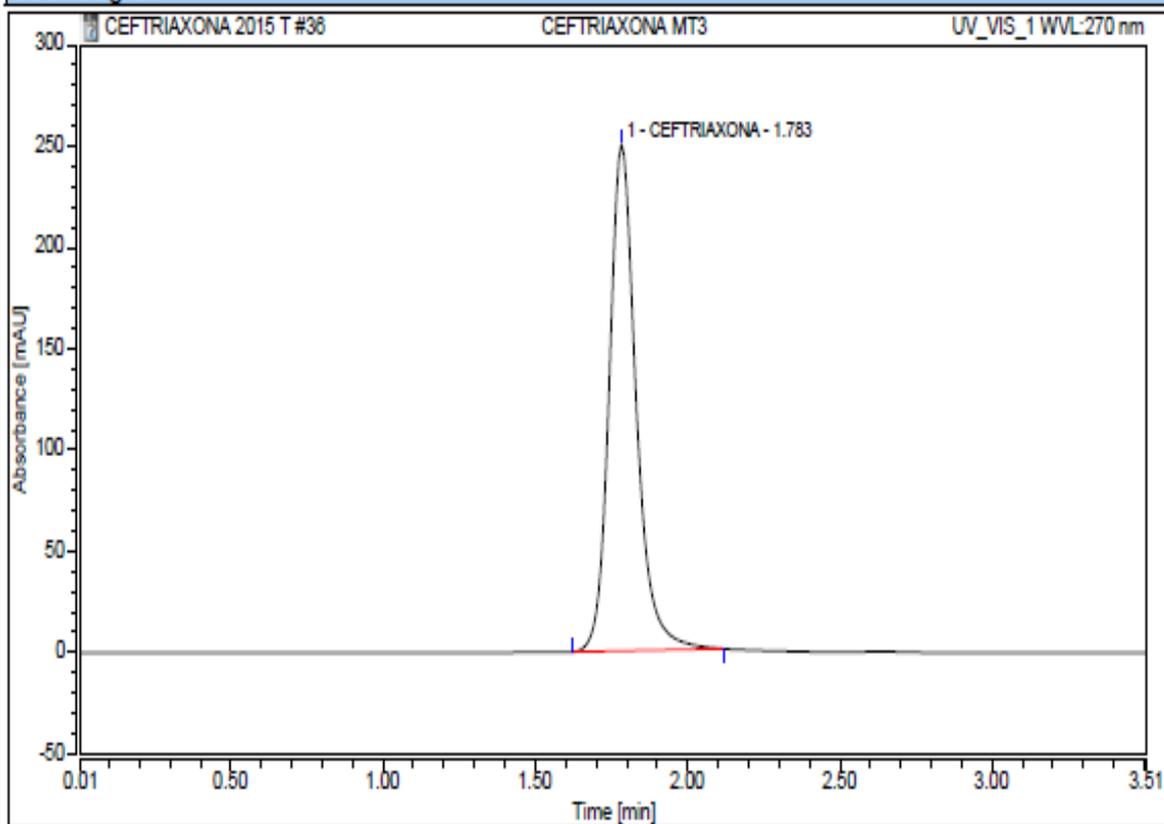
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	CEFTRIAXONA	1.783	25.518	250.695	100.00	100.00	n.a.
Total:			25.518	250.695	100.00	100.00	

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	CEFTRIAXONA MT3	Run Time (min):	3.50
Vial Number:	RB1	Injection Volume:	10.00
Injection Type:	Unknown	Channel:	UV_VIS_1
Calibration Level:		Wavelength:	270.0
Instrument Method:	CEFTRIAXONA 1G	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	CEFTRIAXONA	Dilution Factor:	1.0000
Injection Date/Time:	27/oct/15 13:54	Sample Weight:	1.0000

Chromatogram



Integration Results

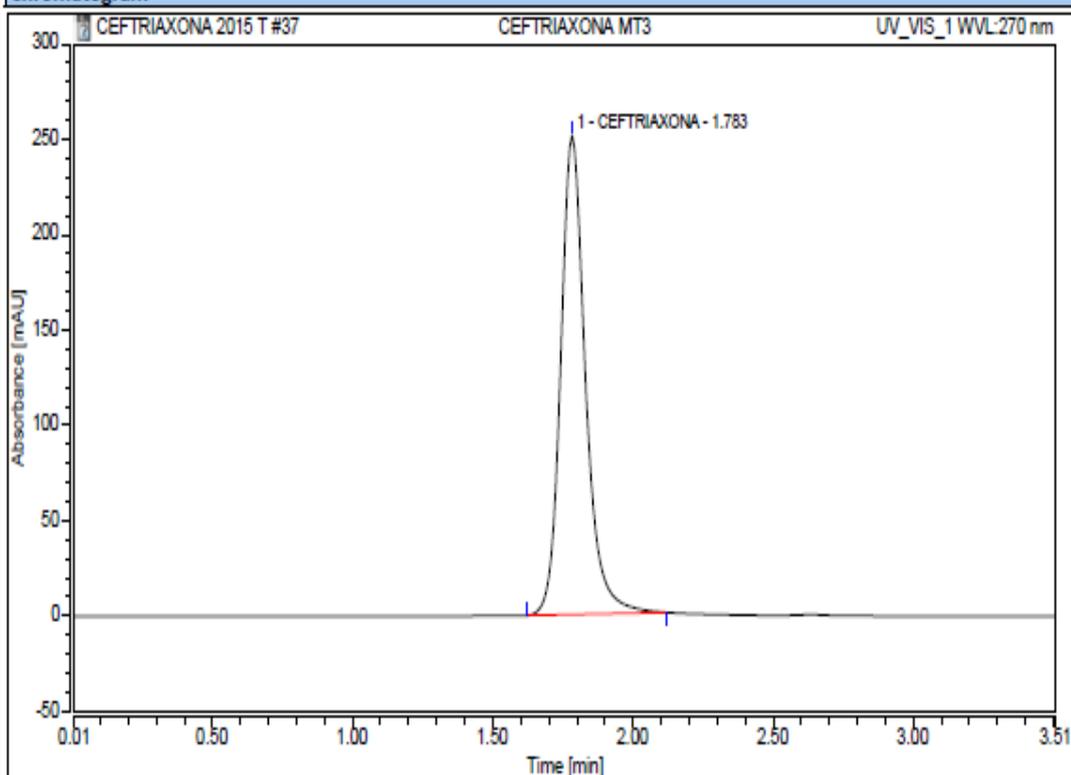
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	CEFTRIAXONA	1.783	25.534	250.440	100.00	100.00	n.a.
Total:			25.534	250.440	100.00	100.00	

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	CEFTRIAXONA MT3	Run Time (min):	3.50
Vial Number:	RB1	Injection Volume:	10.00
Injection Type:	Unknown	Channel:	UV_VIS_1
Calibration Level:		Wavelength:	270.0
Instrument Method:	CEFTRIAXONA 1G	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	CEFTRIAXONA	Dilution Factor:	1.0000
Injection Date/Time:	27/oct/15 13:58	Sample Weight:	1.0000

Chromatogram



Integration Results

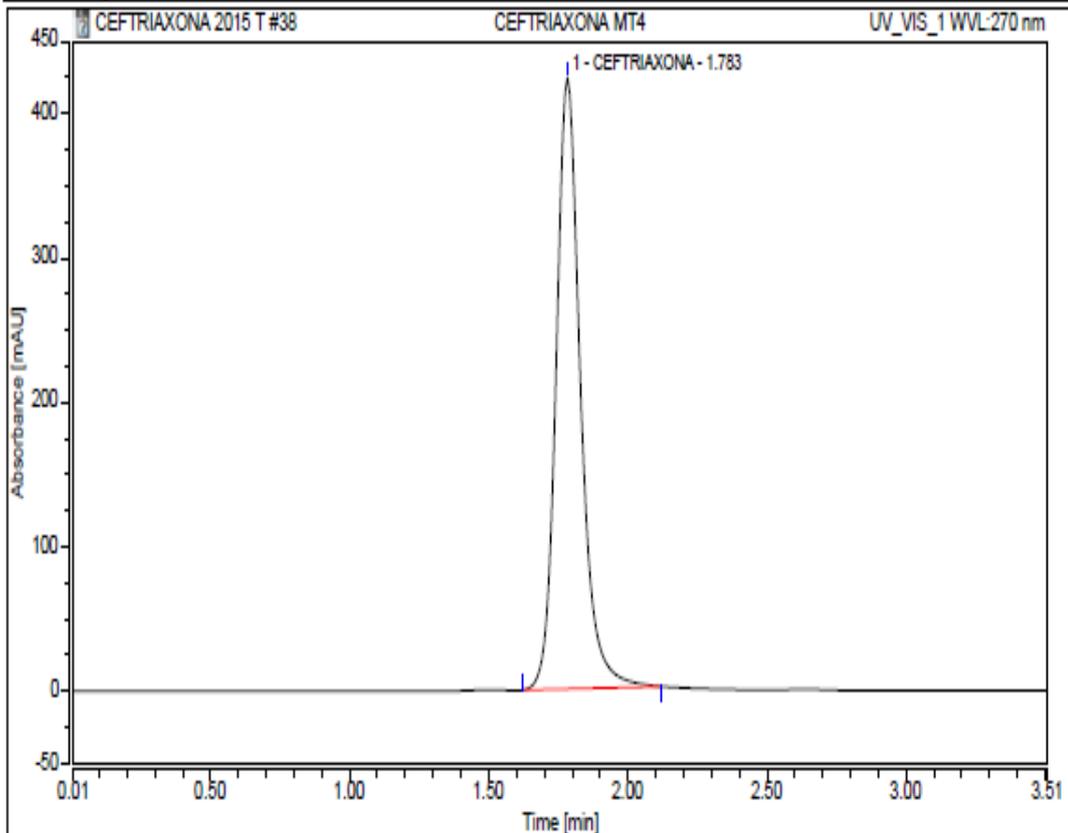
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	CEFTRIAXONA	1.783	25.606	251.405	100.00	100.00	n.a.
Total:			25.606	251.405	100.00	100.00	

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	CEFTRIAXONA MT4	Run Time (min):	3.50
Vial Number:	RB2	Injection Volume:	10.00
Injection Type:	Unknown	Channel:	UV_VIS_1
Calibration Level:		Wavelength:	270.0
Instrument Method:	CEFTRIAXONA 1G	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	CEFTRIAXONA	Dilution Factor:	1.0000
Injection Date/Time:	27/oct/15 14:02	Sample Weight:	1.0000

Chromatogram



Integration Results

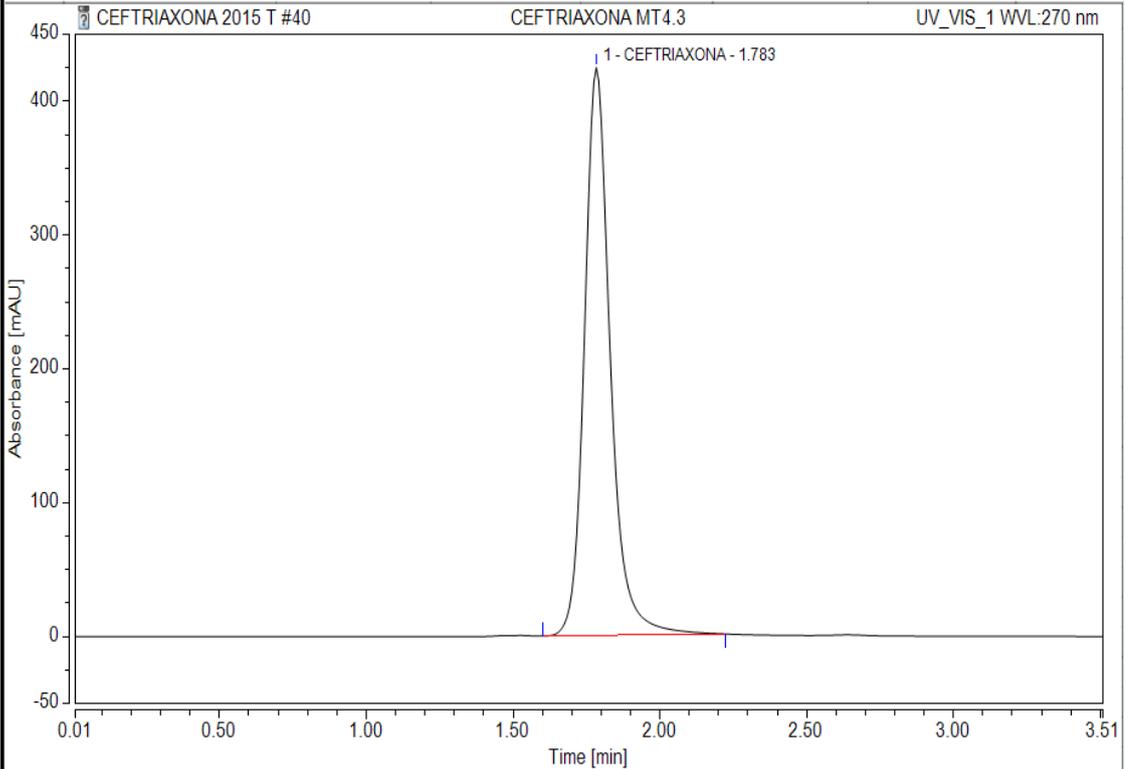
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	CEFTRIAXONA	1.783	42.809	423.478	100.00	100.00	n.a.
Total:			42.809	423.478	100.00	100.00	

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	CEFTRIAXONA MT4.3	Run Time (min):	3,50
Vial Number:	RB2	Injection Volume:	10,00
Injection Type:	Unknown	Channel:	UV_VIS_1
Calibration Level:		Wavelength:	270,0
Instrument Method:	CEFTRIAXONA 1G	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	CEFTRIAXONA	Dilution Factor:	1,0000
Injection Date/Time:	27/oct/15 14:10	Sample Weight:	1,0000

Chromatogram



Integration Results

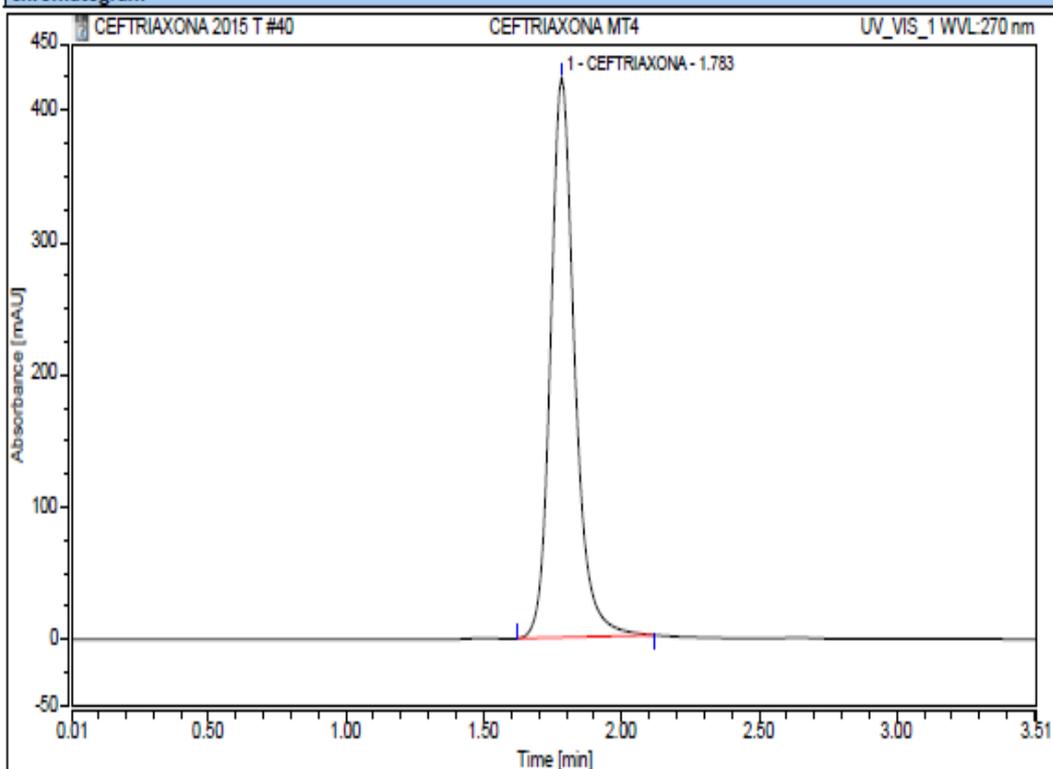
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	CEFTRIAXONA	1,783	42,829	424,546	100,00	100,00	n.a.
Total:			42,829	424,546	100,00	100,00	

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	CEFTRIAXONA MT4	Run Time (min):	3.50
Vial Number:	RB2	Injection Volume:	10.00
Injection Type:	Unknown	Channel:	UV_VIS_1
Calibration Level:		Wavelength:	270.0
Instrument Method:	CEFTRIAXONA 1G	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	CEFTRIAXONA	Dilution Factor:	1.0000
Injection Date/Time:	27/oct/15 14:10	Sample Weight:	1.0000

Chromatogram



Integration Results

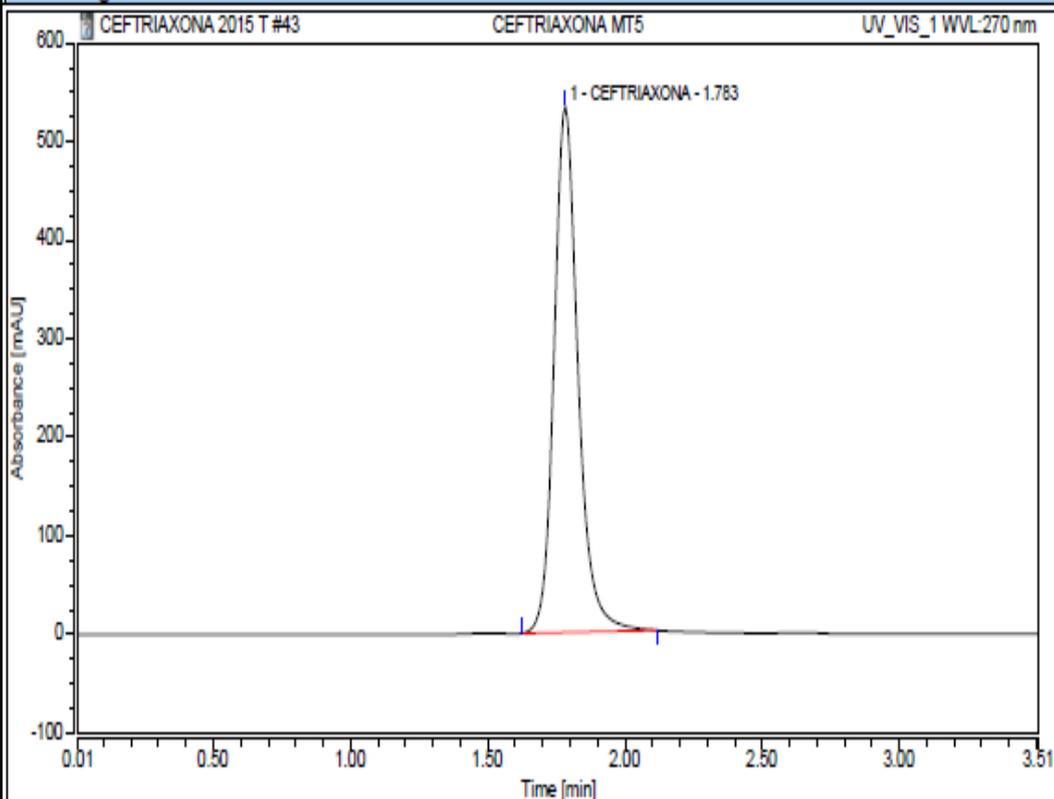
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	CEFTRIAXONA	1.783	42.857	423.860	100.00	100.00	n.a.
Total:			42.857	423.860	100.00	100.00	

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	CEFTRIAXONA MT5	Run Time (min):	3.50
Vial Number:	RB3	Injection Volume:	10.00
Injection Type:	Unknown	Channel:	UV_VIS_1
Calibration Level:		Wavelength:	270.0
Instrument Method:	CEFTRIAXONA 1G	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	CEFTRIAXONA	Dilution Factor:	1.0000
Injection Date/Time:	27/oct/15 14:23	Sample Weight:	1.0000

Chromatogram



Integration Results

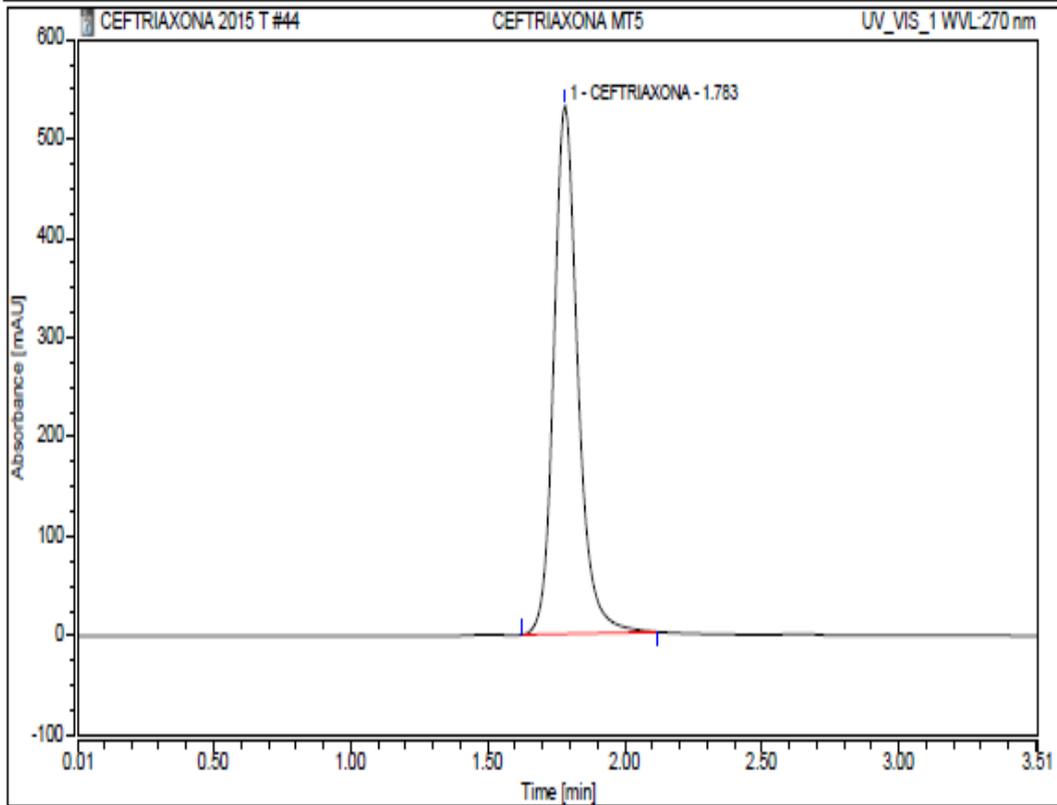
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	CEFTRIAXONA	1.783	53.891	534.140	100.00	100.00	n.a.
Total:			53.891	534.140	100.00	100.00	

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	CEFTRIAXONA MT5	Run Time (min):	3.50
Vial Number:	RB3	Injection Volume:	10.00
Injection Type:	Unknown	Channel:	UV_VIS_1
Calibration Level:		Wavelength:	270.0
Instrument Method:	CEFTRIAXONA 1G	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	CEFTRIAXONA	Dilution Factor:	1.0000
Injection Date/Time:	27/oct/15 14:27	Sample Weight:	1.0000

Chromatogram



Integration Results

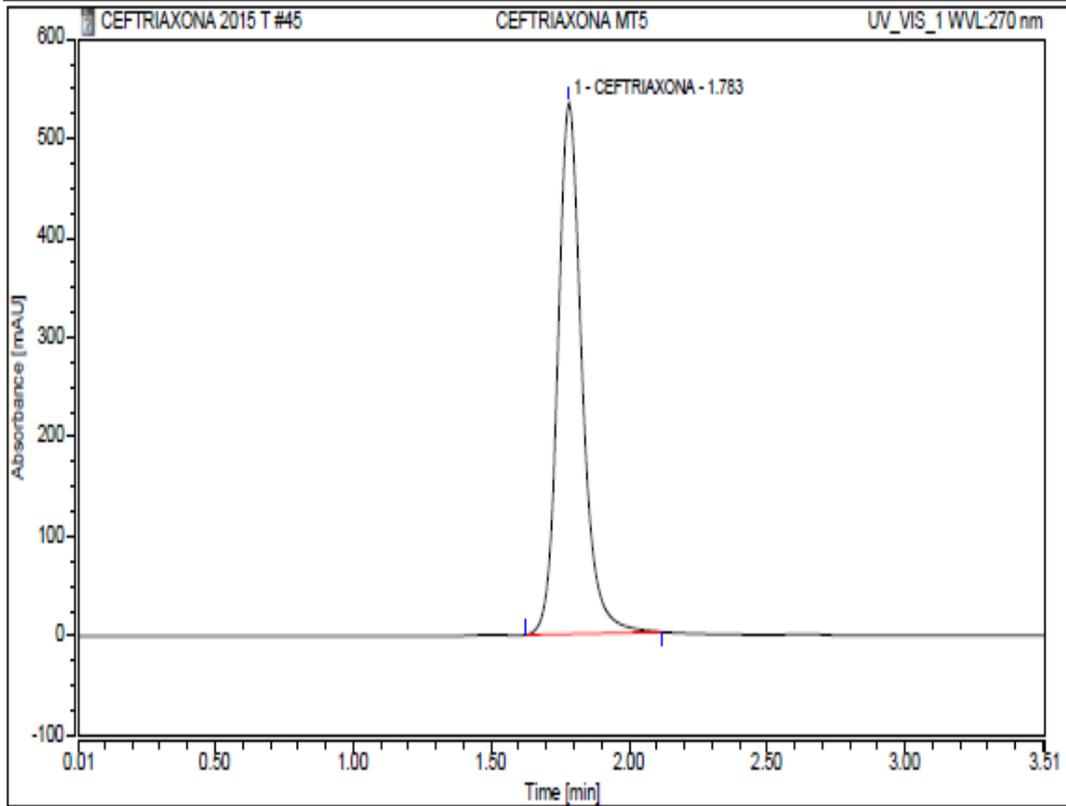
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	CEFTRIAXONA	1.783	53.846	532.453	100.00	100.00	n.a.
Total:			53.846	532.453	100.00	100.00	

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	CEFTRIAXONA MT5	Run Time (min):	3.50
Vial Number:	RB3	Injection Volume:	10.00
Injection Type:	Unknown	Channel:	UV_VIS_1
Calibration Level:		Wavelength:	270.0
Instrument Method:	CEFTRIAXONA 1G	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	CEFTRIAXONA	Dilution Factor:	1.0000
Injection Date/Time:	27/oct/15 14:31	Sample Weight:	1.0000

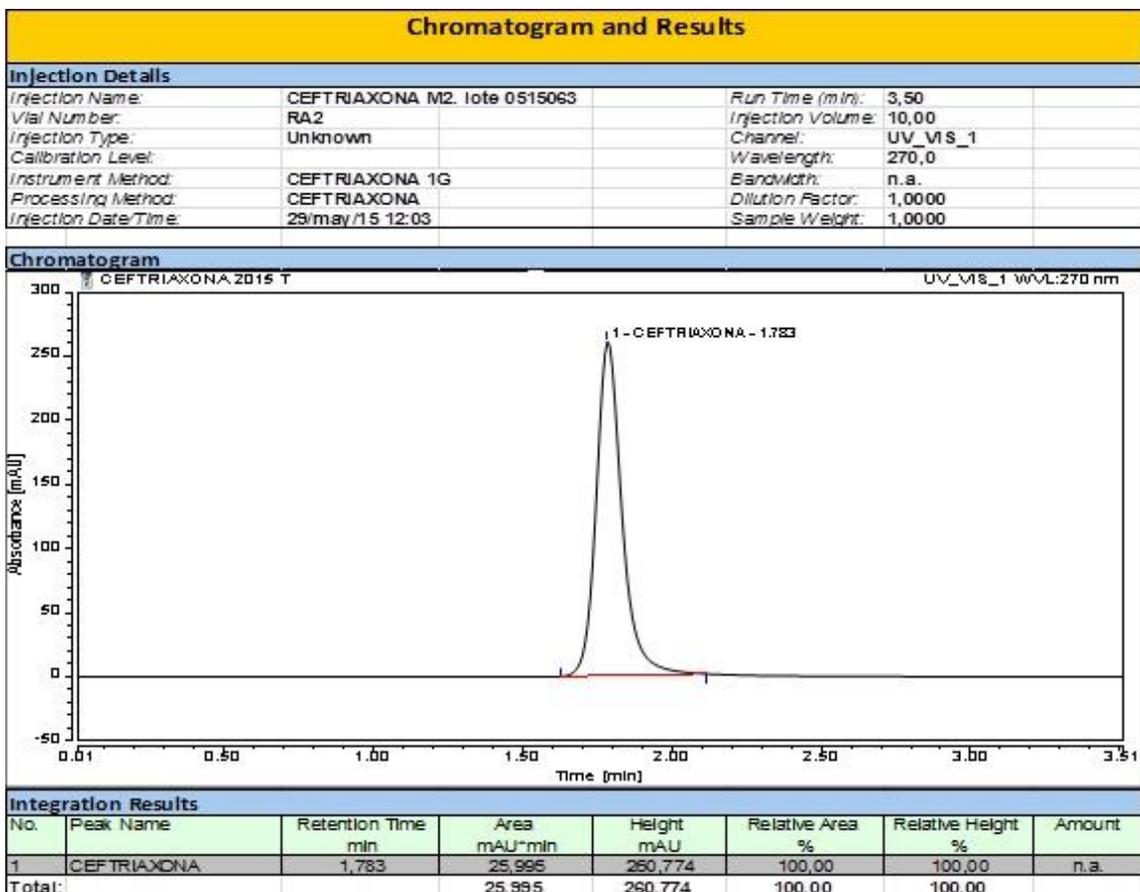
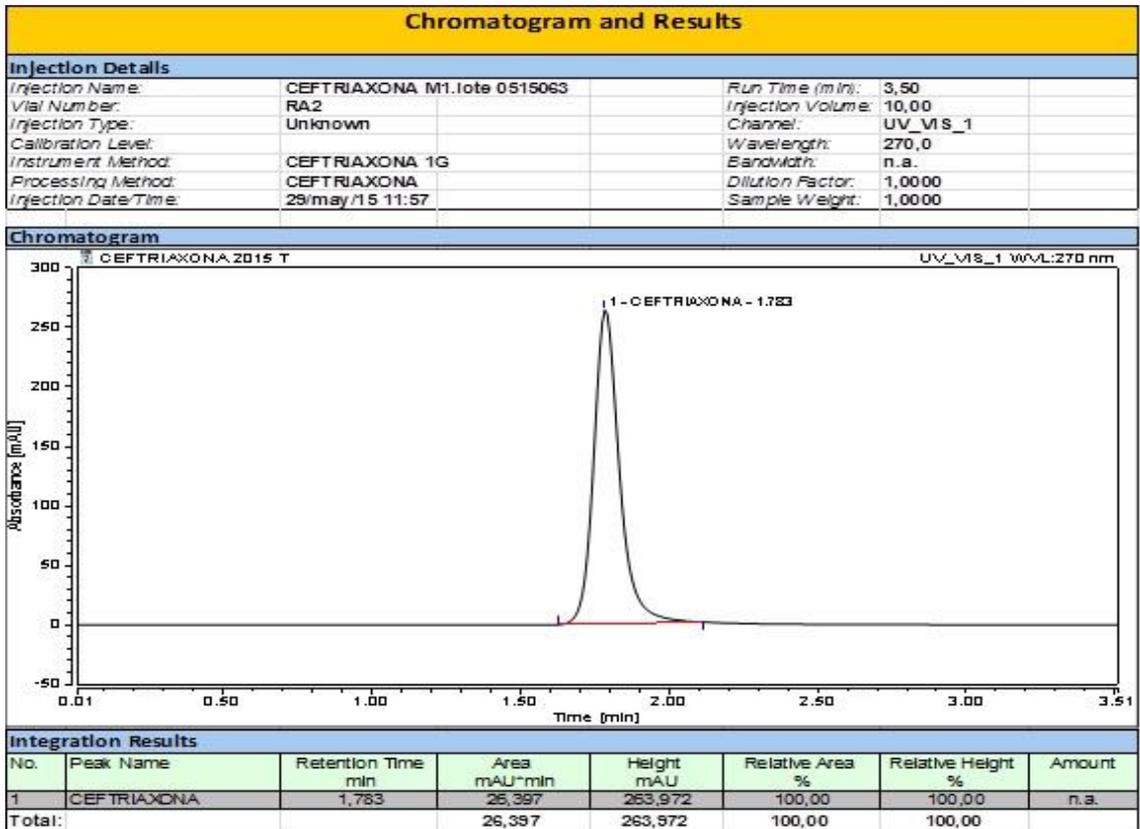
Chromatogram



Integration Results

No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	CEFTRIAXONA	1.783	54.044	535.294	100.00	100.00	n.a.
Total:			54.044	535.294	100.00	100.00	

Anexo B. Cromatogramas del estudio de Precisión, del factor Repetibilidad del lote 0515063 de ceftriaxona, desarrollado en el equipo ULTIMATE 3000

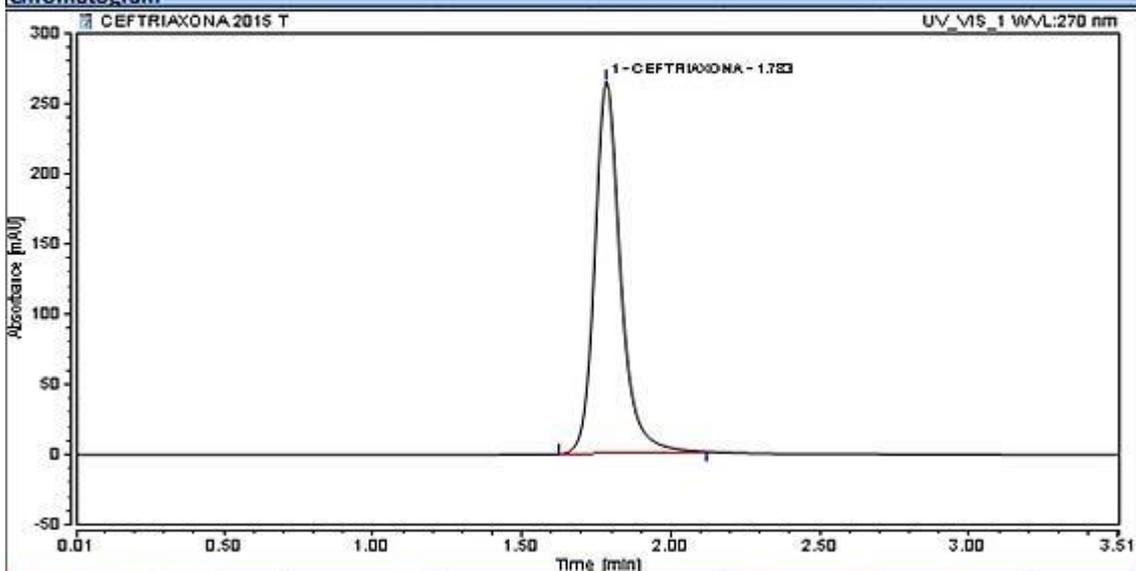


Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	CEFTRIAXONA M3. lote 0515063	Run Time (min):	3,50
Vial Number:	RA 2	Injection Volume:	10,00
Injection Type:	Unknown	Channel:	UV_VIS_1
Calibration Level:		Wavelength:	270,0
Instrument Method:	CEFTRIAXONA 1G	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	CEFTRIAXONA	Dilution Factor:	1,0000
Injection Date/Time:	29/may/15 12:08	Sample Weight:	1,0000

Chromatogram



Integration Results

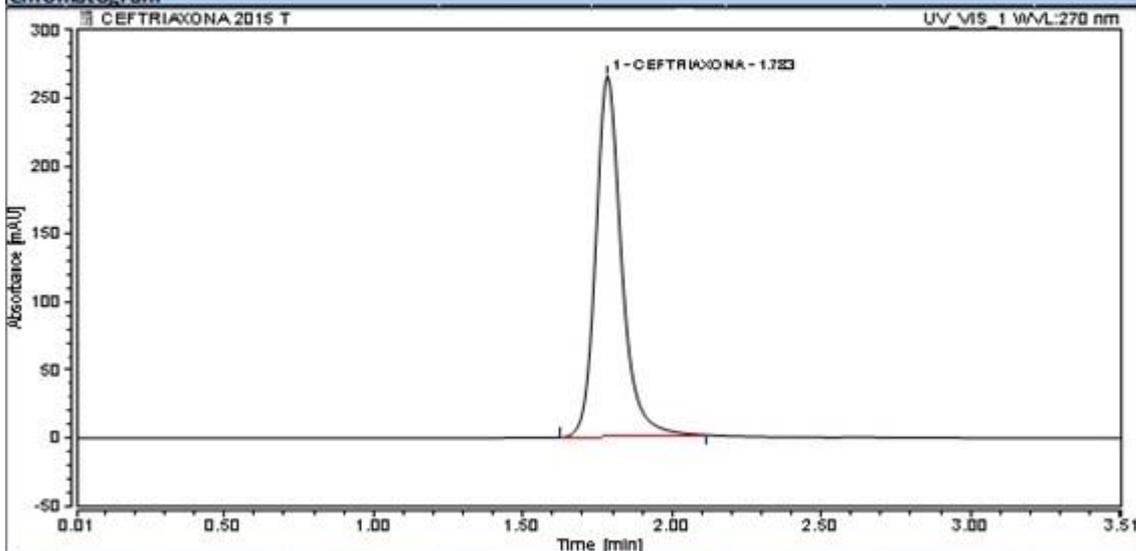
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	CEFTRIAXONA	1,783	26,590	265,145	100,00	100,00	n.a.
Total:			26,590	265,145	100,00	100,00	

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	CEFTRIAXONA M4. lote 0515063	Run Time (min):	3,50
Vial Number:	RA 2	Injection Volume:	10,00
Injection Type:	Unknown	Channel:	UV_VIS_1
Calibration Level:		Wavelength:	270,0
Instrument Method:	CEFTRIAXONA 1G	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	CEFTRIAXONA	Dilution Factor:	1,0000
Injection Date/Time:	29/may/15 12:13	Sample Weight:	1,0000

Chromatogram



Integration Results

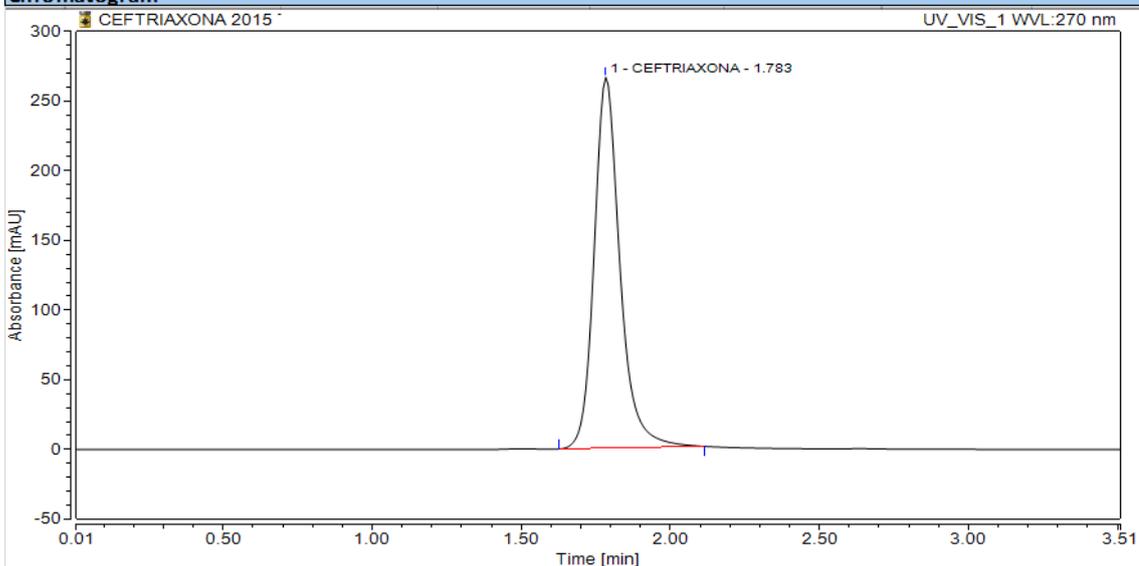
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	CEFTRIAXONA	1,783	26,627	265,876	100,00	100,00	n.a.
Total:			26,627	265,876	100,00	100,00	

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	CEFTRIAXONA M5. lote 0515063	Run Time (min):	3,50
Vial Number:	RA5	Injection Volume:	10,00
Injection Type:	Callbration Standard	Channel:	UV_VIS_1
Calibration Level:		Wavelength:	270,0
Instrument Method:	CEFTRIAXONA 1G	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	CEFTRIAXONA	Dilution Factor:	1,0000
Injection Date/Time:	29/may/15 12:18	Sample Weight:	1,0000

Chromatogram



Integration Results

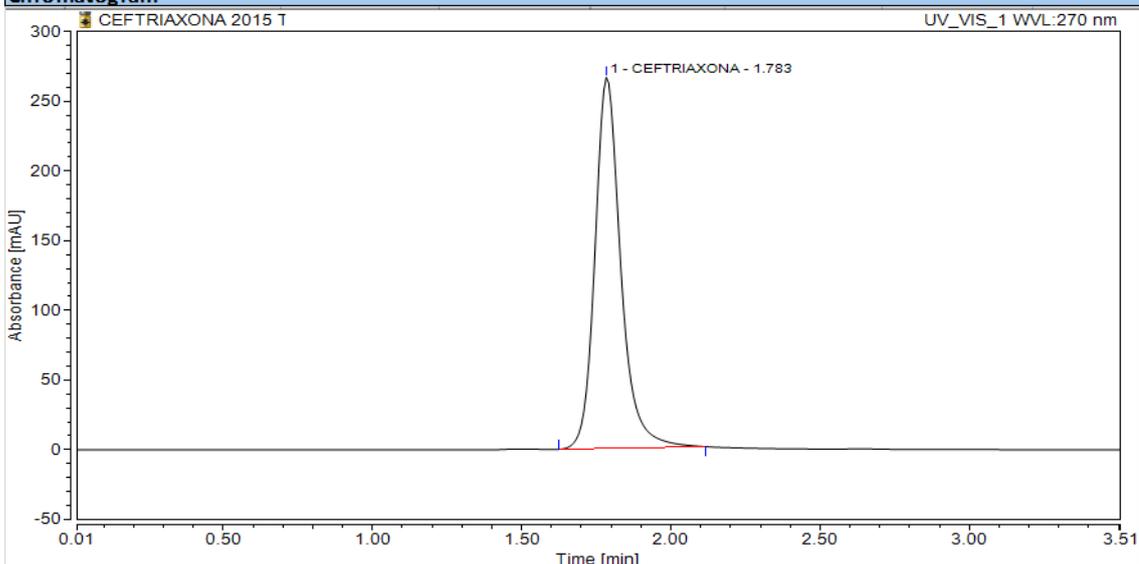
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	CEFTRIAXONA	1,783	26,693	266,332	100,00	100,00	n.a.
Total:			26,693	266,332	100,00	100,00	

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	CEFTRIAXONA M6. lote 0515063	Run Time (min):	3,50
Vial Number:	RA6	Injection Volume:	10,00
Injection Type:	Unknown	Channel:	UV_VIS_1
Calibration Level:		Wavelength:	270,0
Instrument Method:	CEFTRIAXONA 1G	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	CEFTRIAXONA	Dilution Factor:	1,0000
Injection Date/Time:	29/may/15 12:29	Sample Weight:	1,0000

Chromatogram



Integration Results

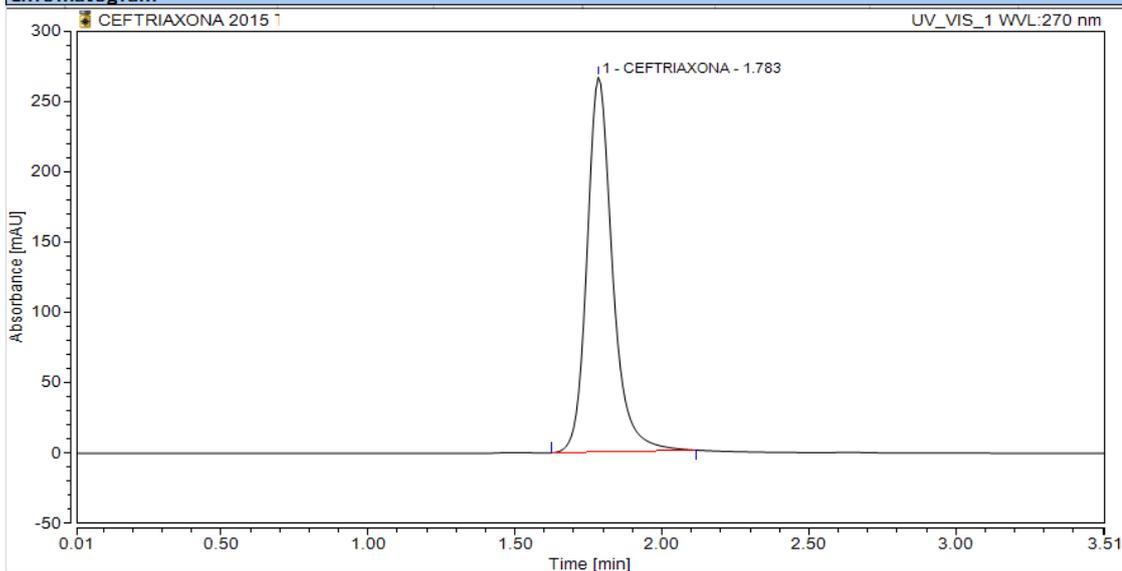
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	CEFTRIAXONA	1,783	26,762	266,430	100,00	100,00	n.a.
Total:			26,762	266,430	100,00	100,00	

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	CEF TRIAXONAM7. lote 0515063	Run Time (min):	3,50
Vial Number:	RA6	Injection Volume:	10,00
Injection Type:	Unknown	Channel:	UV_VIS_1
Calibration Level:		Wavelength:	270,0
Instrument Method:	CEF TRIAXONA 1G	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	CEF TRIAXONA	Dilution Factor:	1,0000
Injection Date/Time:	29/may/15 12:34	Sample Weight:	1,0000

Chromatogram



Integration Results

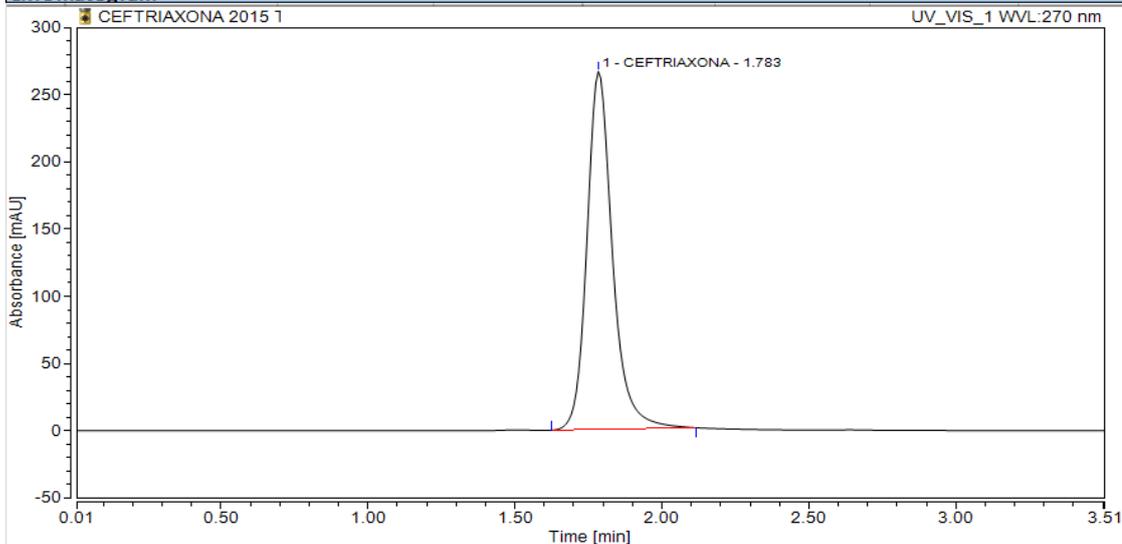
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	CEFTRIAXONA	1,783	26,791	266,573	100,00	100,00	n.a.
Total:			26,791	266,573	100,00	100,00	

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	CEF TRIAXONAM8.lote 0515063	Run Time (min):	3,50
Vial Number:	RA7	Injection Volume:	10,00
Injection Type:	Unknown	Channel:	UV_VIS_1
Calibration Level:		Wavelength:	270,0
Instrument Method:	CEF TRIAXONA 1G	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	CEF TRIAXONA	Dilution Factor:	1,0000
Injection Date/Time:	29/may/15 12:39	Sample Weight:	1,0000

Chromatogram



Integration Results

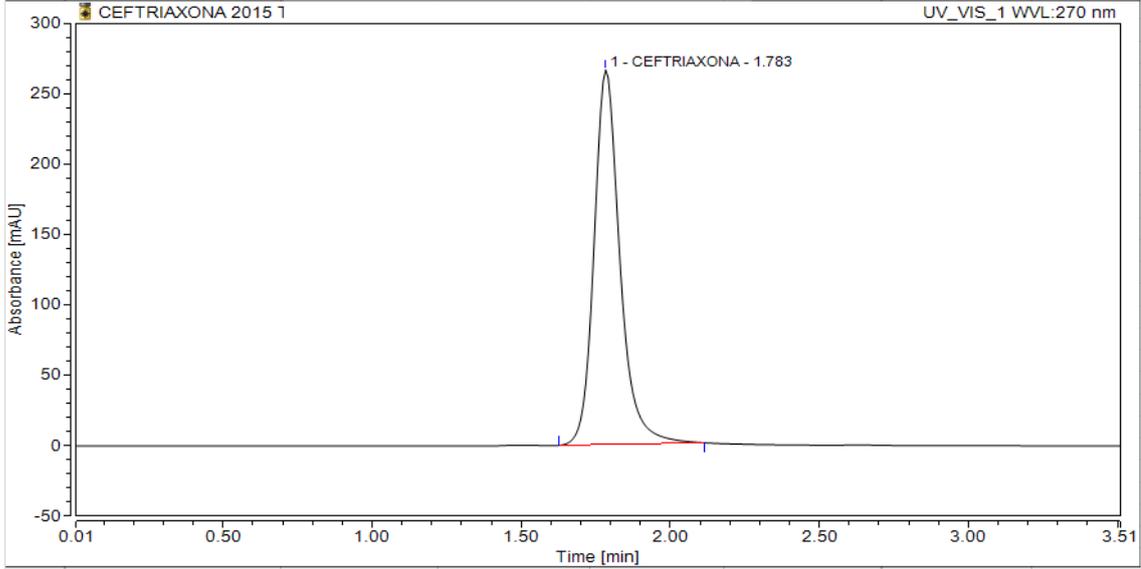
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	CEFTRIAXONA	1,783	26,819	266,557	100,00	100,00	n.a.
Total:			26,819	266,557	100,00	100,00	

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	CEF TRIAXONA M9. Iote 0515063	Run Time (min):	3,50
Vial Number:	RA7	Injection Volume:	10,00
Injection Type:	Unknown	Channel:	UV_VIS_1
Calibration Level:		Wavelength:	270,0
Instrument Method:	CEF TRIAXONA 1G	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	CEF TRIAXONA	Dilution Factor:	1,0000
Injection Date/Time:	29/may/15 12:44	Sample Weight:	1,0000

Chromatogram



Integration Results

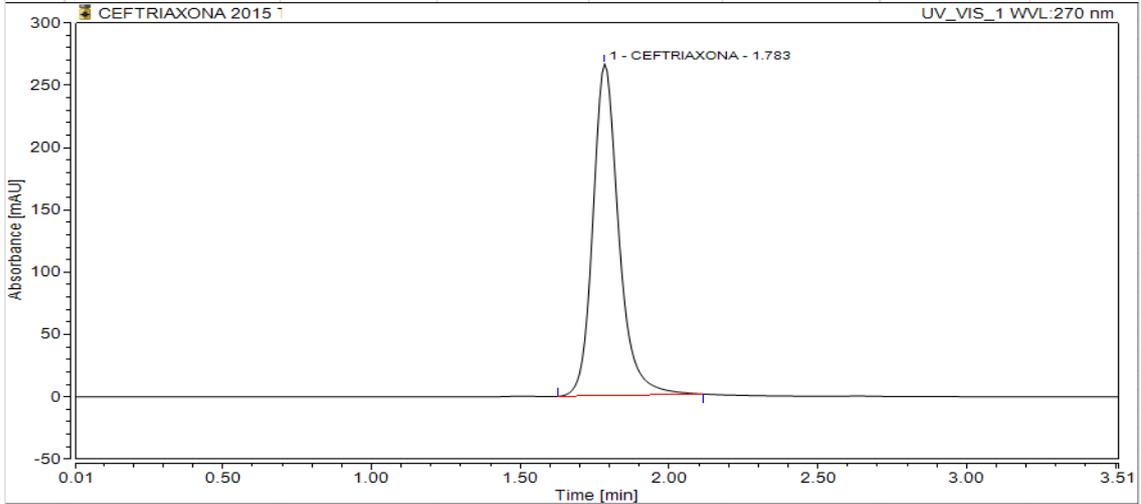
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	CEF TRIAXONA	1,783	26,796	266,275	100,00	100,00	n.a.
Total:			26,796	266,275	100,00	100,00	

Chromatogram and Results

Injection Details

Injection Name:	CEF TRIAXONA M10. Iote0515063	Run Time (min):	3,50
Vial Number:	RA8	Injection Volume:	10,00
Injection Type:	Unknown	Channel:	UV VIS 1
Calibration Level:		Wavelength:	270,0
Instrument Method:	CEF TRIAXONA 1G	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	CEF TRIAXONA	Dilution Factor:	1,0000
Injection Date/Time:	29/may/15 12:49	Sample Weight:	1,0000

Chromatogram



Integration Results

No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	CEF TRIAXONA	1,783	26,834	266,438	100,00	100,00	n.a.
Total:			26,834	266,438	100,00	100,00	

Anexo D. Certificado del producto ceftriaxona

CERTIFICATE OF ANALYSIS

PRODUCT NAME: Ceftriaxone Sodium Sterile USP 37

BATCH NO.: C2101407112

QUANTITY: 45 KG

PACKING: 5KG/Bottle, 10kg/carton

COUNTRY OF ORIGIN: CHINA

MFG. DATE: JUL.25.2014

EXPIRY DATE: JUN.2017

ITEM	SPECIFICATION	TESTING RESULT
Appearance	White to yellowish crystalline powder	White crystalline powder
Identification: IR:	Infrared spectra obtained from samples corresponds to that obtained from reference standards	Complies
Identification: HPLC:	the chromatogram of the assay preparation obtained as directed in the assay exhibits a major peak for ceftriaxone, the retention time of which corresponds to that exhibited in the chromatogram of the standard preparatio obtained as directed in the assay	Complies
Identification: Sodium	it responds to the tests for sodium	Complies
Crystallinity	Meets the requirements	Meets the requirements
pH	6.8-8.0	7.0
Water	8.0%~11.0%	9.4%
Particulate matter	≤3000 particles (≥10 μm)	Particles : 134
	≤300 particles (≥25 μm)	Particles : 2
Assay (anhydrous basis, content of	≥795 μg/mg	910 μg/mg
Related substance :Any impurity	≤1.0%	0.09%
Related substance : total impurities	≤4.0%	0.17%
Residual solvents : methanol	≤0.3%	0.00%
Residual solvents : ethanol	≤0.5%	0.00%
Residual solvents : acetone	≤0.5%	0.18%
Residual solvents : acetonitrile	≤0.041%	N.D
Residual solvents : dichloromethane	≤0.06%	N.D
Bacterial endotoxins:	≤0.20 EU/mg	<0.20 EU/mg
sterility	Meets the requirements	Meets the requirements

ABOVE DATA IS BASED ON THE CERTIFICATE OF ANALYSIS PROVIDED BY THE SUPPLIER / MANUFACTURER OF THIS RAW MATERIAL

CONCLUSION: COMPLY WITH REQUIRED STANDARDS

THE INFORMATION CONTAINED HEREIN IS, TO THE BEST OF OUR KNOWLEDGE, CORRECT. THE DATA OBTAINED AND THE STATEMENTS MADE ARE INTENDED ONLY AS A SOURCE OF INFORMATION. NO WARRANTIES, EXPRESSED OR IMPLIED, ARE MADE ON THE BASIS OF THIS INFORMATION. IT IS SUGGESTED THAT YOU EVALUATE THE PRODUCT ON A LABORATORY SCALE PRIOR TO USE IN A FINISHED PRODUCT. THE INFORMATION CONTAINED HEREIN SHOULD NOT BE CONSTRUED AS PERMISSION FOR VIOLATION OF PATENT RIGHTS.

PREPARED BY: CHEN XIAOYING

APPROVED BY: FANG LI

ZHECHEM

E-mail:cbjzju@zhechem.com

Product name	Ceftriaxone sodium sterile	Batch no	QS1411143 ✓
Mfg date:	NOV,28 th ,2014	Exp date:	NOV,27 th ,2017
Quantity	170.00KGS		

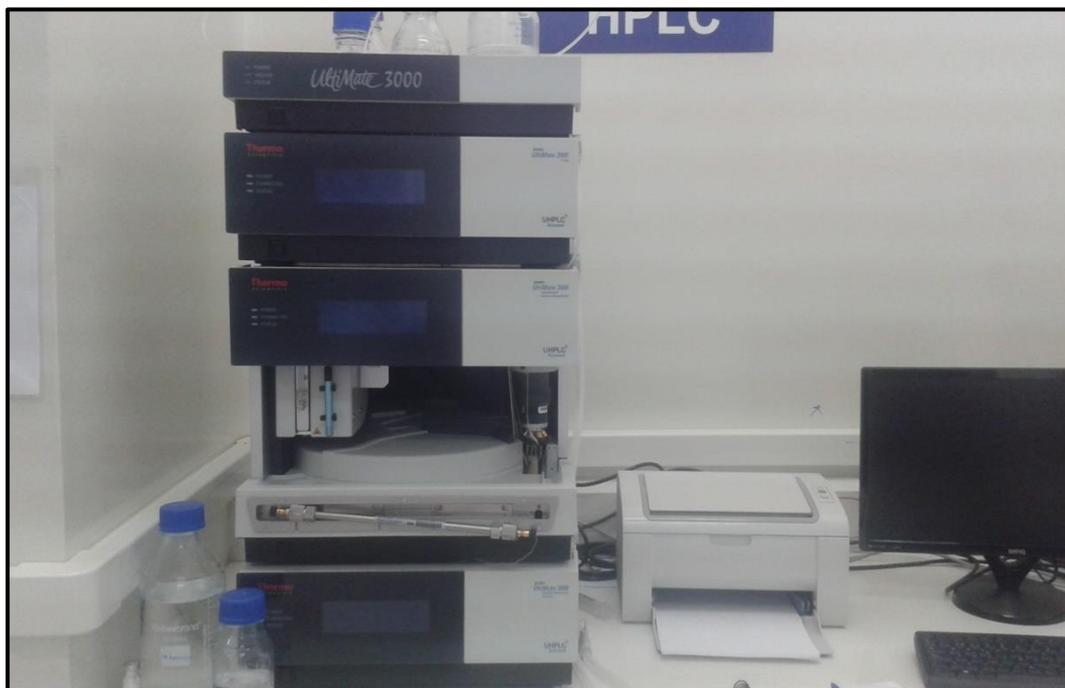
Items	Specification	Results
Characters	Almost white or yellowish,crystalline powder	Complies
Identification	1.IR 2.chemical reaction 3.HPLC	Complies
Specific rotation(50mg/ml in water)	-153° ~-170°	Complies
Assay	NLT 860µg/mg (C ₁₈ H ₁₈ N ₈ O ₇ S ₃ ,calculated on the anhydrous basis)	932.0 µg/mg
PH (250ml/ml in water)	6.0-8.0	6.8
Related compounds	Should be complies	Complies
Residual solvent	Should be complies	Complies
Water	8.0%-11.0%	9.5%
Stability	Should be complies	Complies
Bacterial endotoxins	Should be complies	Complies
Conclusion:	This product meets the requirements of USP35	
Storage:	Store in a sterile,airtight,tamper-proof container at a temperature not exceeding 25°C	

WORLDWIDE GENERAL IMPORT AND EXPORT CORPORATION

Anexo E. Evidencia fotográfica de la validación del método analítico para la cuantificación de ceftriaxona polvo para inyección 1g, desarrollado en el laboratorio de Control de Calidad, empresa Betapharma S.A, Quito. 2015



Fotografía 1. Equipo Merck Hitachi D-6000



Fotografía 2. Equipo Ulti mate 3000 (UPLC)



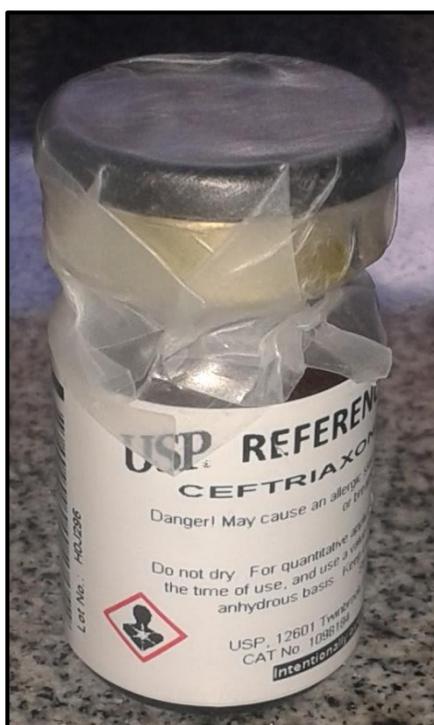
Fotografía 3. Preparación de las diluciones de la muestra de ceftriaxona



Fotografía 4. Calibración del pH de la fase móvil



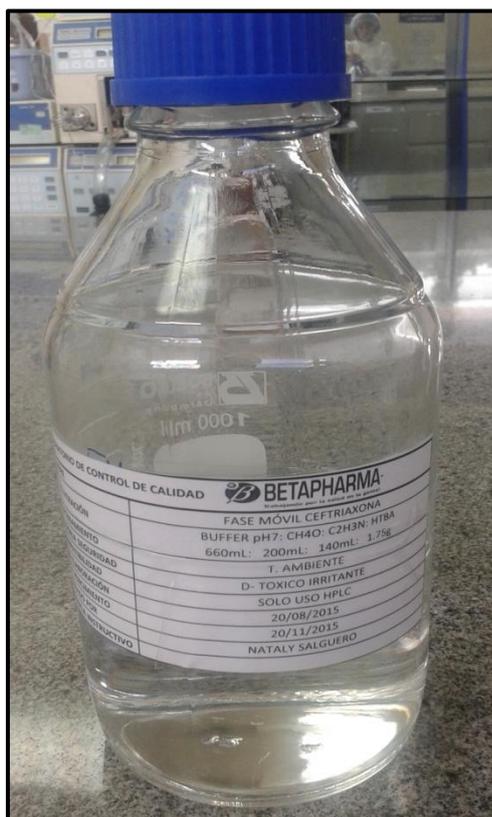
Fotografía 5. Filtración de la fase móvil por el analista



Fotografía 6. Estándar USP ceftriaxona sódica



Fotografía 7. Columnas cromatográficas Merck



Fotografía 8. Fase móvil optimizada y validada para la cuantificación de ceftriaxona polvo para solución inyectable 1g.