DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA DETERMINAÇÃO DE AMOXICILINA EM CÁPSULAS

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) ANALYTICAL METHOD FOR DETERMINATION OF AMOXICILLIN IN CAPSULES

IGLIN, Tiago Hickman¹, FACHEL, Flávia Nathiely Silveira¹; GUWZINSKI, Amanda Gonçalves¹,
SILVEIRA, Ailton Monza da¹, ALBANO, Filipe* de Medeiros², FUNCK, José Aparício Brittes¹

¹ Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Laboratório Analítico de Insumos Farmacêuticos -
LAIF, Av Ipiranga, 6681, prédio 93A sala 104, cep 90619-900, Porto Alegre – RS, Brasil
(fone: +55 51 3320-3551, fax 51 3320-3883)

² Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Engenharia de Produção
Av Ipiranga, 6681, prédio 30, cep 90619-900, Porto Alegre – RS, Brasil
(fone: +55 51 3320-3551)

* Autor correspondente
e-mail: filipe.albano@pucrs.br

Received 26 April 2016; received in revised form 27 June 2016; accepted 27 June 2016

RESUMO

A amoxicilina, substância relacionada com a penicilina semissintética, tem sido amplamente utilizada pela população para tratar infecções causadas por diferentes microrganismos, entretanto os relatos de métodos apropriados para a determinação quantitativa e indicativa de estabilidade de formulações contendo esta substância são raros. Devido à falta de estudos sobre a degradação forçada desta substância e diante da necessidade de monitoramento da qualidade desse tipo de formulação, foi proposto e validado um método indicativo de estabilidade para a determinação do conteúdo de amoxicilina em cápsulas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE, para o controle de qualidade de cápsulas de amoxicilina, possibilitando a disponibilização de informações úteis quanto às características desse tipo de formulação e de estabilidade da mesma. O método foi validado para os parâmetros linearidade, especificidade, exatidão, precisão e robustez. Além disso, foi observado que o método apresenta uma adequada estabilidade necessária à utilização do método.

Palavras-chave: amoxicilina, CLAE, validação de método.

ABSTRACT

Amoxicillin, substance related to semisynthetic penicillin, has been widely used to treat infections caused by various microorganisms, however reports of suitable methods for the quantitative determination and indicative of stability of formulations containing this substance are rare. Due to lack of studies on the forced degradation of the substance and on the need to monitor the quality of this type of formulation, was proposed and validated a method for the determination of amoxicillin content in capsules by high-performance liquid chromatography - HPLC for the quality control of amoxicillin capsules, allowing the provision of useful information about the characteristics of this type of formulation and its stability. The method was validated for parameters of linearity, specificity, accuracy, precision and robustness.

Keywords: amoxicillin capsules; HPLC; validation method.

INTRODUÇÃO

Os agentes antimicrobianos podem ser referidos como um dos mais evidentes exemplos de evolução da medicina moderna. Diversas doenças infecciosas que até então eram consideradas incuráveis ou até mesmo letais, atualmente, são passíveis de tratamento e até mesmo cura devido à existência dos mesmos (Katzung, 2010).

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos bacteriostáticos, que atuam inibindo o crescimento, ou bactericidas, que causam a morte das bactérias. Dentre as classes de antibióticos existentes destaca-se a dos beta-lactâmicos, assim denominada em função da presença de um anel lactâmico (Katzung, 2010). Estes antibióticos atuam através da inibição da síntese de peptidoglicano, um importante componente para a integridade da estrutura da parede celular das bactérias (Guimarães *et al.*, 2010).

As penicilinas são antibióticos betalactâmicos cuja estrutura química é constituída por um anel tiazolidílico fixado a um anel betalactâmico, responsável por transportar um grupo amino secundário, podendo haver neste a ligação de substituintes. Essa ligação e o tipo de substituinte são responsáveis por distribuir as penicilinas em três grupos (as penicilinas, as penicilinas antiestafilocócicas e as penicilinas de espectro ampliado) (Katzung, 2010; Guimarães *et al.*, 2010; Miguel *et al.*, 2013; Brunton *et al.*, 2012).

A amoxicilina (Figura 1) pertence ao grupo das penicilinas de espectro ampliado e trata-se de uma ampicilina semissintética susceptível à penicilase. Por apresentar concentrações plasmáticas 2 a 2,5 vezes maiores que a da ampicilina e não ter sua absorção interferida na presença de alimentos, a amoxicilina foi projetada para o uso oral. O mecanismo de ação da amoxicilina é através da inibição da produção de proteínas da parede celular bacteriana, afetando, de modo geral, a síntese de componentes dos peptidoglicanos da parede celular e com isso causando a lise osmótica (Brunton *et al.*, 2013).

Figura 1. Estrutura química da amoxicilina

Apesar de a amoxicilina fazer parte de diversas monografias farmacopeicas e possuir métodos analíticos distintos para sua determinação (FB, 2010; USP, 2012; BP, 2013; EP, 2011; JP, 2013), a realização de testes de degradação forçada é pouco abordada.

Para o desenvolvimento de um método analítico a garantia da qualidade dos resultados obtidos é de fundamental importância. Segundo a RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA, a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método desenvolvido cumpra as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, a metodologia deve atender a critérios pré-definidos de especificidade, robustez, linearidade, precisão e exatidão, adequadas à análise (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003; HUBER, 2007; ALBANO & RAYA-RODRIGUEZ, 2015).

Neste contexto, e considerando que a amoxicilina é um fármaco amplamente utilizado pela população, este trabalho objetiva desenvolver e validar método indicativo de estabilidade, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), para o controle de qualidade de cápsulas de amoxicilina e disponibilizar informações úteis quanto às características de estabilidade da mesma.

PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materiais

2.1.1 Amostras, Padrão e Reagentes

Foram utilizadas como amostra cápsulas de amoxicilina 500 mg e como padrão amoxicilina USP com 86,4% de pureza. Utilizou-se água ultrapura Milli-Q® da Millipore

Corporation®. Foram utilizados acetonitrila grau CLAE, adquirida da Sigma-Aldrich; hidróxido de potássio e hidróxido de sódio adquiridos da J.T Baker; fosfato de potássio monobásico, ácido clorídrico 30 % e peróxido de hidrogênio 30 % adquiridos da Merck.

Foi realizado o peso médio de uma amostragem de 20 cápsulas da amostra. Para o preparo da amostra foi pesado o equivalente a um peso médio, sendo diluído em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 5,0 até a concentração estimada de 500 µg/mL. Soluções estoque de amoxicilina padrão foram preparadas, individualmente, de quantidade apropriada em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 5,0 de forma a obter solução contendo 1,0 mg/mL.

2.2. Equipamentos e Condições Cromatográficas

As análises foram realizadas utilizando cromatógrafo em fase líquida Shimadzu Corporation da série LC-20AT, com bomba quaternária, forno para controle de temperatura, detector de arranjo de fotodiodos (DAD) e autoamostrador. Utilizou-se coluna C18 Zorbax Eclipse Plus Agilent Technologies® (250 x 4,6 mm d.i., 5 µm) mantida a temperatura ambiente.

A aquisição e a análise dos dados foram efetuadas pelo programa LC solution Version 1.25. A eluição do método foi realizada por gradiente, a fase móvel foi constituída de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 5,0:acetonitrila (98:2; v/v) durante 6 minutos, após, gradiente linear por 29 minutos até a proporção tampão fosfato de potássio 50mM pH 5,0:acetonitrila (75:25; v/v). O fluxo foi de 1,5 mL/min e o detector de DAD foi ajustado em 230 nm. Para os estudos de fotólise, foi utilizada câmara de fotoestabilidade da ATLAS (modelo Suntest CPS +), equipada com lâmpada de xenônio, filtro special window glass (310 nm cut-on) e filtro solar ID65 (320 nm cut-on). Para avaliação da estabilidade frente a diferentes temperaturas foi utilizado estufa ODONTOBRAS 1.5.

2.3. Validação do Método

O método desenvolvido foi validado nos parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez de acordo com as normas vigentes (BRASIL, 2003; ICH, 2005;

F.BRAS., 2010).

2.3.1 Especificidade

A especificidade do método foi estabelecida pela determinação da pureza dos picos cromatográficos utilizando detector de arranjo de fotodiodos em testes de degradação forçada.

Os estudos de degradação forçada da amoxicilina foram realizados a partir da solução da amostra 1,0 mg/mL ou 0,5 mg/mL, dependendo do ensaio. Para os ensaios de hidrólise catalisada por ácido ou base e para avaliação do efeito da temperatura em água, foram preparadas na concentração 1,0 mg/mL de amoxicilina. Após o período de estresse as soluções foram neutralizadas, quando necessário, e diluídas em tampão fosfato, utilizado na fase móvel, até a concentração de 500 µg/mL e analisadas pelo método proposto. Para o ensaio de oxidação a amostra foi preparada na concentração de 500 µg/mL em água:metanol (90:10; v/v). No ensaio de fotólise a amostra foi preparada na concentração final de 500 µg/mL sendo utilizada água como diluente. Para cada condição foram preparados uma amostra e um branco, este último, consistiu de todos os reagentes menos a amostra. Amostras não degradadas também foram preparadas na concentração de 500 µg/mL e analisadas no tempo zero. Todas as soluções foram mantidas ao abrigo da luz e à temperatura ambiente (20-25°C), exceto as expostas à luz e à temperatura, respectivamente.

As condições de estresse utilizadas estão descritas a seguir.

Estudos hidrolíticos: Soluções de amoxicilina foram expostas ao HCl 0,1 M à temperatura ambiente durante duas horas. Os estudos em condições alcalinas foram realizados à temperatura ambiente em NaOH 0,005 M durante vinte horas.

Estudos de temperatura: Para avaliar os efeitos da temperatura, soluções da substância ativa em água foram expostas à temperatura de 80 °C durante duas horas.

Estudos oxidativos: Soluções de amoxicilina em H₂O₂ 0,01% foram mantidas à temperatura ambiente durante 15 minutos.

Estudos fotolíticos: Esses estudos foram realizados em câmara de fotólise equipada com lâmpada de xenônio, filtro special window glass e filtro solar ID65, equivalente ao padrão de luz indireta de interiores, com exposição entre 320 e 780 nm. Soluções de amoxicilina 0,5 mg/mL, acondicionadas em frascos de 10 mL, foram colocados na câmara de fotoestabilidade mantida a 25 °C e irradiadas com 250 W/m² durante 72 horas. Amostras protegidas da luz também foram colocadas na câmara no intuito de avaliar possíveis efeitos desta sobre a mesma.

2.3.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada no intervalo de 404,29 a 605,22 µg/mL, através de três curvas padrão, com cinco diferentes concentrações. A curva padrão foi realizada em três dias diferentes. Com as áreas médias dos cromatogramas obtidos nos diferentes dias, foi construído um gráfico, plotando-se os resultados das áreas versus concentração. Foi calculado o coeficiente de correlação e a equação da reta. A linearidade do método foi verificada pela análise de variância (ANOVA), com 95% de confiança (alpha 0,05).

2.3.3 Precisão

A repetibilidade foi avaliada utilizando seis amostras na concentração de supostamente 500 µg/mL. Para analisar a precisão intermediária foram executados dois testes, utilizando seis amostras cada, com operadores diferentes (n=12). Os resultados dos estudos de precisão foram expressos em termos de desvio padrão relativo (DPR).

2.3.4 Exatidão

Utilizou-se o teste de recuperação para avaliar a exatidão do método. Assim, soluções contendo 410 µg/mL de amoxicilina foram adicionadas de quantidades conhecidas da solução padrão, em três diferentes concentrações, no intervalo entre 92 a 112% da concentração trabalho. Foram preparadas quatro amostras de amoxicilina cápsulas e a estas soluções, com exceção de uma denominada amostra não adicionada, foram adicionadas diferentes quantidades da solução padrão,

conforme especificado na Tabela 1. A exatidão do método foi avaliada em triplicata e o resultado foi expresso em percentagem de recuperação.

Tabela 1. Concentração das soluções para o estudo de exatidão do método

2.3.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada em triplicata através da variação da proporção dos constituintes da fase móvel (1 e 3 % de acetonitrila) e alteração do fluxo da mesma (1,4 e 1,6 mL/min). Cada parâmetro foi analisado separadamente. Utilizou-se a pureza do pico para avaliar se ocorreria alguma alteração na especificidade do método.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

O uso da fase móvel constituída de tampão fosfato 50 mM pH 5,0 e acetonitrila (98:2; v/v) apresentou pureza dos picos cromatográficos maior que o limiar (*threshold*), permitindo assim assegurar-se que a substância amoxicilina elui sem a presença de impurezas ou excipientes. A coluna C18 utilizada garantiu adequada resolução entre a amoxicilina e a impureza mais próxima com tempo de retenção relativo de 0,85 em relação à amoxicilina, cujo valor médio obtido foi superior a 3,0. Os cromatogramas do padrão de amoxicilina na concentração de 500 µg/mL e da amostra, supostamente na concentração de 500 µg/mL, obtidos nestas condições, estão representados nas Figuras 2 e 3.

Nestes cromatogramas, o pico cromatográfico com tempo de retenção de 5,97 minutos refere-se à amoxicilina, tanto para a amostra como para o padrão.

Figura 2. Cromatograma do componente ativo do padrão de amoxicilina 500 µg/mL e da pureza do pico cromatográfico obtidos por CLAE e pelo detector de arranjo de fotodiodos.

Figura 3. Cromatograma do componente ativo da amostra de amoxicilina, supostamente na

concentração de 500 µg/mL, e da pureza do pico cromatográfico obtidos por CLAE e pelo detector de arranjo de fotodiodos.

Segundo a Farmacopeia Brasileira (FB, 2010), a quantidade de amoxicilina deve estar entre 90,0 e 120,0%. O teor encontrado para a amostra analisada de amoxicilina em cápsulas, dispostos na Tabela 2, encontrara-se dentro dos valores preconizados.

Tabela 2. Teor de amoxicilina encontrado na amostra e seus limites aceitáveis.

3.1. Estudos de especificidade do método

A amoxicilina degradou $14,38 \pm 3,50$ % em condições ácidas (HCl 0,1 M, 2 h) com dois potenciais produtos de degradação. Em condições alcalinas (NaOH 0,005 M, 20 h) degradou $25,10 \pm 2,54$ %, com dois potenciais produtos de degradação. A amoxicilina degradou $27,33 \pm 5,31$ % sob aquecimento (H₂O, 80 °C, 2 h) apresentando diversos produtos de degradação sendo quatro principais e $21,53 \pm 6,79$ % quando submetida à oxidação (H₂O₂ 0,01 %, 0,25 h). O pico cromatográfico observado no tempo de retenção de 1,8 min refere-se provavelmente à fenacetina, conservante do peróxido de hidrogênio, pois o mesmo também foi observado no branco da amostra. Quando exposta à luz (250 W/m², 72 h) a amostra degradou $9,62 \pm 2,13$ %, sendo observado o aparecimento de diversos produtos de degradação.

Ao avaliar a pureza do pico cromatográfico dos testes de degradação forçada observou-se que não ocorreu nenhuma coeluição de produtos de degradação, demonstrando que este é um método específico.

3.2. Linearidade

A curva padrão representada na Figura 9 demonstrou que os valores do pico cromatográfico da amoxicilina no intervalo entre 404,29 a 605,22 µg/mL são diretamente proporcionais à concentração da amoxicilina na amostra.

Figura 4. Representação gráfica da curva padrão da amoxicilina

O coeficiente de correlação foi superior a 0,99. A análise de variância dos resultados demonstrou que a correlação foi significativa ($p < 0,05$) e o desvio de linearidade não foi significativo ($p > 0,05$), conforme indica a Tabela 3.

Tabela 3. ANOVA das áreas absolutas da curva padrão da amoxicilina, intervalo de 404,29 a 605,22 µg/mL

3.3. Precisão

A repetibilidade ou precisão intradia foi avaliada através do DPR obtido na determinação de seis amostras, contendo 100% da concentração de trabalho. A precisão intermediária ou interdia foi obtida pela repetição do ensaio com dois operadores diferentes. O valor de DPR não foi maior que 1,5% para repetibilidade. Na precisão intermediária não houve diferença significativa ($p > 0,05$) demonstrando que não houve diferença entre os operadores na preparação das amostras, confirmando que o método desenvolvido é preciso, conforme exposto na Tabela 4 e 5.

Tabela 4. ANOVA das áreas absolutas da curva padrão da amoxicilina, intervalo de 404,29 a 605,22 µg/mL

Tabela 5. ANOVA das áreas absolutas da curva padrão da amoxicilina, intervalo de 404,29 a 605,22 µg/mL

3.5. Exatidão

A exatidão avalia a proximidade de uma série de resultados obtidos experimentalmente com o valor verdadeiro (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Os valores recuperados para as diferentes quantidades de padrão adicionados à amostra, na Tabela 6, demonstram que o método desenvolvido foi exato, entre 95 e 105 % de recuperação.

Tabela 6. Avaliação da exatidão do método para

a amoxicilina.

3.5. Robustez

O método mostrou-se robusto em relação ao parâmetro composição da fase orgânica (1–3% de acetonitrila). Os resultados mostraram-se adequados, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) em relação às áreas da amoxicilina. Em relação aos parâmetros de eficiência da coluna e separação do método os resultados mostraram-se adequados, conforme pode ser observado na Tabela 7.

Na avaliação do parâmetro fluxo (1,4–1,6 mL/min), para os parâmetros de eficiência da coluna e separação do método os resultados mostraram-se adequados. Os resultados podem ser observados na Tabela 8.

Em todas as análises de robustez o pico da amoxicilina se manteve puro garantindo assim a especificidade do método.

Tabela 7. Avaliação da robustez do método alterando a proporção de orgânico na fase móvel ($n=3$)

Tabela 8. Avaliação da robustez do método alterando o fluxo ($n=3$)

CONCLUSÕES:

O método proposto para determinação de amoxicilina cápsulas por CLAE foi validado de acordo com os parâmetros de validação exigidos pela legislação vigente. Mostrou-se linear na faixa de 404,29 a 605,22 µg/mL, preciso, exato e robusto frente a variações de composição e fluxo de fase móvel.

Ao avaliar a pureza do pico cromatográfico obtido nos testes de degradação forçada observou-se que não ocorreu nenhuma coeluição de produtos de degradação. O método desenvolvido, portanto, é um método indicativo de estabilidade, tendo em vista que o mesmo possui a capacidade de quantificar a amoxicilina na forma farmacêutica cápsulas na presença de produtos de degradação e impurezas.

REFERÊNCIAS:

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA; RE nº 899, de 29/5/2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Ministério da Saúde: Brasil, 2003.
2. ALBANO, F, M. RAYA-RODRIGUEZ, M, T. Validação e Garantia da Qualidade de Ensaios Laboratoriais. Ed. 2. Rede Metrológica RS. 2015.
3. British Pharmacopoeia 2013, The Stationery Office: London, 2012.
4. BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMAN, B. C.; Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica, 12a ed., McGraw Hill: Rio de Janeiro, 2012.
5. European Pharmacopoeia, 7th ed., Council of Europe: Strasbourg, 2011.
6. Farmacopeia Brasileira, 5ª ed., Atheneu: São Paulo, 2010.
7. GOMES, M.L.P.C.; SOUZA, S.V.C.; Quím. Nova. 2010, 33, 972.
8. GUIMARAES, D.O; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T.; Quím. Nova. 2010, 33, 667.
9. HUBER, L.; Validation and Qualification in Analytical Laboratories. 2th ed. Informa Healthcare: New York, 2007.
10. ICH; International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Q2B (R1): Guideline on Validation of Analytical Procedure-Methodology, 2005.
11. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.
12. KATZUNG, B. G.; Farmacologia básica e clínica, 10a ed., McGraw Hill: São Paulo, 2010.
13. MIGUEL, G.C.; ORLANDO, E.A.; SIMIONATO, A.V.C. Quím. Nova. 2013, XY, 1.RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F; MELO, L.F.C.; Quím. Nova. 2004, 27, 771.
14. The Japanese Pharmacopoeia, 16th ed., <http://jpdb.nihs.go.jp/jp15e/>, acessada em Julho 2013.
15. The United States Pharmacopoeia, 38th ed., United States Pharmacopoeial Convention: Rockville, 2015.

Tabela 1. Concentração das soluções para o estudo de exatidão do método

Fármaco	Concentração da amostra (µg/mL)	Concentração do padrão adicionado (µg/mL)	Concentração final obtida (µg/mL)	Concentração da amostra* (%)
Amoxicilina	410	50	460	92
	410	100	510	102
	410	150	560	112

*em relação à concentração trabalho

Tabela 2. Teor de amoxicilina encontrado na amostra e seus limites aceitáveis.

	Quantidade declarada (mg)	Quantidade encontrada (n=6)	Limites aceitáveis (F.BRAS., 2010; USP 35, 2012)
Amoxicilina	500	91,89% (DP ± 1,18)	90,0 a 120,0%

Tabela 3. ANOVA das áreas absolutas da curva padrão da amoxicilina, intervalo de 404,29 a 605,22 µg/mL

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos Quadrados	Variância	F _{calculado}	F _{tabelado}
ENTRE	4	7643629925636	1910907481409	258,68*	3,48
Regressão linear	1	7632195082764	7632195082764	1033,16*	4,96
Desvio de linearidade	3	11434842871	3811614290	0,52**	3,71
DENTRO	10	73872040926	7387204093		
Total	14	15358361			

*significativo para IC 95%; **não significativo para IC 95%.

Tabela 4. ANOVA das áreas absolutas da curva padrão da amoxicilina, intervalo de 404,29 a 605,22 µg/mL

Parâmetro	Dosagem declarada (mg)	Dosagem encontrada (mg)	(%)*± DP; (DPR%)
Repetibilidade (n = 6)	500	459,47	91,89 ± 1,18; (1,28)

DP, desvio padrão; DPR, desvio padrão relativo.

*em relação ao teor declarado

Tabela 5. ANOVA das áreas absolutas da curva padrão da amoxicilina, intervalo de 404,29 a 605,22 µg/mL

Parâmetro	valor-p (IC = 95%)
Precisão intermediária (n = 2)	0,0737

Tabela 6. Avaliação da exatidão do método para a amoxicilina.

Nível de concentração da amostra (%)	Padrão adicionado à amostra (µg/mL)	Concentração média (µg/mL) (n=3)	Recuperação (%), (DPR%)
92	50	51,12	102,18 ; (2,85)
102	100	100,47	100,45 ; (1,50)
112	150	153,83	102,49 ; (1,33)

DP, desvio padrão; DPR, desvio padrão relativo.

*em relação à concentração trabalho

Tabela 7. Avaliação da robustez do método alterando a proporção de orgânico na fase móvel (n=3)

Variação	Amoxicilina					
	Tr	k	N	T	R	Área
Tampão:ACN (97:3; v/v)	4,51	1,53	6253	1,12	2,66	4771898
Tampão:ACN (98:2; v/v)	5,93	2,28	6942	1,06	3,30	4789233
Tampão:ACN (99:1; v/v)	7,82	3,28	7567	1,01	3,90	4777323
valor-p; IC = 95 %						
0,9618						

Tampão, tampão fosfato de amônio 25mM; ACN, acetonitrila; Tr, tempo de retenção; k, fator de capacidade; N, pratos; T, fator de cauda; R, resolução entre a amoxicilina e a impureza com tempo de retenção relativo de 0,85; IC, intervalo de confiança

Tabela 8. Avaliação da robustez do método alterando o fluxo (n=3)

Variação	Amoxicilina			
	k	N	T	R
Fluxo 1,4 mL/min	2,39	6399	1,11	3,43
Fluxo 1,5 mL/min	2,45	6305	1,11	3,34
Fluxo 1,6 mL/min	2,43	5892	1,11	3,30

k, fator de capacidade; N, pratos teóricos; T, fator de cauda; R, resolução entre a amoxicilina e a impureza com tempo de retenção relativo de 0,85; IC, intervalo de confiança.

Figura 2. Cromatograma do componente ativo do padrão de amoxicilina 500 µg/mL e da pureza do pico

Figura 3. Cromatograma do componente ativo da amostra de amoxicilina, supostamente na concentração de 500 µg/mL, e da pureza do pico cromatográfico obtidos por CLAE e pelo detector de arranjo de fotodiodos.

Figura 4. Representação gráfica da curva padrão da amoxicilina