



**UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO**

**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**MAESTRÍA EN QUÍMICA APLICADA**

**TEMA:**

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS ANÁLITICOS DE HPLC Y  
ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE PARA EL ENSAYO DE AMOXICILINA  
MÁS ÁCIDO CLAVULÁNICO APLICADO EN EL LABORATORIO DE CONTROL  
FARMACEÚTICO ROCNARF.

**AUTOR**

Q.F. JENNY ALEXANDRA CORTEZ HERREA

**DIRECTOR TMF:**

MSc. MÓNICA VILLAMAR AVEIGA

**MILAGRO, 22 DE JUNIO DEL 2022**

**ECUADOR**

## ACEPTACIÓN DE TUTORÍA

Por la presente hago constar que he analizado el proyecto de grado presentado por la Srta. CORTEZ HERRERA JENNY ALEXANDRA, para optar al título de Magíster en Química Aplicada y que acepto tutorar a la estudiante, durante la etapa del desarrollo del trabajo hasta su presentación, evaluación y sustentación.

Milagro, a los 22 días del mes de junio del 2022.



Firmado electrónicamente por:  
MONICA DEL  
ROCIO VILLAMAR  
AVEIGA

---

MÓNICA DEL ROCÍO VILLAMAR AVEIGA

C.I.: 0918306507

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

El autor de esta investigación declara ante el Comité Académico del Programa de Maestría en Química Aplicada de la Universidad Estatal de Milagro, que el trabajo presentado es de mi propia autoría, no contiene material escrito por otra persona, salvo el que está referenciado debidamente en el texto; parte del presente documento o en su totalidad no ha sido aceptado para el otorgamiento de cualquier otro Título de una institución nacional o extranjera.

Milagro, a los 22 días del mes de Junio de 2022.

---

Jenny Alexandra Cortéz Herrera

120715303-0

**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
**CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA**

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN QUÍMICA APLICADA**, otorga al presente proyecto de investigación en las siguientes calificaciones:

TRABAJO DE TITULACION	58.33
DEFENSA ORAL	40.00
PROMEDIO	<b>98.33</b>
EQUIVALENTE	<b>Excelente</b>



**JUAN DIEGO  
VALENZUELA  
COBOS**

**Phd. VALENZUELA COBOS JUAN DIEGO  
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL**



**MONICA DEL  
ROCIO VILLAMAR  
AVEIGA**

**Msc VILLAMAR AVEIGA MONICA DEL ROCIO  
DIRECTOR/A DE TFM**



**MANUEL ALEJANDRO  
FIALLOS CARDENAS**

**Mgtr. FIALLOS CARDENAS MANUEL ALEJANDRO  
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo con todo amor y cariño:

A DIOS que con su infinito amor y la sabiduría proveyó las fuerzas para esforzarme en todo momento y permitirme poder concluir mis estudios.

A mis padres Jenny Herrera y Eduardo Cortéz; hermanos Israel Cortéz y Reyna Cortéz, quienes con su amor incondicional siempre estuvieron presentes brindándome una palabra de aliento, de esperanza, enseñándome con su ejemplo el valor del esfuerzo y trabajo duro, lo que sin duda alguna da como resultado el fruto de la victoria y la gratificación de haber vencido sin importar que tan fuertes fueran las adversidades.

A los profesores de la maestría, que, gracias a sus conocimientos y disposición de impartir su enseñanza, lograron inculcar las bases necesarias para la culminación del presente trabajo, en especial mi tutora MSc. Mónica Villamar por dedicarme su generosa atención y el tiempo en la minuciosa labor de revisión y corrección de este trabajo.

A todas aquellas personas que me apoyaron, y que algunas ya no están presentes; siempre ofreciendo su apoyo de una forma directa e indirecta, dedicaron su amor, su tiempo, ánimo y conocimientos para que hoy dé por concluido una de las mayores metas que he tenido en la vida y por ello les dedico este trabajo con todo el afecto y cariño que siento en mi corazón.

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar, a DIOS por concederme la vida con todos sus dones y bendiciones para poder cumplir con cada objetivo en el diario vivir.

A mis padres, quienes con sus esfuerzos me alentaban y apoyaban incondicionalmente para hacer realidades mis sueños de llegar a ser una máster.

Agradezco muy especialmente a mi tutora MSc. Mónica Villamar por sus valiosas orientaciones técnicas y el apoyo en la elaboración de la presente investigación.

Al Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos ROCNARF; principalmente al PhD. Galo Estupiñán, Director Técnico, Q.F. Lilia Muñoz, Jefe de Control de Calidad, por sus invaluable colaboraciones y apoyo en la realización de este estudio.

Finalmente, a los Docentes del Posgrado en Química Aplicada, de la Universidad de Milagro que impartieron sus conocimientos en esta maestría, brindando las bases para desarrollar mis capacidades y habilidades como profesional en la rama de Química.

A todas las personas que me brindaros su apoyo y que participaron en la realización del presente trabajo.

## **CESIÓN DE DERECHOS DEL AUTOR A LA UNEMI**

Ingeniero.

Fabricio Guevara Viejó, PhD.

**RECTOR**

**Universidad Estatal de Milagro**

**Presente.**

Mediante el presente documento, libre y voluntariamente procedo a hacer entrega de la Cesión de Derecho del Autor del Trabajo realizado como requisito previo para la obtención de mi Título de Cuarto Nivel, en la Maestría de Química Aplicada cuyo tema fue el “ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS DE HPLC Y ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE PARA EL ENSAYO DE AMOXICILINA MÁS ÁCIDO CLAVULÁNICO APLICADO EN EL LABORATORIO DE CONTROL FARMACEÚTICO ROCNARF y que corresponde a al Departamento de Investigación y Postgrado.

Milagro, 22 de Junio del 2022.

Jenny Alexandra Cortez Herrera

CI: 1207153030

## ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS .....	xii
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	4
1. EL PROBLEMA .....	4
<b>1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	4
1.1.1 Problematización.....	4
1.1.2 Delimitación del problema.....	5
1.1.3 Formulación del problema .....	5
1.2 OBJETIVOS .....	6
1.2.1 Objetivo General .....	6
1.2.2 Objetivos Específicos.....	6
1.3 JUSTIFICACIÓN .....	6
CAPÍTULO II.....	7
2. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1 ANTECEDENTES .....	7
2.1.1 Antecedentes Históricos.....	7
2.1.2 Antecedentes Referenciales.....	9
2.2 MARCO CONCEPTUAL .....	10
2.2.1 Métodos Analíticos .....	10
2.2.2 Clasificación de Métodos Analíticos.....	10
2.2.3 Métodos Instrumentales .....	11
2.2.3.1 Parámetros de Utilidad de un método instrumental .....	12
2.2.4 Tipos de Métodos Instrumentales .....	13
2.2.4.1 Métodos Electroanalíticos .....	13
2.2.4.2 Métodos de Análisis Ópticos .....	13
2.2.4.3 Métodos Espectroscópicos .....	13
2.2.4.4 Métodos Cromatográficos .....	15
2.2.4.4.1 Cromatografía de Gases (CG).....	15
2.2.4.4.2 Cromatografía Líquida (HPLC) .....	16
2.2.4.4.2 Componentes del Cromatógrafo Líquido de Alto Rendimiento .....	17
2.2.4.4.3 Método .....	18

2.2.5 Fármacos: Concepto .....	22
2.2.5.1 Antibióticos .....	22
2.2.5.2 Clasificación de los Antibióticos.....	22
CAPÍTULO III .....	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1 MATERIALES .....	26
3.1.1 Insumos .....	26
3.1.2 Reactivos .....	26
3.1.2 Equipos.....	27
3.1.3 Material de Estudio .....	27
3.2 METODOLOGÍA .....	27
3.2.1 Selección de la muestra .....	27
3.2.1.1 Determinación del Peso de la Muestra.....	28
3.2.1.2 Determinación del Volumen Reconstituido .....	28
3.2.1.3 Determinación del pH .....	28
3.2.1.4 Determinación de la Gravedad Específica. ....	28
3.2.2 Preparación de las soluciones.....	29
3.2.4 Condiciones del Equipo .....	31
3.2.5 Determinación de la concentración de los Principios Activos.....	33
3.2.6 Procesamientos de Datos.....	34
CAPÍTULO IV .....	35
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	35
4.1 Selección de las muestras según criterios de aceptación USP.....	35
4.2 Preparación de soluciones para el ensayo de Amoxicilina más Ácido Clavulánico. .....	38
4.3 Determinación la concentración de Amoxicilina más Ácido Clavulánico mediante el ensayo por HPLC.....	39
CAPÍTULO V .....	50
Conclusiones y recomendaciones .....	50
Conclusiones .....	50
Recomendaciones.....	51
BIBLIOGRAFÍA .....	52
ANEXOS .....	55

## ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1. Materiales usados en el Análisis de Amoxicilina + Ácido Clavulánico .....	26
Tabla 2. Identificación de Estándar de Amoxicilina .....	26
Tabla 3. Identificación de Estándar de Ácido Clavulánico .....	27
Tabla 4. Equipos utilizados en el Análisis de Amoxicilina + Ácido Clavulánico .....	27
Tabla 5. Criterios de Aceptación en la Selección de las Muestras .....	28
Tabla 6. Preparación del Estándar Amoxicilina Trihidrato Polvo.....	29
Tabla 7. Preparación del Estándar de Clavulanato de Potasio .....	29
Tabla 8. Preparación de la Muestra para Amoxicilina Trihidrato Polvo.....	30
Tabla 9. Preparación de la Muestra para Ácido Clavulánico .....	30
Tabla 10. Preparación de la Solución Buffer previa a la mezcla de la Fase Móvil.....	31
Tabla 11. Preparación de la Fase Móvil .....	31
Tabla 12. Condiciones Cromatográficas .....	32
Tabla 13. Condiciones Espectrofotométricas .....	33
Tabla 14. Determinación de Pesos en Muestra 1.....	35
Tabla 15. Determinación de Pesos en Muestra 2.....	35
Tabla 16. Determinación de Pesos en Muestra 3.....	35
Tabla 17. Volumen Reconstituido en Muestra 1, 2, 3 de Análisis .....	36
Tabla 18. Resultados de pH obtenidos en Muestras 1,2 y 3 de Análisis.....	36
Tabla 19. Gravedad Específica de la Muestra 1 .....	36
Tabla 20. Gravedad Específica de la Muestra 2 .....	37
Tabla 21. Gravedad Específica de la Muestra 3 .....	37
Tabla 22. Resultados de los Parámetros obtenidos en la Muestras 1,2,3 .....	37
Tabla 23. Lecturas Cromatográficas de las Muestras 1, 2, 3 de Amoxicilina más Ácido Clavulánico por HPLC .....	41
Tabla 24. Lecturas UV de las Muestras 1, 2, 3 de Amoxicilina + Ácido Clavulánico por Espectrofotometría.....	42
Tabla 25. Concentraciones de Amoxicilina más Ácido Clavulánico en Polvos para Reconstitución por HPLC y Espectrofotometría UV Visible.....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figure 1. Estructura Química de la Amoxicilina.....	25
Figure 2 Estructura Química del Ácido Clavulánico.....	25
Figure 3. Concentración del Estándar del Ácido Clavulánico.....	38
Figure 4. Concentración del Estándar Amoxicilina.....	38
Figure 5. Concentración de la Muestras de Amoxicilina .....	38
Figure 6. Concentración de Ácido Clavulánico.....	38

## ABREVIATURAS

**AAS**= Espectroscopía de Absorción Atómica.

**AMX**= Amoxicilina

**ADN**= Ácido Desoxirribonucleico.

**CZE**= Electroforesis Capilar de Zona

**DAD**= Detector Arreglo de Diodos.

**DCI**= Denominación Común Internacional

**DRIFT**= Espectroscopía Infrarrojo de Reflectancia Difusa con transformación de Fourier.

**GC**= Cromatografía de Gases.

**HPLC**= High Performance Liquid Chromatography ( Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia).

**LCIR**=

**LC-MS**= Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (Espectrómetro de Masas acoplado a Cromatografía Líquida.

**SIA**= Análisis de Inyección Secuencial.

**USP** = United States Pharmacopeia (Farmacopea de Estados Unidos).

**UV**= Ultravioleta.

## RESUMEN

El objetivo de realizar esta investigación fue proponer un estudio de comparación de dos metodologías analíticas para la cuantificación de Amoxicilina más Acido Clavulánico en Polvos para Reconstitución de 250mg/ml, efectuándose en las instalaciones del Laboratorio Farmacéutico Rocnarf ubicado en la ciudad de Guayaquil en el departamento de Control de Calidad, en los meses de enero y marzo del 2022. Se realizaron los análisis fisicoquímicos de las metodologías por Espectrofotometría Ultravioleta Visible y por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, en los cuales se establecieron los procedimientos, parámetros de desempeño a evaluar y sus especificaciones, preparación de reactivos, materiales y equipos a utilizar. Los resultados obtenidos de ambos métodos se compararon haciendo uso del Software Statgraphics para la Comparación de Medias y Verificación de Varianza, en el cual se concluye que la metodología por Espectrofotometría es comparable a la técnica de HPLC para la determinación de Amoxicilina más Ácido Clavulánico en Polvos para Reconstitución de 250mg/, basados en los datos obtenidos por HPLC y Espectrofotometria UV-Visible en las concentraciones de Amoxicilina demuestran un 0.142% de desviación estándar para el método por Espectrofotometría UV -Visible mientras que existe un 0.126% para el HPLC, se obtuvo un coeficiente de variación de 0.139% para Espectrofotometría Uv Visible y un 0.127% para HPLC y un sesgo estandarizado de 1.163 % para para Espectrofotometría Uv Visible y un 0.566% para HPLC, en el caso del Ácido Clavulánico demuestran un 0.424% de desviación estándar para el método por Espectrofotometría UV -Visible mientras que existe un 0.341% para el HPLC, se obtuvo un coeficiente de variación de 0.374% para Espectrofotometría UV Visible y un 0.323% para HPLC y un sesgo estandarizado de -0.865% para para Espectrofotometría UV Visible y un 0.367% para HPLC, dado que no existe una diferencia significativa entre ambas metodologías, ambos valores de sesgo estandarizado se encuentran dentro del rango esperado, lo que indica que son comparables o similares estadísticamente con los valores obtenidos por el método HPLC que es el método de referencia. Con lo cual la hipótesis nula queda aprobada y en este caso, se puede hacer uso del Método Espectrofotométrico para realizar este análisis convencional, debido a que sus resultados analíticos a las pruebas físico-químicas demuestran la óptima calidad de los medicamentos y se encuentran dentro de los criterios de aceptación para que el producto pueda ser aprobado y comercializado.

**Palabras Claves:** cromatografía, espectrofotometría, métodos, comparación, cuantificación.

## ABSTRACT

The objective of carrying out this research was to propose a comparison study of two analytical methodologies for the quantification of Amoxicillin plus Clavulanic Acid Powder for Reconstitution of 250mg/ml, carried out in the facilities of the Rocnarf Pharmaceutical Laboratory located in the city of Guayaquil in the department of Quality Control, in the months of January and March 2022. The physicochemical analyzes of the methodologies were carried out by Ultraviolet Visible Spectrophotometry and by High Efficiency Liquid Chromatography, in which the procedures, performance parameters to be evaluated and their specifications, preparation of reagents, materials and equipment to be used. The results obtained from both methods were compared using the Statgraphics Software for the Comparison of Means and Verification of Variance, in which it is concluded that the methodology by Spectrophotometry is comparable to the HPLC technique for the determination of Amoxicillin plus Clavulanic Acid in Powders. for Reconstitution of 250mg/, based in the data obtained by HPLC and UV-Visible Spectrophotometry in the concentrations of Amoxicillin show a 0.142% standard deviation for the UV-Visible Spectrophotometry method while there is 0.126% for HPLC, a variation coefficient of 0.139% was obtained for Visible Uv Spectrophotometry and 0.127% for HPLC and a standardized bias of 1.163% for Visible Uv Spectrophotometry and 0.566% for HPLC, in the case of Clavulanic Acid they show a 0.424% standard deviation for the UV-Visible Spectrophotometry method while there is 0.341% for HPLC, a coefficient of variation of 0.374% for UV Visible Spectrophotometry and 0.323% for HPLC and a standardized bias of -0.865% for UV Visible Spectrophotometry and 0.367% for HPLC was obtained, given that there is no significant difference between both methodologies, both standardized bias values are within the expected range, which indicates that they are comparable stable or statistically similar with the values obtained by the HPLC method, which is the reference method. With which the null hypothesis is approved and, in this case, the Spectrophotometric Method can be used to carry out this conventional analysis, because its analytical results to the physical-chemical tests demonstrate the optimal quality of the drugs and are within the acceptance criteria so that the product can be approved and marketed.

**Keywords: chromatography, spectrophotometry, methods, comparison, quantification.**

## INTRODUCCIÓN

La evaluación para garantizar la confiabilidad de las mediciones dentro de un laboratorio de análisis de medicamentos es de gran importancia ya que debe ofrecer un servicio de calidad con resultados eficientes. Hoy en día ante la presencia de nuevas técnicas, metodologías o adaptaciones de procedimientos conocidos, los laboratorios deben, establecer el grado de conformidad de acuerdo con los métodos utilizados y los potencialmente más útiles para mejorar el desempeño analítico previo a los cambios en los procedimientos. La mejor estrategia para la investigación en la aplicación de un método es su comparación con la metodología considerada “*gold standard*” para el analito estudiado. (Briozzo, Perego, & Moiron , 2015).

Para estudiar la aplicación de un método potencialmente utilizable es ensayar en paralelo con una buena aproximación entre, el principio activo (Amoxicilina + Ácido Clavulánico) por el nuevo método a estudiar (Espectrofotometría), en comparación con el que se está utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), esto con el objeto de estimar si los resultados son próximos, iguales o diferentes entre ambas metodologías. Y de esta manera determinar si el método comparado cumple con los requerimientos específicos de análisis para ser utilizado según estos resultados. (Abril, y otros, 2017)

La industria farmacéutica mayormente se ha encaminado en investigar nuevas metodologías analíticas, que le permitan obtener resultados en forma rápida y confiable, para un ensayo en específico. Sin embargo, algunos métodos analíticos investigados para ciertos principios activos quedan sin aplicación, debido a que sus parámetros de desempeño de calidad (linealidad, exactitud, rango, precisión ,especificidad y robustez) y operativos (sencillez y economía) resultan ser los no ideales para un ensayo analítico específico. (Cumba & Calderón, 2011)

Los métodos analíticos instrumentales pueden tener un objetivo cualitativo, cuantitativo o estructural que se basan en la medición de propiedades físicas de los analitos tales como conductividad, absorción o emisión de la luz, razón masa a carga y fluorescencia, también emplean frecuentemente procedimientos para separar y resolver compuestos relacionados, los cuales se basan en su mayoría en cromatografías y electroforesis capilar. (Barcelona, Marin, & Stambouliau, 2008)

Los métodos analíticos más usados son los cromatográficos como el de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), los medicamentos son muestras complicadas y estos métodos se caracterizan por su sensibilidad y su capacidad para la separación de especies termolábiles o no volátiles. Los métodos cromatográficos han tenido un gran impacto en la ciencia, debido a su utilidad para caracterizar mezclas complejas. Sin embargo, cuando se utilizan en el análisis rutinario, presentan el inconveniente de requerir equipamiento sofisticado y caro, reactivos de alto costo y utilizar solventes que en algunos casos son contaminantes, además de insumir tiempos importantes. (Universidad del Litoral, 2016)

Actualmente, el Laboratorio Farmacéutico Rocnarf, en el área de Control de calidad dispone de un solo método analítico para la cuantificación de Amoxicilina y Ácido Clavulánico en polvos para reconstitución como forma farmacéutica disponibles en el mercado, así lo evidencia, la información obtenida de una búsqueda realizada en documentos oficiales y no oficiales. El método de HPLC es el único descrito en la farmacopea de los Estados Unidos USP 41. Al no existir alternativas analíticas para cuantificar dichos principios activos, se generan algunas limitaciones, entre ellas: altos costos de operación, congestiones por el elevado número de ensayos en los laboratorios de control de calidad, interrupciones por mantenimiento correctivo y preventivo del cromatógrafo, laboriosidad del método, y finalmente dificultades técnicas.

La Espectrofotometría Ultravioleta-Visible es un método específico el cual se encarga del análisis óptico, por tanto, es de gran utilidad para la identificación y cuantificación de sustancias.

Todos los componentes de la solución van a tener un patrón de absorción de luz específico a determinada longitud de onda. Por otra parte, la concentración y la identificación de todos los componentes que se encuentran disueltos en la muestra se pueden determinar mediante la comparación de la longitud de onda y la absorción de la luz de la muestra con estándar de referencia que contenga los mismos componentes que la muestra.

Entre las ventajas que trae consigo el usar la metodología por Espectrofotometría de UV-Vis: interfase amigable e intuitiva, rapidez de resultados, precisión extrema, versatilidad, además, presenta una eficiencia en el costo.

En base a esto, los espectrofotómetros han sido constantemente mejorados para que la versatilidad de los análisis sea más sencilla. Actualmente, estos instrumentos son indispensables en los laboratorios destinados a los estudios de química analítica de todas las áreas: área ambiental para el análisis de aguas, laboratorios de investigación y desarrollo, microbiología, medicamentos, alimentos y bebidas, etc.

En el caso de las valoraciones o cuantificaciones, de igual manera se requiere una comparación con una solución de referencia o un estándar. Se recomienda emplear la longitud de onda máxima observada realmente en el instrumento utilizado, ya sea indicado en la monografía o bien utilizando el resultado de la identificación.

La referencia se puede realizar a diferentes concentraciones para realizar una curva de calibración, la cual se determina con las lecturas de las absorbancias para realizar la lectura de las muestras problemas. Estos resultados se obtienen directamente del equipo o se pueden realizar cálculos manuales. (Cumba & Calderón, 2011)

El propósito de esta investigación es comparar metodologías aplicables al análisis de componentes en productos farmacéuticos, que no cuenten con una monografía oficial para el control de calidad, o que, a su vez, en el caso de contar con método oficial, éste no implique solamente el uso de HPLC o técnicas analíticas complejas. El trabajo está orientado además a la cuantificación de amoxicilina más ácido clavulánico en polvos para reconstitución como estudio de comparación de un método espectrofotométrico frente a un método estandarizado como es el HPLC.

## CAPÍTULO I

### 1. EL PROBLEMA

#### 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

##### 1.1.1 Problematización

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) es una de las técnicas más utilizadas debido a su capacidad de separar analitos de distinta naturaleza presentes en una mezcla. Su aplicación industrial abarca la farmacéutica, la bioquímica, los alimentos, los productos de la industria química, la medicina clínica y la química forense. No obstante, esta amplitud de aplicaciones dificulta la toma de decisiones a la hora de desarrollar un proceso de separación por esta técnica. (Ospina & Hernandez, 2018)

El método de cuantificación que utiliza la Farmacopea de Estados Unidos (USP) 41 para cuantificar amoxicilina en materia prima y en tabletas es por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), método por el cual se obtiene una alta precisión en sus resultados, alrededor de ( $\pm 0.5\%$  o menor) (Snyder et ál., 2010)

En trabajos de otros autores se validan métodos para cuantificar amoxicilina por HPLC teniendo en cuenta los productos de degradación y las sustancias relacionadas a su proceso de producción. No obstante, algunos protocolos presentan desventajas, como los largos tiempos de análisis o deriva de línea de base al usar sistemas de elución de gradiente ternarios. (De Battista, 2005)

Otras metodologías existentes, incluyen la utilización de espectroscopía infrarrojo de reflectancia difusa con transformación de Fourier (DRIFT), análisis de inyección secuencial (SIA) y electroforesis capilar de zona (CZE), métodos que presentan elevada exactitud y precisión, pero con un muy elevado costo de adquisición. (Avelina, 2018)

El análisis convencional de muestras complejas implica el uso de procesos separativos difíciles para la eliminación de interferencias, como así también la utilización de instrumental analítico de elevado costo, el cual no siempre es asequible en laboratorios de control de calidad de bajo presupuesto. Un tipo de muestra compleja para analizar resultan los antibióticos en formulaciones comerciales. (Barcelona, Marin, & Stamboulian, 2008)

Éstos están normalmente constituidos por combinaciones de principios activos como es el caso de la amoxicilina + ácido clavulánico. Además de que se debe incluir la presencia de diferentes excipientes que pueden producir una disminución o aumento de la respuesta instrumental del analito debido a la presencia de otros componentes. La determinación analítica convencional de estas especies involucra el uso de técnicas instrumentales de muy elevado costo, como lo es la cromatografía líquida de alta resolución lo que hace poco factible su adquisición para laboratorios de análisis de rutina para control de calidad, además del considerable tiempo de análisis que se toma al emplear un ensayo de este tipo.

### **1.1.2 Delimitación del problema**

La investigación se llevó a cabo en los Laboratorios Rocnarf S.A en el Área de Control de Calidad localizada en la ciudad de Guayaquil, Provincia del Guayas, ubicada en la Avenida Juan Tanca Marengo km 5.5 vía a Daule, el cual ofrece servicio de control interno para la cuantificación de Principios Activos en el Área de Producción.

### **1.1.3 Formulación del problema**

¿El análisis de Amoxicilina más Ácido Clavulánico realizado por HPLC como método estandarizado es comparable con el análisis realizado por espectrofotometría UV-Visible?

¿El método de Espectrofotometría UV Visible es capaz de determinar la concentración de Amoxicilina más Ácido Clavulánico?

**Hipótesis Nula:** El ensayo de Amoxicilina más Ácido Clavulánico realizado por HPLC como método estandarizado es igual al ensayo realizado por espectrofotometría UV-Visible.

**Hipótesis Alternativa:** El ensayo de Amoxicilina más Ácido Clavulánico realizado por HPLC como método estandarizado es diferente al ensayo realizado por espectrofotometría UV-Visible.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo General**

- ❖ Comparar dos métodos analíticos de HPLC vs Espectrofotometría UV-Visible para el ensayo de Amoxicilina más Ácido Clavulánico aplicados en el laboratorio de control farmacéutico Rocnarf S.A

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

- ❖ Seleccionar las muestras según criterios de aceptación USP.
- ❖ Preparar de las soluciones para el ensayo de Amoxicilina más Ácido Clavulánico.
- ❖ Determinar la concentración de Amoxicilina más Ácido Clavulánico mediante el ensayo por HPLC.
- ❖ Determinar la concentración de Amoxicilina más Ácido Clavulánico mediante el ensayo por Espectrofotometría UV Visible.
- ❖ Establecer un cuadro comparativo en base a los resultados obtenidos entre el método analítico estandarizado por HPLC y el método por Espectrofotometría UV Visible.

## **1.3 JUSTIFICACIÓN**

Se considera beneficioso la realización de este trabajo de investigación en el estudio de la comparación de dos técnicas analíticas; debido al aporte que proporciona tanto al sector empresarial como farmacéutico y siendo de gran importancia, disponer de métodos de análisis alternativos, que proporcionen rapidez, seguridad, confiabilidad, en la calidad de los resultados.

Es en este aspecto donde el uso de un método alternativo adquiere relaciones de interés y de factibilidad para los laboratorios de bajos recursos, ya que se podría optimizar considerablemente el análisis en función de costos y tiempo. A partir del presente trabajo se prevé el estudio de un método de análisis de bajo costo instrumental como es la Espectrofotometría UV Visible, con adecuadas propiedades analíticas y que sea comparable a un método ya estandarizado como el HPLC, que permitan su empleo en la industria farmacéutica, como así también en laboratorios de control de calidad de medicamentos de recursos medios o limitados.

## **CAPÍTULO II**

### **2. MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 ANTECEDENTES**

##### **2.1.1 Antecedentes Históricos**

La industria farmacéutica constantemente busca la mejora continua de la calidad de los medicamentos y su total garantía de seguridad, la calidad de los medicamentos se logra en toda la cadena del proceso de producción, desde la investigación y desarrollo del producto hasta el último análisis sobre el producto final, ya que de la calidad depende un efecto terapéutico óptimo. (Huber, 2010)

A lo largo de la historia se ha buscado y se ha intentado mejorar constantemente los distintos métodos de análisis de cuantificación medicamentos que se tienen, por procesos más sencillos y que generen resultados confiables. Actualmente para conseguir este tipo de resultados se poseen gran variedad equipos que brindan la máxima calidad posible a la hora de realizar un análisis determinado, esto trae consigo una implicación bastante notoria y es que a pesar de que el resultado es el mejor posible, este se consigue con equipos que por lo general presenta un alto costo económico y procedimientos que demandan una gran cantidad de tiempo.

Los antibióticos son un tipo importante de moléculas a analizar en la industria farmacéutica ya que son medicamentos primordiales. En la determinación de antibióticos con fines cualitativos o cuantitativos, los métodos cromatográficos son los más utilizados debido a su especificidad, precisión, exactitud, reproducibilidad y sensibilidad. Dentro de las técnicas cromatográficas utilizadas, se encuentran la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La separación cromatográfica se realiza utilizando diferentes tipos de columnas y con sistemas de detección acoplados al cromatógrafo tales como detector de diodos (DAD), detector de fluorescencia o espectrómetro de masas, entre otros. (Soledad, 2016).

A pesar de su alta precisión en los resultados la mayor parte de los estudios coinciden en la dificultad del análisis con respecto al proceso, por ejemplo, la utilización de gran variedad de reactivos y columnas para cada uno de los análisis. Es así como a lo largo del

tiempo y debido a lo ya mencionado se ha ido mejorando los distintos procesos de análisis de antibióticos con la utilización del HPLC.

Al ser uno de los métodos más utilizados muchos de las otras metodologías existentes para realizar análisis cuantitativos quedan rezagadas debido a la alta precisión de resultados que la cromatografía líquida presenta es así como por ejemplo la Farmacopea Nacional Argentina en ninguna de sus ediciones codifica métodos para valorar amoxicilina en formas farmacéuticas, las farmacopeas de reconocimiento internacional la determinan únicamente por cromatografía líquida de alta resolución. (De Battista, 2005)

En el caso de la (USP) 24<sup>a</sup> edición para cuantificar amoxicilina en materia prima y en tabletas, la columna que utiliza es una de fase reversa ligada a octadecilsilanos (ODS) de 3,9 x 30 cm, y como precolumna una de 2x2cm, también de ODS. (USP, 2012)

En trabajos como los de Hossain en 1999 o Valvo en 1998, se validan métodos para cuantificar amoxicilina por HPLC teniendo en cuenta los productos de degradación y las sustancias relacionadas a su proceso de producción. No obstante, algunos protocolos presentan desventajas, como los largos tiempos de análisis o deriva de línea de base al usar sistemas de elución de gradiente ternarios.

Shakoor y colaboradores en 1978 desarrollan un método por HPLC que utiliza un sistema de fase móvil isocrático, que permite cuantificar amoxicilina en presencia de sus sustancias relacionadas en cortos tiempos de análisis, resultando ventajoso para controles de calidad de medicamentos que contienen esta droga. Dicho método utiliza una columna ODS de 100 x 2 mm, y también ha sido validado para cápsulas y suspensiones.

Otro método que es bastante utilizado para el análisis cuantitativo de diferentes principios activos es la Espectrofotometría UV- Visible, un método sencillo por el cual se obtienen también buenos resultados de análisis pero que poco a poco va perdiendo su relevancia debido a la existencia del HPLC.

Haciendo una revisión de diferentes métodos que utilizan la espectrofotometría para la determinación de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, se han encontrado algunos ejemplos a destacar. Smith, J., y cols (1967), y Baker, W. L. (1989) desarrollaron métodos espectrofotométricos con sales de cobre. El-Obeid H. A., y cols (1999), estudiaron un método colorimétrico utilizando reacciones con ácido ascórbico, Prasad, P., y cols. (2000) desarrollaron un método basado en la formación de un complejo azul de metileno-antibiótico aniónico.

El-Obeid H. A., y cols (1999) desarrollaron un método colorimétrico selectivo para la determinación de ampicilina, amoxicilina, cefalexina, cefadroxilo y cefaclor en preparaciones farmacéuticas, basado en la medición del color cuando los productos de la degradación alcalina de estos agentes reaccionan con el ácido ascórbico.

Un método espectrofotométrico de extracción para la determinación de algunos antibióticos betalactámicos como el cefaclor, la ampicilina y la amoxicilina usando azul de metileno como reactivo analítico, fue desarrollado por Prasad, P., y col (2000). Este método está basado en la formación de un complejo azul de metileno-antibiótico aniónico extraíble en cloroformo, cuando se hace reaccionar un antibiótico  $\beta$ -lactámico con un exceso de azul de metileno a pH 9,5. (Soledad, 2016)

### **2.1.2 Antecedentes Referenciales**

Publicaciones más recientes como los que aparecen en (De Battista, 2005) desarrollan un método que ofrece la ventaja de utilizar columnas cromatográficas convencionales, cuyas condiciones cromatográficas comprenden el uso de una columna en fase reversa C18 (250 x 4mm x 5 mm) y sin el uso de pre columna ; se utiliza como fase móvil buffer de fosfatos y acetonitrilo como modificador, en proporción (39:1) a pH 5, obteniendo una excelente precisión con dispersión menor al 1%, recuperación mayor al 98% y una alta selectividad para cuantificar amoxicilina en presencia de impurezas orgánicas.

Salem, H., y cols (2002) desarrollaron un método basado en la oxidación selectiva de los antibióticos tanto con Ce (IV) como con Fe (III) en medio ácido, Okoye, N y cols (2007) y Farhadi, K y cols (2002) investigaron un método basado en la formación del complejo de azul de Prusia. Sin embargo, estos métodos espectrofotométricos sólo se aplicaron al análisis de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en formas puras o en preparaciones farmacéuticas Tanto los antibióticos  $\beta$ -lactámicos como los macrólidos son incoloros y no tienen cromóforos con propiedades de adsorción significativas en el UV. Es por ello por lo que para determinar estos antibióticos usando espectrofotometría es necesario basarse en derivados adecuados para obtener los compuestos coloreados que puedan medirse en el rango visible del espectro. (Soledad, 2016)

## 2.2 MARCO CONCEPTUAL

### 2.2.1 Métodos Analíticos

Es un procedimiento que descompone un todo en sus elementos básicos y, por tanto, que va de lo general (lo compuesto) a lo específico (lo simple), es posible concebirlo también como un camino que parte de los fenómenos para llegar a las leyes, es decir, de los efectos a las causas. (Avelina, 2018)

El proceso analítico se puede considerar dividido en 3 etapas:

- a) Operaciones previas (muestreo, acondicionamiento, disolución, separaciones, reacciones analíticas y otras)
- b) Medición y traducción de la señal analítica mediante el uso de instrumentos.
- c) Toma y tratamiento de datos. La calidad de los resultados depende de la calidad de las diferentes etapas del proceso analítico.

En la elección de un método se debe focalizar la atención en los principios analíticos involucrados, más bien que en el grado de sofisticación del instrumento. Muchas veces un método con uso de instrumentos modernos puede producir valores menos confiables que el método tradicional que pretende reemplazar y es preferible desarrollar programas que aseguren la calidad de los datos obtenidos. (Vinagre, 2021)

### 2.2.2 Clasificación de Métodos Analíticos

**Cualitativos:** Estos se basan en reacciones químicas, como la precipitación y formación de complejos, además de técnicas de separación que pueden ser marchas analíticas catiónicas, aniónicas y pruebas de llama.

**Cuantitativos:** Estos métodos son más complejos y requieren en general de equipos especializados para ello. Se pueden subdividir en:

- ❖ **Análisis Volumétrico:** Este conjunto de técnicas determinan de manera indirecta la concentración de un analito en una muestra, basándose en medición del volumen de un reactivo de concentración conocida. Esto se conoce como titulación.
- ❖ **Análisis Gravimétrico:** Este método se basa en la medición de la masa o el cambio de ella en la muestra luego de someterse a distintos tratamientos. La medición de la masa se realiza mediante balanzas analíticas especializadas. (Cromtek, 2021)

### **2.2.3 Métodos Instrumentales**

Existen equipos para automatizar los análisis para estudiar muestras complejas de manera eficiente, algunos de ellos son los Métodos espectrométricos, basados en la absorción de la luz, métodos electroanalíticos, que miden cambios en las propiedades eléctricas, como el PH y Métodos cromatográficos, que separan e identifican de manera cualitativa y cuantitativa los componentes y que se pueden combinar con técnicas volumétricas (Cromtek, 2021).

Los sistemas instrumentales aplicados al análisis y control químicos son ampliamente aceptados como métodos que ahorran tiempo, requieren menos separaciones químicas y son seguros y sensibles. La ventaja que tienen sobre los métodos de análisis “por vía húmeda” deriva directamente del hecho de que determinan la composición química por medio de la medición de las propiedades físicas. Como resultado, los aparatos y los procedimientos de interés son comunes tanto a lo que tradicionalmente se denomina análisis como a las investigaciones químicas.

Los métodos instrumentales se diferencian de los métodos analíticos clásicos principalmente en que no se requiere que haya reacción química y que son métodos relativos. Es decir, se requiere realizar un calibrado para relacionar la señal medida con la propiedad que se quiere obtener y esta relación sólo se puede aplicar a las condiciones en la que se ha determinado. (Cromtek, 2021)

Sólo es necesario recordar el gran número de propiedades físicas de las sustancias: índice de refracción, color, susceptibilidad magnética, conductividad térmica, grado de acidez y muchas otras; para percibir la magnitud del campo de la medición instrumental. Algunas propiedades son específicas y permitirán una identificación y determinación cuantitativa directa de una sustancia. Otras, tales como la conductividad eléctrica y el índice de refracción, no son específicas. Sin embargo, las propiedades no específicas pueden usarse también para verificar la identidad de una sustancia cuando se conocen otras características (la identidad y pureza de los líquidos orgánicos puede confirmarse determinando el índice de refracción). (Cromtek, 2021)

### **2.2.3.1 Parámetros de Utilidad de un método instrumental**

#### **Precisión**

Es el grado de concordancia mutua de los datos determinados de la misma manera. Cuantitativamente se determina mediante la desviación estándar o absoluta, el coeficiente de variación o la varianza de los datos obtenidos a través de un método. La precisión es independiente del valor exacto.

#### **Exactitud**

Está relacionada con lo que se acerca el valor medido al valor real. La inexactitud de los datos se debe a un error sistemático del instrumento. Para obtener una buena medida de debe calibrar el instrumento para que sea lo más exacto y preciso posible.

#### **Tiempo y coste**

Es importante cuando hay que un número elevado de análisis. La necesidad de abaratar el coste y reducir el tiempo ha llevado la automatización de los métodos instrumentales. De este modo se reduce la intervención humana y los errores producidos por la manipulación humana.

#### **Sensibilidad**

Capacidad para discriminar entre pequeñas diferencias de concentración del analito. Se evalúa mediante la sensibilidad de calibración, que es la pendiente de la curva de calibración a la concentración de interés.

#### **Límite de detección**

Concentración correspondiente a una señal de magnitud igual al blanco más tres veces la desviación estándar del blanco.

#### **Selectividad**

Cuantifica el grado de ausencia de interferencias debidas a otras especies contenidas en la matriz.

**Seguridad** Amplitud de condiciones experimentales en las que puede realizarse un análisis. Además, hay que considerar otro tipo de parámetros asociados y de gran importancia práctica como son la rapidez, coste, seguridad del proceso, peligrosidad. (Vinagre, 2021).

## **2.2.4 Tipos de Métodos Instrumentales**

### **2.2.4.1 Métodos Electroanalíticos**

Se entiende bajo el término "electrónica analítica" diferentes procedimientos de análisis, en algunos casos muy complejos. Uno de estos procedimientos es la conductimetría. Se usa la conductividad eléctrica de un líquido (prueba) para determinar el contenido y su concentración.

### **2.2.4.2 Métodos de Análisis Ópticos**

Con estos procedimientos se iluminan las pruebas por luz o radiación electromagnética. La radiación respectivamente la luz es reflejada o refractada parcialmente. Esta variación se puede medir con un refractómetro.

### **2.2.4.3 Métodos Espectroscópicos**

En la espectroscopia se descompone la radiación de una prueba según su energía; los espectros ópticos se pueden observar con un espectroscopio. En la espectroscopia se usan diferentes tipos de procedimientos. Estos se pueden dividir en diversas categorías principales: espectroscopía absorción atómica, espectroscopia de fluorescencia, espectroscopia ultravioleta visible.

## **Fundamento**

El fundamento de la espectroscopía se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV-visible. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas.

El tipo de espectrometría depende de la cantidad física medida tras dicha interacción, normalmente la cantidad que se mide es una intensidad de energía absorbida o producida. Así pues, tenemos los siguientes tipos de espectrofotometría o espectrometría:

- ❖ Absorción atómica
- ❖ Fluorescencia
- ❖ Ultravioleta visible

### **Espectrofotometría de Absorción Atómica**

En la espectroscopia de absorción atómica (AAS), el vapor del analito es irradiado haciendo uso de una fuente de radiación externa. Si dicha fuente es de la frecuencia (longitud de onda) apropiada, la absorben los átomos del analito promoviéndolos a estados excitados.

Después de unos cuantos nanosegundos, los átomos se relajan a su estado fundamental mediante la transferencia de energía a otros átomos o moléculas del medio. Se detecta la radiación que no es absorbida de manera que cada elemento deja su huella a través de las longitudes de onda vacías (Torres, 2017).

### **Espectrofotometría UV-Visible**

Es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma (Abril, y otros, 2017)

### **Espectrofotometría de Fluorescencia**

La fluorescencia es uno de los fenómenos luminiscentes que tienen lugar con ciertos átomos y moléculas capaces de absorber radiación de cierta longitud de onda para, posteriormente, emitir radiación a una longitud de onda mayor. Cuando el analito absorbe radiación experimenta una “transición” a un estado electrónico de mayor energía o estado excitado. Desde ese estado las moléculas en su estado fundamental y pueden hacerlo de diversas maneras. Los de las posibles formas de hacerlo implican emisión de fotones fluorescencia y fosforescencia. La primera se lleva a cabo desde un estado excitado singlete, mientras que la fosforescencia lo hace desde un estado triplete (Mendez, 2019).

### **Componentes Del Espectrofotómetro Uv-Vis**

- ❖ **Fuente de luz policromática** (para la visible lámpara de Tungsteno y para UV lámpara de deuterio).
- ❖ **Sistema óptico** necesario para seleccionar una determinada longitud de onda (colimador,

- ❖ monocromador, selector de longitud de onda).
- ❖ **Cubeta** (recipiente donde se coloca la muestra a medir, para el visible debe ser de vidrio de plástico; para UV de cuarzo). Muchas veces al camino óptico se lo denomina ancho de la cubeta.
- ❖ **Detector** (Fototubo) y **Procesador**; lector de la señal. (Abril, y otros, 2017)

#### 2.2.4.4 Métodos Cromatográficos

La cromatografía es un método físico de separación para la caracterización de mezclas complejas, la cual tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia. Es un conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes. Puede cumplir dos funciones básicas que no se excluyen mutuamente:

- ❖ Separar los componentes de la mezcla, para obtenerlos más puros y que puedan ser usados posteriormente (etapa final de muchas síntesis).
- ❖ Medir la proporción de los componentes de la mezcla (finalidad analítica). En Este caso, las cantidades de material empleadas son pequeñas.

La cromatografía describe un procedimiento químico en el que se separa una mezcla en sus componentes individuales mediante una fase móvil y una fase estacionaria. La fase estacionaria consta, según el procedimiento, de materia sólida o un líquido, y la fase móvil de un líquido o Gas. (S.L., 2015)

##### 2.2.4.4.1 Cromatografía de Gases (CG)

Es una técnica analítica que permite separar mezclas de compuestos fácilmente volatilizables y térmicamente estables en sus componentes individuales. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, a través de una fase estacionaria con la que es inmisible fijada a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyan de modo distinto entre ambas. Aquellos componentes fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas que pueden identificarse cualitativa y/o determinarse cuantitativamente. La clasificación más

frecuente en cromatografía, la marca el tipo de fase móvil, en este sentido la cromatografía de gases emplea como fase móvil un gas.

La muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito cuya única función es la del transporte de este a través de la columna.

#### **2.2.4.4.2 Cromatografía Líquida (HPLC)**

Es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Consiste en una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil. La fase estacionaria es sílica. La fase móvil actúa de portador de la muestra. La muestra en solución es inyectada en la fase móvil. Los componentes de la solución emigran de acuerdo con las interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna. Estas interacciones químicas, determinan la separación de los contenidos en la muestra. La utilización de los diferentes detectores dependerá de la naturaleza de los compuestos a determinar. (Avelina, 2018)

El HPLC es uno de los tantos métodos de cromatografía para la separación y análisis de los componentes químicos de una mezcla. Básicamente, en este método participan la fase móvil estacionaria (inmiscibles entre sí) y la muestra de interés. La fase móvil es líquida y su función es llevar la muestra a través de la fase estacionaria, que puede ser sólida o una película líquida soportada en un sólido inerte. Las distintas fuerzas químicas y físicas que actúan entre la mezcla a analizar y las dos fases determinan la retención y separación de cada uno de los componentes de la mezcla. Los componentes con mayor afinidad con la fase estacionaria se desplazarán con menor velocidad que aquellos que presentan menor afinidad. Estas diferencias de velocidades dan origen a la separación de los componentes. (Lloyd, Kikland, & Dolan, 2009)

Las principales fuerzas que actúan en las moléculas son:

- ❖ Las fuerzas de dispersión de London
- ❖ Las interacciones dipolo
- ❖ Las interacciones por puente de hidrógeno
- ❖ Interacciones dieléctricas
- ❖ Interacciones electroestáticas

A diferencia de otras técnicas, la HPLC cuenta con varias ventajas:

- ❖ Amplio rango de aplicabilidad debido a la alta disponibilidad de equipos, columnas y demás materiales, que la hacen capaz de analizar casi cualquier mezcla deseada.
- ❖ Alta precisión en sus resultados ( $\pm 0.5$  % o menor).
- ❖ Variedad de técnicas, entre las cuales están la cromatografía por partición, adsorción, intercambio iónico y exclusión molecular
- ❖ Fácil manipulación de los gradientes generados en la fase móvil.
- ❖ No es destructiva, es decir, los compuestos separados en la columna pueden ser recolectados, lo que permite el uso de la HPLC como una técnica de preparación o purificación de muestras
- ❖ Tiempo de separación menor a 30 min por muestra analizada.
- ❖ Alta reproducibilidad en los análisis cuantitativos.
- ❖ Alto poder de separación con detección sensible.
- ❖ La operación es flexible, personalizable y automatizada.
- ❖ No está restringida por la volatilidad o estabilidad térmica de la muestra. (Avelina, 2018)

#### 2.2.4.4.2 Componentes del Cromatógrafo Líquido de Alto Rendimiento

Un cromatógrafo líquido de alto rendimiento opera generalmente con cinco instrumentos: reservorio, bomba, inyector, horno (columna), detector y registrador

- ❖ **Reservorio:** Se encuentra la fase móvil. Esta fase consiste en una mezcla de sustancias polares y no polares que varían en concentración dependiendo de la muestra que se quiere analizar, la cual debe estar filtrada para evitar obstrucciones por posible material particulado. Los reservorios suelen estar hechos de vidrio; pueden requerirse uno o más, dependiendo de si se hace o no un gradiente de concentración. (Lloyd, Kikland, & Dolan, 2009)
- ❖ **La bomba:** Se encarga de succionar la fase móvil del reservorio para hacerla fluir por todo el sistema a una velocidad precisa y constante. Aquí normalmente operan hasta 6000 psi, dependiendo de factores como tiempo, tamaño de la columna, composición de la fase móvil y flujo deseado. Se inyecta usualmente un volumen que varía entre 5  $\mu$ L y 5 mL. (Lloyd, Kikland, & Dolan, 2009)
- ❖ **El inyector:** Puede ser automático o manual. El sistema de inyección automático permite que la muestra sea introducida a la fase móvil presurizada de manera

exacta y precisa, por lo que actualmente los inyectores manuales son raramente empleados. (Lloyd, Kikland, & Dolan, 2009)

- ❖ **El horno:** Se encarga de regular y mantener la temperatura dentro de la columna, ya que esta influye directamente en la retención y selectividad de esta.

Por otro lado, la columna está fabricada generalmente en acero inoxidable, tiene una longitud de 50 a 300 mm y está rellena de la fase estacionaria, además, su tamaño de partícula está entre 3 a 10  $\mu\text{m}$ .

Las variaciones de estas dimensiones y materiales determinan la resolución, eficiencia, velocidad y vida útil de la columna.

- ❖ **El detector:** Ubicado al final de la columna, es el encargado de captar los cambios en los efluentes de la columna y convertirlos en señales eléctricas, las cuales son recibidas por el registrador. Los detectores se pueden clasificar en dos grandes grupos; selectivos, como los detectores de fluorescencia, que miden una propiedad física o química propia de los solutos presentes en la mezcla (solo los que cuenten con dicha propiedad serán detectados), y universales, que miden una propiedad física específica del eluyente (fase móvil).

- ❖ **El registrador:** Recolecta y procesa las señales recibidas del convertidor y los plasma en un cromatograma para su posterior lectura e interpretación. (Lloyd, Kikland, & Dolan, 2009).

#### 2.2.4.4.3 Método

Teniendo claras las nociones básicas del funcionamiento y principios de la cromatografía líquida de alto rendimiento se pueden revisar aquellos criterios indispensables para realizar la separación de una mezcla de analitos.

Este método tiene cinco pasos:

- ❖ Evaluar la composición de la muestra y determinar las metas de separación.
- ❖ Pretratamiento de la muestra.
- ❖ Selección del modo de operación y el tipo de HPLC.
- ❖ Selección del detector.
- ❖ Selección de las condiciones de separación. (Lloyd, Kikland, & Dolan, 2009)

## **Evaluar la composición de la muestra y determinar las metas de separación**

Antes de tomar cualquier decisión, es necesario evaluar la composición de la mezcla y establecer las metas de separación.

Según Snyder et ál. (2009), se deben conocer tres factores de la muestra a separar:

- ❖ El número de compuestos presentes, estructura química, funcionalidad, peso molecular, valor de pKa, espectro UV y el rango aproximado de las concentraciones de cada molécula presente en la muestra.
- ❖ La solubilidad de la muestra.
- ❖ La posible existencia de enantiómeros en la muestra.

El objetivo de la separación no se debe limitar a la obtención de buena resolución y tiempo mínimo de análisis.

## **Pretratamiento de la muestra**

Según Snyder et ál. (2009), las razones más usuales por las que la muestra requiere el pretratamiento son:

- ❖ Necesita dilución, neutralización o cualquier otro tipo de manipulación volumétrica.
- ❖ Es sólida y necesita ser disuelta o extraída.
- ❖ Contiene sólidos suspendidos o cualquier otra interferencia o sustancia tóxica que pueda dañar el equipo, por lo que necesitan ser removidos.
- ❖ Requiere una separación parcial, ya sea para concentrar los analitos en la muestra o eliminar contaminantes.

### **2.2.9.1 Selección del modo de operación y el tipo de HPLC**

Existen tres modos en los que se puede operar la cromatografía líquida de alto rendimiento:

**Fase reversa.** Es la primera opción para analizar la mayoría de las muestras, especialmente, aquellas que contienen sustancias neutrales o no ionizadas, solubles, en mezclas de compuestos orgánicos y agua. La fase estacionaria es hidrofóbica mientras que la fase móvil es un líquido polar, normalmente una mezcla de agua-metanol o agua-acetonitrilo.

**Par ion.** Este modo es empleado cuando se tienen compuestos iónicos o ionizables, especialmente bases y cationes. Los iones en solución pueden ser neutralizados y

separados como un par de iones en una columna de fase reversa o normal con la adición de contraiones lipofílicos. (Lloyd, Kikland, & Dolan, 2009)

**Fase normal.** Este método separa los analitos con base en su polaridad. La fase estacionaria (usualmente sílice) es polar, mientras la móvil es no polar. Se emplea como segunda opción cuando ninguna de las anteriores funciona, aunque es la primera opción para muestras lipofílicas que no se disuelven bien en mezclas de agua y compuestos orgánicos o mezclas de isómeros. Las sustancias comúnmente usadas como fase móvil para este método son: hexano, cloruro de metileno, cloroformo, éter dietílico y mezclas de estos. (Lloyd, Kikland, & Dolan, 2009)

Por otro lado, están los tipos de HPLC, que se clasifican según el mecanismo de retención, el cual se escoge dependiendo de la naturaleza de los compuestos presentes en la muestra. (Avelina, 2018)

Los tipos existentes son:

**Adsorción.** Se basa en la competencia por los analitos neutrales entre la fase móvil (líquida) y la fase estacionaria (sólida). Los compuestos de la muestra interactúan con la fase móvil a través de enlaces dipolo-dipolo reversible. Los tiempos de retención de las moléculas dependerán de la fase estacionaria; por ejemplo, si se desea retener compuestos polares se debe utilizar una fase estacionaria igualmente polar; en el caso contrario se emplearía una fase estacionaria apolar. (Lloyd, Kikland, & Dolan, 2009)

**Partición.** En este HPLC también se da la competencia por los analitos; pero, a diferencia del método de adsorción, la fase estacionaria es un líquido. Debido a la inestabilidad de las fases líquidas estacionarias, este método no es muy empleado en la actualidad. (Lloyd, Kikland, & Dolan, 2009)

**Exclusión molecular.** Es conveniente para la separación de analitos con una diferencia en su tamaño molecular mayor al 10% para moléculas pequeñas y al 20% para macromoléculas. Es empleado también para calcular los pesos de los compuestos de una muestra. En este tipo de HPLC, la columna funciona como un tamiz molecular con una fase estacionaria sólida porosa, en la que las moléculas más grandes son las primeras en salir. (Mendez, 2019)

**Afinidad.** Este método aprovecha la tendencia de algunas sustancias a reaccionar a otras como los métodos cromatográficos. Se aplica usualmente para la separación de moléculas biológicas capaces de formar complejos disociables con otras especies como las proteínas y los ácidos nucleicos. Se basa en el mecanismo de llave-herradura, característico de los sistemas biológicos, en los que el ligando (ente biológico) se une a la molécula biológica específica de este. (Lloyd, Kikland, & Dolan, 2009)

### **Selección del detector**

El detector usado por defecto es el de UV, ya que normalmente el rango UV de cada uno de los componentes de la muestra es fácil de encontrar en la literatura, aunque no siempre es el detector adecuado. Para tener una idea más clara de cuál detector es el más apropiado, se deben tener en cuenta las metas planteadas para la separación, los tipos de detectores y la naturaleza de la muestra. Según su mecanismo, los detectores se clasifican en:

**Detectores de propiedades intensivas.** Miden el cambio en la propiedad intensiva (que es común para todos los compuestos), como la diferencia de las medidas entre la fase móvil con y sin la muestra. Detectan todos los compuestos. Dentro de este mecanismo se encuentran los detectores de índice de refracción, electroquímicos y de dispersión de luz. (Lloyd, Kikland, & Dolan, 2009)

**Detectores específicos.** Responden a una característica única de la muestra o de algunos analitos de la muestra. En este grupo se encuentran los detectores UV-VIS de matrices de fotodiodos, de fluorescencia, de espectroscopia de masas y de conductividad eléctrica. (Lloyd, Kikland, & Dolan, 2009)

**Detectores de modificación de la fase móvil.** Modifican la fase móvil después de que atraviesa la columna para producir un cambio en las propiedades del analito. Los detectores de reacción, de espectrometría de masas y de dispersión de luz por evaporación pertenecen a esta clasificación. (Lloyd, Kikland, & Dolan, 2009)

**Técnicas Hifenizadas.** Hacen referencia al acoplamiento de un instrumento analítico independiente al sistema de HPLC, como el LC-MS, que es un espectrofotómetro de masa acoplado al HPLC o el LCIR (unión de un espectroscopio infrarrojo al HPLC). (Lloyd, Kikland, & Dolan, 2009)

### 2.2.9.2 Selección de las condiciones de separación

Las siguientes condiciones iniciales para la separación:

- ❖ Columna de 15 x 0.46 cm con un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ .
- ❖ Fase estacionaria C8 o C18.
- ❖ Fase móvil compuesta por dos solventes: acetonitrilo y una solución buffer 25 mM de fosfato de potasio de pH entre 2 y 3, con una fuerza de la fase móvil (%B) entre 80 y 100 %.
- ❖ Flujo de 1.5 a 2 mL/min para la fase móvil.
- ❖ Temperatura del horno entre 35 y 45 °C.
- ❖ Inyección de menos de 25  $\mu\text{L}$  de muestra. (Lloyd, Kikland, & Dolan, 2009)

### 2.2.5 Fármacos: Concepto

#### 2.2.5.1 Antibióticos

El término antibiótico fue propuesto por Selman A. Waksman, descubridor de la estreptomicina, para definir sustancias dotadas de actividades antimicrobianas y extraídas de estructuras orgánicas vivientes. (Hotchkiss, 2003).

#### 2.2.5.2 Clasificación de los Antibióticos

##### ❖ Según el espectro de acción

- a) Amplio: aquellos antibióticos que son activos sobre un amplio número de especies y géneros diferentes.
- b) Reducido: antibióticos solo-activos sobre un grupo reducido de especies.

##### ❖ Según el mecanismo de acción

Es el mecanismo por el cual un antibiótico es capaz de inhibir el crecimiento o destruir una célula bacteriana. Se dividen en inhibidores de la formación de la pared bacteriana, inhibidores de la síntesis proteica, inhibidores de la duplicación del ADN, inhibidores de la membrana citoplasmática, inhibidores de vías metabólicas.

##### ❖ Según farmacocinética y farmacodinamia

###### **Betalactámicos**

Los antibióticos betalactámicos incluyen diferentes grupos tales como penicilinas, cefalosporinas, monobactams, carbapenemos e inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas.

### ❖ Penicilinas

En el año 1928 Sir Alexander Fleming descubre la penicilina como resultado de estudios relacionados con estafilococos, los cuales se habían contaminado con un hongo del género *Penicilium*. A partir de 1939, comienzan las investigaciones relacionadas con la penicilina, y se observa la curación de ratones infectados originalmente con estreptococos, y a partir de este momento se extiende su aplicación a pacientes infectados con estafilococos, demostrándose incuestionablemente su actividad terapéutica.

Las penicilinas son un grupo de antibióticos de origen natural y semisintético que contienen el núcleo de ácido 6-aminopenicilánico, que consiste en un anillo betalactámico unido a un anillo tiazolidínico. Los compuestos de origen natural son producidos por diferentes especies de *Penicillium spp.*

#### 2.2.13.1 Amoxicilina

La amoxicilina (AMX) es un antibiótico de la clase de los betalactámicos, que pertenece al grupo de las penicilinas semisintéticas de espectro ampliado. Abarca, además de las bacterias grampositivas, una serie de bacilos gramnegativos, como la *Escherichia coli*, los géneros *Haemophilus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Salmonella* entre otros. De acuerdo con el listado de la Organización Mundial de la Salud (OMS) integra el grupo de los medicamentos esenciales y es ampliamente utilizada tanto en los países desarrollados como en desarrollo. (De Battista, 2005)

#### 2.2.14.1 Ácido Clavulánico

El ácido clavulánico (DCI) es un inhibidor de  $\beta$ -lactamasas que se combina en preparaciones antibióticas con alguna penicilina para vencer ciertos tipos de resistencias a antibióticos. Se usa para vencer la resistencia en bacterias que secretan  $\beta$ -lactamasa, como varias cepas de *Staphylococcus aureus* y algunas bacterias gram negativas, que de otra forma inactivaría la mayoría de las penicilinas. (Katzung, Masters & Trevor, 2009)

Por si solo el ácido clavulánico carece de actividad bactericida, pero presenta alta afinidad por las  $\beta$ -lactamasas, generando un proceso fisicoquímico complejo, al principio reversible y posteriormente irreversible (sustrato “suicida”). Esta inhibición restablece la actividad antimicrobiana de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos frente a bacterias resistentes por producción de  $\beta$ -lactamasas de bacterias Gram positivas, y algunas de las producidas por

bacterias Gram negativas. Por tanto, aunque por sí sólo posee una escasa actividad antibacteriana, cuando se asocia a la amoxicilina, se conserva el efecto bactericida de la misma y además se incorporan a su espectro de actividad las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas. Así, se incrementa la actividad de la amoxicilina para un amplio grupo de bacterias Gram positivas y Gram negativas, entre las que podemos incluir las que causan con más frecuencia patología en la edad pediátrica: *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus spp*, y algunas cepas de *Escherichia coli*, *Proteus spp*, *Salmonella*, *Shigella* y *Klebsiella pneumoniae* además de mantener su actividad frente a bacterias que no producen betalactamasas como *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*. (Ares, Garrido, & Miguélez, 2018)

#### **2.2.14 Amoxicilina - Acido Clavulánico**

La amoxicilina- ácido clavulánico es un antibiótico muy utilizado en la práctica clínica para el tratamiento de infecciones de origen bacteriano, debido a su amplio espectro y buena tolerancia. La amoxicilina-clavulánico es una combinación de penicilina semisintética con un inhibidor de beta-lactamasas, que se introdujo a la práctica clínica en 1981, comercializándose en 1984. (Ponce, Arráez, & Hermida, 2007)

La producción de betalactamasas constituye uno de los principales mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos betalactámicos. La utilización de inhibidores de betalactamasas en combinación con antibióticos betalactámicos permite la inactivación de determinadas betalactamasas producidas por gérmenes Gram positivos, Gram negativos, anaerobios, y aun por micobacterias. Los inhibidores de betalactamasas representan una alternativa terapéutica mejorada respecto del resto de los betalactámicos al asegurar, en la mayoría de los casos, un mayor espectro antimicrobiano comparado con el de sus análogos. La actividad enzimática de las betalactamasas está dirigida específicamente a la hidrólisis del anillo betalactámico, con producción de un compuesto sin actividad antibacteriana. Actualmente existen tres inhibidores de betalactamasas localmente disponibles: ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. (Barcelona, Marin, & Stambouljian, 2008)

### 1.2.13.2 Estructura química de la Amoxicilina

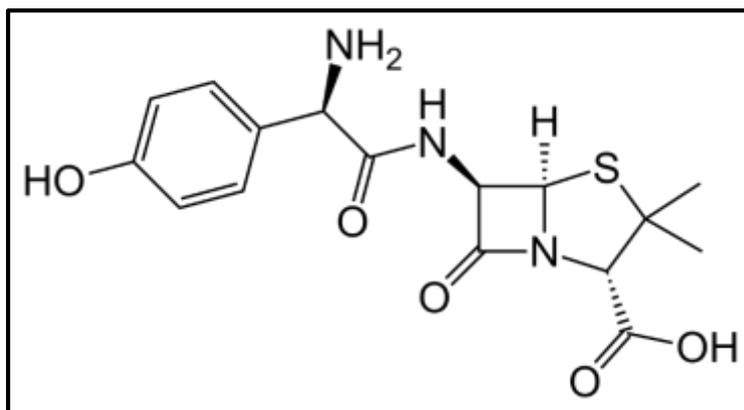


Figure 1. Estructura Química de la Amoxicilina

**Nombre Químico:** Ácido (2S, 5R, 6R)-6-[(R)-2-amino-2-(4-hidroxifenil) acetamido]-3,3-dimetil7-oxo-4-tia-1-azabicyclo [3.2.0] heptano-2-carboxílico.

**Formula:** C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>

### 1.2.13.3 Estructura química del Ácido Clavulánico

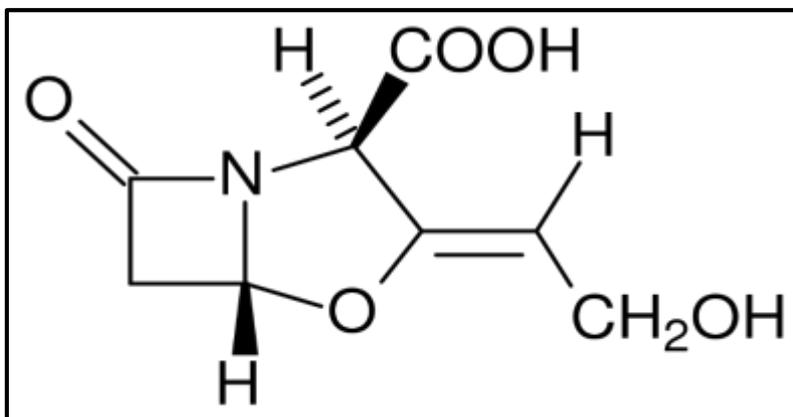


Figure 2 Estructura Química del Ácido Clavulánico

**Formula:** C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>

**CAPÍTULO III**  
**3. MATERIALES Y MÉTODOS**  
**3.1 MATERIALES**

**3.1.1 Insumos**

Tabla 1. Materiales usados en el Análisis de Amoxicilina + Ácido Clavulánico

<b>CANTIDAD</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>CAPACIDAD</b>
2	Beaker	250 ml
4	Pipetas Volumétricas	5 ml
6	Matraz Aforado	100 ml – 250 ml
1	Filtro de Membrana	Poros 0.45um- 47mm
3	Filtros HPLC	Poros 0.45um – 25 mm
3	Jeringas Estériles	5 ml
3	Viales	3 ml
2	Celdas de Cuarzo	1 ml
1	Auxiliar de Pipetas	Goma
1	Piseta de Agua	100 ml

**3.1.2 Reactivos**

- ❖ Estándar de Amoxicilina USP
- ❖ Estándar de Clavulanato de Potasio USP
- ❖ Buffer de Fosfato de Sodio 0.1 M pH 5.0
- ❖ Agua Purificada
- ❖ Metanol grado HPLC

Tabla 2. Identificación de Estándar de Amoxicilina

<b>ESTÁNDARES DE REFERENCIA SECUNDARIO</b>	
<b>NOMBRE</b>	Amoxicilina Polvo Trihidrato
<b>N° DE CONTROL</b>	C21024
<b>LOTE</b>	602012203022
<b>PUREZA</b>	98.49%
<b>FECHA DE ELABORACIÓN</b>	Marzo 08/2020
<b>FECHA DE EXPIRACIÓN</b>	Marzo /2023
<b>CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO</b>	Ambiente 25°C

Tabla 3. Identificación de Estándar de Ácido Clavulánico

<b>ESTÁNDARES DE REFERENCIA SECUNDARIO</b>	
<b>NOMBRE</b>	Clavulanato de Potasio
<b>N° DE CONTROL</b>	C20565
<b>LOTE</b>	3621911302
<b>PUREZA</b>	49.59%
<b>FECHA DE ELABORACIÓN</b>	Septiembre /2019
<b>FECHA DE EXPIRACIÓN</b>	Abril/2022
<b>CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO</b>	Refrigeración 2-8° C

### 3.1.2 Equipos

*Tabla 4. Equipos utilizados en el Análisis de Amoxicilina + Ácido Clavulánico*

<b>EQUIPOS</b>	<b>MARCA</b>	<b>CÓDIGO</b>
Balanza Analítica	Mettler Toledo	RFQBA -269
Potenciómetro	Mettler Toledo	RFQPo-264
Desionizador/Purificador de Agua	N/A	FRQpa-273
Espectrofotómetro UV-Vis	SpectroQuan PROVE 300	ESPEC-4645
Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución	Merck Hitachi EliteChrome	CCL-001

### 3.1.3 Material de Estudio

Producto formulado de Amoxicilina + Ácido Clavulánico 250mg/ml en la presentación 100 ml de polvo para reconstitución.

## 3.2 METODOLOGÍA

### 3.2.1 Selección de la muestra

Se toma una muestra mediante muestreo aleatorio simple, y se seleccionan 3 frascos de Amoxicilina + Ácido Clavulánico en Polvo con una concentración de 250 mg/ml en la presentación por 100 ml, identificado con el lote 912X. La muestra debe cumplir con los criterios de aceptación (Tabla 13) ; si cumple se procede a la preparación de las soluciones y si no cumple se vuelve a seleccionar otra muestra.

Tabla 5. Criterios de Aceptación en la Selección de las Muestras

<b>PARÁMETROS</b>	<b>CRITERIOS DE ACEPTACIÓN</b>
<b>Aspecto</b>	Polvo fino, color blanco a crema, homogéneo, libre de partículas extrañas, olor y sabor a naranja.
<b>Peso</b>	15.00 g $\pm$ 5% 14.250 -15.750 g.
<b>Volumen Reconstituido</b>	100 ml $\pm$ 3 % 97 - 103 MI
<b>pH</b>	3.80 - 6.60
<b>Gravedad Específica</b>	1.0200-1.0600 g/cc
<b>Ensayo Químico</b> <b>Amoxicilina</b>	90-110 %
<b>Ensayo Químico</b> <b>Ácido Clavulánico</b>	90-125 %

### 3.2.1.1 Determinación del Peso de la Muestra

Se tomaron 3 frascos de un lote fabricado, donde se anotó el peso bruto del producto, el peso del recipiente vacío y por diferencia de pesos se obtuvo el peso de la muestra.

### 3.2.1.2 Determinación del Volumen Reconstituido

Se la realiza tomando un volumen de 90 ml agua purificada, colocarlo en el frasco del producto y agitar hasta tener una suspensión homogénea, luego se procede a medir el volumen con la ayuda de una probeta.

### 3.2.1.3 Determinación del pH

Una vez reconstituido el producto se procede a tomar el pH con la ayuda de un potenciómetro, verificando que los valores se encuentren estables y en el intervalo establecido.

### 3.2.1.4 Determinación de la Gravedad Específica.

Se realizan las mediciones con la ayuda de un picnómetro previamente calibrado, se coloca la muestra dentro del picnómetro, se inserta la tapa al picnómetro y se procede a pesar. Registrar el peso para su posterior calculo.

### 3.2.2 Preparación de las soluciones

Se prepararon las soluciones para los estándares, las muestras y los medios de dilución; tanto para el análisis en HPLC y Espectrofotometría UV-Visible.

#### 3.2.2.1 Soluciones utilizadas en el análisis por Cromatografía Líquida y Espectrofotometría Uv Visible.

#### Soluciones Estándares

Tabla 6. Preparación del Estándar Amoxicilina Trihidrato Polvo

PESO DEL ESTÁNDAR DE AMOXICILINA TRIHIDRATO POLVO	114.18 mg
VOLUMEN DE AFORO CON AGUA PURIFICADA	100 mL
CONCENTRACIÓN DEL ESTANDAR	1001.70 µg/mL

Tabla 7. Preparación del Estándar de Clavulanato de Potasio

PESO DEL ESTÁNDAR DE CLAVULANATO DE POTASIO	71.4 mg
VOLUMEN DE AFORO CON AGUA PURIFICADA	100 mL
CONCENTRACIÓN DEL ESTANDAR	249.90 µg/mL

### Soluciones Muestras

Tabla 8. Preparación de la Muestra para Amoxicilina Trihidrato Polvo

PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO 250mg/mL	Por cada 5ml contiene 250 mg de Amoxicilina Trihidrato Polvo
VOLUMEN DE LA MUESTRA DE AMOXICILINA + ÁCIDO CLAVULÁNICO	5mL
VOLUMEN DE AFORO CON AGUA PURIFICADA	250mL
CONCENTRACIÓN DE AMOXICILINA TRIHIDRATO POLVO	1000.0 µg/mL

Tabla 9. Preparación de la Muestra para Ácido Clavulánico

PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO 250mg/mL	Por cada 5ml contiene 62.5 mg de Ácido Clavulánico
VOLUMEN DE LA MUESTRA DE AMOXICILINA + ÁCIDO CLAVULÁNICO	5mL
VOLUMEN DE AFORO CON AGUA PURIFICADA	250mL
CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO CLAVULÁNICO	250.0 µg/mL

### Solución (Fase Móvil)

Tabla 10. Preparación de la Solución Buffer previa a la mezcla de la Fase Móvil

PESO DE BUFFER DE FOSFATO DE SODIO 0.1	7.8 g
VOLUMEN DE AFORO CON AGUA PURIFICADA	1000 mL

Tabla 11. Preparación de la Fase Móvil

MEZCLA EN RELACIÓN DE 95:5	Solución de Buffer de Fosfato de Sodio y Metanol
VOLUMEN DE LA SOLUCIÓN DE BUFFER DE FOSFATO DE SODIO 0.1	950 mL
VOLUMEN DE AFORO CON METANOL GRADO HPLC	50 mL
VOLUMEN FINAL DE LA FASE MOVIL	1000 mL

### 3.2.4 Condiciones del Equipo

#### 3.2.4.1 Condiciones del Equipo de Cromatografía Líquida

- ❖ Encender el computador, seguido del Equipo HPLC.
- ❖ Verificar que el Software del HPLC se conecte con el Computador.
- ❖ Programar y seleccionar el Método a analizar.
- ❖ Ajustar las condiciones necesarias del equipo para la muestra en analisis.
- ❖ Verificar que la Fase Móvil se encuentre en canal correspondiente.
- ❖ Purgar el Equipo HPLC durante un tiempo de 5 a 10 min.
- ❖ Estabilizar el Equipo HPLC durante 45 min y preparar las soluciones estándares y la muestra.
- ❖ Preparar, filtrar y colocar las muestras y los estándares en sus respectivos viales.

- ❖ Colocar los viales en el automuestreador para ejecutar en el Equipo la función de Inyección de muestras, para su posterior análisis e interpretación de resultados.

Tabla 12. Condiciones Cromatográficas

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

<b>Fase Estacionaria</b>	Columna C18 4 mm x 30 cm
<b>Fase Móvil</b>	1000 mL
<b>Flujo</b>	2mL/ min
<b>Volumen de Inyección</b>	20uL
<b>Presión</b>	1350-1500 psi
<b>Horno</b>	25°C
<b>Detector</b>	UV 220 nm

### 3.2.4.2 Condiciones del Equipo de Espectrofotometría UV Visible

- ❖ Encender el computador, seguido del Equipo Espectrofotométrico.
- ❖ Verificar que el Software del equipo se encuentre conectado al computador.
- ❖ Seleccionar el método a analizar.
- ❖ Ajustar las condiciones necesarias del equipo.
- ❖ Estabilizar el Equipo durante 10 min y preparar las soluciones estándares y la muestra.
- ❖ Filtrar las muestras y estándares.
- ❖ Encerar el equipo con un Blanco, el cual contiene agua purificada.
- ❖ Colocar las muestras y los estándares en celdas de cuarzo para ejecutar en el Equipo las lecturas de las absorbancias, para su posterior análisis e interpretación de resultados.

Tabla 13. Condiciones Espectrofotométricas  
CONDICIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS

<b>Blanco</b>	Agua Purificada
<b>Longitud de Onda</b>	210 nm - 230 nm
<b>Temperatura</b>	25°C

### 3.2.5 Determinación de la concentración de los Principios Activos.

#### 3.2.5.1 Cromatografía Líquida

Una vez realizadas las corridas de las muestras, se obtendrán los cromatogramas con las respectivas concentraciones en las unidades de porcentaje (%).

El equipo realiza el cálculo de la concentración mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{Ar(Mt)}{Ar(St)} \times \frac{Conc\ de\ St}{Conc\ de\ Mt} \times 100 = \text{---}\%$$

**Donde;**

**Ar (Mt)** = Área de la Muestra

**Ar (St)** = Área del Estándar

**Conc (Mt)** = Concentración de la Muestra

**Conc (St)** = Concentración del Estándar.

#### 3.2.5.2 Espectrofotometría UV Visible

Una vez realizadas las lecturas de las muestras, se obtendrán las lecturas de las absorbancias con las respectivas concentraciones en las unidades de porcentaje (%).

El equipo realiza el cálculo de la concentración mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{Abs(Mt)}{Abs(St)} \times \frac{Conc\ de\ St}{Conc\ de\ Mt} \times 100 = \text{---}\%$$

**Donde;**

**Abs (Mt)** = Absorbancia de la Muestra

**Abs (St)** = Absorbancia del Estándar

**Conc (Mt)** = Concentración de la Muestra

**Conc (St)** = Concentración del Estándar.

### **3.2.6 Procesamientos de Datos**

Se compararán los datos obtenidos de la concentración de Amoxicilina más Ácido Clavulánico entre los métodos de HPLC y Espectrofotetría UV-Visible en unidades porcentuales (%).

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Selección de las muestras según criterios de aceptación USP.

Se seleccionó la muestra teniendo en cuenta varios parámetros tales como el color, olor, sabor, peso, volúmenes, pH y gravedad específica, que se desempeñen de acuerdo con los criterios de aceptación establecidos, para su posterior análisis de principio activo.

En las características organolépticas como su Aspecto se observó que las 3 muestras seleccionadas presentaron un aspecto de polvo fino, color blanco a crema, homogéneo, libre de partículas extrañas, olor agradable y sabor a naranja cumpliendo con las especificaciones establecidas.

En la Determinación del Peso se obtuvieron los pesos de las muestras en análisis dentro de las especificaciones establecidas, dando como resultado el peso de la Muestra 1; 15.260g, Muestra 2; 15.248g y Muestra 3; 15.253g respectivamente. (Tabla 14,15,16).

Tabla 14. Determinación de Pesos en Muestra 1

#### MUESTRA 1

PESO BRUTO	35.000 g
PESO DEL RECIPIENTE VACÍO	19.256 g
PESO DE LA MUESTRA	<b>15.260 g</b>

Tabla 15. Determinación de Pesos en Muestra 2

#### MUESTRA 2

PESO BRUTO	35.105 g
PESO DEL RECIPIENTE VACÍO	19.857 g
PESO DE LA MUESTRA	<b>15.248 g</b>

Tabla 16. Determinación de Pesos en Muestra 3

#### MUESTRA 3

PESO BRUTO	35.245 g
PESO DEL RECIPIENTE VACÍO	19.992 g
PESO DE LA MUESTRA	<b>15.253 g</b>

En la Determinación del Volumen reconstituido se obtuvo como volumen final de la solución en la Muestra 1; 100 mL, Muestra 2; 101 mL y Muestra 3; 100 mL. (Tabla 17)

Tabla 17. Volumen Reconstituido en Muestra 1, 2, 3 de Análisis

<b>Volumen de Reconstitución</b>	<b>Muestra 1</b>	<b>Muestra 2</b>	<b>Muestra 3</b>
Agua Purificada	90 mL	90 mL	90 mL
Volumen Final de la Solución	100 mL	101 mL	100

En la Determinación del pH, se registraron los valores de 5,53; 5.12; 5,09 respectivamente en cada una de las muestras. (Tabla 18)

Tabla 18. Resultados de pH obtenidos en Muestras 1,2 y 3 de Análisis

<b>PH</b>	<b>3.80 – 6.60</b>
<b>MUESTRA 1</b>	5.23
<b>MUESTRA 2</b>	5.12
<b>MUESTRA 3</b>	5.09

En la Determinación de la Gravedad Específica, se obtuvieron los siguientes datos en la medición de las muestras, Muestra 1; 1,0423g/cc, Muestra 2; 1,0456g/cc y la Muestra 3; 1,0442g/cc. (Tabla 19,20,21).

**Ecuación para determinar la Gravedad Específica**

$$\frac{x - 13,2394}{9,8370} = g/cc$$

Donde X indica la medida en gramos del Picnómetro + Muestra.

Tabla 19. Gravedad Específica de la Muestra 1

<b>MUESTRA 1</b>	
<i>Peso del Picnómetro + Muestra</i>	23.4925 g
<i>Cálculos</i>	
$\frac{23,4925g - 13,2394}{9,8370} = 1,0423g/cc$	

Tabla 20. Gravedad Específica de la Muestra 2

**MUESTRA 2**

<i>Peso del Picnómetro + Muestra</i>	23,5249 g
<i>Cálculos</i>	
$\frac{23,5249g - 13,2394}{9,8370} = 1,0456g/cc$	

Tabla 21. Gravedad Específica de la Muestra 3

**MUESTRA 3**

<i>Peso del Picnómetro + Muestra</i>	23,5111 g
<i>Cálculos</i>	
$\frac{23,5111g - 13,2394}{9,8370} = 1,0442g/cc$	

Tabla 22. Resultados de los Parámetros obtenidos en la Muestras 1,2,3

PARÁMETROS	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MUESTRA 3
<b>Aspecto</b>	Polvo fino, color blanco a crema, homogéneo, libre de partículas extrañas, olor y sabor a naranja.	Cumple	Cumple	Cumple
<b>Peso</b>	15.00 g ± 5% 14.250 -15.750 g.	15.260 g	15.248 g	15.253g
<b>Volumen Reconstituido</b>	100 ml ± 3 % 97 - 103 mL	100 mL	101 mL	100 mL
<b>pH</b>	3.80 - 6.60	5.23	5.12	5.09
<b>Gravedad Específica</b>	1.0200-1.0600 g/cc	1.0423 g/cc	1.0456 g/cc	1.0442 g/cc

En la siguiente tabla se muestran los datos obtenidos de las concentraciones de cada muestra, dando como resultado el contenido de la Muestra 1, Muestra 2 y la Muestra 3.

#### 4.2 Preparación de soluciones para el ensayo de Amoxicilina más Ácido Clavulánico.

##### Cálculos para la preparación de Soluciones Estándares por Cromatografía Líquida y Espectrofotometría.

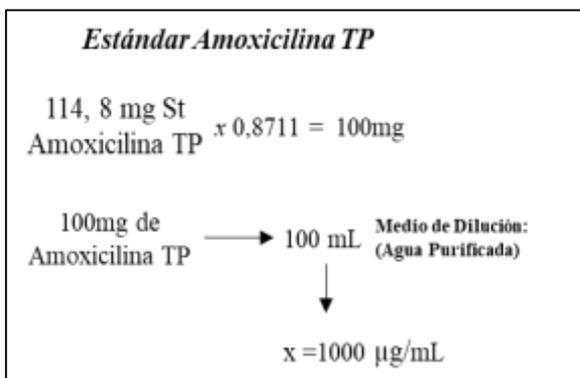


Figure 4. Concentración del Estándar Amoxicilina

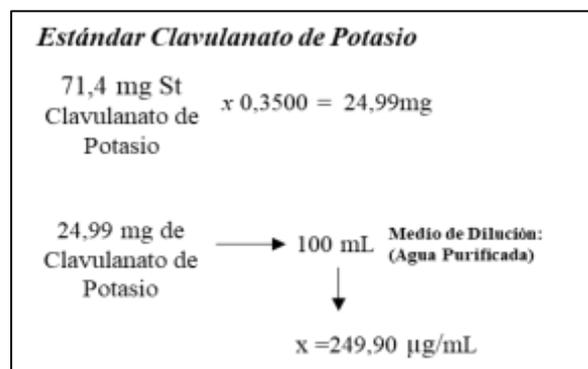


Figure 3. Concentración del Estándar del Ácido Clavulánico

##### Cálculos para la preparación de Soluciones Muestras por Cromatografía Líquida.

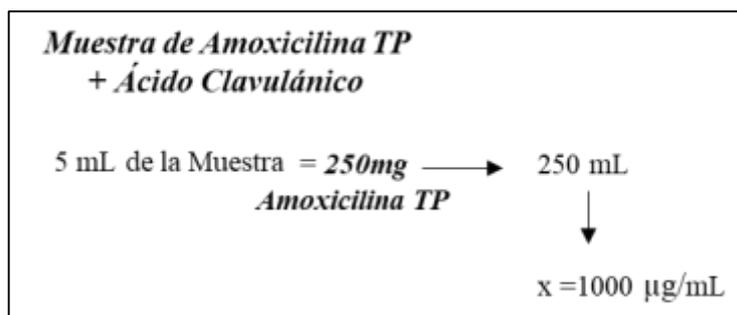


Figure 5. Concentración de la Muestras de Amoxicilina

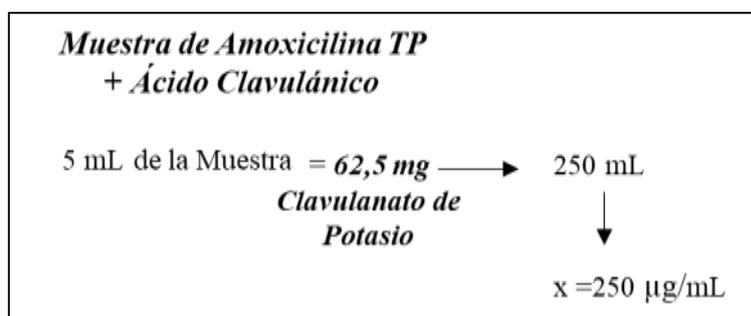


Figure 6. Concentración de Ácido Clavulánico

### 4.3 Determinación la concentración de Amoxicilina más Ácido Clavulánico mediante el ensayo por HPLC.

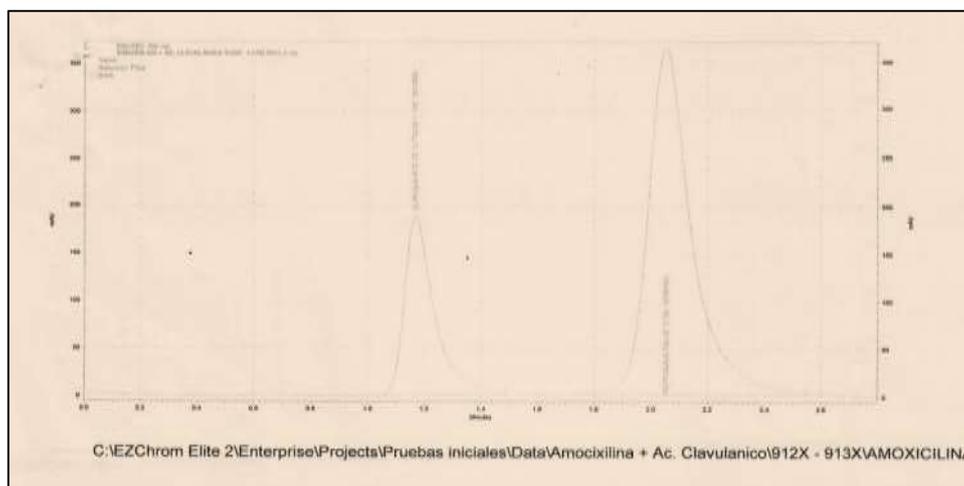


Ilustración 1. Cromatograma de los Estándares de Amoxicilina más Ácido Clavulánico

En la imagen N°3 se muestran los cromatogramas de los picos obtenidos de los Estándares del Ácido Clavulánico en el minuto 1.173 con un área de 5'184.414,00 y de Amoxicilina en el minuto 2.067 con un área de 15'107.432,00 respectivamente.

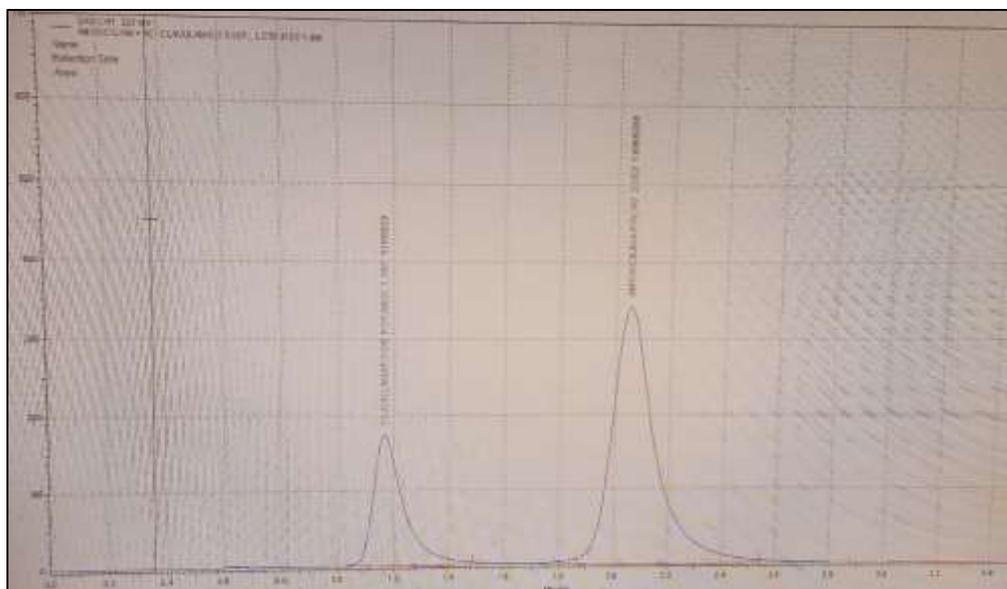


Ilustración 2. Cromatograma de la Muestra 1 de Amoxicilina más Ácido Clavulánico

En la siguiente imagen N°4 se muestran los cromatogramas de los picos obtenidos de la Muestra 1 de Ácido Clavulánico en el minuto 1.167 con un área de 5'888.929,00 y de Amoxicilina en el minuto 2.053 con un área de 14'968.088,00 respectivamente.

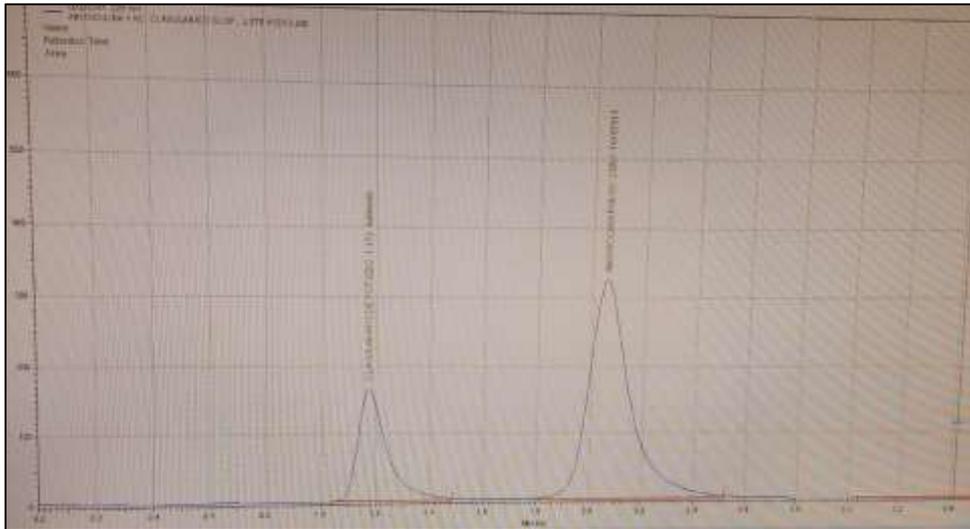


Ilustración 3. Cromatograma de la Muestra 2 de Amoxicilina más Ácido Clavulánico

En la siguiente imagen N°5 se muestran los cromatogramas de los picos obtenidos de la Muestra 2 de Ácido Clavulánico en el minuto 1.173 con un área de 5'890.666,00 y de Amoxicilina en el minuto 2.060 con un área de 14'957.511,00 respectivamente.

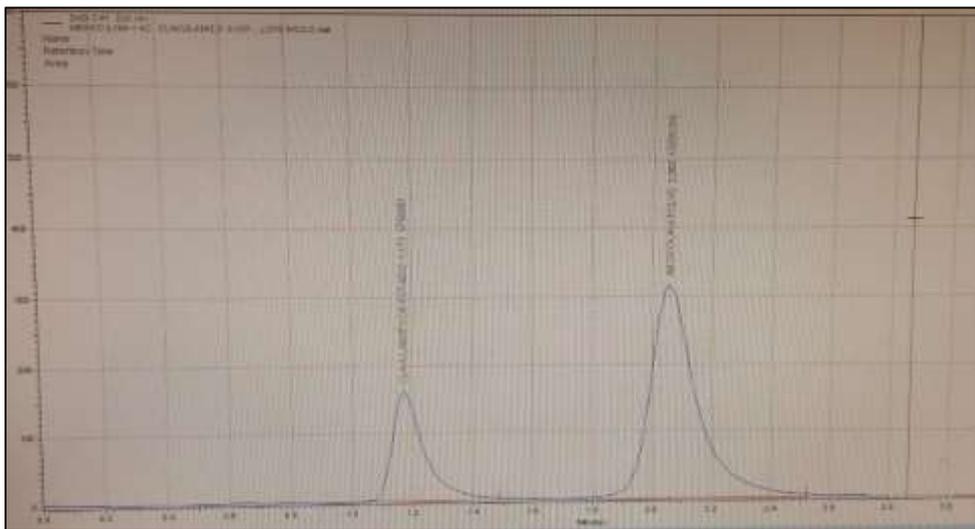


Ilustración 4. Cromatograma de la Muestra 3 de Amoxicilina más Ácido Clavulánico

En la siguiente imagen N°6 se muestran los cromatogramas de los picos obtenidos de la Muestra 3 de Ácido Clavulánico en el minuto 1.173 con un área de 5'856.661,00 y de Amoxicilina en el minuto 2.060 con un área de 14'996.318,00 respectivamente.

Tabla 23. Lecturas Cromatográficas de las Muestras 1, 2, 3 de Amoxicilina más Ácido Clavulánico por HPLC

	Área	Tiempo de Retención	Longitud de Onda	Concentración Teórica (ug/ml)	Concentración Real (%)
<b>Estándar Amoxicilina</b>	15'107.432,00	2.067	220 nm	1000 ug/ ml	N/A
<b>Estándar Ácido Clavulánico</b>	5'184.414,00	1.173	220 nm	249,90 ug/ml	N/A
<b>MUESTRA 1</b>					
<b>Amoxicilina</b>	14'968.088,00	2.053	220 nm	1000,10 ug/ml	99,09 %
<b>Ácido Clavulánico</b>	5'888.929,00	1.167	220 nm	250,00 ug/ml	113.38 %
<b>MUESTRA 2</b>					
<b>Amoxicilina</b>	14'957.511,00	2.060	220 nm	1000,0 ug/ ml	99,00 %
<b>Ácido Clavulánico</b>	5'890.666,00	1.173	220 nm	249,90 ug/ ml	113.60 %
<b>MUESTRA 3</b>					
<b>Amoxicilina</b>	14'996.318,00	2.060	220 nm	1000,10 ug/ ml	99,25 %
<b>Ácido Clavulánico</b>	5'856.661,00	1.173	220 nm	250 ug/ml	112.78 %

En la siguiente tabla se muestran los datos obtenidos de las concentraciones de cada muestra por el Método de HPLC, dando como resultado que la Muestra 1 contiene 99.09% de Amoxicilina y 113.38% de Ácido Clavulánico, la Muestra 2 contiene 99.00% de Amoxicilina y 113.60% de Ácido Clavulánico y la Muestra 3 contiene 99.25% de Amoxicilina y 112.78% de Ácido Clavulánico. Tabla 23.

**4.4 Determinar la Concentración de Amoxicilina más Ácido Clavulánico mediante el ensayo por Espectrofotometría UV Visible.**

Wavelength Program			
Date:04 /02/2022	Time: 15:12:19	Method: WP1	AMOXICILINA+ AC CLAV.
Slit: UV/VIS: 1.00 nm			LOTE: 912 X
Analyst: WZP			ANÁLISIS QUÍMICO
Sample ID	Cyc Factor	210,00 nm	230,00 nm
AMOXI+ACCLAV	1 1,0000	0,3320	0,7974
STANDAR	1 1,0000	0,3319	0,7988
LOTE912 X	1 1,0000	0,3523	0,8120
MT1	1 1,0000	0,3522	0,8122
LOTE912 X	1 1,0000	0,3510	0,8124
MT2	1 1,0000	0,3510	0,8123
LOTE912 X	1 1,0000	0,3502	0,8145
MT3	1 1,0000	0,3502	0,8140

Ilustración 5.Lecturas UV Visible Amoxicilina más Ácido Clavulánico

En la siguiente imagen N°7 se muestran las lecturas de absorbancias de los Estándares de Amoxicilina y Acido Clavulánico; así como de la Muestra 1 Muestra 2 y Muestra 3 respectivamente.

Tabla 24. Lecturas UV de las Muestras 1, 2, 3 de Amoxicilina + Ácido Clavulánico por Espectrofotometría

	Absorbancia	Longitud de Onda	Concentración Teórica ug/ml	Concentración (%)
<b>Estándar Amoxicilina</b>	0,7981	230,00 nm	1000 ug/ ml	N/A
<b>Estándar Ácido Clavulánico</b>	0,3319	210,00 nm	249,90 ug/ml	N/A
<b>MUESTRA 1</b>				

<b>Amoxicilina</b>	0,8122	230,00 nm	1000,10 ug/ml	<b>101,76 %</b>
<b>Ácido Clavulánico</b>	0,3522	210,00 nm	250,00 ug/ml	<b>106,15 %</b>
<b>MUESTRA 2</b>				
<b>Amoxicilina</b>	0,8124	230,00 nm	1000,0 ug/ ml	<b>101,79%</b>
<b>Ácido Clavulánico</b>	0,3510	210,00 nm	249,90 ug/ ml	<b>105,75 %</b>
<b>MUESTRA 3</b>				
<b>Amoxicilina</b>	0,8143	230,00 nm	1000,10 ug/ ml	<b>102,02 %</b>
<b>Ácido Clavulánico</b>	0,3502	210,00 nm	250 ug/ml	<b>105,47 %</b>

En la siguiente tabla se muestran los datos obtenidos de las concentraciones de cada muestra por el Método de Espectrofotometría UV Visible, dando como resultado que la Muestra 1 contiene 99.09% de Amoxicilina y 113.38% de Ácido Clavulánico, la Muestra 2 contiene 99.00% de Amoxicilina y 113.60% de Ácido Clavulánico y la Muestra 3 contiene 99.25% de Amoxicilina y 112.78% de Ácido Clavulánico.

**4.5 Establecer un cuadro comparativo en base a los resultados obtenidos entre el método analítico estandarizado por HPLC y el método por Espectrofotometría UV Visible.**

Tabla 25. Concentraciones de Amoxicilina más Ácido Clavulánico en Polvos para Reconstitución por HPLC y Espectrofotometría UV Visible.

<b>CONCENTRACIONES DE AMOXICILINA MÁS ÁCIDO CLAVULÁNICO EN POLVOS PARA RECONSTITUCIÓN 250mg/ml</b>		
<b>MÉTODOS ANÁLITICOS</b>	<b>CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (%)</b>	<b>ESPECTROFOTOMETRÍA UV- VISIBLE (%)</b>
<b>MUESTRA 1</b>		
<b>Amoxicilina</b>	99.09 %	101,76 %
+		
<b>Ácido Clavulánico</b>	113.38 %	106,15%
<b>MUESTRA 2</b>		
<b>Amoxicilina</b>	99.00 %	101,79 %
+		
<b>Ácido Clavulánico</b>	113.60 %	105,75 %
<b>MUESTRA 3</b>		
<b>Amoxicilina</b>	99.25 %	102, 02 %
+		
<b>Ácido Clavulánico</b>	112.78 %	105, 47 %

En la siguiente tabla se detallan los datos obtenidos de las concentraciones de cada muestra mediante dos Métodos Analíticos realizados por HPLC y Espectrofotometría UV Visible.

Se realizó el análisis estadístico de Comparación de Muestras por el Software Statgraphics Centurión IX el cual está diseñado para comparar dos o múltiples muestras de datos.

### **Comparación de Dos Muestras - ESPECTROFOTOMETRÍA & HPLC para Amoxicilina.**

Al ejecutar varias pruebas para determinar si hay diferencias estadísticamente significativas entre los dos métodos se obtuvo que:

**Muestra 1:** Concentraciones de Amoxicilina por Espectrofotometría UV Visible

**Muestra 2:** Concentraciones de Amoxicilina por HPLC

Muestra 1: 3 valores en el rango de 101,76% a 102,02%

Muestra 2: 3 valores en el rango de 99,0% a 99,25%

### **Análisis Estadístico**

	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>
<b>ESPECTROFOTOMETRÍA</b>	3	101,857%	0,142244%
<b>HPLC</b>	3	99,1133%	0,126623%
<b>Total</b>	6	100,485%	1,50741%

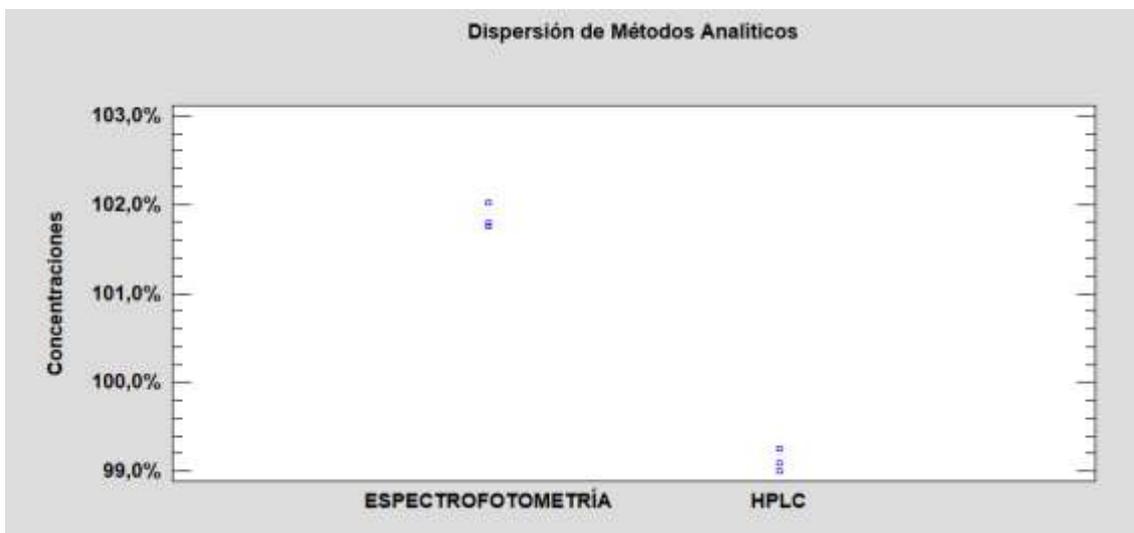
	<i>Coficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
<b>ESPECTROFOTOMETRÍA</b>	0,139651%	101,76%	102,02%
<b>HPLC</b>	0,127756%	99,0%	99,25%
<b>Total</b>	1,50013%	99,0%	102,02%

	<i>Rango</i>	<i>Sesgo Estandarizado</i>
<b>ESPECTROFOTOMETRÍA</b>	0,26%	1,16374
<b>HPLC</b>	0,25%	0,566446
<b>Total</b>	3,02%	0,00339901

	<i><b>ESPECTROFOTOMETRÍA</b></i>	<i><b>HPLC</b></i>
<b>Recuento</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>Promedio</b>	101,857%	99,1133%
<b>Desviación Estándar</b>	0,142244%	0,126623%
<b>Coefficiente de Variación</b>	0,139651%	0,127756%
<b>Mínimo</b>	101,76%	99,0%
<b>Máximo</b>	102,02%	99,25%
<b>Rango</b>	0,26%	0,25%
<b>Sesgo Estandarizado</b>	1,16374	0,566446

Esta tabla muestra el análisis estadístico para las dos muestras de datos. De particular interés son el sesgo estandarizado donde se usa para comparar si las muestras provienen de distribuciones normales. Valores de estos estadísticos fuera del rango de -2 a +2 indican desviaciones significativas de la normalidad, lo que tendería a invalidar las pruebas que comparan las desviaciones estándar.

En este caso, ambos valores de sesgo estandarizado se encuentran dentro del rango esperado.



#### 4.5.2 Verificación de Varianza

<i>Comparación</i>	<i>Sigma1</i>	<i>Sigma2</i>	<i>F-Ratio</i>
ESPECTROFOTOMETRÍA / HPLC	0,142244%	0,126623%	1,26195

<i>Comparación</i>	<i>P-Valor</i>
ESPECTROFOTOMETRÍA / HPLC	0,8842

#### Comparación de Medias

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de ESPECTROFOTOMETRÍA:  
101,857% +/- 0,353353% [101,503%; 102,21%]

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de HPLC: 99,1133% +/- 0,314548%  
[98,7988%; 99,4279%]

Intervalos de confianza del 95,0% intervalo de confianza para la diferencia de medias  
suponiendo varianzas iguales: 2,74333% +/- 0,30527% [2,43806%; 3,0486%]

#### Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula:  $media1 = media2$

Hipótesis Alt.:  $media1 < > media2$

Suponiendo varianzas iguales:  $t = 24,9509$  valor-P = 0,0000153168

Se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0,05$ .

De interés particular es el intervalo de confianza para la diferencia entre las medias, el cual se extiende desde 2,43806% hasta 3,0486%. Puesto que el intervalo no contiene el valor 0, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos muestras, con un nivel de confianza del 95,0%.

Los estadísticos mostrados en esta tabla evalúan la hipótesis nula de que las desviaciones estándar dentro de cada una de las 2 columnas (Sigma 1 y Sigma 2 ) son iguales. De particular interés es el valor-P. Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe

una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza.

### **Comparación de Dos Muestras - ESPECTROFOTOMETRÍA & HPLC para Ácido Clavulánico.**

Al ejecutar varias pruebas para determinar si hay diferencias estadísticamente significativas entre los dos métodos se obtuvo que:

**Muestra 1: Concentraciones de Ácido Clavulánico por Espectrofotometría UV Visible.**

**Muestra 2: Concentraciones de Concentraciones de Ácido Clavulánico por HPLC.**

Muestra 1: 3 valores en el rango de 105,47 a 106,15

Muestra 2: 3 valores en el rango de 112,78 a 113,6

Este procedimiento está diseñado para comprar dos muestras de datos. Calculará varias estadísticas y gráficas para cada muestra, y ejecutará varias pruebas para determinar si hay diferencias estadísticamente significativas entre las dos muestras.

	<i>ESPECTROFOTOMETRÍA</i>	<i>HPLC</i>
<b>Recuento</b>	3	3
<b>Promedio</b>	105,79	113,253
<b>Desviación Estándar</b>	0,34176	0,424421
<b>Coefficiente de Variación</b>	0,323055%	0,374754%
<b>Mínimo</b>	105,47	112,78
<b>Máximo</b>	106,15	113,6
<b>Rango</b>	0,68	0,82
<b>Sesgo Estandarizado</b>	0,367321	-0,865063

En este caso, ambos valores de sesgo estandarizado se encuentran dentro del rango esperado.

### **Comparación de Medias**

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de ESPECTROFOTOMETRÍA: 105,79

+/- 0,848979

[104,941; 106,639]

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de HPLC: 113,253 +/- 1,05432  
[112,199; 114,308]

Intervalos de confianza del 95,0% intervalo de confianza para la diferencia de medias  
suponiendo varianzas iguales: -7,46333 +/- 0,873493 [-8,33683; -6,58984].

### **Prueba t para comparar medias**

Hipótesis nula:  $\mu_1 = \mu_2$

Hipótesis Alt.:  $\mu_1 \neq \mu_2$

suponiendo varianzas iguales:  $t = -23,7227$  valor-P = 0,0000187225

Se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0,05$ .

De interés particular es el intervalo de confianza para la diferencia entre las medias, el cual se extiende desde -8,33683 hasta -6,58984. Puesto que el intervalo no contiene el valor 0, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos muestras, con un nivel de confianza del 95,0%.

### **Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar**

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.:  $\sigma_1 \neq \sigma_2$

$F = 0,648409$  valor-P = **0,786709**

No se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0,05$ .

De particular interés es el intervalo de confianza para la razón de varianzas, el cual se extiende desde 0,0166259 hasta 25,2879. Puesto que el intervalo contiene el valor de 1, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar de las dos muestras con un nivel de confianza del 95,0% .

De acuerdo con el análisis estadístico de comparación de grupos de datos en este caso los datos obtenidos por HPLC y Espectrofotometría UV Visible son comparables o similares estadísticamente con los valores obtenidos por el método HPLC que es el método de referencia.

Con lo cual la hipótesis nula queda aprobada y en este caso se puede usar el Método Espectrofotométrico para realizar este análisis.

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

#### **CONCLUSIONES**

El método analítico presentado en la investigación posee la ventaja de no requerir pretratamiento de la muestra, ya que las mismas son disueltas en condiciones normales sin pérdida de analitos, evitando el empleo de métodos separativos previos o de otro pretratamiento de la muestra. Esto es importante debido a que las muestras reales presentan excipientes, los cuales conforman una matriz de interferencias que no afecta al método analítico propuesto.

En bibliografía se observa un gran número de investigaciones relacionados a la determinación de amoxicilina más ácido clavulánico en muestras farmacéuticas. En general, estas metodologías publicadas incluyen equipo instrumental de muy elevado costo, lo cual lo hace poco accesible a pequeños laboratorios de control de calidad o laboratorios de bajos recursos. La metodología propuesta permite realizar análisis de control de calidad de amoxicilina en muestras farmacéuticas reales, empleando herramientas analíticas asequibles para cualquier laboratorio de bajos recursos presupuestarios.

Debido a su bajo costo de implementación, la metodología multivariada propuesta es adecuada para laboratorios de control de calidad, laboratorios de rutina y de bajos recursos presupuestarios, para la cuantificación rápida y confiable de Amoxicilina más Ácido Clavulánico en productos farmacéuticos comerciales.

Las muestras analizadas provenientes de los laboratorios mencionados dan resultados analíticos a las pruebas físico-químicas que demuestran la óptima calidad de los medicamentos.

## RECOMENDACIONES

- ❖ Se recomienda al Laboratorio realizar calificación técnica al personal de Análisis Físicoquímico de Producto Terminado para la utilización correcta y adecuada de esta metodología.
- ❖ Continuar los estudios comparativos de Amoxicilina más Ácido Clavulánico 250 mg/5 mL suspensión oral, mediante otros tipos de metodologías analíticas.
- ❖ Ampliar el número de lotes analizados por producto, así como también la cantidad de laboratorios en estudio; para ello se podría tener en cuenta muestras de diferente procedencia.
- ❖ Realizar estudios comparativos similares al desarrollado en este trabajo de tesis con otros antibióticos de uso común en la población.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abril, N., Fernandez, E., Barcena, A., Galván, A., Jorrín, J., & Peinado, J. (2017). *Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*. Obtenido de chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Fwww.uco.es%2Fdptos%2Fbioquimica-biol-mol%2Fpdfs%2F08\_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf&clen=357438&chunk=true
2. Ares, A., Garrido, C., & Miguélez, A. (2018). Amoxicilina Acido Clavulanico. ¿Cuál es la dosis? ¿Qué presentación usamos? *Grupo Patología Infecciosa*.
3. Avelina, M. (2018). *Cromatografía Analítica*. Obtenido de Liquida y Gases: efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Fwww.ucm.es%2Fdata%2Fcont%2Fdocs%2F650-2013-12-02-gases%25201%25C3%25ADquidos.pdf&clen=36501&chunk=true
4. Barcelona, L., Marin, M., & Stamboulian, D. (2008). Betalactamicos con Inhibidores de Belactamasas Amoxicilina- Sulbactam. *MEDICINA Fundación Centro de Estudios Infectológicos (FUNCEI), Buenos Aires*, 65-74.
5. Briozzo, G., Perego, M., & Moiron , M. (2015). Comparación de dos métodos para la determinación de fosfatasa alcalina en suero. *Revista del Hospital Materno Infantil Ramón*, 2. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/912/91226402.pdf>
6. Cromtek. (2021, Febrero). *QUÍMICA ANALÍTICA: MÉTODOS EN EL LABORATORIO*. Obtenido de Clasificacion de Los Metodos Analiticos: <https://www.cromtek.cl/2021/07/12/quimica-analitica-metodos-en-el-laboratorio/>
7. Cumba , A., & Calderón, C. (2011, Enero 20). *Desarrollo y Validación de un Método Espectrofotométrico para Cuantificación de Claritromicina en Comprimidos*. Obtenido de Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador: [http://www.usfx.bo/nueva/vicerrectorado/citas/SALUD\\_10/Quimica\\_Farmacutica/66.pdf](http://www.usfx.bo/nueva/vicerrectorado/citas/SALUD_10/Quimica_Farmacutica/66.pdf)

8. De Battista, G. A. (2005). Cuantificación de amoxicilina en formas farmacéuticas por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. *Rev. Cienc. Tecnol.*, 18-27.
9. Huber, L. (2010). Buenas prácticas de Laboratorio y Buenas prácticas de Manufactura. *Agilent Technologies*.
10. Lloyd, S., Kikland, J., & Dolan, J. (2009). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. EE.UU: Hoboken.
11. Mendez, H. (2019). *Espectrofotometría de Fluorescencia*. Obtenido de Métodos Analíticos:  
[https://www.academia.edu/28694197/Espectrofotometr%C3%ADa\\_de\\_Fluorescencia](https://www.academia.edu/28694197/Espectrofotometr%C3%ADa_de_Fluorescencia)
12. Ospina, D., & Hernández, Y. (2018). Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. *Revista Semilleros: Formación Investigativa*, 4.
13. Ponce, I., Arráez, N., & Hermida, I. (2007). Paciente con fracaso hepático agudo tras toma. *Revista Clínica de Medicina de Familia*, 92-96.
14. S.L., P. I. (2015, Septiembre 14). *Diferentes procedimientos de análisis*. Obtenido de Equipos de medida - Balanzas - Regulación y control: <https://www.pce-iberica.es/instrumentos-de-medida/instrumentos-laboratorios/analisis-instrumental.htm>
15. Seija, V., & Vignoli, R. (2014). Temas de bacteriología y Virología Médica (Principales grupos de Antibióticos). *Academia*, 631-638.
16. Soledad, B. (2016). Estudio, desarrollo y aplicación de polímeros molecularmente impresos para la determinación de antibióticos en leche por cromatografía líquida de alta presión con detección en el ultravioleta (HPLC-UV).
17. Torres, A. (2017, Junio). *Desarrollo de una síntesis de cristales porosos magnéticos para la extracción en fase sólida de arsénico*. Obtenido de chrome-extension://efaidnbmnnnibpajpcgclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Fcimav.repositorioinstitucional.mx%2Fjspui%2Fbitstream%2F1004%2F2127%2F1%2FAbraham\_Tesis\_Borrador%2520V5%2520Final.pdf&cien=5337060
18. Universidad del Litoral. (2016). *desarrollar metodologías fácilmente aplicables al análisis de mezclas de componentes de preparados farmacéuticos*. Obtenido de

<https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/20/cap1.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

19. USP. (2012). *Farmacopea de Estados Unidos de America* .
20. Velasteguí, J. G. (2012). Validación del Método Analítico de Valoración de Amoxicilina en Polvo para Suspensión Oral Fabricado por Betapharma S.A. Mediante HPLC. *DSpace ESPOCH*.
21. Vinagre, J. (2021). *CALIDAD DE METODOS ANALITICOS*. Obtenido de CRITERIOS PARA LA ELECCION DE UN METODO:  
<https://www.fao.org/3/ah833s/AH833S15.htm>

## ANEXOS



