

## Evaluación de los métodos analíticos para el control de calidad de ampicilina y oxacilina

Evaluation of the analytical methods for the quality control of ampicillin and oxacillin

Lisandra García Borges <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-4546-3936>

Marilyn López Armas <sup>1</sup>

Vivian Martínez Espinosa <sup>1</sup>

Caridad M. García Peña <sup>1</sup>

Alfredo Fernández Martínez <sup>2</sup>

Marlén Cárdenas Peña <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. La Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Empresa Farmacéutica 8 de Marzo. La Habana, Cuba.

\*Autor de correspondencia: [lisandra.garcia@cidem.cu](mailto:lisandra.garcia@cidem.cu)

### RESUMEN

**Introducción:** La calidad de la materia prima que se destina a la industria farmacéutica es muy importante para el desarrollo de un medicamento. Por este motivo, se incrementan las exigencias de las regulaciones internacionales para garantizar su seguridad y eficacia. Para lo que se supervisa el cumplimiento de las buenas prácticas en la producción, a partir del análisis confiable de los ingredientes activos farmacéuticos. En el presente artículo se estudian la ampicilina y la oxacilina por ser materias primas que se emplean en la fabricación de antibióticos de amplio espectro de actividad y alta demanda en la población.

**Objetivo:** Evaluar el desempeño que tienen los métodos analíticos empleados en la cuantificación del Ingrediente Activo Farmacéutico en el análisis del control de calidad de la ampicilina y la oxacilina que se destina a la producción.

**Métodos:** Se emplearon la cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa. Se realizó la evaluación teniendo en cuenta los parámetros de validación atendiendo a la Categoría I (Clase C), cumpliendo con las regulaciones vigentes en Cuba.

**Resultados:** El método analítico que se utilizó para cada Ingrediente Activo Farmacéutico cumple con los requerimientos establecidos de linealidad en un rango de 50 a 150 %, precisión CV < 2 %, selectividad y exactitud.

**Conclusión:** Los métodos analíticos que se utilizan en la cuantificación del Ingrediente Activo Farmacéutico son válidos para realizar el control de calidad de la ampicilina y la oxacilina que se destina a la producción y permiten cumplir las exigencias regulatorias vigentes.

**Palabra clave:** ampicilina; oxacilina; validación; cromatografía.

## ABSTRACT

**Introduction:** The quality of the raw material destined to the pharmaceutical industry is a critical point in the development of a medicine, for which the international regulatory requirements have been increasing in order to guarantee the safety and efficacy of the drugs. In this regard, it is supervised the compliance with the good practices in the production based on reliable analysis of pharmaceutically active ingredients. For this study, ampicillin and oxacillin were selected because they are raw materials used in the manufacture of antibiotics with a broad spectrum of activity and high demand in the population.

**Objective:** To evaluate the performance of the analytical methods implemented in the quantification of the Active Pharmaceutical Ingredient (IFA, by its acronym in Spanish) to be used during the analysis of quality control of ampicillin and oxacillin for production.

**Methods:** The method of analysis used for the quantification of the Active Pharmaceutical Ingredient was the high resolution liquid chromatography of reverse phase. The evaluation was made taking into account the validation parameters attending to Category I (Class C) complying with the regulations in force in Cuba.

**Results:** The analytical method used for each IFA meets the established requirements of linearity in a range of 50 to 150%, CV precision < 2%, selectivity and accuracy.

**Conclusion:** The analytical methods used in the quantification of the IFA are valid to conduct the quality control of ampicillin and oxacillin that are destined to production and permit the accomplishment of the current regulatory requirements.

**Keyword:** ampicillin; oxacillin; validation; chromatography.

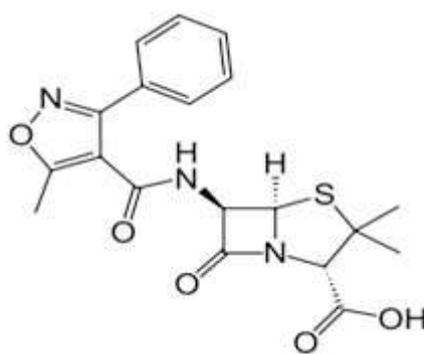
Recibido: 15/03/2018

Aceptado: 17/04/2019

## INTRODUCCIÓN

La calidad de la materia prima que se destina a la industria farmacéutica es muy importante para el desarrollo de un medicamento. Por este motivo, se incrementan las exigencias de las regulaciones internacionales para garantizar su seguridad y eficacia. Para lo que se supervisa el cumplimiento de las buenas prácticas en la producción, a partir del análisis confiable de los ingredientes activos farmacéuticos. En el presente artículo se estudian la ampicilina y la oxacilina por ser materias primas que se emplean en la fabricación de antibióticos de amplio espectro de actividad y alta demanda en la población.

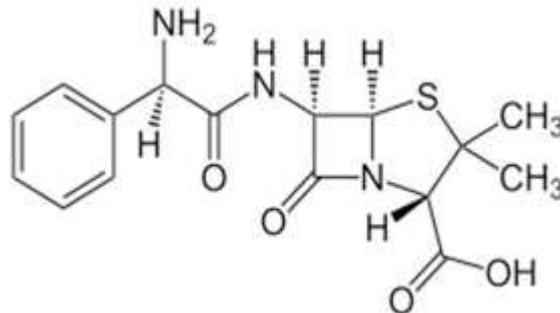
Pocos hallazgos en la práctica de la medicina han tenido el impacto que tuvo el descubrimiento de las penicilinas. Después de su introducción inicial en el tratamiento de infecciones estafilocócicas hubo una disminución de la efectividad de la penicilina G, debido a la aparición de estafilococos productores de betalactamasas. Esta situación promovió el desarrollo de investigaciones que impulsaron la producción de penicilinas semisintéticas penicilinasas resistentes<sup>(1)</sup>. Poseen una cadena lateral acílica que inhibe la acción de la penicilinasas, por lo que previene la apertura del anillo betalactámico y supera en estabilidad hidrolítica a la penicilina, entre estas se encuentra la oxacilina (Fig. 1).



Fuente: United States Pharmacopeial Convention. USP XXXX-NF-35. Official Monographs.

**Fig. 1** - Estructura química de la oxacilina.

Este grupo no cubría el espectro antimicrobiano para Gram negativo, lo que motivó que los investigadores decidieran modificar la estructura básica de los betalactámicos y crearan las penicilinas de amplio espectro.<sup>(2)</sup> Estos fármacos mantienen la actividad bactericida de las otras penicilinas y, además, tienen una actividad mayor contra los Gram negativos porque tienen una gran penetración a través de su membrana externa.<sup>(1)</sup> En estas penicilinas de amplio espectro clasifica la ampicilina, (Fig. 2).



Fuente: United States Pharmacopeial Convention. USP XXXX-NF-35. Official Monographs.

**Fig. 2** - Estructura química la ampicilina.

La oxacilina es uno de los antibióticos de elección para casi todas las enfermedades estafilocócicas, a pesar de la creciente frecuencia de aislamiento de los microorganismos meticilina resistentes. Su acción depende de su capacidad para alcanzar y unirse a las proteínas que ligan penicilinas, que se localizan en las membranas citoplasmáticas bacterianas. Se indica para el tratamiento de la neumonía estafilocócica; septicemia bacteriana; sinusitis; infecciones de la piel y tejidos blandos entre otras.<sup>(3)</sup> Se administra mediante inyección por vía intramuscular o intravenosa o se administra en infusión por vía intravenosa.<sup>(3)</sup>

La ampicilina es un antibiótico de amplio espectro bactericida y activo por vía oral. Se formó por la adición de un grupo amino a la molécula básica de benzil penicilina.<sup>(2)</sup> Se desarrolló por primera vez en 1961, para su síntesis se utilizó un derivado de la fenilglicina y ácido 6-aminopenicilánico.<sup>(4)</sup> Actúa inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana uniéndose a unas proteínas específicas llamadas PBPs (*Penicillin-Binding Proteins*) que se localizan en la pared celular. Tiene actividad contra enterococos y *haemophilus influenzae*, y menor contra *S. Piogenes*, *S. Pneumoniae*, *Neisseria species* y *Clostridium Species*.<sup>(5)</sup> Se utiliza para el tratamiento de infecciones debidas a organismos susceptibles como la otitis media, la sinusitis y las cistitis. Es el fármaco que se prefiere

para el tratamiento de infecciones urinarias producidas por enterococos sensibles, pues tiene un bajo costo y baja toxicidad.<sup>(5)</sup> Este medicamento puede administrarse en solución inyectable intramuscular o intravenosa, tabletas, cápsulas, suspensión inyectable o por vía oral.<sup>(3)</sup>

La Regulación 61/2012, del Centro Estatal para el Control de los Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED) tiene entre sus objetivos garantizar el cumplimiento de los estándares de calidad en el desarrollo de cada uno de estos antibióticos, por lo que enfatiza en la caracterización de la materia prima. Plantea la exigencia regulatoria de realizar la validación, evaluación o estandarización, según corresponda, de los métodos de análisis empleados en la cuantificación del Ingrediente Activo Farmacéutico (IFA), ya sea por métodos farmacopeicos o por los desarrollados por el fabricante.<sup>(6,7)</sup>

La validación de las metodologías analíticas permite garantizar la calidad del proceso resultante en productos farmacéuticos, lo que otorga la confianza necesaria, a la vez que confiere un elevado grado de comparabilidad entre los resultados de los análisis químicos. Aunque los procedimientos analíticos farmacopéicos no necesitan ser validados íntegramente si su alcance es justificar el control de calidad, sí debe verificarse la aptitud del método analítico en condiciones reales del laboratorio. Las características de desempeño usualmente recomendadas, de acuerdo a los parámetros establecidos en los estudios de validación, son selectividad, linealidad y precisión.<sup>(7,8,9)</sup>

La literatura muestra diferentes métodos para la determinación de estos antibióticos. Entre ellos se referencian: la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), el análisis de inyección en flujo (FIA) junto al detector de luminiscencia y la electroforesis.<sup>(2,10,11)</sup> En la actualidad, la estrategia que más se utiliza para la determinación de estas penicilinas es el CLAR, debido a su selectividad, sensibilidad, eficacia y reproducibilidad, además por la naturaleza polar, no volátil y termosensible de los antibióticos.<sup>(2,11,12)</sup> Hay algunas condiciones de detección relacionadas con CLAR para la cuantificación de estos antibióticos de acuerdo a la matriz de trabajo como son: la espectrofotometría, fluorescencia y espectrometría de masas.<sup>(2,10,11,12,13)</sup>

El objetivo de la investigación es evaluar el desempeño que tienen los métodos analíticos empleados en la cuantificación del Ingrediente Activo Farmacéutico en el análisis del control de calidad de la ampicilina y la oxacilina que se destina a la producción

## MÉTODOS

Las materias primas, ampicilina trihidratada y oxacilina fueron proporcionada por la Empresa Farmacéutica 8 de Marzo (La Habana, Cuba), con un porcentaje de pureza mayor del 99 %.

Los disolventes y reactivos que se utilizaron fueron de calidad CLAR (Merck, Alemania) Se utilizó sustancia de referencia química de calidad USP (Estados Unidos) correspondiente a cada IFA con pureza mayor del 99 %.

Se empleó un cromatógrafo de líquidos modelo *Knauer* (Alemania) equipado con bomba isocrática, inyector automático con un volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$  e integrador (*SHIMADZU CR 8 A*), detector UV (ultravioleta) modelo *Knauer* acoplados a una PC con el programa *Biochrom* (CIGB, Cuba). Se usó la columna *LiChrosorb RP-18* encapada con diámetro de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , con dimensiones de 4.6-mm  $\times$  15 cm y la temperatura del horno de  $30 \pm 5^\circ\text{C}$ .

La fase móvil en el caso de la ampicilina consistió en la preparación de solución de fosfato ajustado a pH ligeramente ácido y acetonitrilo, en diferentes proporciones: eluente A: (1:15) v/v; eluente B:(3:7) v/v. La elución fue en gradiente utilizando cambios de proporción entre los eluentes (t = 0 min 100 % A, 0 % B; t=6 min 100 % A, 0 %B; t =15 min 0 % A, 100 % B; t = 18 min 100 % A, 0 % B) a un caudal de 1 ml  $\text{min}^{-1}$ . La longitud de onda de detección fue de 215 nm.

Para la oxacilina, la fase móvil se preparó con solución tampón de fosfato de potasio monobásico, acetonitrilo y metanol en las proporciones 70:30:10 v/v, a un caudal de 1 ml  $\text{min}^{-1}$ . La longitud de onda de detección fue de 230 nm.

La evaluación del desempeño del método se realizó teniendo en cuenta los lineamientos para la validación que estableció la Conferencia internacional de armonización (ICH) y la farmacopea USP.<sup>(4,6,10)</sup> A los valores obtenidos en cada ensayo se le determinó la homogeneidad de varianza para demostrar el comportamiento normal de los datos y se procesaron a partir de métodos paramétricos como el *ANOVA* simple, regresión lineal, con la utilización del software estadístico *Stagaphic plus* versión 5.5. Los parámetros que se analizaron fueron:

### *Selectividad*

Las muestras se sometieron a diferentes condiciones drásticas: hidrólisis ácida HCL 1 N, hidrólisis básica NaOH 1 N, oxidación con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , temperatura 1 h por reflujo y luz sola durante siete días. Cada una de las muestras degradadas se inyectó para obtener

cromatogramas independientes, así como las muestras sin degradar y las sustancias de referencia química USP.

#### *Linealidad*

Se evaluó por triplicado en muestras de la sustancia de referencia química de cada uno de los analitos a determinar, con diferentes niveles de concentración correspondientes a 50 %, 75 %, 100 %, 125 % y 150 % de principio activo. La evaluación de la linealidad se realizó a través de los estadígrafos de regresión simple, la determinación del coeficiente de variación de los factores de respuesta y el nivel de significación del intercepto asumiendo una confianza del 95 %.<sup>(7)</sup>

#### *Precisión*

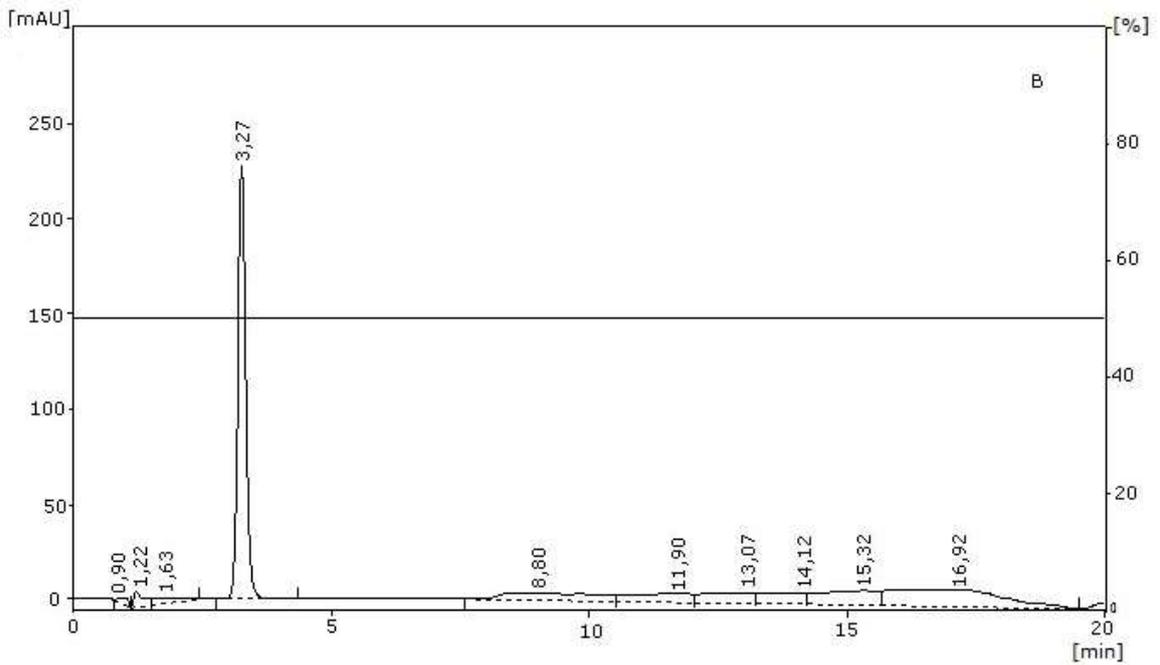
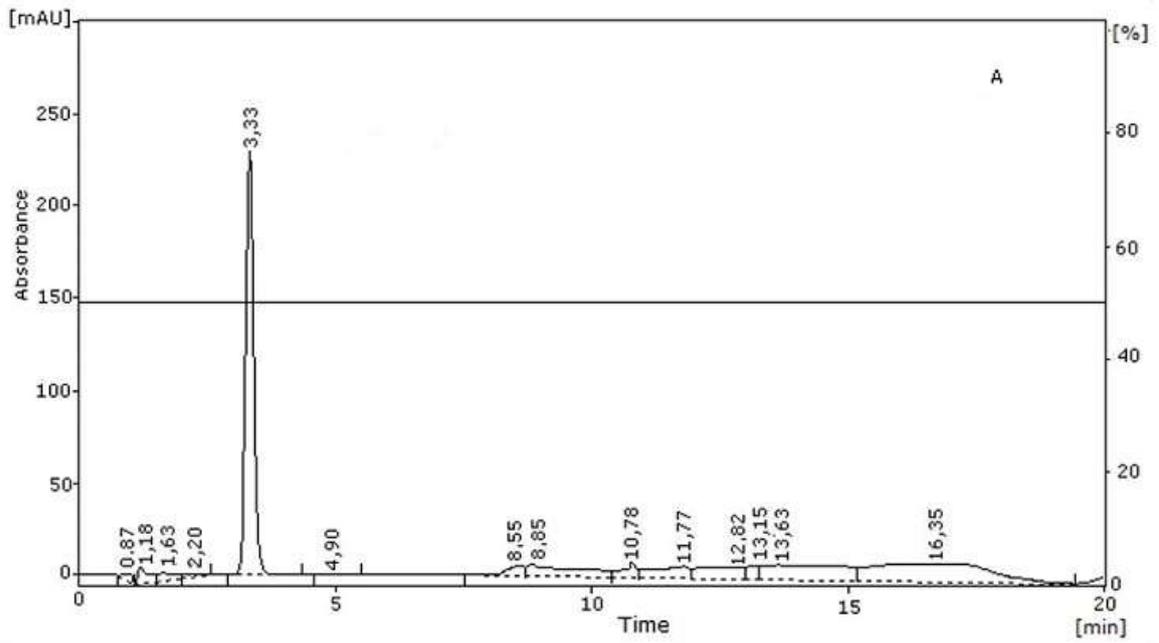
La precisión se determinó a través de la evaluación de la repetibilidad, se realizaron nueve réplicas de materia prima a una concentración equivalente al 100 % de la concentración declarada para el medicamento. La precisión intermedia se estableció a través de los resultados obtenidos, para la misma muestra, por diferentes analistas en dos días. En el análisis de los resultados se tuvo en cuenta el coeficiente de variación (CV) y en el caso de la precisión intermedia se realizó además una comparación por ANOVA y prueba *t Student* con un nivel de confianza del 95 %.

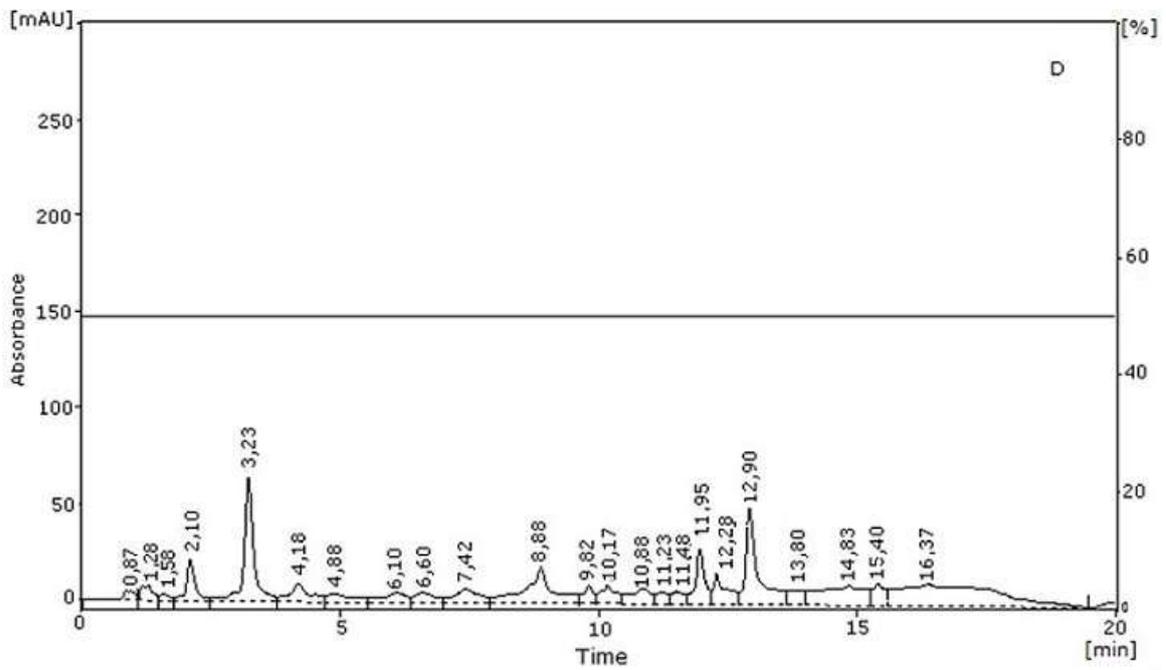
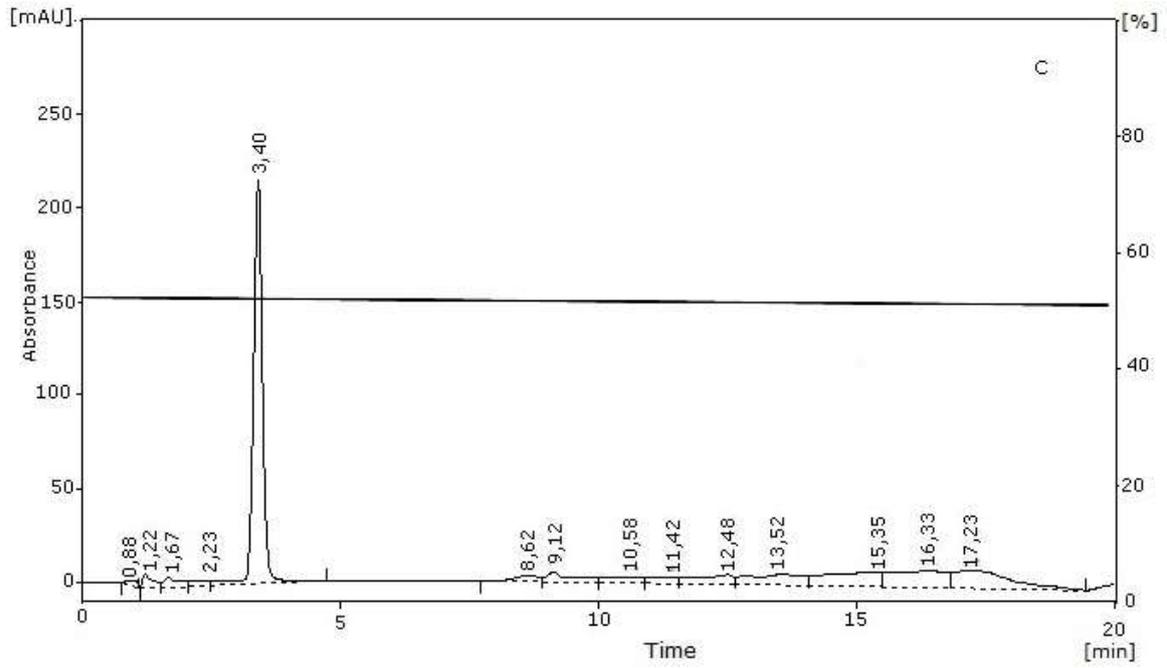
#### *Exactitud*

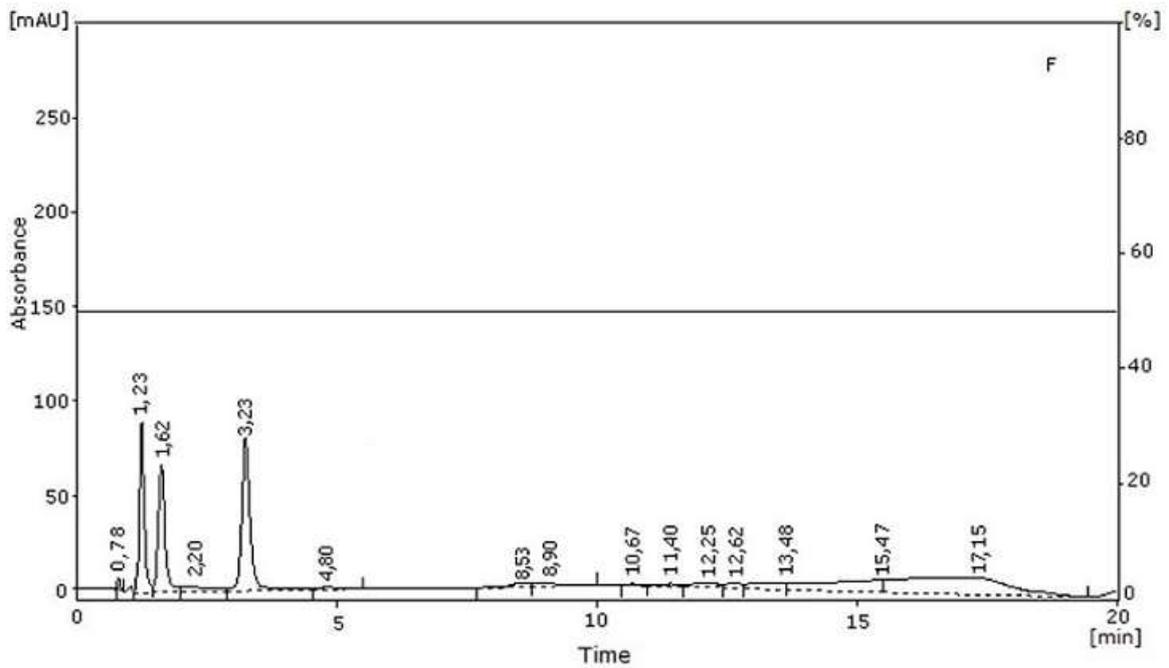
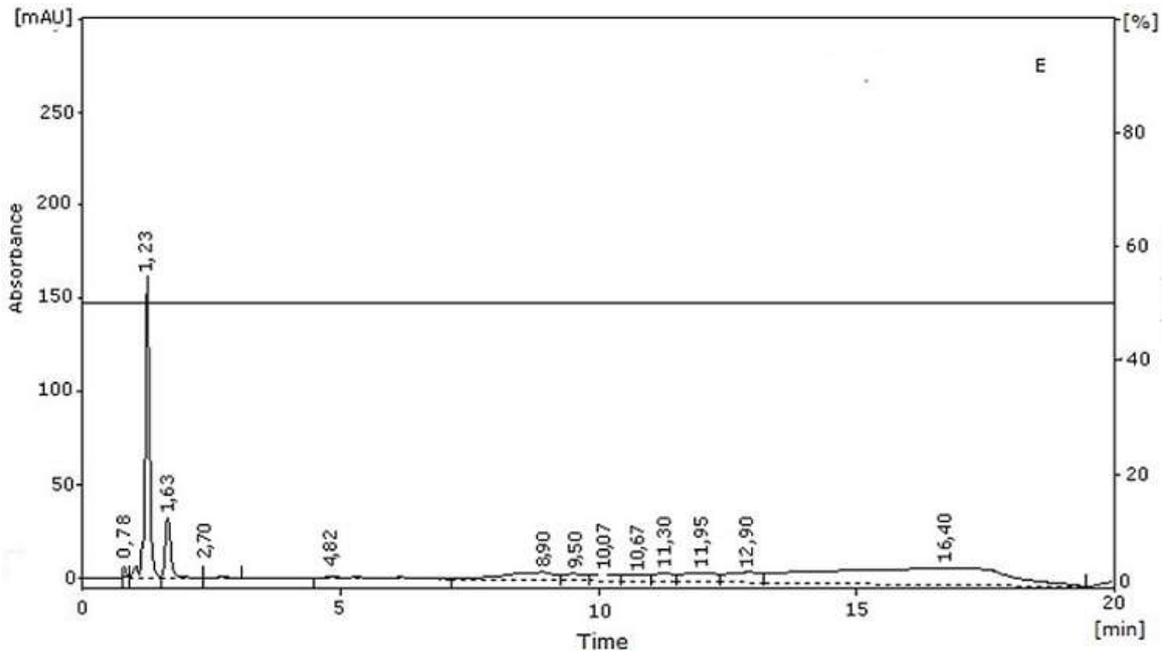
La exactitud se estableció con el ensayo de recuperación a tres concentraciones diferentes 80, 100 y 120 %.<sup>(7)</sup> Se emplearon tres réplicas en cada caso. Se determinó el porcentaje de recuperación, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Se aplicó además el ensayo de *Gochran* (C) para evaluar si la variación de la concentración producía diferencias significativas en los resultados y la prueba de la *t* de Student para determinar diferencias significativas entre la recuperación media y el 100 %.

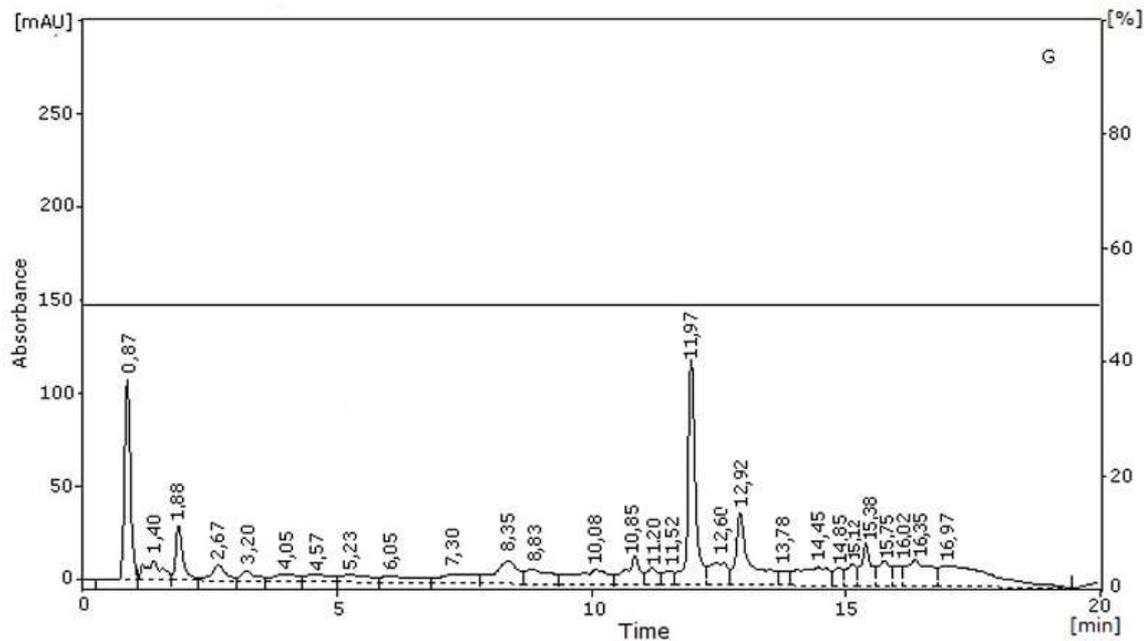
## RESULTADOS

En la figura 3 se observan los cromatogramas correspondiente a la degradación de la ampicilina en los diferentes medios. Se aprecia que no existe diferencia entre los tiempos de retención (*tr*) (3,30 min) de la sustancia de referencia química y la muestra materia prima. Además se puede visualizar que los *tr* para cada uno de los productos de degradación, se diferencian del tiempo de retención del producto de interés.



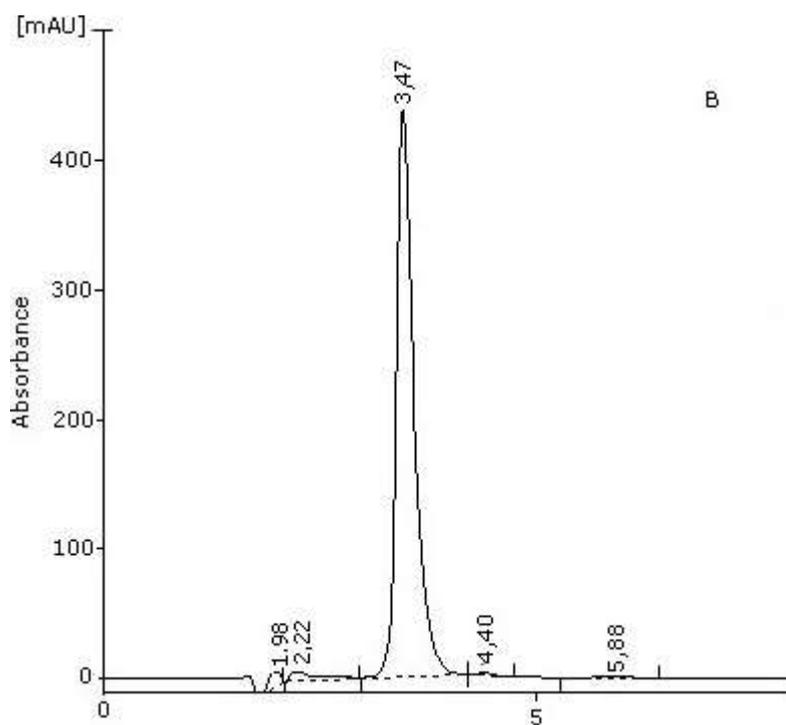
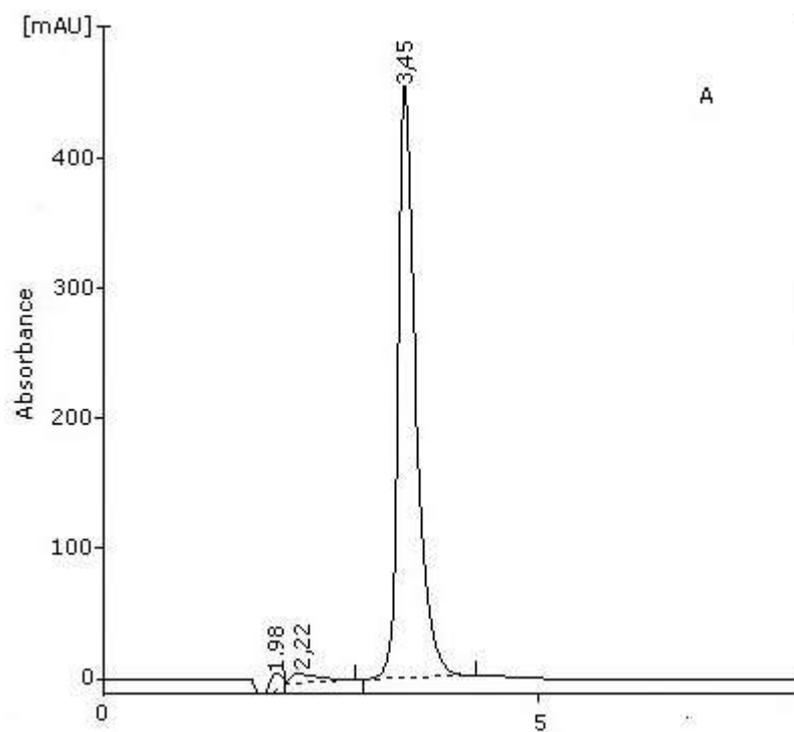


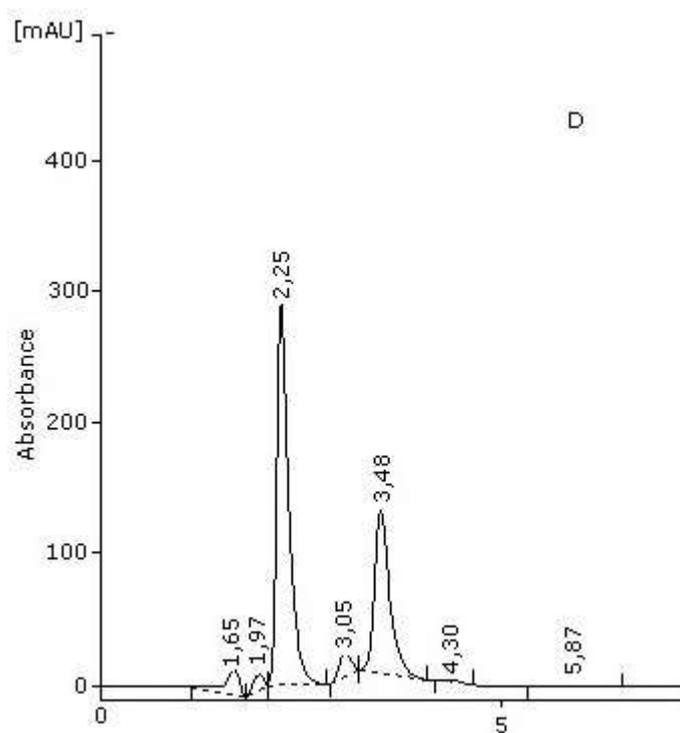
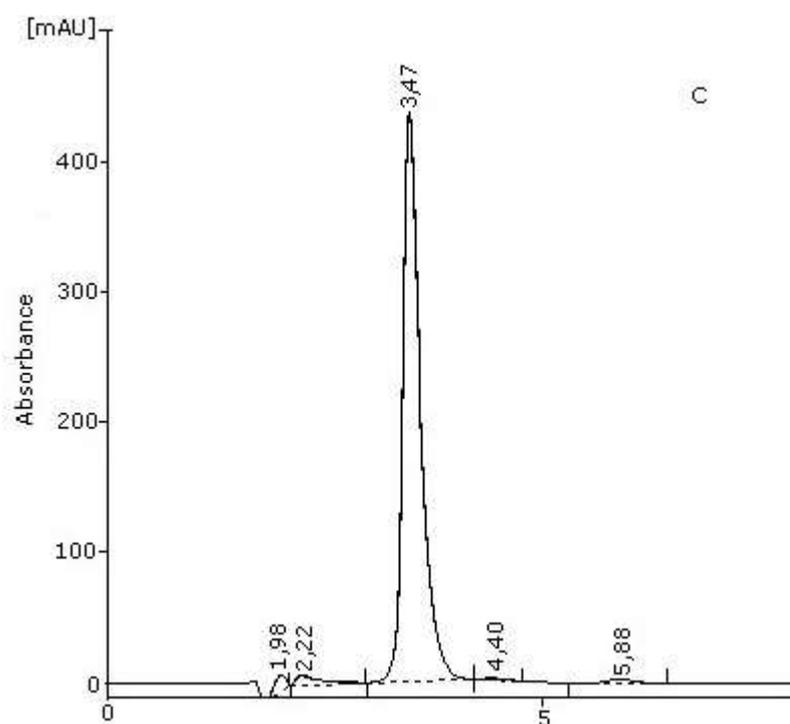


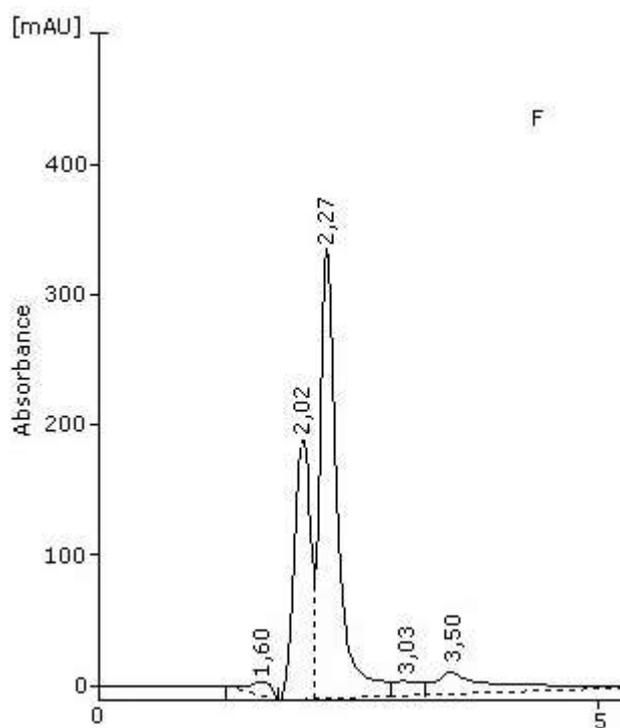
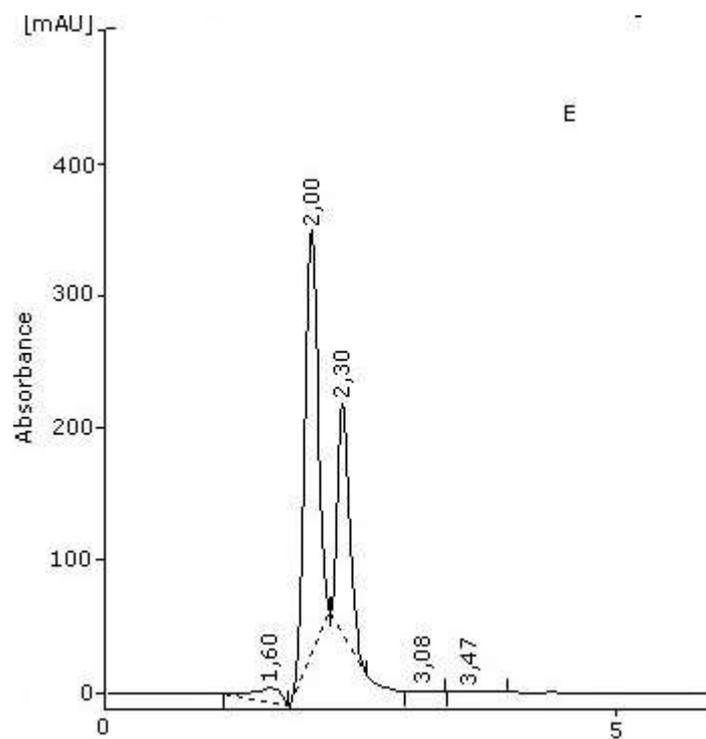


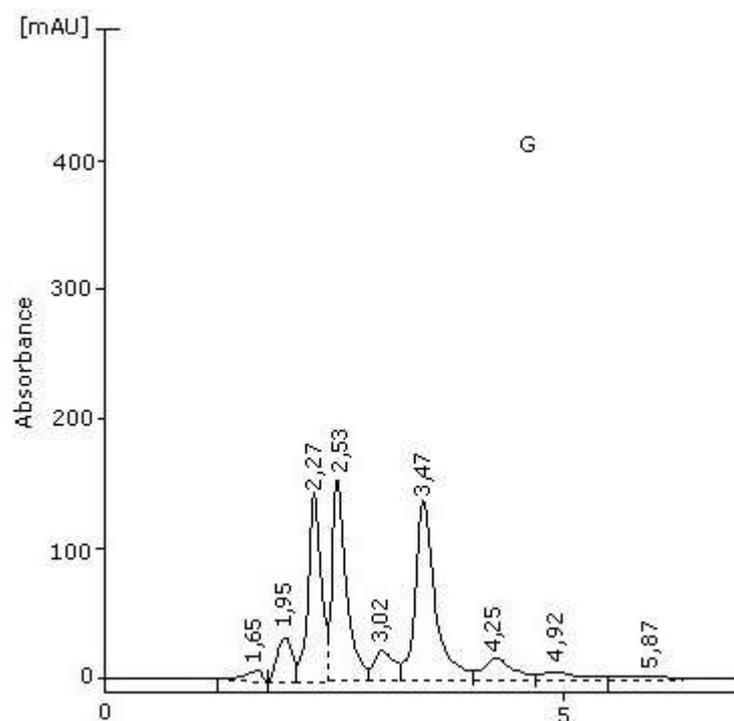
**Fig. 3** - Cromatograma de sustancia de referencia química (A), muestra (B), productos de degradación de la ampicilina por fotólisis (C), termólisis (D), hidrólisis básica (E), hidrólisis ácida (F) y oxidación (G).

La oxacilina mostró un comportamiento similar a la ampicilina en los cromatogramas obtenidos (Fig. 4), donde el  $t_r$  para la sustancia de referencia y la muestra fue de 3,45 minutos.









**Fig. 4** - Cromatograma de sustancia de referencia química (A), muestra (B) y productos de degradación de la Oxacilina por fotólisis (C), termólisis (D), hidrólisis básica (E), hidrólisis ácida (F) y oxidación (G).

La ampicilina y la oxacilina resultaron lineales en el rango de 50 a 150 %. Para la ampicilina la ecuación de la recta se expresó según:  $y = 3899,9 x + 121,128$ , el coeficiente de correlación ( $r$ ) fue igual a 0,99951 y el nivel de significación del intercepto 0,0971.

Para la oxacilina la ecuación de la recta se expresa según:  $y = 53507,1 x + 103,45$  y el coeficiente de correlación ( $r$ ) fue igual a 0,99988 y el nivel de significación del intercepto 0,1748.

Cuando se aplicó el test de linealidad mediante el coeficiente de variación de los factores de respuesta ( $CV_f$ ), se obtuvo que la ampicilina tuvo un  $CV_f = 2,64$  % y una desviación estándar relativa de la pendiente del 1,80 %, por lo que se cumple el criterio de linealidad. La oxacilina demostró una adecuada linealidad al obtener valores inferiores en el coeficiente de variación de los factores de respuesta,  $CV_f = 0,695$  %, y una desviación estándar relativa de la pendiente del 0,899 %.

En la tabla se presentan los resultados del ensayo de repetibilidad, precisión intermedia y exactitud donde se obtuvieron coeficientes de variación inferiores al 2 %, en cada caso.

Tabla – Repetibilidad, precisión intermedia y exactitud

Repetibilidad. No. de muestras: 10						
Parámetro	Ampicilina			Oxacilina		
X*	100,35			96,17		
S**	0,82			0,75		
CV***	0,81			0,78		
Precisión intermedia						
Parámetro	Ampicilina			Oxacilina		
	analista	días		analista	días	
X*	100,01 %	100,17 %		95,84 %	96,74 %	
valor <i>p</i> asociado al resultado (prueba de Fisher)	0,786	0,540		0,690	0,222	
valor <i>p</i> asociado al resultado (prueba de <i>t student</i> )	0,076	96,74 %		0,059	0,062	
Exactitud						
Parámetro	Ampicilina			Oxacilina		
	Concentración teórica 80 %	Concentración teórica 100 %	Concentración teórica 120 %	Concentración teórica 80 %	Concentración teórica 100 %	Concentración teórica 120 %
% de recuperación	99,64	100,63	100,48	95,52	96,72	96,39
Prueba de Gochram G exp. ≤ G tab (0,797)	0,501			0,496		

\*media aritmética, \*\*desviación estándar, \*\*\*coeficiente de variación

## DISCUSIÓN

Todas las penicilinas tienen básicamente la estructura del ácido 6-aminopenicilánico que tiene un anillo de tiazolina, con un grupo amino libre, unido a un anillo β-lactámico. Son considerados ácidos orgánicos débiles poco solubles e inestables: sensibles al calor, a la luz, al pH extremo, a los metales pesados y a los compuestos oxidantes y reductores.<sup>(14,15)</sup>

También suelen deteriorarse en solución acuosa, por lo que se recomienda para su empleo reconstituirse inmediatamente antes de inyectarse.

La selectividad del método analítico permite su empleo no solo en controles de calidad, sino además en estudios de estabilidad.<sup>(16)</sup> La ruta de degradación de estos compuestos ha sido estudiada por diferentes autores,<sup>(2,15,17,18,19)</sup> así como la selectividad de métodos acoplados al CLAR para separar los IFAs y sus productos de degradación.<sup>(15,17)</sup>

En el análisis de los cromatogramas (Figs. 3A, 3B, 4A, 4B) se demuestra la equivalencia de los tiempos de retención del pico de la sustancia de referencia química y las muestras analizadas para cada IFA. Lo que avala al método para los casos de los IFAs estudiados, en cuanto a la rutina de identificación y cuantificación del laboratorio de control de calidad.<sup>(16)</sup> Sin embargo, se tuvo en cuenta en este estudio la degradación forzada, o prueba de estrés, que se lleva a cabo en condiciones más duras que las utilizadas para la prueba de estabilidad acelerada.<sup>(16)</sup> Las penicilinas, sufren todos los mecanismos de degradación característicos de los medicamentos, por lo que el este estudio se sometió el IFA y la sustancia de referencia a condiciones específicas de hidrólisis ácida y básica, luz, oxidación con peróxido y temperatura.

En ambos IFAs se puede observar una disminución del área del pico en todas las condiciones expuestas. Esto indica que el compuesto experimentó modificaciones estructurales, lo que se corresponde con otros estudios.<sup>(2,15,17,18)</sup> Se visualiza una pérdida del área del pico en más de un 15 % y la aparición de nuevos picos dentro del cromatograma, en tiempos de retención diferente al del IFA. Lo anterior demuestra que es correcto proponer el método para el desarrollo de estudios de estabilidad de la ampicilina y la oxacilina.

Es característico en este tipo de compuesto que ocurra la degradación por hidrólisis, debido a la presencia del anillo  $\beta$ -lactámico, así como del radical ácido unido al grupo amino del ácido 6-aminopenicilánico.<sup>(18,19)</sup> Las penicilinas experimentan degradación rápida en condiciones alcalinas. La hidrólisis alcalina se inicia con el ataque nucleófilo sobre el carbono carbonílico del anillo  $\beta$ -lactámico, con la formación de un intermedio tetraédrico, seguido de la apertura carbono carbonílico del anillo del anillo para dar el ácido peniciloico. El grupo carboxilo presente en el ácido peniciloico, después de la apertura del enlace, se somete a una descarboxilación que da lugar al ácido penicárico y la transferencia de un hidrógeno al nitrógeno lactámico.<sup>(15)</sup> En este mecanismo el ataque nucleofílico da lugar a un intermedio tetraédrico que se divide en el enlace C2-N3 a dos productos potenciales en los que el hidrógeno se une al oxígeno o nitrógeno.<sup>(18,19)</sup>

En la hidrólisis ácida, el anillo  $\beta$ -lactama altamente tenso y su enlace amida se rompen dando una gama de productos complejos: ácido penfílico, ácido peniciloico y ácido penicilénico.<sup>(18,19)</sup> El ácido peniciloico existe en su forma isomérica, es decir, ácido penamadálico mediante la apertura del anillo de tiazolidina que se caracteriza por su pico de UV alrededor de 320 nm bajo condiciones de ácido fuerte. Se degrada aún más para dar los últimos productos descompuestos. En un medio ácido fuerte (pH 2 o menos), sufre una reestructuración a través de la formación de oxazolina que da lugar al ácido penfílico.<sup>(15)</sup>

En las figuras 3E, 3F y en las figuras 4E y 4F se pudo apreciar la degradación por hidrólisis de estos IFAs, así como dos picos a menor tiempo de retención. La ampicilina y la oxacilina se degradaron totalmente por hidrólisis básica y más de un 80 % por la hidrólisis ácida, estos resultados coinciden con los reportados por otros autores que emplean la cromatografía de fase reversa.<sup>(7,8,11)</sup>

El proceso de oxidación de estos compuestos se caracteriza por la pérdida de electrones por parte de la molécula.<sup>(18)</sup> Este proceso está presente en la descomposición fotoquímica y en la descomposición por temperatura, aunque el mecanismo es más complejo, esto justifica que el comportamiento frente a estas variables difiera desde el punto de vista experimental.

En la ampicilina (Figs. 3C, 3D, 3G) se observa un degradado casi total del IFLA durante la oxidación y la degradación por temperatura, además aparecen picos secundarios que no interfieren con el pico principal. *Praca* y col.<sup>(2)</sup> obtuvieron resultados similares para la ampicilina en elución isocrática por fase reversa, sin embargo, solo un 15 % se pudo determinar en la degradación por fotólisis, esto responde a la diferencia de la ruta de degradación en cada oxidación.

En la oxacilina (Figs. 4C, 4D, 4G) el comportamiento no fue muy diferente. El IFA se degradó en más de un 70 % con la temperatura y la oxidación con peróxido y, se pudo apreciar la aparición de productos de degradación a menor tiempo de retención que el IFA. En el caso de la fotólisis no aparecen picos secundarios a esta longitud de onda y se degradó solo en un 11 %.

Los resultados durante el ensayo de linealidad permiten predecir que se alcanza una recta lineal con una correlación positiva entre los valores de concentración definidos y las áreas obtenidas en cada caso. El intervalo de confianza del intercepto incluye al cero para el 95 % de confiabilidad en ambos IFAs, lo que demuestra la proporcionalidad del método.

En la tabla se aprecia que los valores de CV para la precisión son inferiores al 2 % respectivamente, que es un valor que se considera como límite para métodos

cromatográficos. Con estos resultados y los derivados del análisis de ANOVA, se puede afirmar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las variables utilizadas para el estudio, analistas y días, porque en la prueba de homogeneidad de varianzas, durante la precisión intermedia la probabilidad asociada con el valor de  $p$  de la prueba de Fisher y el valor de  $p$  de *t de Student*, son mayor que 0,05 en todos los casos.<sup>(7)</sup> El valor de porcentaje de recobro, en la exactitud (Tabla), está dentro de los límites permitidos para los métodos cromatográficos (98,0-102,0 %). Al realizar el ensayo de *Gochran* para una probabilidad de 0,05;  $k = 3$  y  $n = 3$  se obtuvieron resultados satisfactorios de acuerdo a los criterios establecidos, lo que permite afirmar que el método es exacto para determinar la concentración de la materia prima.

Por lo que se puede concluir, que los métodos analíticos por CLAR que se utilizan en la cuantificación del Ingrediente Activo Farmacéutico son válidos para realizar el control de calidad de la ampicilina y la oxacilina que se destina a la producción, lo que permite cumplir las exigencias regulatorias vigentes. Por lo que su uso es adecuado en la rutina del laboratorio para la determinación de la calidad de estas materias primas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gómez J, García-Vázquez E, Hernández-Torres A. Los betalactámicos en la práctica clínica. *Revista Española de Quimioterapia*. 2015;28(1):1-9.
2. Jank L, Targa Martins M, Bazzan Arsand J, Barcellos Hoff, Barreto F, Pizzolato TM. High-throughput method for the determination of residues of  $\beta$ -lactam antibiotics in bovine milk by LC-MS/MS, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32-12, 1992-2001; 2015. p 1-10. DOI: [10.1080/19440049.2015.1099745](https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1099745)
3. Amyes SGB. *Antibacterial Chemotherapy: (Oxford Infectious Diseases Library) Theory, Problems, and Practice*. Editorial Oxford University Press Inc. Nueva York; 2010. p.10
4. Drugs.com Know more. Be sure. [Internet] Ampicillin, Drugs information [actualizado 1 agosto 2019; acceso 20/01/2017] Disponible en: <https://www.drugs.com/mtm/ampicillin.html#moreResources>
5. Mensa J, Gatell JM, García Sánchez E. *Guía de Terapéutica Bacteriana*. Barcelona: Editorial Antares; 2016.

6. CECMED. Regulación 61. Requisitos para el registro sanitario de medicamentos de uso humano. *Ámbito Regulator (Boletín)*. 2012;XII(158) [acceso 22/08/2019]. Disponible en: <https://www.cecmec.com/sites/default/files/adjuntos/ambitor/AmbReg-158.pdf>
7. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonized Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1); 1994.
8. Volonté MG, Quiroga P. *Análisis Farmacéutico*. [Internet]. La Plata: Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP); 2013. 350 p. [acceso 22/08/2019]. Disponible en: [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/32503/Documento\\_completo.pdf?sequence=3&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/32503/Documento_completo.pdf?sequence=3&isAllowed=y)
9. United States Pharmacopeial Convention. USP XXXX-NF-35. Official Monographs. 22 ed. Rockville: Mack Printing; 2017. p. 2234,4647.
10. Mahdi Saeed A, Redha Hadi M, Muhsin Abid F. Bioavailability of ampicillin 500 mg capsule on healthy Iraqi volunteers by HPLC. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2017;8(4):938-44. 2017.
11. Lara FJ, Olmo-Iruela M, Cruces-Blanco C, Quesada-Molina C, García-Campaña AM. Advances in the determination of  $\beta$ -lactam antibiotics by liquid chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2012;38:52-66.
12. Mitchell JM, Griffiths MW, MC Ewen SA, MC Nab WB, Yee AJ. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, test, and test performance". *J. Food. Prot.* 1998;61:742-56.
13. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. *Pharmaceutical Development Q8 (R2)*; 2009 [acceso 22/08/2019]. Disponible en: [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q8\\_R1/Step4/Q8\\_R2\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf)
14. Contreras A, Soledad-Rodríguez Beatriz E. Estandarización de un método analítico para determinar ampicilina como contaminante en bajas concentraciones, en muestras acuosas por HPLC-UV. *Rev. Tekhné*. 2017 [acceso 22/08/2019];20(1):001-6. Disponible en: <http://revistasenlinea.saber.ucab.edu.ve/temas/index.php/tekhne/article/view/3389>
15. Deshpande AD, Baheti KG, Chatterjee NR. Degradation of *bb*-lactam antibiotics. *Current Science*. 2004;87(12):1684-95.

16. Mirzaei R, Yunesian M, Nasser S, Gholami M, Jalilzadeh E, Shoeibi S, et al. An optimized SPE-LC-MS/MS method for antibiotics residue analysis in ground, surface and treated water samples by response surface methodology- central composite design. *J Environ Health Sci Eng.* 2017;15:21. DOI: [10.1186/s40201-017-0282-2](https://doi.org/10.1186/s40201-017-0282-2).
17. Frau J, Coll M, Donoso J, Munoz F, Vilanova B, Garcia-Blanco F. Alkaline and acidic hydrolysis of the  $\beta$ -lactam ring. *Electronic Journal of Theoretical Chemistry.* 1997;2:56–65.
18. Zhang K, Zhou X, Du P, Zhang T, Cai M, Sun P, Huang C. Oxidation of  $\beta$ -lactam antibiotics by peracetic acid: Reaction kinetics, product and pathway evaluation. *Water Research.* 2017;123:153-61.
19. Mitchell MS, Ullman LJ, Teel LA, Watts JR. pH and temperature effects on the hydrolysis of three  $\beta$ -lactam antibiotics: Ampicillin, cefalotin and cefoxitin *Science of The Total Environment.* 2014;466-467(1):547-55.

### **Conflicto de interés**

Los autores declaran que no presentan conflictos de intereses.

### **Contribuciones de los autores**

*Lisandra García Borges:* contribución importante a la idea y diseño del estudio, al análisis e interpretación de los resultados, a la calibración del equipo analítico, recogida de datos, su análisis e interpretación, así como al procesamiento estadístico. Redacción del borrador del artículo, arreglos y aprobación de su versión final.

*Marilyn López Armas:* participación en la verificación y calibración del equipo, desarrollo de la técnica analítica, preparación y análisis de las muestras

*Vivian Martínez Espinosa:* participación en la verificación y calibración del equipo, desarrollo de la técnica analítica, preparación y análisis de las muestras.

*Caridad M García Peña:* contribución al diseño del estudio y revisión de los resultados.

*Alfredo Fernández Martínez:* contribución importante del material de trabajo y especificaciones de calidad de los reactivos, participación en desarrollo de la técnica analítica.

*Marlén Cárdenas Peña:* contribución importante del material de trabajo y especificaciones de calidad de los reactivos, participación en desarrollo de la técnica analítica.