

# Validación de un método analítico por HPLC para la determinación de Roxitromicina en comprimidos

## Validation of Analytical Method by HPLC for determination of Roxithromycin in Tablets

MIRIAM GUTIÉRREZ\* Y MIRIAM REGNAULT\*

### Resumen

La roxitromicina es un antibiótico que pertenece al grupo de los macrólidos y es utilizado en infecciones de gérmenes sensibles broncopulmonares, de la esfera otorrinolaringológica. Los antibióticos macrólidos inhiben la síntesis proteica mediante la unión reversible con las subunidades ribosómicas 50S de los microorganismos sensibles. El efecto principal es la inhibición del paso de translocación en la síntesis proteica, de manera que se inhibe la síntesis misma. La acción es predominantemente bacteriostática, pero a altas concentraciones es levemente bactericida.

El propósito de esta investigación fue la validación de un método por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación de un antibiótico cuyo principio activo es roxitromicina en su presentación comercial de 300 mg por comprimido. Las condiciones cromatográficas fueron: columna C18  $\mu$ -Bondapak (4,6 x 250 mm), 10 $\mu$ , fase móvil de acetonitrilo:metanol:acetato de amonio 0,5% (50:30:20) a 1,5 mL/min, detector UV a 215 nm, volumen de inyección de 50  $\mu$ l y un tiempo de corrida de 10 min. Los resultados demuestran que el método desarrollado es preciso, exacto, específico y lineal ya que estos parámetros se encuentran dentro de los rangos requeridos en la *Farmacopea Americana*, USP 28 y la Conferencia Internacional de Armonización (ICH).

**Palabras clave:** roxitromicina, cromatografía líquida de alta resolución, HPLC, validación.

### Abstract

Roxithromycin is an antibiotic that belongs to macrolides group and it is used in infections germs of the respiratory system. The macrolides antibiotic inhibits protein synthesis by a reversible union with the 50 S ribosomic subunits of sensitive microorganisms. The main effect is the inhibition of the translocation step in the protein synthesis, so that the synthesis itself is inhibited. The action is predominantly bacteriostatic, but at high concentrations it is slightly germicide.

The purpose of this investigation was the validation of a high resolution liquid chromatography (HPLC) method for the roxithromycin analysis in its commercial presentation of 300 mg tablet. The conditions for HPLC analysis were: a 10  $\mu$  column-C18  $\mu$ -Bondapak (4,6 x 250 mm), mobile phase acetonitrile:methanol:0,5% ammonium acetate (50:30:20) at 1,5 mL/min, UV detection at 215 nm, injection volume of 50  $\mu$ l and separation time of 10 min. The results show a validation of a method for roxithromycin determination by HPLC in terms of accuracy, precision, selectivity, and linearity as parameters which are within the criteria required by the United States Pharmacopeia, USP 28 and the International Conference of Harmonization, ICH.

**Key Words:** roxythromycin, high resolution liquid chromatography, HPLC, validation.

### Introducción

La roxitromicina es un antibiótico que pertenece al grupo de los macrólidos y es utilizado en infecciones de gérmenes sensibles broncopulmonares, de la esfera otorrinolaringológica (figura 1). Los gérmenes usualmente sensibles a este fármaco son: *Streptococcus A*, *Streptococcus agalactiae*, *Neumococo*, *Meningococo*, *Gonoco-*

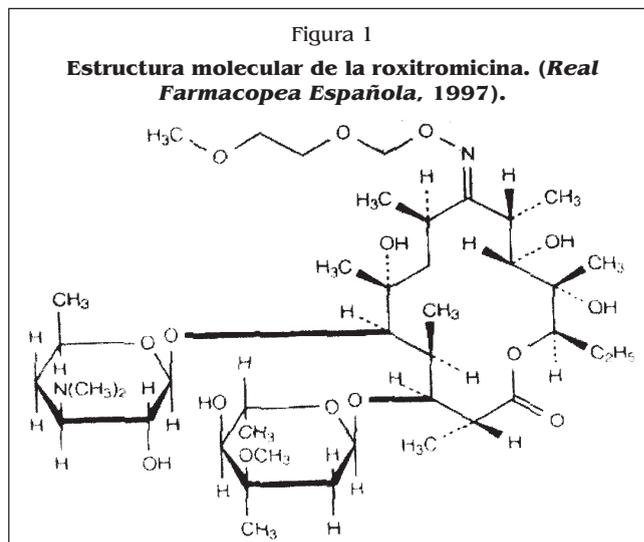
*co*, *Bordetella pertussis*, *Listeria monocitogenes*, *Clostridium*, *Chlamydia trachomatis* y *psittaci*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Campylobacter*, *Legionella pneumophilia*. Las especies medianamente sensibles son: *Haemophilus influenzae*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* y las especies resistentes son las *Pseudomonas (Spilva y Muktans, 2003)*. Los antibióticos macrólidos inhiben

\* Postgrado de Aseguramiento de la Calidad, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Apdo. 40109 Caracas 1040<sup>a</sup> Venezuela. Telf. (58) 212 605.2751 Fax: (58) 212 605.2707 [miriamregnault@hotmail.com](mailto:miriamregnault@hotmail.com)

la síntesis proteica mediante la unión reversible con las subunidades ribosómicas 50S de los microorganismos sensibles (Goodman y Gilman, 1991). El efecto principal es la inhibición del paso de traslocación en la síntesis proteica, de manera que se inhibe la síntesis misma. La acción es predominantemente bacteriostática, pero a altas concentraciones es levemente bactericida (Martindale, 1993).

Rutinariamente, el laboratorio fabricante de la roxitromicina emplea el método por difusión en agar 3 dosis para la determinación del contenido o potencia, el cual fue desarrollado por la propia empresa. Es importante resaltar que no existe método farmacopéico para la determinación de roxitromicina en comprimidos. La Real Farmacopea Española (1997) propone el análisis por HPLC para el principio activo roxitromicina. Por otra parte, ninguna otra farmacopea hace referencia sobre el antibiótico en estudio. Diversos autores han publicado diferentes metodologías cromatográficas aplicables al análisis del antibiótico roxitromicina y varios macrólidos relacionados en diversas matrices. Kanfer y col., en 1998 reportaron una revisión del análisis de los antibióticos los macrólidos. Se han publicado metodologías para la determinación de este antibiótico en diversas matrices, tales como alimentos, tejidos biológicos y sedimentos de ríos utilizando espectrometría de masas, que si bien es muy sensible su aplicación en la industria farmacéutica actualmente, es muy limitada (Lim y col., 2000; Dubois y col., 2001; Loffler y Ternes, 2003; Miao y Metcalfe, 2003). Choi y col. (2001) reportaron la determinación de este antibiótico utilizado como estándar interno en la determinación de claritromicina en el plasma humano por HPLC con detección electroquímica, la cual es poco utilizada en el control de calidad de productos farmacéuticos. La estructura molecular de la roxitromicina presenta escasos grupos cromóforos y auxocromos, por lo que su absorción en UV es débil (figura 1). Por tal razón, se propone la determinación de la roxitromicina derivada en formulaciones farmacéuticas por fluorescencia y espectrofotometría visible luego de la oxidación con cerio (VI) y permanganato, respectivamente (Khashaba, 2002; Suhagia y col. 2006). Chepkwony y col., (2001) reportaron también una metodología de cromatografía líquida isocrática para el análisis de materia prima de roxitromicina, y Qi y col. (2004) reportaron la determinación simultánea de roxitromicina y cloruro de amroxol a niveles de 201,2 - 2012,2  $\mu\text{g/ml}$  y 42,7 - 427,0  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, en tabletas, utilizando cromatografía líquida con detección ultravioleta.

El presente trabajo describe la validación de un método analítico por HPLC con detección ultravioleta para la determinación de roxitromicina en tabletas. El método reportado es isocrático, metodológicamente útil para ser



utilizado como control de calidad en la industria farmacéutica y con niveles de sensibilidad superior a los procedimientos similares descritos con anterioridad.

## Materiales y métodos

### EQUIPOS

Cromatógrafo líquido Agilent 1100 series, con detector UV, bomba isocrática 4 válvulas (Prod&Khym, Caracas, Venezuela). Baño ultrasonido Branson 5510 (Cenatec, Caracas-Venezuela). Balanza analítica Mettler AT 200 (Cenatec, Caracas-Venezuela). Espectrofotómetro UV Hewlett Packard modelo 8452A (Prod&Khym, Caracas, Venezuela).

### MATERIALES

Columna C18  $\mu$ -Bondapak (4,6 x 250 mm), 10 $\mu$  (Waters, Cienvar, Caracas-Venezuela). Acetonitrilo (Fischer Scientific) y metanol (Merck), ambos grado HPLC (Didacta, Caracas-Venezuela). Agua grado HPLC obtenida utilizando un equipo MilliQ (Cienvar, Caracas-Venezuela). Patrón USP de roxitromicina (Rockville, USA). Patrones de referencia de roxitromicina derivado 1 (de-cladinosa) 95,3% p/p, isómero Z de roxitromicina 92,2% p/p, roxitromicina derivado 3 (Éter derivado) 84,8% p/p, roxitromicina derivado 4 (metil derivado) 95,0% p/p, roxitromicina derivado 5 (oxima de eritromicina) 96,5% p/p (Aventis-Pharma, Caracas-Venezuela). Muestras de roxitromicina comprimidos 300 mg (Aventis-Pharma, Caracas-Venezuela). Acetato de amonio grado reactivo Reidel de Häen (Didacta, Caracas-Venezuela) Membranas de filtración Sartorius tamaño de poro 0,45  $\mu\text{m}$  Sartolon Polyamida (Didacta, Caracas-Venezuela).

## Metodología analítica

### PREPARACIÓN DE LA FASE MÓVIL

La fase móvil empleada en la metodología utilizada

fue acetonitrilo:metanol: acetato de amonio 0,5% (50:30:20). La mezcla fue filtrada usando membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  y desgasificada con vacío con agitación magnética por 10 minutos.

#### PREPARACIÓN DEL PATRONES Y MUESTRAS

Las soluciones de patrones y muestras se prepararon justamente antes de ser utilizados. Se pesaron cantidades de roxitromicina necesaria para obtener una solución madre de 10 mg/mL de concentración, se asistió la disolución con ultrasonido y se llevó a volumen con fase móvil. Finalmente, se filtró a través de membranas de filtración de 0,45  $\mu\text{m}$ .

#### PROCEDIMIENTO CROMATOGRÁFICO

Las condiciones cromatográficas fueron: columna C18  $\mu$ -Bondapak (4,6 x 250 mm), 10 $\mu$ , fase móvil de acetonitrilo:metanol:agua:acetato de amonio (50:30:20:1g) a de 1,5 mL/min, detector UV a 215 nm, volumen de inyección de 50  $\mu\text{l}$  y un tiempo de corrida de 10 min.

### Validación del método cromatográfico

#### PRECISIÓN

La precisión del método se determinó inyectando por duplicado nueve muestras de roxitromicina a una concentración de 1 mg/ml. Se calculó el porcentaje de desviación estándar relativa (DSR, ver sección de resultados, Tabla I). Para la precisión del sistema se realizaron seis inyecciones consecutivas de la concentración 1 mg/mL de la curva estándar de roxitromicina. Se calculó el porcentaje de desviación estándar relativa (DSR) de las áreas y tiempos de retención para cada una de ellas (ver sección de resultados, Tabla II).

#### ADECUACIÓN DEL SISTEMA

Utilizando los cromatogramas obtenidos en la determinación de la precisión de método en la forma indicada anteriormente, se calcularon los valores de número de platos teóricos (N), factor de cola (T) y factor de capacidad k' utilizando el programa de computación HP ChemiStations programado con los cálculos de los parámetros descritos en la USP (ver sección de resultados, Tabla III). El tiempo muerto se determinó mediante la inyección de metanol con una gota de acetona; el tiempo obtenido fue de 1,152.

#### EXACTITUD

La exactitud se determinó calculando el porcentaje de recuperación de nueve réplicas de un nivel de concentración del 100% de un lote comercial de roxitromicina,

Tabla I

#### Precisión del Método Analítico de Roxitromicina Comprimidos (1 mg/mL)

Muestra	Inyección	Áreas	% DSR
M1	1	3750,78296	0,03
	2	3749,34180	
M2	1	3730,91113	0,36
	2	3750,05396	
M3	1	3730,06226	0,02
	2	3731,03296	
M4	1	3742,33081	0,01
	2	3742,04639	
M5	1	3787,17993	0,16
	2	3778,75171	
M6	1	3730,88574	0,26
	2	3744,84570	
M7	1	3711,53662	0,14
	2	3703,89453	
M8	1	3707,46948	0,55
	2	3736,83472	
M9	1	3795,64746	0,25
	2	3808,99219	
<b>PROMEDIO</b>		<b>3746,25557</b>	
<b>% DSR</b>			<b>0,79</b>

Tabla II

#### Precisión del Sistema para una Solución Estándar de Roxitromicina (1mg/mL)

Inyección	Tiempo de retención (min)	Áreas	Concentración obtenida (mg/mL)
1	5,649	3876,87891	1,010
2	5,651	3880,95825	1,011
3	5,661	3885,02271	1,012
4	5,667	3884,83276	1,012
5	5,668	3884,17627	1,012
6	5,667	3882,7915	1,011
<b>PROMEDIO</b>	<b>5,661</b>	<b>3882,4434</b>	
<b>% DSR</b>	<b>0,15</b>	<b>0,08</b>	

tomando como valor de referencia el resultado obtenido por el método microbiológico validado para el mismo lote (ver sección de resultados, Tabla IV).

#### ESPECIFICIDAD

La especificidad del método se evaluó comparando los cromatogramas del placebo (todos los excipientes que se utilizan en la fabricación de la roxitromicina

Tabla III

**Resultados de la Adecuación del Sistema para el Análisis de Roxitromicina**

Inyección	Compuesto (min)	TR	AREA	T	K'	N
1	Roxitromicina	5,649	3876,87891	1,813	3,903	2052
2	Roxitromicina	5,651	3880,95825	1,816	3,905	2054
3	Roxitromicina	5,661	3885,02271	1,818	3,914	2060
4	Roxitromicina	5,667	3884,83276	1,816	3,919	2031
5	Roxitromicina	5,668	3884,17627	1,805	3,920	2066
6	Roxitromicina	5,667	3882,7915	1,811	3,919	2031
<b>PROMEDIO</b>		<b>5,661</b>	<b>3882,4434</b>	<b>1,813</b>	<b>3,91</b>	<b>1,813</b>
<b>% DSR</b>		<b>0,15</b>	<b>0,08</b>	<b>0,25%</b>	<b>0,19%</b>	<b>0,25%</b>

Tabla IV

**Exactitud del Método Analítico de Roxitromicina Comprimidos (1 mg/ml)**

Muestra	Inyección	Concentración obtenida (mg/comprimido)	Recuperación %
M1	1	292,67	98,26
	2	292,56	98,23
M2	1	290,92	97,68
	2	290,41	97,51
M3	1	290,65	97,59
	2	290,72	97,61
M4	1	292,74	98,29
	2	292,71	98,28
M5	1	296,45	99,53
	2	295,79	99,31
M6	1	291,64	97,92
	2	292,27	98,13
M7	1	290,87	97,66
	2	290,27	97,46
M8	1	290,65	97,59
	2	292,85	98,32
M9	1	297,46	99,87
	2	298,50	100,22
Promedio		292,79	98,30
% DSR		0,87	

comprimidos), fase móvil, fase móvil en hisopo, etanol (solvente utilizado en la validación de limpieza), etanol en hisopo, estándar de roxitromicina y los estándares de impurezas (isómero Z-de roxitromicina, roxitromicina derivado 1, roxitromicina derivado 3, roxitromicina derivado 4 y roxitromicina derivado 5) con el cromatograma de la muestra de roxitromicina. Estas impurezas pudieran estar presentes en la materia prima, provenientes del proceso de síntesis de la misma.

**LINEALIDAD Y RANGO**

La linealidad se determinó inyectando dos réplicas de cada nivel de concentración de la curva de calibración, utilizando estándar secundario de roxitromicina. Las concentraciones utilizadas en la curva estándar fueron las siguientes: 0,6; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1 y 1,2 mg/mL (ver sección de resultados, Tabla V).

**Resultados y discusión****PRECISIÓN**

Los resultados para la determinación de la precisión en términos de repetibilidad del método analítico se muestran en la Tabla I. Como puede observarse en los resultados mostrados para las muestras de comprimidos 300 mg, el porcentaje de desviación estándar relativa fue de 0,79. Los resultados de la precisión del sistema, basados en la variación de áreas y tiempo de retención del método analítico, se muestran en la Tabla II. Al igual que los resultados de precisión del método analítico, la desviación estándar relativa fue menor a 2%, es decir, el método demostró ser preciso (USP 28, ICH).

**ADECUACIÓN DEL SISTEMA**

Los resultados promedios del número de platos teóricos, factor de cola y factor de capacidad obtenidos fueron: N= 1.813; T= 1,8 y k'= 3,91 respectivamente. La evaluación de la adecuación del sistema permitió verificar que el sistema de medición funcionara apropiadamente y se demostró que los resultados obtenidos en la validación del método analítico son fiables (Tabla III).

**EXACTITUD**

La exactitud se evaluó en términos de recuperación a partir de los resultados obtenidos en el ensayo de precisión. Se tomó el valor de referencia 297,84 mg/comprimido, valor que se obtuvo del análisis de rutina

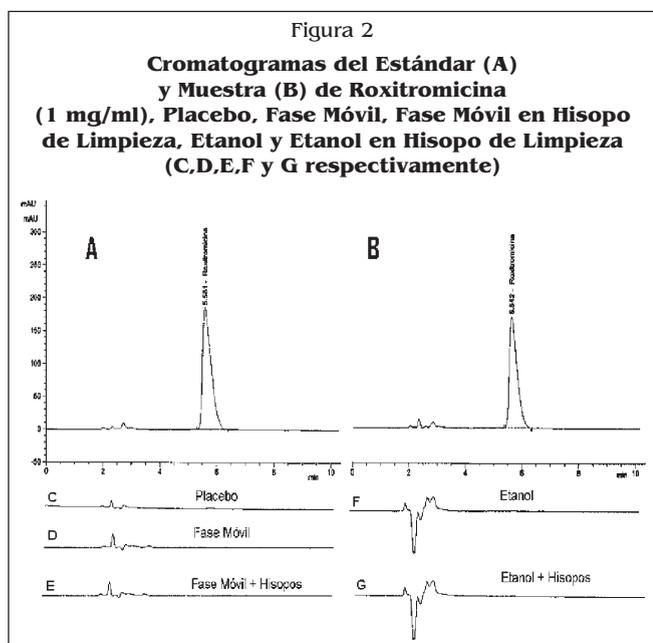
Tabla V  
**Determinación de la Linealidad del Método  
 en el Rango de Concentración**

Concentración (%)	Concentración (mg/mL)	Área	Promedio	% DSR
60	0,6	2252,768	2253,419	0,04
		2254,071		
80	0,8	3112,979	3117,162	0,19
		3121,346		
90	0,9	3401,713	3421,813	0,85
		3441,913		
100	1,0	3982,975	3940,051	1,54
		3897,128		
110	1,1	4166,833	4170,481	0,12
		4174,129		
120	1,2	4585,401	4590,255	0,15
		4595,109		

por el método microbiológico (Clavel y Pedrique, 1991) validado para muestras del mismo lote de comprimidos de roxitromicina. Para obtener un resultado por el método por HPLC se realizaron los cálculos para obtener el contenido de las nueve muestras evaluadas. En la Tabla IV se puede observar que la desviación estándar relativa fue 0,87, es decir, menor a 2%, por lo que los porcentajes de recuperación se encuentran dentro de los límites de la especificaciones generales oficiales (USP 28, ICH).

#### ESPECIFICIDAD

En la figura 2 se observan los cromatogramas del estándar y la muestra de roxitromicina, ambos compara-



bles en términos de tiempos de retención. Así como también los obtenidos para el placebo, fase móvil, fase móvil en hisopo, etanol y etanol en hisopo. Así mismo, la resolución mostró ser satisfactoria entre el pico cromatográfico de la roxitromicina y los estándares de impurezas relacionados con el antibiótico estudiados.

#### LINEALIDAD Y RANGO

Los datos de la curva de calibración obtenida en el estudio se muestran en la Tabla V. La ecuación de regresión obtenida para la curva de calibración inyectando dos réplicas de cinco niveles de concentración fue de  $y = 3861,4 x - 21,788$ , con un factor de regresión  $r = 0,997$ . El método mostró la capacidad de producir resultados directamente proporcionales a la concentración del analito dentro del intervalo ensayado, con un coeficiente de correlación lineal ( $r^2$ ) que debe ser  $\geq 0,99$ .

Todos y cada uno de los parámetros de validación evaluados: precisión, adecuación del sistema, exactitud, especificidad, linealidad y rango proporcionaron la evidencia documentada de que el procedimiento validado descrito proporciona una metodología adecuada al control de calidad del producto roxitromicina en muestras de comprimidos 300 mg, según la USP 28 y la guía ICH.

#### COMPARACIÓN MÉTODO MICROBIOLÓGICO VS HPLC

El mismo lote de muestra roxitromicina 300 mg comprimidos que se utilizó para el desarrollo y la validación del método por HPLC en el presente trabajo, fue utilizado para el análisis por el método microbiológico difusión en agar. Al comparar los resultados del método microbiológico y HPLC (297,84 vs 292,78 mg/comprimidos), se obtuvo una desviación estándar relativa de 1,17%, es decir, la diferencia es muy poca si tomamos en cuenta que el fundamento de ambos métodos es totalmente diferente.

#### Conclusiones y recomendaciones

De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos concluir que el método de ensayo reportado para la determinación de roxitromicina en comprimidos por HPLC es preciso, exacto, específico y lineal para los parámetros evaluados en este estudio, ya que se encuentra dentro de los rangos establecidos. Los métodos microbiológicos, en su gran mayoría, son los utilizados oficialmente para establecer la actividad de los antibióticos. Sin embargo, la cromatografía líquida de alta resolución es la técnica que en los últimos años ha crecido en importancia más rápidamente. Cada una de estas técnicas tiene sus ventajas y limitaciones, pero la metodología propuesta en este estudio tiene la ventaja de la obtención de resultados en un tiempo más corto, sin dejar a un lado la comprobación de la actividad del antibiótico; para ello se propone

utilizar el mismo método de difusión en agar, con las mismas variantes y concentraciones, tanto de la muestra como del estándar. Si la sustancia ensayada es un agente bactericida o bacteriostático, se obtendrá una zona de inhibición, de esta manera se puede corroborar si el lote de roxitromicina ensayado tiene actividad biológica.

El método reportado es isocrático por HPLC con detección ultravioleta, metodológicamente útil para ser utilizado como control de calidad en la industria farmacéutica, disminuyendo los tiempos de análisis en comparación con el método microbiológico que actualmente se utiliza, sin implicar costos de equipamiento más complejo no disponible para los análisis de rutina.

## Agradecimientos

Las autoras agradecen el apoyo de la empresa Aventis-Pharma, donde se desarrolló la investigación, y a la Facultad de Farmacia de la UCV, ya que la misma forma parte del Trabajo Especial de Grado de la autora Miriam Gutiérrez correspondiente al Postgrado de Aseguramiento de la Calidad de dicha Institución.

## Referencias bibliográficas

- CHEPKWONY HK, KAMAU FN, RODRÍGUEZ E, ROETS E Y HOOGMARTENS J. (2001). Isocratic liquid chromatographic method for the análisis of roxithromycin and structurally related substances in bulk samples. *J Chromatogr* 54: 725-729.
- CHOI S, KIM S, LEE H, NA D, YOON Y, LEE S, KIM J, LEE K Y LEE H. (2001). Column-switching high-performance liquid chromatographic determination of clarithromycin in human plasma with electrochemical detection. *Talanta* 54: 377-382.
- CLAVELL L Y PEDRIQUE M. (1991). *Métodos de difusión. Análisis Microbiológico de los Antibióticos*. Fondo Editorial Facultad de Farmacia-UCV, Caracas, Venezuela, pp. 1-5.
- DUBOIS M, FLUCHARD D, SIOR E Y DELAHAUT PH. (2001). Identification and quantification of five macrolide antibiotics in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*: 753: 189-202.
- GOODMAN LS Y GILMAN A. (1991). *Agentes Antimicrobianos. Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 8ª ed, Editorial Médica Panamericana, México, p. 1096.
- ICH Q2A: *Validation of Analytical Methods (Definitions and Terminology)*, October 1994. ICH Q2B: *Analytical Validation-Methodology*, November, 1996.
- KANFER I, SKINNER M Y WALTER R. (1998). Analysis of macrolide antibiotics. *J Chromatogr A* 812: 255-286.
- KHASHABA P. (2002). Spectrofluorimetric analysis of certain macrolide antibiotics in bulk and pharmaceutical formulations. *J Pharm & Biomed Anal* 27: 923-932.
- LIM J, JANG B, LEE R, PARK S Y YUN H. (2000). Determination of roxithromycin residues in the flounder muscle with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 746: 219-25.
- LÖFFLER D Y TERNES T. (2003). Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1021:133-144.
- MARTINDALE (1993). *The extra pharmacopeia*. 30<sup>th</sup>, Edited by James E.F. Reynolds, London, The Pharmaceutical Press. p. 164.
- MIAO XS Y METCALFE CD. (2003). Determination of pharmaceuticals in aqueous xxx using positive and negative voltage switching microbore liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 38:27-34.
- QI M, WANG P, CONG R Y YANG J. (2004). Simultaneous determination of roxithromycin and ambroxol hydrochloride in a new tablet formulation by liquid chromatography. *J Pharm & Biomed Anal* 35:1287-91.
- REAL ACADEMIA ESPAÑOLA. Nuevo tesoro lexicográfico de la Lengua Española (Documento en línea) Disponible en: <http://buscon.rae.es/httle/icono/fondoRAE.jpg> 1992 (Consulta: 2005 Febrero 12). *Real Farmacopea Española*. (1997). *Roxitromicina*. 1ª ed., Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, España, pp.1547-1549.
- SPILVA DE LEER A Y MUKTANS SPILVA Y. (2000). *Guía de especialidades farmacéuticas*. 26ª ed., Global ediciones S.A., Caracas, Venezuela, pp. 8.
- SUHAGIA B, SHAH S, RATHOD I, PATEL H, DOSHI K Y PARMAR V. (2006). Spectrophotometric estimation of roxithromycin in tablet dosage forms. *Indian J. Pharm.Sci* 68 (4):543-546.
- UNITED STATES PHARMACOPEA. USP 28 – NF 23 General Chapters: <1225> *Validation of compendial methods* (2005). (Documento en línea) Disponible en <http://www.uspnf.com> (Consulta: Enero 23, 2005).

Recibido: 19 de marzo de 2007  
Aprobado: 28 de junio de 2007