

50524
48



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"**

**"Implementación de la Técnica de Cuantificación
de Clenbuterol Clorhidrato Por Electroforesis
Capilar Para el Producto Mucovibrol C".**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:
BEATRIZ GONZÁLEZ VIGUERAS

DIRECTOR: IBQ. Luciano López Horcasitas.
ASESOR: Q. Carlos Salvador Valadez Sánchez.



MÉXICO D.F.

2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional Autónoma de México

JURADO ASIGNADO SEGÚN EL TEMA:

PRESIDENTE

M en C Rosalinda Escalante Pliego

VOCAL

IBQ Luciano López Horcasitas

SECRETARIO

Q Carlos Salvador Váladez Sánchez

PRIMER SUPLENTE

Q Ma. Teresa Mendoza Mata

SEGUNDO SUPLENTE

Q Ma. Guadalupe Miranda Jimeno

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorios LIOMONT S. A. de C.V. Departamento de Aseguramiento de Calidad Unidad de Control Químico.

ASESOR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Q Carlos Salvador Váladez Sánchez

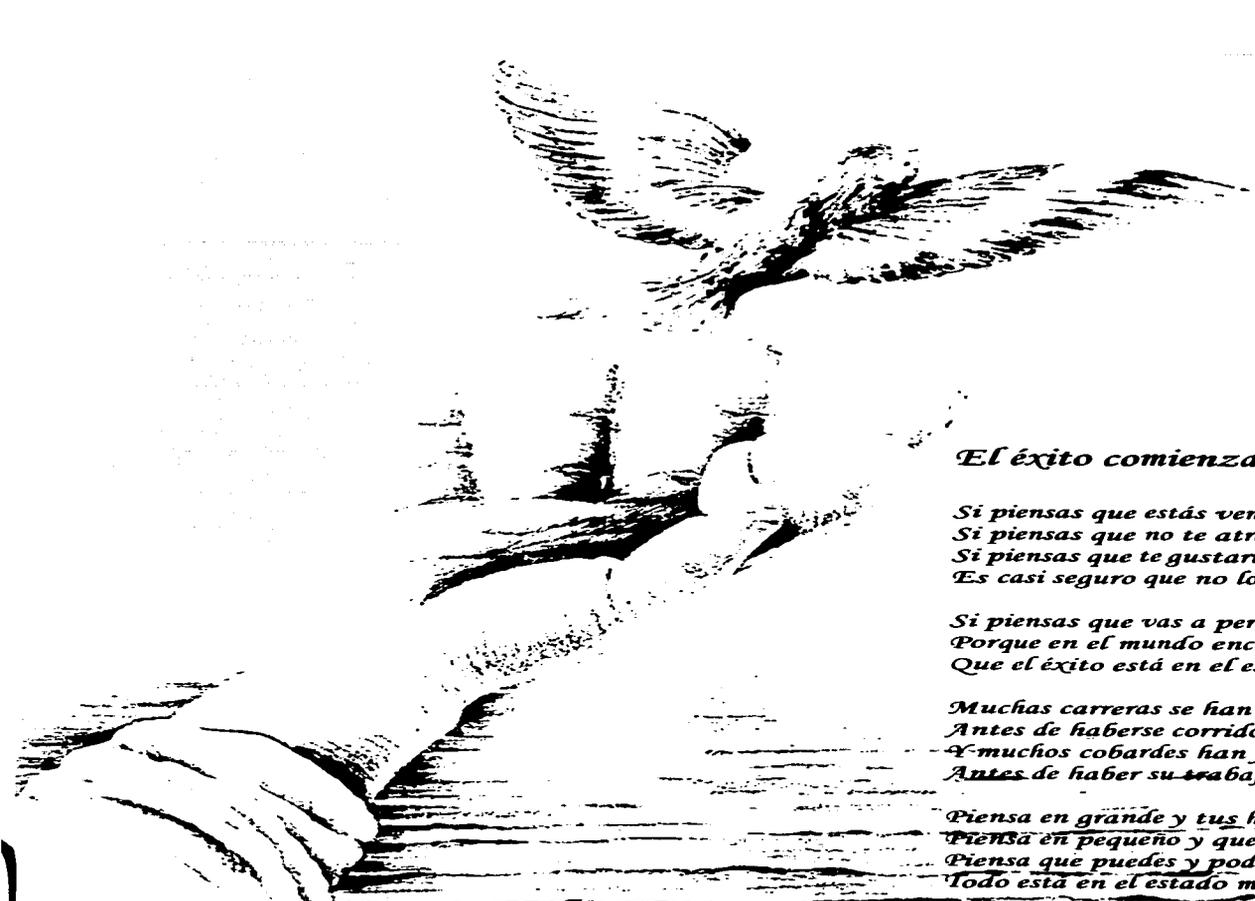
DIRECTOR DE TESIS


IBQ Luciano López Horcasitas

SUSTENTANTE


Benítez González Viguera

**EL PRESENTE PROYECTO SE REALIZÓ EN EL
LABORATORIO DE CONTROL QUÍMICO DE LA
COMPAÑÍA LIOMONT S.A. de C.V.**



El éxito comienza con la voluntad

*Si piensas que estás vencido, lo estás;
Si piensas que no te atreverás, no lo harás;
Si piensas que te gustaría ganar, pero no puedes,
Es casi seguro que no lo lograrás.*

*Si piensas que vas a perder, ya has perdido,
Porque en el mundo encontrarás
Que el éxito está en el estado mental.*

*Muchas carreras se han perdido
Antes de haberse corrido,
Y muchos cobardes han fracasado
Antes de haber su trabajo empezado.*

*Piensa en grande y tus hechos crecerán,
Piensa en pequeño y quedarás atrás,
Piensa que puedes y podrás,
Todo está en el estado mental.*

*Si piensas que estás aventajado, lo estás;
Tienes que pensar bien para elevarte,
Tienes que estar seguro de ti mismo,
Antes de ganar un premio.*

*La batalla de la vida no siempre la gana
El hombre más fuerte o el más ligero,
Porque tarde o temprano, el hombre que gana,
Es aquel que cree poder hacerlo.*

Napoléon Hill

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y a la facultad de estudios Superiores Zaragoza por darme la oportunidad de superarme profesionalmente.

A los profesores integrantes del H. Jurado, por sus acertadas aportaciones y comentarios.

A Luciano López por el gran apoyo que me brinda, para que me supere y sea mejor día con día en mi vida profesional.

A todos mis profesores por su paciencia y dedicación, que fueron la base para que culminaran mis estudios.

A los Laboratorios LIOMONT por todo el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

Al Profesor Carlos Salvador por su gran apoyo y confianza. Para que este sueño fuese realidad.

A mis compañeros y amigos de trabajo Tony, Blanca, Raúl y sobre todo a Guille y Pepe por la gran amistad y apoyo que me han brindado.

*Siente lo que dices....
Con cariño;
Di lo que piensas....
Con esperanza;
Piensa lo que haces....
Con fe,
Has lo que debes....
Con amor.
Porque vivir...
Es llegar a donde todo empieza,
A donde nada termina.*

DEDICATORIAS

A Dios

*Por ser la vela de la que nace
la luz que brilla en toda oscuridad.
Por darme la fuerza necesaria para
ser mejor día con día.*

*A mi Mάma, por todo el esfuerzo,
que realizo para que yo pudiese tener
una carrera y ser alguien en la vida,
gracias por enseñarme a ser mujer, y
no rendirme ante nada, por sacar de mi
la fortaleza en los momentos más
dificiles, por ser el pilar y eje de mi
vida; porque sin ti nada de lo que he
logrado seria.*

*A mis mejores amigas, Janet, Lety, Sonia y
Susana, por compartir tantos momentos
bellos y sobre todo por brindarme su amistad
incondicional en los momentos más difciles:
ya que la amistad es el tesoro más grande de
este mundo.*

*Y a todos aquellos que no necesito
mencionar porque saben que tienen un
lugar especial en mi corazón.*

*A mi Mάma Josefina, a mis tíos
Jaime y Leticia por cuidarme
desde que era yo pequeña, e
impulsarme a seguir adelante y
superarme.*

*A Luciano, Guille y Pepe, por su gran
apoyo, por sus regaños y consejos que
son los que me impulsaron a culminar
este trabajo.*

*Al amor de mi vida, por enseñarme que
que las cosas más simples y sencillas
son las más bellas de este mundo, por
enseñarme lo que es verdaderamente
ese sentimiento limpio y puro que es el
amor.*

ÍNDICE.

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Historia de la Electroforesis capilar.....	2
2.2 Definición de electroforesis.....	4
2.3 Electroforesis Capilar.....	5
2.4 Breves nociones teóricas.....	6
2.4.1 Corriente electroosmótica.....	8
2.5 De la electroforesis en papel filtro a la electroforesis capilar.....	11
III. APARATO PARA ELECTROFORESIS CAPILAR.....	12
IV. INSTRUMENTACIÓN.....	15
V. PRINCIPIO FÍSICOQUÍMICO.....	16
5.1 Capilares.....	19
5.1.1 Siembra de las muestras.....	19
5.2 Voltajes.....	21
5.3 Eficacia de la separación.....	22
5.4 Polaridad.....	22
5.5 Sistemas de detección.....	22
5.6 Reactivos en electroforesis capilar.....	24
VI. TIPOS DE ELECTROFORESIS CAPILAR.....	24
6.1 Electroforesis capilar libre.....	24
6.2 Electroforesis de zona.....	25
6.3 Electroforesis capilar por isoelectroenfoque.....	25
6.4 Isotacoforesis.....	26
6.5 MEKC o MECC (electroforesis micelar electrocinética).....	28
6.5.1 Micelas.....	29
6.5.2 Clases de surfactantes y propiedades.....	30
6.6 Electroforesis capilar en gel (CGE o ECG).....	31
6.6.1 Capilares.....	33
6.6.2 Aplicaciones.....	34
6.7 Isoelectroenfoque capilar.....	34
6.8 Isotacoforesis.....	35
6.9 Aplicaciones de la electroforesis Capilar.....	36
6.9.1 Aplicaciones de la Isotacoforesis.....	36
6.9.2 Electroforesis capilar en zonas (CZE).....	37
6.9.3 ECIF (O CIEF).....	38
6.10 Electro cromatografía micelar. MEEC.....	38
6.10.1 Definición.....	38
VII. SELECCIÓN DE SOLUCIONES AMORTIGUADORAS.....	40
7.1 Tabla de soluciones amortiguadoras.....	44
7.1.1 Soluciones amortiguadoras Zwitteriónicas.....	46

7.2	Aditivos.....	46
7.2.1	Surfactantes.....	47
7.2.2	Sectores quirales.....	48
7.2.3	Ciclodextrinas.....	49
7.2.3.1	Ciclodextrinas (CD) o (CDs).....	49
7.2.3.2	Estructura espacial de las CD.....	50
7.2.3.3	La conicidad.....	50
7.2.3.4	La cavidad.....	50
7.2.3.5	Uniones químicas entre en huésped y las CD.....	51
7.2.3.6	Las principales propiedades de las ciclodextrinas.....	52
VIII.	APLICACIONES.....	54
IX.	DESARROLLOS TECNOLÓGICOS QUE CONTRIBUYERON A LA EC.....	54
X.	VENTAJAS DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR.....	55
10.1	Comparación de EC vs HPLC.....	56
10.2	Volúmenes empleados.....	57
10.3	Aplicaciones de la EC en la Industria Farmacéutica.....	58
10.3.1	Costos de operación.....	60
XI.	FICHA TÉCNICA DEL CLENBUTEROL CLORHIDRATO.....	61
11.1	Farmacología del Clenbuterol.....	64
11.2	Farmacocinética y farmacodinamia en humanos.....	64
11.3	Contraindicaciones.....	64
11.4	Precauciones o restricciones de uso durante el embarazo.....	65
11.5	Reacciones secundarias y adversas.....	65
11.6	Interacciones medicamentosas y de otro género.....	65
11.7	Alteraciones de pruebas de laboratorio.....	65
11.8	Precaución y relación con efectos de carcinogenesis.....	65
11.9	Sobredosificación o ingesta accidental.....	65
XII.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	66
XIII.	OBJETIVO GENERAL.....	67
13.1	Objetivos particulares.....	67
XIV.	HIPÓTESIS.....	68
XV.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	69
15.1	Variables.....	72
15.2	Preparación de soluciones.....	73
15.3	Procedimiento.....	76
15.4	Cálculos.....	76
	PROTOCOLO DE VALIDACIÓN.....	77

15.5 Sistema de electroforesis capilar MDQ P/ACE.....	90
15.6 Análisis estadístico.....	93
15.7 Diagrama de Flujo.....	94
XVI. RESULTADOS.....	95
XVII. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	141
XVIII. CONCLUSIONES.....	146
XIX. PROPUESTAS.....	148
XX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149

TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

I



I. INTRODUCCIÓN.

La electroforesis capilar se popularizó a principio de los años 80's. Jorgenson *et al.*, (1983)^{32,33}, demostró la excepcional eficacia que podría obtenerse realizando la electroforesis en capilares de vidrio. Su trabajo en la separación por electroforesis de biomoléculas estimuló el desarrollo de la instrumentación comercial y la investigación de áreas de la aplicación donde el uso de electroforesis convencional era poco frecuente. Una área se desarrolló para el análisis farmacéutico donde las pocas aplicaciones de electroforesis estaban apenas comenzando y por tanto tratando de implementar técnicas de cuantificación.

Sin embargo, la introducción de la Electroforesis Capilar (EC) permitió dirigir el análisis cuantitativo y automatizado. Para asegurar la seguridad y eficacia del análisis del producto, es importante caracterizar el activo en la formulación. La caracterización involucra la valoración del activo (pureza) por los métodos físicos y químicos. La medida de propiedades químicas como: ensayo, pureza quiral, el volumen del ion inorgánico, y la confirmación de identidad, la cual es realizada rutinariamente por HPLC y otras técnicas cromatográficas. Recientemente, la electroforesis capilar (EC) se ha desarrollado para realizar estas pruebas, demostrando ser una alternativa complementaria y atractiva a los métodos más establecidos. La mayoría de fármacos son solubles ya sea en agua o en soluciones ácidas o básicas. Por tanto la base para la separación por EC es mediante el pH y las propiedades isoeléctricas que la molécula presente.

La electroforesis capilar (EC) es una familia de técnicas relacionadas que emplean capilares, para realizar separaciones de moléculas grandes y pequeñas. Estas separaciones se facilitan respectivamente por el uso de altos voltajes, que pueden generar el flujo electroosmótico (FEO) de soluciones amortiguadoras y las especies iónicas, dentro del capilar.

La EC:

- Utiliza las fuerzas del campo eléctrico a menudo superior que 500 V/cm.
- Usa la moderna tecnología de detección de tal manera que el electroferograma resultante es similar al cromatograma obtenido por HPLC.
- Tiene las eficacias en el orden de cromatografía gaseosa capilar o aun mayor.
- Requiere cantidades diminutas de muestra.
- Es fácilmente automatizado para el análisis cuantitativo preciso y facilidad de uso.
- Consume cantidades mínimas de reactivos.
- Es aplicable a una selección más ancha de analitos comparada a otras técnicas de la separación analíticas.

Por tal motivo, se pretende implementar una técnica de análisis para cuantificar Clenbuterol-HCl (Pág. 61) por electroforesis capilar, reduciendo de esta forma tiempo, recursos económicos y contribuyendo con ello a la mejora continua de la empresa.



II. ANTECEDENTES.

2.1 Historia de la Electroforesis capilar.

El desplazamiento de sustancias bajo la acción de un campo eléctrico, fue citado por Reuss en 1809 en las memorias de la Sociedad Imperial Natural de Moscú (1809) (Jorgenson *et al.*, 1981)³³

En la figura 1, se observa el comportamiento migratorio de pequeñas partículas de arena en agua contenida en un recipiente de vidrio con un lecho de arena fina en su fondo y dos tubos conteniendo dos electrodos conectados a una batería.

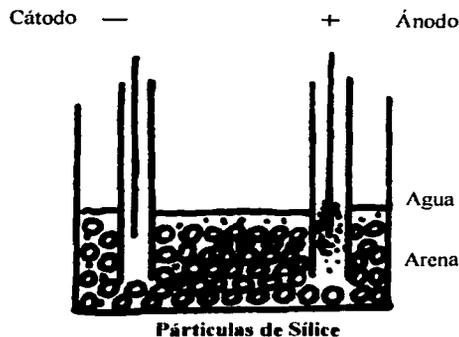


Figura 1. Migración de las partículas de sílice.

El paso de la corriente produce un enturbiamiento en las proximidades del polo positivo producido por la migración de partículas de arena muy pequeñas que se movilizan por su carga eléctrica negativa.



Este experimento puede ser considerado como el primer aporte bibliográfico que revela la polarización de la sílice, pues la arena es dióxido de silicio y fundida permite obtener los capilares que se emplean en la electroforesis capilar (Herren *et al.*, 1987)³⁰.

Varios años más tarde, en 1816, fue observado el transporte del agua por acción de la corriente galvánica generada por la polarización negativa del capilar que une a los recipientes electródicos.

La pared del capilar, sabemos hoy, adquiere carga negativa (al paso de la corriente eléctrica) produciéndose la polarización del agua, la que por consiguiente tiende a desplazarse hacia el polo negativo. Esta corriente líquida que se desplaza en sentido opuesto a la dirección de la corriente eléctrica, se designa con el nombre de Flujo electroosmótico (FEO) (figura. 2) (Herren *et al.*, 1987)³⁰.

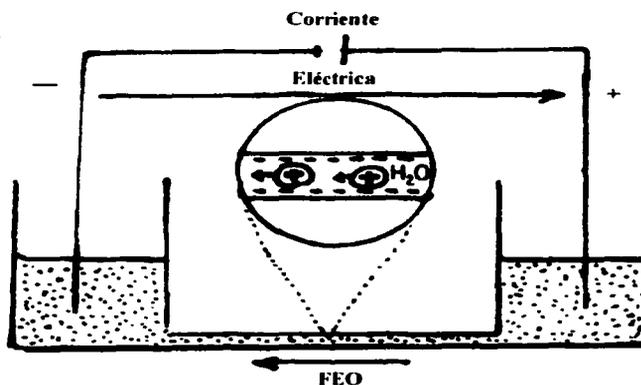


Figura 2. Flujo electroosmótico.

TRABAJOS CON
FALLA DE ORIGEN



2.2 Definición de electroforesis.

Ha sido definida como el movimiento o desplazamiento diferencial de especies cargadas (iones), sustancias neutras o migración pasiva, por atracción o repulsión en un campo eléctrico. La electroforesis en solución en medios libres sin elementos de soporte (agar, almidón, geles de poliacrilamida), fue desarrollada por Tiselius (Guzmán, 1997)²⁶.

Donde resolvió mezclas de proteínas en un tubo de vidrio aplicando un campo eléctrico de corriente continua, no pulsante, estudios que lo hicieron acreedor al Premio Nóbel en Química.

Los problemas experimentales que se presentaron, estuvieron vinculados a la difusión térmica y a la convección, lo que determinó el empleo de medios anticonvectantes como agar, agarosa y poliacrilamidas en forma de geles (Guzmán, 1997)²⁶.

En la actualidad se han desarrollado nuevos soportes, aplicados al campo de las proteínas y productos de la biología molecular, como son los geles de agarosa y poliacrilamida en placas o films de distinto espesor verticales u horizontales como se muestra en al figura 3 (Chrambach, 1985)¹⁵.

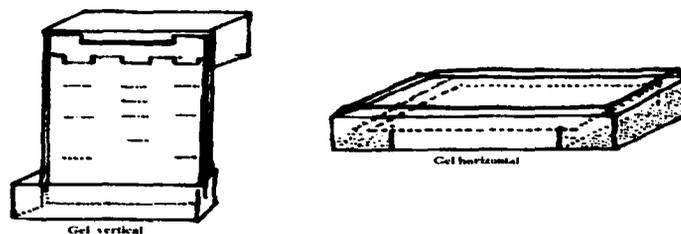


Figura 3. Distintos tipos de electroforesis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



2.3 Electroforesis Capilar.

El empleo de capilares para la separación de sustancias neutras o iones cargados eléctricamente, apareció en 1967 en una experiencia desarrollada por Hjerten empleando capilares milimétricos, los que eran rotados a través de su sección longitudinal para evitar los efectos de la convección (Chrambach, 1985)¹⁵.

Virtanen y Mikkers, (1979) desarrollaron las separaciones empleando electroforesis en capilares de 200 μm de diámetro interno en vidrio y teflón respectivamente (Heiger, 1992)²⁹.

La separación de cloruro, aspartato y glutamato por isotacoforesis, hecha por Martin en 1942, los trabajos de Konstantinov, Oshukova en 1963 y los de Evercast en su tesis de graduación en 1964, fueron los precursores en el empleo de capilares y la medición de la absorción UV a través del mismo, permitió obtener los espectros característicos de la separación (Heiger, 1997)²⁸.

Más adelante, en 1985, (Lukacs y Jorgenson) emplearon técnicas avanzadas en la obtención de capilares de sílica fundida con diámetros de 75 μm . Jorgenson, (1981)³³ clarifica teóricamente las relaciones entre los parámetros operacionales y las cualidades de la separación, revelando el elevado potencial analítico de esta técnica.

Esta separación de péptidos realizada sobre un capilar de sílica fundida a potenciales eléctricos elevados de 20 a 30 kV en un campo de 400 a 500 V/cm refrigerados por aire, fue el lanzamiento de la Electroforesis capilar (Lukacs y Jorgenson, 1981)³³.

Estos capilares de 75 a 100 cm de largo y con diámetros internos de 50-70-100 μm y de 300 a 400 de diámetro externo son los que permiten una capacidad elevada de resolución $N > 200.000$ Platos/m (Lukacs y Jorgenson, 1981)³³.



El flujo electroosmótico generado por los grupos silanol de la superficie interna del capilar da como resultado una corriente plana del frente del líquido que contrasta con el frente parabólico de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (figura 4).

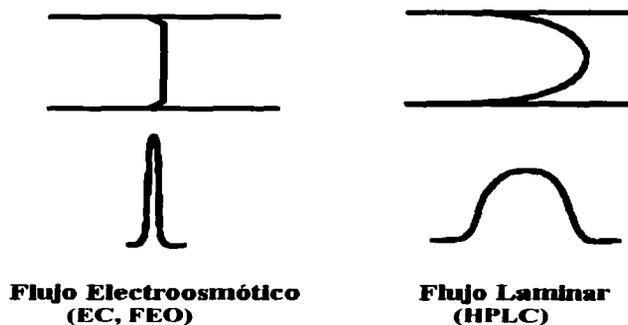


Figura 4. Comparación de flujos entre Electroforesis capilar (FEO) y HPLC (flujo laminar).

La ventaja de esta técnica, es que el capilar de sílice fundida que generalmente se cubre con una capa de polimina para darle mayor rigidez y resistencia, tiene una ventana a través de ella que permite el pasaje de la luz UV de tal manera que la visualización y detección es directa. Con esta técnica descrita es posible separar cationes, aniones, proteínas, macromoléculas y sustancias no cargadas en forma simultánea (Chrambach, 1985)¹⁵

2.4 Breves Nociones Teóricas (Evaerest *et al.*, 1976).¹⁹

La separación por electroforesis está basada en la diferencia de velocidad de los solutos en un campo eléctrico. La velocidad de un ion está dada por:

$$v = \mu_e E$$

Donde:

v = velocidad iónica

μ_e = movilidad electroforética

E = campo eléctrico

Existe una relación entre el voltaje aplicado y la longitud del capilar en Volts/cm, la movilidad de un ion es una constante, la que puede ser determinada por el coeficiente de fricción a través de un medio elegido (Evaerest *et al.*, 1976).¹⁹

$$\mu_c = \frac{\text{Fuerza eléctrica (F}_E\text{)}}{\text{Fuerza friccional (F}_F\text{)}}$$

La fuerza eléctrica está representada en la siguiente ecuación:

$$F_E = qE$$

Donde:
q = carga iónica
E = campo eléctrico

Y para un ion esférico friccional está determinada por la ecuación:

$$F_F = - 6 \pi \eta r v$$

Donde:
q = carga iónica
 η = viscosidad de la solución
r = radio iónico
v = velocidad del ion

En el estado estacionario, las fuerzas son iguales y opuestas:

$$qE = 6 \pi \eta r v$$

$$qE = 6 \pi \eta r v \mu_c E$$

$$\mu_c = \frac{qE}{6 \pi \eta r E}$$

$$\mu_c = \frac{q}{6 \pi \eta r E}$$

FALLA DE ORIGEN



Con lo expuesto, queda en evidencia que especies altamente cargadas tienen movilidades elevadas. La movilidad electroforética se encuentra usualmente en las tablas de constantes físicas (Altria, 1995).⁵

2.4.1 Corriente electroosmótica.

El componente efector más importante en la "Electroforesis Capilar es la electroendosmosis o flujo electroosmótico (FEO) ó corriente electroosmótica".

Surge como consecuencia de aplicar un campo eléctrico que genera una doble capa eléctrica entre la solución y la pared del capilar. En condiciones acuosas, la fase sólida posee un exceso de cargas negativas, como resultado de dos procesos fisicoquímicos, la ionización de la superficie (que es un equilibrio ácido-base) y por otra parte, la adsorción de especies iónicas sobre la superficie del capilar como se observa en la figura 5 (Jorgenson y Lukacs, 1993)³².

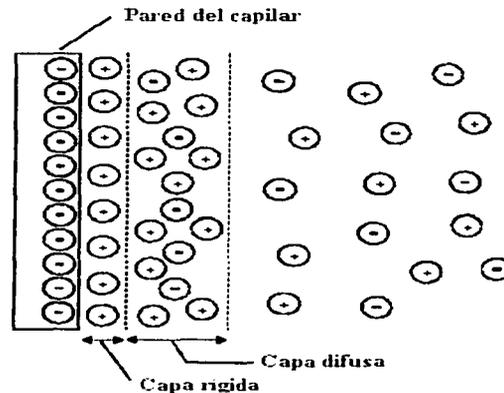


Figura 5. Distribución de la carga en la doble capa en la pared del capilar cargada negativamente produciendo la formación del potencial Z y el Flujo electroosmótico (FEO).



Estos procesos ocurren en el capilar al paso de la corriente eléctrica y la corriente electroendosmótica, se encuentra altamente controlada por los numerosos grupos silanol (SiOH) que también pueden existir como SiO en el capilar (figura 5a).

Los círculos en grisado representan las moléculas de sílica transformadas por hidratación en silanoles en medio acuoso cuando pasa la corriente eléctrica (figura 5b).

Los contraiones (cationes en la mayoría de los casos) mantienen el balance de cargas; ese potencial se llama potencial zeta. Cuando se aplica el voltaje a través del capilar, los cationes que forman la doble capa eléctrica migran hacia el polo negativo (figura 5 c).

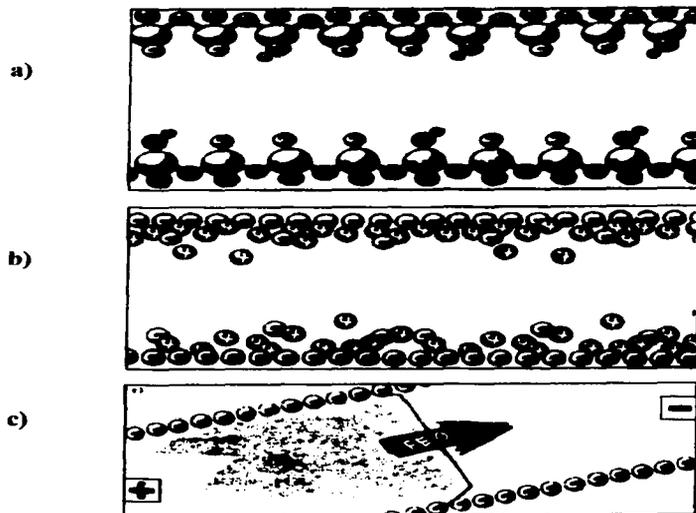


Figura 5. Desarrollo de flujo electroendosmótico: a) Superficie de sílica fundida cargada negativamente (Si-O) b) Acumulación de cationes hidratados cerca de la superficie c) Flujo de cargas hacia el cátodo luego de la aplicación de un campo eléctrico.

Por consiguiente, la doble capa eléctrica tiene un balance que está a su vez en equilibrio con la pared que corresponde al potencial zeta. La magnitud del flujo electroosmótico puede ser expresada en términos de la movilidad y velocidad por la fórmula siguiente (Jorgenson y Lukacs, 1993)³²:

Donde:

$$V_{FEO} = (\epsilon \xi / \eta) E \text{ ó}$$

$$\mu_{FEO} = (\epsilon \xi / \eta)$$

V_{FEO} = velocidad
 μ_{FEO} = movilidad FEO
 ϵ = constante dieléctrica
 ξ = potencial Z

A pH elevado, los grupos silanol son desprotonados y el Flujo electroosmótico es significativamente mayor que a pH bajo donde son protonados, en el cuadro 1, se muestran los factores que afectan a la electroforesis capilar (Jorgenson & Lukacs, 1993)³².

Cuadro 1. Factores que afectan la velocidad de migración	
<i>Factor</i>	<i>Efecto</i>
<ul style="list-style-type: none"> ● Composición del amortiguador de pH ● Fuerza iónica ● Viscosidad ● pH ● Constante dieléctrica ● Aditivos 	<ul style="list-style-type: none"> μ_{eo} μ_{eo} μ_{eo}, μ_{ep} μ_{eo} μ_{eo}, μ_{ep}
<ul style="list-style-type: none"> ● Voltajes ● Dimensiones de la columna ● Temperatura 	<ul style="list-style-type: none"> E E μ_{eo}

$(\mu_{eo} + \mu_{ep})E$ = velocidad de migración (v)

μ_{eo} = movilidad electroosmótica observada.

μ_{ep} = movilidad electroforética observada

E = Volts (V) aplicados por centímetro de capilar (V/cm)



2.5 De la electroforesis en papel filtro a la electroforesis capilar.

El papel de filtro es un conglomerado de fibras de celulosa que se embeben en una solución amortiguadora de pH, éstas por su composición química al paso de una corriente eléctrica se polarizan negativamente mientras que el agua se carga positivamente y migra en sentido opuesto a la dirección de migración de la corriente (Bio Rad, 2000)¹¹.

A esta corriente líquida, conocida como corriente electroosmótica, se suman o se oponen las corrientes de líquido producidas por la evaporación e^- (\rightarrow) y e^+ (\leftarrow), la migración de un compuesto cargado positiva o negativamente será hacia el cátodo o el ánodo según actúen las fuerzas (figura 6).



Figura 6. Polarización de las fibras de celulosa ante el paso de una corriente eléctrica.



Si consideramos un capilar de sílice, el fenómeno es muy similar, pero la evaporación es nula. En la pared del capilar, por paso de la corriente eléctrica se produce una capa eléctrica negativa (silanos) que condiciona la polarización del agua y consecuentemente tiene lugar una corriente líquida en sentido opuesto al campo eléctrico aplicado (Altria y Filbey, 1993)¹.

La corriente líquida se transforma progresivamente en una fuerza llamada **flujo electroendosmótico (FEO)**, que es equivalente a la obtenida por acción de la bomba en Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC). Esta corriente de líquido actúa transportando a los compuestos contenidos en el capilar, acorde a la carga eléctrica, que adquieren en el campo eléctrico (voltajes desde 20 a 50 V/cm) (Nesse y Castagnino, 1971)⁴¹.

III. APARATO PARA ELECTROFORESIS CAPILAR.

Está constituido por una fuente de poder (FP) de alto voltaje (20 a 30 kV) y de 0 a 200 μ A, y un capilar de sílica de 25 a 75 μ m de diámetro interno y de 100 a 200 μ m de diámetro externo, el que puede estar refrigerado por aire o líquido por efecto Peltier. Los electrodos de platino se encuentran ubicados en el recipiente que contiene la solución amortiguadora, que además de servir para su contacto, recibe los extremos del capilar.

El carrousel puede estar termostizado y contiene las soluciones amortiguadoras y las muestras. Con un movimiento de ascenso y descenso puede enviar cada una de las soluciones empleadas en la corrida al capilar o a los recipientes electródicos (Heiger, 1992)²⁹.

Los capilares de sílica dejan pasar la luz ultravioleta visible a distintas longitudes de onda, generando por arreglos de diodos, los espectros para la identificación de los compuestos separados por electroforesis capilar (figura 7) y en el cuadro 2 se muestran las características de la electroforesis capilar.

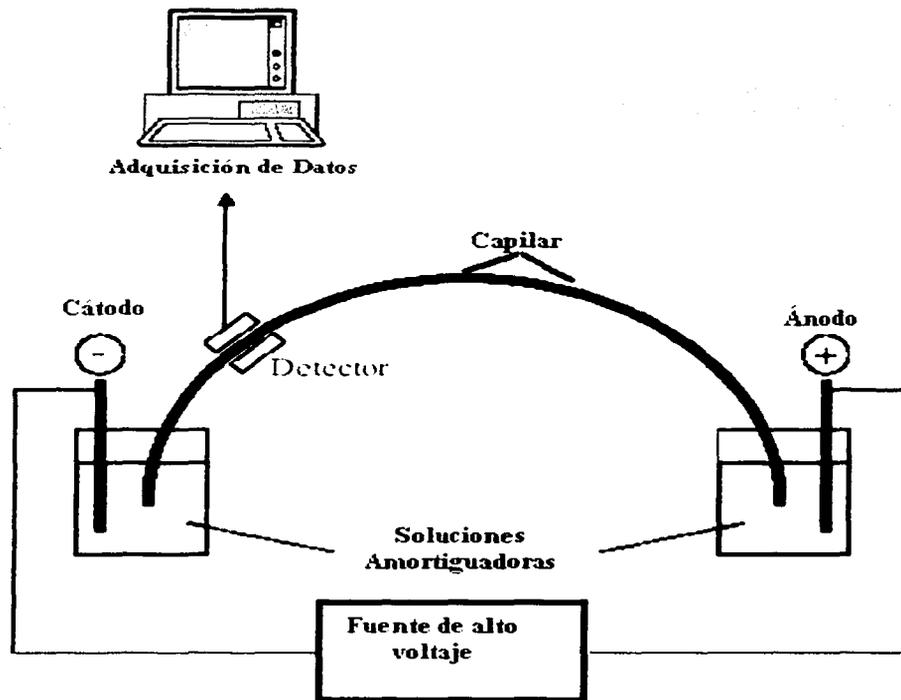


Figura 7. Conformación básica del equipo de electroforesis capilar.



Cuadro 2. Características de la Electroforesis Capilar (Heiger, 1997)²⁸.	
Nanotécnica	Los rangos de material introducido es de 1-40 nL. Y es posible inyectar cantidades mas pequeñas como picolitros e incluso femtolitros y también varios microlitros, usando sistema de preconcentación.
Alta velocidad	Sustancias son separadas en 10-40 minutos usando capilares de silica fundida de 50 a 75µm de diámetro interno. Es posible reducir el tiempo de separación usando capilares de diámetro interno más pequeños.
Alta resolución	Es posible obtener varios cientos de miles de platos teóricos; en algunos casos hasta varios millones de platos teóricos pueden ser obtenidos.
Alta reproducibilidad	Puede obtenerse tiempos de migración con reproducciones por debajo del 5% de error y error por debajo del 2% (RSD) para reproducibilidad de área de picos.
Alta sensibilidad	Sub-atomoles niveles es posible detectarlos, el limite de detección para EC es desorden de 10^{-15} M o 10^{-23} mol (por debajo de 200 moléculas).
Peso molecular no limitante	Sustancias pequeñas pueden ser separadas simultáneamente en una misma columna apartir de un complejo de macromoléculas.
Condiciones de trabajo	El rango de separación usualmente utilizan soluciones amortiguadoras que pueden hacerse en medios ligeramente ácidos o alcalinos. medios no acuosos también son usados. Existe una gran variedad de aditivos que son adicionados a los amortiguadores de pH para mejorar la resolución.
Compatibilidad con sistemas biológicos	Los niveles de pH son consistentes para la valoración de macromoléculas biológicas.
Instrumentación	Totalmente automatizada por encima del HPLC.
Colección micropreparativa	Posibilidad de colectar cantidades que van de los microgramos así como la purificación de las mismas.
Consumo mínimo de reactivos	Nanolitros de muestra y mililitros de amortiguador de pH son utilizados, los de desechos son mínimos.

0-0-0
0-0-0

IV. INSTRUMENTACIÓN.

Los equipos desarrollados por la industria instrumental aparecieron en 1988, y el primer simposium internacional sobre el tema fue al año siguiente, lo cual permitió mostrar los extraordinarios avances de este logro analítico.

Los aparatos comerciales de electroforesis capilar, comprenden dos compartimentos electroforéticos unidos por un compartimiento que contiene un capilar, una fuente de alta tensión de 20 a 30 kV, una ventana en el capilar es sometida a la luz UV con un detector unido a un registrador, el cual grafica las diferencias de absorbancia; a un sistema de administración de datos. Las terminales de salida permiten, por su conexión, el registro del voltaje, tiempo de corrida, y registro de la temperatura del capilar, a través de un software, que está incluido en una estación de trabajo computarizada así como la recuperación de las muestras por medio de un carrusel (figura 8) (McLaughlin *et al.*, 1991).⁴⁰

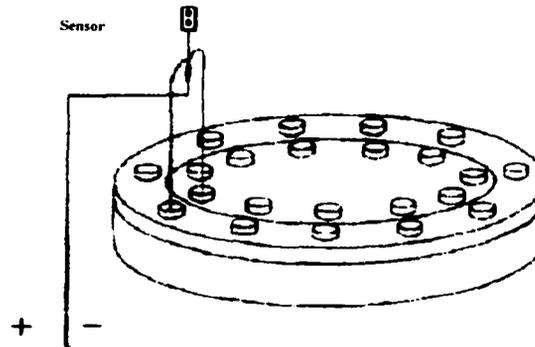


Figura 8. Carrusel del equipo de electroforesis capilar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



V. PRINCIPIO FÍSICOQUÍMICO (Heiger, 1997²⁸; Altria, 1993)⁴.

Las moléculas son separadas por las fuerzas del campo eléctrico aplicado, recordemos que la electroforesis ha sido definida como el movimiento diferencial de especies cargadas (iones), por atracción o repulsión en un campo eléctrico. Las muestras separadas en el capilar son monitoreadas por el detector (figura 9)

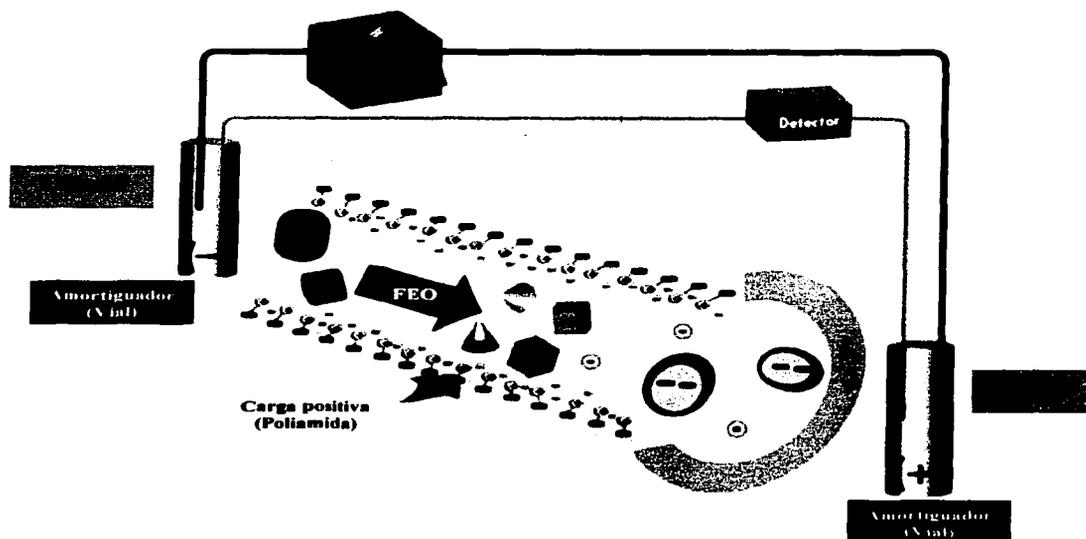


Figura 9. Representación Fenómeno de polarización del capilar, desplazamiento iónico y detección.

Los picos del electroferograma son similares a los del HPLC, y se generan como consecuencia de la concentración de los analitos y de su velocidad de migración (figura 9a y 9b).

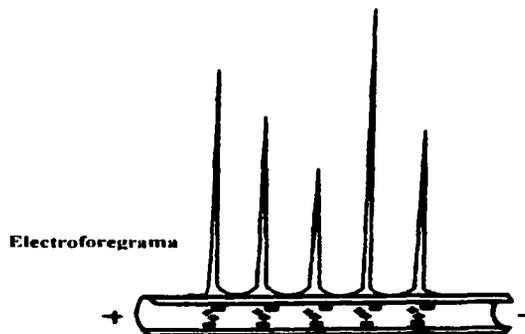


Figura 9 a. Electroforegrama.

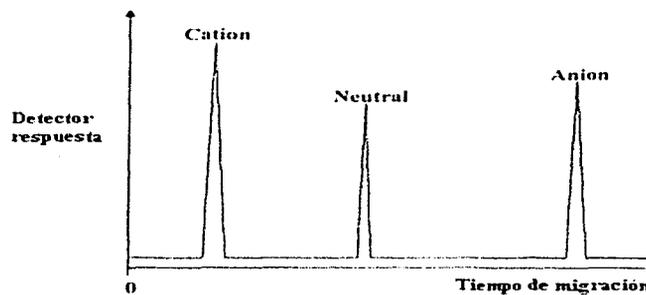


Figura 9 b. Electroferograma y orden de separación según las características del analito.

Las muestras son introducidas en el capilar por electrocinética, o desplazamiento de inyección electroforética. Durante la inyección electroforética, el capilar está sumergido en la



muestra, y se aplica una corriente de alto voltaje. Los iones de la muestra migran dentro del capilar en relación a sus movilidades electroforéticas.

Si la fuerza iónica de la muestra es más baja que el amortiguador electroforético, los cambios en el campo eléctrico de la interface muestra-amortiguador producen un efecto de enfoque o *staging* en el cual los iones del analito se concentran alrededor de la zona de interfase. Este proceso de delineamiento de la zona, puede producir incrementos en la detección de la sensibilidad y poder de resolución (figura 10) (Yeung & Kuhr, 1991)⁵¹.

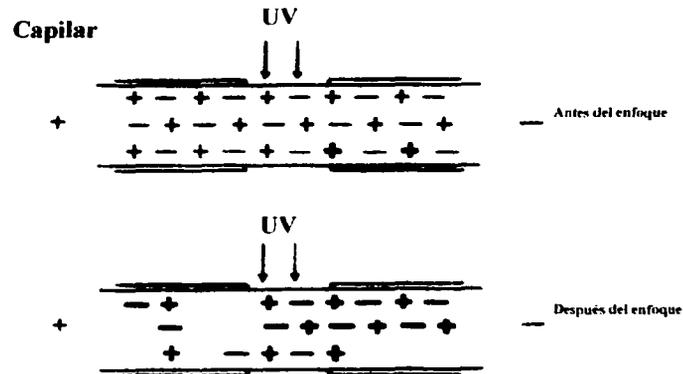


Figura 10. Enfoque de la muestra en la migración electroforética.



5.1 Capilares.

La electroforesis se efectúa en capilares de sílice fundida, de 25 a 75 μm de diámetro interno; los capilares son recubiertos externamente con una película de poliaminas, para protegerlos de los daños mecánicos. Al capilar se le realiza una ventana de detección, para el paso de la luz ultra-violeta, quemando el capilar con un micromechero, procurando no tocar la ventana con los dedos (Bio Rad, 2000)¹¹.

5.1.1 Siembra de las muestras.

La inyección electrocinética, consiste en introducir el material empleando una combinación de la bomba electroosmótica y la movilidad electroforética.

La inyección por desplazamiento puede ser realizada por aplicación de la muestra con gas inerte a presión (por Ej. nitrógeno) o por vacío en el extremo del capilar.

Inyección por diferencia de altura. Idéntico efecto puede obtenerse por cambio en las alturas relativas de la muestra o de los viales de salida de la solución amortiguadora (inyección por gravedad).

La inyección electroforética, produce un desplazamiento iónico, una zona de muestra, con analitos de distinta concentración que en la solución de la muestra.

Si la fuerza iónica de la solución muestra es más baja que el amortiguador electroforético, los cambios en el campo eléctrico de la interfase muestra-solución amortiguadora producen un efecto de enfoque o *stacking*, en el cual los iones del analito aparecen concentrados alrededor de la zona de la interfase. Este proceso de delineamiento de la zona, puede producir incrementos de la sensibilidad y poder de resolución (Yeung & Kuhr, 1991)⁵¹.

El efecto de enfoque, puede producir cambios sustanciales en la inyección electroforética (figura 11) (tabla 1) (Bio Rad, 2000)¹¹.

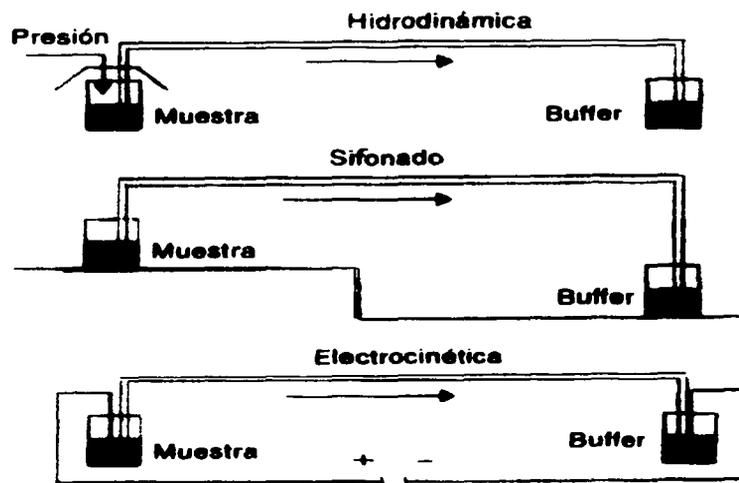


Figura 11. Diagrama de los tres métodos de introducción de la muestra.

Tabla 1. Volúmenes inyectados para varios capilares.

ΔP (diferencia de presión) en milibars (mbar)	50 μm	75 μm	100 μm
50 mbar	1.0 nL	5.2 nL	16.4 nL
75 mbar	1.5 nL	7.8 nL	24.6 nL
100 mbar	2.0 nL	10.4 nL	32.8 nL

nL nanolitro



5.2 Voltajes

Las fuentes estabilizadas de corriente continua generan 10 a 30 kV y elevados campos eléctricos (100 a 500 V/cm) en el capilar, pueden variar de 25 a 75 μm de diámetro interno pudiendo llegar a 300 μm de diámetro externo. Las longitudes pueden llegar a 1 m, pero normalmente no exceden los 75 cm (figura 12) (Altria y Regan 1994)³.



Figura 12. Esquema interno del capilar

En algunos aparatos, el capilar se ofrece dentro de un soporte de plástico en el cual se ha prealineado el capilar con una lente de microenfocado, para obtener una detección más sensible y estable. Los estuches de plástico que contienen el capilar son herméticos y en su interior se hacen circular líquidos refrigerados por efecto Peltier (Bio Rad, 2000)¹¹.

Es imprescindible mantener la temperatura para evitar la formación de gradientes térmicos que producen distorsiones en las bandas aisladas. Las zonas de alta definición se reducen cuando se emplean capilares de 25 a 50 μm de diámetro interno, y de esta forma se permiten definir las zonas y aumentar la sensibilidad (Lukacs y Jorgenson, 1985)³⁷.

La alta resistencia eléctrica del capilar limita la corriente y el calentamiento interno, se logran campos eléctricos muy elevados (100 a 500 V/cm) con mínima generación de calor. El empleo de campos eléctricos muy elevados permite reducir drásticamente el tiempo de realización del examen, y la elevada relación del área al volumen, disipa en forma eficaz el calor que se pueda producir (Lukacs y Jorgenson, 1985)³⁷.



5.3 Eficacia de la separación.

La eficiencia del pico, frecuentemente mayor de 10^5 a 10^6 platos teóricos se debe en parte al accionar del flujo electroosmótico, un fenómeno electroforético que se genera por el flujo de la solución dentro del capilar (Lukacs y Jorgenson, 1985)³⁷.

5.4 Polaridad.

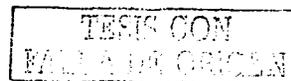
La EC puede ser desarrollada empleando polaridad positiva o polaridad negativa, lógicamente, el valor del pH permite definir el sentido de la migración, a pH bajo, muchas proteínas y péptidos son catiónicos y migran hacia el cátodo negativo en el extremo del capilar e inversamente, a pH elevado, muchas biomoléculas tienen una carga neta negativa y migran hacia el ánodo positivamente cargado (Altria y Regan, 1994)³.

El conocimiento del pKa para distintos componentes de las muestras (péptidos y aminoácidos) como también del pI (punto Isoeléctrico) para las proteínas, permite seleccionar los amortiguadores apropiados para determinar el sentido de la migración para que los compuestos se orienten hacia el detector; normalmente se emplean campos eléctricos de 200 a 400 V/cm (Lukacs y Jorgenson, 1985)³⁷.

Para muchas aplicaciones, el empleo de capilares de longitud elevada (hasta 1 m) permite y requiere que el voltaje sea mayor a 20 kV para encontrar el campo eléctrico adecuado.

5.5 Sistemas de detección.

Una amplia variedad de detectores han sido desarrollados para la EC (incluyendo fluorescencia, electroquímica y conductividad), sin embargo, los detectores más usados comercialmente son los que emplean el ultravioleta (arreglo de diodos) y UV visible. Los detectores son similares a los de la cromatografía líquida de alta resolución, usando fuentes de deuterio con filtros o detección con longitudes de onda seleccionadas, en el cuadro 3 se enlistan los diferentes tipos de detectores acoplados a electroforesis capilar (Lux *et al.*, 1990)³⁸.





Cuadro 3. Métodos de detección en Electroforesis Capilar			
Método	Límite de detección de masa (moles)	Límite de detección por concentración (molar)*	Ventajas y Desventajas
UV-Vis Absorción	10^{-13} - 10^{-16}	10^{-5} - 10^{-8}	Universal (excepto por sustancias cromóforas). El arreglo de diodos ofrece información espectral.
Fluorescencia	10^{-15} - 10^{-17}	10^{-7} - 10^{-9}	Sensitivo; requiere usualmente derivatización de la muestra.
Fluorescencia de inducción láser	10^{-18} - 10^{-20}	10^{-14} - 10^{-16}	Extremadamente sensible, usualmente requiere derivatización de la muestra.
Amperometría	10^{-18} - 10^{-19}	10^{-10} - 10^{-11}	Sensitiva; Selectiva pero solamente usando analitos electroactivos. Requiere modificaciones especiales en el capilar.
Conductividad	10^{-15} - 10^{-16}	10^{-7} - 10^{-8}	Universal, pero requiere modificación electrónica especial así como en el capilar.
Espectrometría de masas	10^{-16} - 10^{-17}	10^{-8} - 10^{-9}	Sensitiva y ofrece información estructural
UV indirecto, Fluorescencia y amperometría	10-100 veces por debajo del método directo		Primariamente para iones inorgánicos y otras sustancias como agentes cromóforos; sensibilidad baja para métodos directos

Las fuentes de luz generalmente provienen de un haz de luz entre un fotodiodo de referencia y un microenfocado óptico en el estuche del capilar.

El escaneo es a través de un detector que ilumina el capilar con luz blanca luego dispersada y analizada a través de un policromador por arreglo de fotodiodos (detector para óptica reversa). Alternativamente, el sistema óptico convencional (forward optic) puede ser empleado por una banda espectral aislada por un monocromador colocado entre la fuente de luz y el capilar (Compton y Brownlee, 1988)¹⁷.



El escáneo puede ser controlado rápidamente por un sistema computarizado que controla el movimiento del monocromador en el rango espectral en el tiempo de milisegundos. Este sistema de detección produce menos ruido de fondo y mucha más sensibilidad que el detector con arreglo de diodos (Lukacs y Jorgenson, 1985)³⁷.

5.6 Reactivos en electroforesis capilar.

Una amplia variedad de soluciones amortiguadoras y aditivos puede ser usada para las separaciones; la mayoría de ellos son amortiguadores de pH no tóxicos, de fosfato, borato y TRIS (Heiger, 1992)²⁹.

Esto no es un contraste con la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), pues no emplea sustancias orgánicas, inflamables o tóxicas como acetonitrilo, hexano, metanol, dioxano, tetrahidro furano etc. Se requieren volúmenes muy pequeños de soluciones de electrolitos que no presentan los principios de toxicidad encontrados en HPLC (Heiger, 1992)²⁹.

VI. TIPOS DE ELECTROFORESIS CAPILAR.

Hemos citado la migración electroforética de acuerdo a los trabajos desarrollados por Tiselius en el tubo en U de sílice en 1937.

6.1 Electroforesis capilar libre.

En los gráficos obtenidos por el detector se indica el instante cero ($t = 0$) que corresponde al periodo de siembra, en el cual no hay separación. Al valor $t > 0$, se produce la separación por el empleo de la corriente aplicada (20 a 30 kV) para un capilar de 50 μm de diámetro interno y longitud variada (20 a 70 cm). En el se representa la migración de las especies iónicas ABC que se separan por distinta movilidad, generando zonas iónicas como en el caso de la electroforesis libre de Tiselius, denominada *electroforesis de límites móviles*.



6.2 Electroforesis de zona (McCormick, 1988)³⁹.

Es el mismo principio que la electroforesis libre o de límites móviles. La incorporación de sustancias neutras que actúan como separadores permite una separación en zonas, como se muestra en la figura 13.

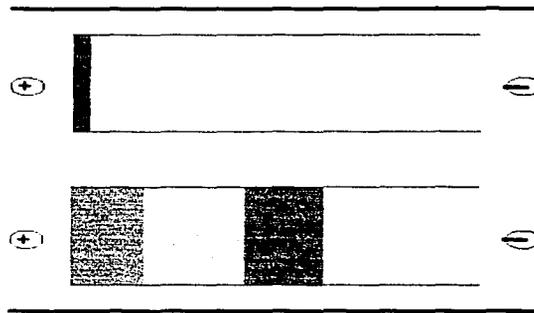


Figura 13. Electroforesis Capilar de Zona

6.3 Electroforesis capilar por isoelectroenfoque (Svensson, 1962)⁴⁸.

Este procedimiento está destinado a la separación de componentes anfotéricos de una mezcla en un gradiente de pH continuo y estable que se extiende desde bajo pH en el ánodo y elevado en el cátodo. El secreto de esta técnica reside, fundamentalmente en la obtención de un gradiente de pH continuo y estable, lo que ha sido posible empleando anfóteros obtenidos por la unión de poliaminas y ácidos orgánicos formando uniones poliaminicas y policarboxílicas, que en un ámbito de protones que son cedidos o los incorporan a las moléculas, lo que actúa como un estabilizador de pH.



Cuando en un medio con anfólitos se aplica un campo eléctrico, los anfólitos migran hacia un punto isoelectrico, generando un gradiente estable de pH. Estos anfólitos son sintetizados para obtener gradientes de pH de 2 a 11, y con resolución del orden de 0.001 unidades de pH. Cuando al gradiente de pH se le introduce una proteína en ese gradiente de anfólitos, cada zona intercambia protones con la muestra proteica, generando una separación isoelectrica conocida como electroenfocado o electrofocusing.

Considerando el gráfico de la figura 14, allí pueden apreciarse las diferentes zonas de pH creadas por la migración de protones que en el anfólito generan el gradiente de pH que condiciona el espectro isoelectrico de las proteínas combinadas en las zonas de su punto isoelectrico (Svensson, 1962)⁴⁸.

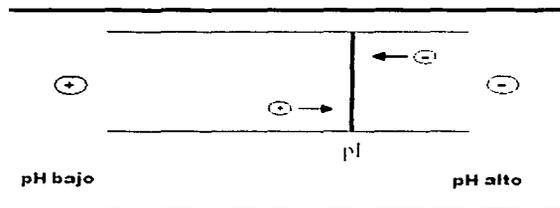


Figura 14. Enfocado Isoelectrico.

6.4 Isotacoforesis (Evaerest, 1980).

El nombre deriva de la separación electroforética de las bandas que migran todas a igual velocidad (Iso= igual y tacho = velocidad).

La mezcla de analitos debe ser colocada entre dos soluciones electrolíticas con iones de diferente movilidad, uno rápido llamado ion líder (guía) o inicial (L) y otro más lento llamado ion terminal (T) en la figura 15 se describe este comportamiento.

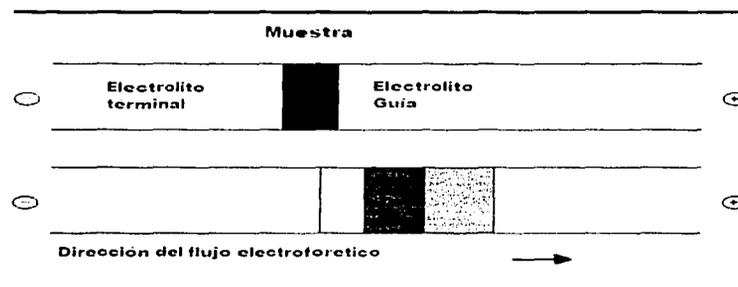


Figura 15. Fundamento de la Isotacoforesis.

Si se desea investigar un catión, el electrolito inicial puede contener un catión de elevada movilidad como el ion hidrógeno, mientras que el terminal puede contener un ion que sea más lento que el que se desea investigar. Por esta razón, el electrolito líder o guía siempre debe ser colocado para migrar hacia el cátodo y el terminal debe migrar hacia el ánodo. Al aplicar el campo eléctrico, al cabo de un tiempo todos los iones adquieren la misma velocidad (Evaerest, 1980)²⁰.

En la zona del campo donde los iones presentes tienen baja movilidad, el campo es más fuerte, moviéndose el menos móvil de los cationes a la misma velocidad que el más móvil de ellos. En el estado estacionario, cada componente de la muestra catiónica migra como si se tratara de una banda pura, como si estuviera comprimida entre las paredes de un emparedado o sándwich entre la zona iónica de mayor y de menor movilidad (Evaerest, 1980)²⁰.

La característica de esta técnica es que la focalización isotacoforética que ocurre entre las bandas móviles produciendo bandas definidas.



6.5 MEKC o MEEKC (Electroforesis micelar electrocinética)

Es un híbrido entre la electroforesis y cromatografía. fue introducida por Terabe, 1984. Está ampliamente difundida y es la única técnica que permite la separación de sustancias neutras o cargadas. La separación de sustancias neutras por MEKC se logra empleando tensoactivos en la solución amortiguadora de corrida. La CMC (concentración micelar crítica) es de 8 a 9 mM para SDS (docecilsulfato de sodio). Se forman micelas que son agregados de moléculas individuales tensoactivas. Las micelas son esencialmente esféricas, con los extremos hidrofóbicos orientados hacia el centro como los extremos de una medusa, para evitar la interacción con el centro hidrofílico. El empleo de las micelas obtenidas por soluciones surfactantes puede dar un aumento de la separación como en la cromatografía líquida de fase reversa, pero con los beneficios de la EC. También la MEKC produce en IEF, ITP (isoelectroforesis e isotacoforesis) un elevado control de FEO figuras 16 y 17 (Foley, 1990)²¹.

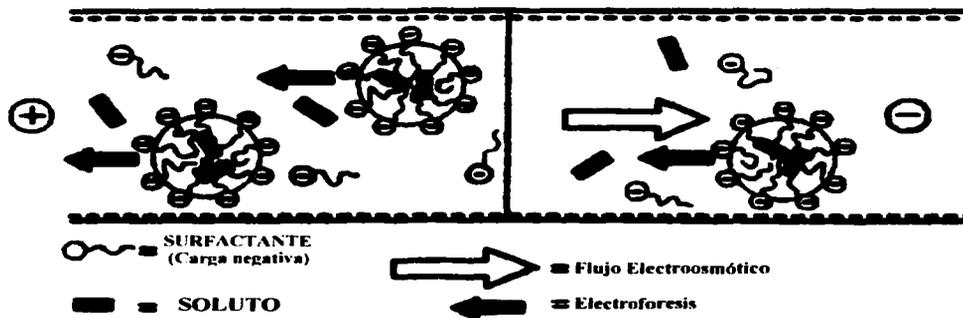


Figura 16. Mecanismo de laMEKC (Cromatografía Micelar electroforética Capilar)



MEEKC : Mecanismo

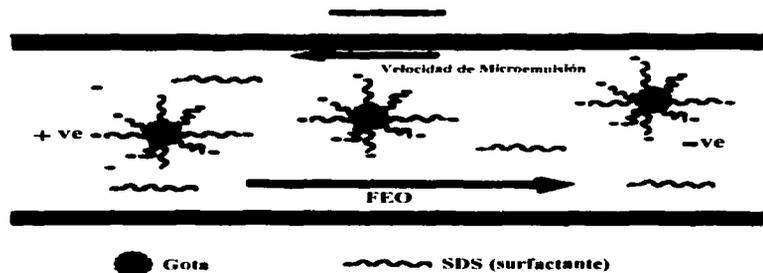


Figura 17. Mecanismo MEEKC (se puede usar también con un surfactante tal como el SDS (dodecilsulfato de sodio), la separación depende de la afinidad de un producto con el SDS).

6.5.1 Micelas.

Son agregados anfóliticos de moléculas conocidas como surfactantes. Ellas son largas cadenas de moléculas (10-50 unidades de carbono) que están caracterizadas por largas colas hidrofóbicas y cabezas hidrofílicas (Foley, (1990)²¹.

Las micelas normales están orientadas en solución con la cola hidrofílica orientada hacia adentro y la cabeza hidrofóbica hacia fuera. La cola del surfactante no puede ser solvatada en solución acuosa. Cuando la CMC (concentración micelar crítica) es conocida, el agregado puede ser total.

El agregado produce cambios físicos en la tensión superficial, viscosidad y su habilidad para dispersar la luz que acompaña a la formación de la micela (Foley, 1990)²¹.



6.5.2 Clases de surfactantes y propiedades

El dodecil sulfato de sodio es el surfactante más ampliamente usado: tiene una MM de 288 y una CMC de 8 mM siendo el número de agregación número de moléculas /micelas de 62 (concentración crítica micelar). Las micelas tienen la habilidad de organizar analitos a nivel molecular basados en interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Las moléculas neutras pueden unirse a micelas mientras que el cuerpo hidrofóbico tiene un alto poder de solubilización. El analito puede repartirse entre la micela y la mayor parte de la fase estacionaria; este factor contribuye a la movilidad electroforética del analito y contribuye sobre todas las separaciones (Weinberg, 1993)⁴⁹.

La interacción entre las micelas y los solutos neutros es la que produce la separación. Las micelas son esencialmente esféricas, con los extremos hidrofóbicos orientados hacia el centro para evitar la interacción con el amortiguador hidrofílico, y los extremos cargados hacia el amortiguador (Weinberg, 1993)⁴⁹.

La adición de tensoactivos, y en consecuencia la formación de micelas cargadas, a favor o en contra del FEO, dependiendo de la carga adquirida. Siendo el dodecil sulfato de sodio (SDS) un tensoactivo aniónico, migran hacia el ánodo es decir en dirección opuesta al Flujo electroosmótico (FEO); por lo tanto a pH neutro o básico, las micelas migran hacia el ánodo en dirección opuesta al FEO (Weinberg, 1993)⁴⁹.

Como a voltajes elevados la velocidad del FEO es generalmente mayor que la velocidad de migración de las micelas, a pH neutro o básico, el movimiento resultante es en la dirección del FEO (Beckman-Coulter, 1999)⁹.

Durante la migración, las micelas pueden interactuar con los solutos a través de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas como en cromatografía. Durante la migración, las micelas pueden interactuar con los solutos en modo cromatográfico.



Separación de especies neutras

La separación de estas sustancias se efectúa por partición dentro y fuera de las micelas. Cuando el soluto interactúa más con la micela, mayor será su tiempo de migración, pues la micela es atraída contra el Flujo Electroosmótico (FEO), en cambio, cuando no está en contacto con la micela, es transportado por el FEO (Beckman Coulter, 1999)⁹.

Los compuestos más hidrofóbicos interactúan más fuertemente con la micela y son más retenidos. La separación de solutos neutros es esencialmente cromatográfica y puede ser explicada usando relaciones cromatográficas modificadas. La selectividad puede ser manipulada variando la naturaleza física (tamaño, carga, geometría) de la micela, usando diferentes tensoactivos, similares a los empleados en las diferentes fases estacionarias; estos pueden ser aniónicos, catiónicos, no iónicos, zwitteriónicos o mezclas de ellos. También, pueden emplearse sales biliares o microemulsiones (Beckman-Coulter, 1999)⁹.

Como ocurre en cromatografía, pueden ser empleados modificadores orgánicos para manipular el soluto-micela (ej. metanol-acetonitrilo -Isopropanol).

6.6 Electroforesis capilar en gel (CGE o ECG).

La separación de moléculas de gran tamaño y peso molecular ha requerido el desarrollo de la electroforesis en gel. Esta separación tiene en especial que emplea procedimientos o principios basados en el tamaño y empleando un polímero que actúa como "tamiz molecular" (Jenkins y Guerin, 1996)³¹.

En la figura 18, se ilustra el principio de la electroforesis zonal, en la cual los solutos migran a través del retículo del polímero que ofrece mayor obstáculo al movimiento, cuanto mayor es su tamaño (Crambach, 1985)¹⁵.

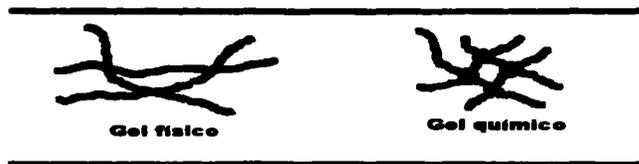


Figura 18. El mecanismo de la electroforesis capilar en gel se pueden dos tipos de gels: gel físico o químico donde el gel químico, poliacrilamida y físicos: hidroxipropilmetilcelulosa.

El mecanismo que rige la separación en electroforesis capilar en gel (ECG) es similar al principio en gel, tubo o placa, a diferencia de la CGE, que incluyen campos eléctricos 10 a 100 veces más elevados, sin efecto del calentamiento de Joule, la detección sobre el capilar y automatización de la instrumentación. Además, no se necesita usar un gel anticonvectivo, pues las características del capilar proporcionan esta capacidad (Jenkins y Guerin, 1996)³¹.

Las separaciones preparativas, que constituyen la mayor ventaja de la electroforesis clásica, se pueden lograr en cierto grado, empleando capilares de diámetro interno mayor de 100 a 200 μm y bajos campos eléctricos.

Los polímeros de la ECG pueden ser entrecruzados en forma covalente (como una BIS-Poliacrilamida) por unión al hidrógeno como la agarosa o soluciones de polímero lineal como poliacril amida o metil celulosa. Las macromoléculas pueden ser separadas usando cada tipo de gel (tabla 2) (Jenkins y Guerin, 1996)³¹.

Tabla 2. Polímeros de la Electroforesis capilar en gel (Chrambach, 1985)¹⁵:

Polímero	Tipo	Aplicación
entrecruzados	2.6% T, 3.6 C	Oligonucleótidos. Secuencia de DNA
Lineales. poliacrilamida	< 0.1-6%	Fragmentos de restricción
Hidroxi alquil celulosa	6-15 %	Oligonucleótidos. Secuencia de ADN, Proteínas
dextrano		Fragmentos de restricción.
agarosa	0.05-1.20%	Protéínas.



Una matriz muy usada, la poliacrilamida entrecruzada, se polimeriza *in situ* y no se saca del capilar; es muy importante emplear soluciones sin gases (desgasificar al someterlas a vacío) y emplear sustancias puras para evitar burbujas, pues si no pueden producirse geles inestables.

6.6.1 Capilares.

Una mención especial merecen los capilares y su tratamiento. Se pueden emplear capilares de sílica fundida sin recubrir y es conveniente emplear ambientes "cubiertos o Coated". Generalmente, una buena práctica es lavar el capilar con hidróxido de sodio (0.1 M) seguido de solución amortiguadora y agua destilada, para eliminar los contaminantes. La preparación de estos geles requiere mucho cuidado pues son de polimerización muy rápida. Su inconveniente radica en que los geles tienen naturaleza rígida, y las muestras pueden tapan el capilar o pueden formarse burbujas que lo inutilizan. Con el uso apropiado, pueden hacerse múltiples inyecciones: la rigidez impide el empleo de la inyección hidrodinámica (Jorgenson y Lukacs, 1993)³².

Los polímeros lineales ofrecen una alternativa más flexible, pues son soluciones de polímero; no es imprescindible la polimerización "*in situ*". El polímero puede disolverse en el amortiguador e introducirse hidrodinámicamente en el capilar.

La concentración del polímero necesaria es inversamente proporcional al tamaño del analito. Cuando tiene baja viscosidad, pueden ser introducidos a presión, y son menos susceptibles a la formación de burbujas y otros problemas (Jorgenson & Lukacs, 1993)³².

La eficiencia de la Electroforesis capilar de Zona y Electroforesis Capilar de Gradiente son muy similares pues son técnicas electroforéticas zonales.



6.6.2 Aplicaciones

Ha sido muy aplicada esta técnica a la resolución de proteínas y productos de biología molecular (análisis de pureza de oligonucleótidos, terapia génica, secuenciado de DNA y análisis de productos de PCR y de química forense).

6.7 Isoelectroenfoque capilar (Evaerest, 1980).

En esta técnica los recipientes electródicos se llenan cada uno con una solución básica y otro con una solución ácida. El capilar se llena con un anfolito que está constituido por una mezcla de agregados moleculares obtenidos por la reacción de ácido acrílico polietileno-tetra o penta aminas que al paso de la corriente se ordena de acuerdo a la atmósfera protónica que se obtiene.

Esta atmósfera iónica de protones, reacciona con los grupos amino y carboxilos generando zwitteriones, que delimitan un gradiente de pH estable y continuo. Los péptidos y proteínas se desplazan y separan acorde al ámbito químico que permite su desplazamiento hasta el valor del pH igual a su pI. Los ámbitos extremos del pH del sistema anfolito pueden ser 3 a 9, subordinados a las características del anfolito empleado (Altria y Simpson, 1987)⁶.

Al aplicar el campo eléctrico en el capilar que contiene los solutos y el anfolito, los con naturaleza proteica con carga eléctrica, migran hasta enfocarse, por lo que encuentran el ámbito de pH igual a su punto isoelectrónico (pI); estas bandas proteicas son muy angostas porque la difusión a una zona de pH diferente trae como consecuencia una generación de cargas, y la subsiguiente migración de vuelta a la zona apropiada (McCormick, 1988)³⁹.

La corriente es la que produce la migración de los iones, y cuando el sistema alcanza el estado estacionario, no fluye más corriente, una vez enfocadas las proteínas en el área de los anfolitos, las soluciones son movilizadas y pasan a través del detector.



El Flujo Electroosmótico (FEO) necesita ser reducido o eliminado, en la electroforesis capilar por isoelectroenfoque, porque el flujo podría barrer los anfólitos del capilar. antes que se complete el enfoque.

La reducción del FEO puede ser obtenida usando un recubrimiento dinámico o covalente; el primero es simple, pero es difícil obtener reproducibilidad, pero son útiles para limitar la adsorción de las proteínas a la pared del capilar. Aplicaciones de la electroforesis capilar por isoelectroenfoque, se han empleado exitosamente para la medición del pI de proteínas y para lograr la separación de isómeros. Es muy útil para la separación de hemoglobinas e inmunoglobulinas (McCormick, 1988)³⁹.

6.8 Isotacoforesis (Guzman, 2002)²³.

En los compartimientos electródicos se une una combinación de dos sistemas amortiguadores, para generar un estado en el cual todas las zonas separadas se muevan a igual velocidad, por eso se llama *iso* (igual) y *tachos* (velocidad). En general se deben elegir las soluciones amortiguadoras que tengan uno de ellos como ion rápido y el otro un ion lento, y que el coeficiente de fricción sea el mismo para los componentes de ambos amortiguadores.

Cuando se aplica el campo eléctrico en la separación de aniones se busca una solución amortiguadora con un electrolito delantero que contenga un anión con una movilidad efectiva mayor que la del soluto. Similarmente, el amortiguador usado como electrolito terminal debe tener un anión cuya movilidad sea menor que la de los solutos. Cuando está actuando, el anión rápido o delantero se desplaza primero (Reinoud *et al.*, 1994)⁴⁷.

El estado estacionario se logra porque el campo eléctrico varía en cada zona, y es auto ajustado para mantener la velocidad constante con el mínimo de campo en la zona de máxima movilidad. Lo expuesto genera un fenómeno muy particular entre las zonas, y las fronteras iónicas son muy agudas entre ellas. Si un ion difunde en una zona vecina, cambia su velocidad y retorna rápidamente a su zona (Reinoud *et al.*, 1994)⁴⁷.



Sí, las zonas iónicas son menos o más concentradas que el electrolito delantero, éstas se hacen más angostas o más anchas, para su adaptación a la concentración apropiada. Esta propiedad entre soluciones que tienen un anión (o catión) común y un ion rápido (o lento) y permite su concentración, pues el ion a separar debe encontrarse entre las movilidades del ion más rápido y del más lento (Guzman, 2002)²³.

Este efecto de concentración puede ser aplicado a electroforesis capilar de zona (CZE), a la electroforesis capilar electrocinética (MEKC) y a la electroforesis en gel. Este fenómeno de concentración y afinado de las bandas se observa en las separaciones de proteínas o aminoácidos. Cuando no existe una adecuada refrigeración y se evapora el agua del amortiguador, la concentración del disolvente aumenta y las bandas se hacen cada vez más nítidas. Un angostamiento de la zona puede ocurrir si se agrega un electrolito en alta concentración (Altria, 1994)³.

6.9 Aplicaciones de la Electroforesis Capilar.

6.9.1 Aplicaciones de la isotacoforesis (Zimmerman *et al.*, 1980⁵²; Reinoud *et al.*, 2000)⁴⁷.

La bibliografía es extensa en esta área, pero no tanto como las separaciones en electroforesis capilar zonal y los que emplean medios soportes como los geles lineales o entrecruzados. Los primeros trabajos fueron realizados para separar aniones como oxalato urinario; también se ha aplicado a separación de purinas y pirimidinas en suero. Se ha extendido a la identificación y separación de pequeñas moléculas de péptidos en fluido de pacientes urémicos o pueden ser aplicados en electroforesis capilar de zona, pero con una etapa de isotacoforesis, los ácidos orgánicos como aniones piruvato, citrato, malato, acetoacetato, en electroforesis con capilares cubiertos con poliacrilamida lineal. (Guzman *et al.*, 1989)²⁵.

También se ha aplicado isotacoforesis para separar aminoácidos urinarios, previamente derivatizados con ophthaldialdiyodo (OPA) y nalfatalina 2,3- dicarboxaldehído. Los productos



derivatizados por CZE son detectados empleando por fluorescencia estimulada con láser (figura 19).

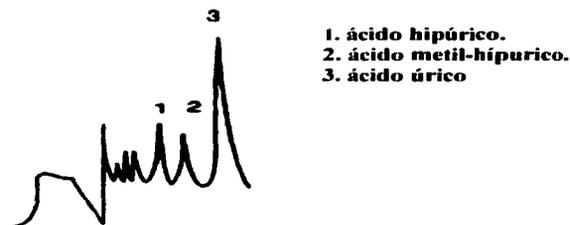


Figura 19. Separación por electroforesis capilar y por isotacofóresis.

6.9.2 Electroforesis capilar en zonas (CZE)

Ha sido empleada en Química Clínica para la separación de las proteínas del suero humano normal y patológico, péptidos como insulina, hemoglobinas normales y patologías en un lapso de 3 a 5 minutos. Separa pequeñas moléculas ionizadas, como nucleósidos, nucleótidos, aminoácidos, vitaminas y fármacos iónicos (Beckman Coulter, 1989)¹⁰.

Puede proveer la CZE la separación de estereoisómeros y puede esta técnica permitir la caracterización de fármacos quirales y de sus metabolitos; se emplean ciclodextrinas en los amortiguadores como aditivos. Los oligosacáridos cíclicos poseen cavidades hidrofóbicas en las cuales el anfolito puede estar en forma de complejo-huésped. (Guzman *et al.*, 1989)²⁵.

La cavidad y la dimensión del grupo funcional, es la que permite la enantioselectividad a la separación (Guzman, 1997)²⁶.



Con esta técnica se pueden separar iones inorgánicos, incorporando un ion que absorbe en UV y los iones se detectan por la producción de una absorbancia negativa, y producir picos negativos, se separan así iones como $S_2O_3^{-2}$, Br^{-1} , Cl^{-1} , SO_4^{-2} , NO_2^{-1} , N_3^{-1} , SCN^{-1} , ClO_3^{-1} , BrO_3^{-1} , PO_4^{-3} .

6.9.3 ECIF (O CIEF)

El sistema contiene en los recipientes electródicos ácido fosfórico en el cátodo e hidróxido de sodio en el ánodo, el ámbito del capilar y la muestra contienen anfolito que al pasar la corriente genera un ámbito de pH en forma de gradiente estable y continuo en donde la proteína se desplaza hasta que su pI idéntico al pH del medio produzca su inmovilización. Este gradiente se mantiene estable al paso de la corriente y para desplazarlo se emplea simultáneamente leve presión y corriente o se desplaza hidrodinámicamente por presión o combinado el electrolito por un zwitterion. Se emplean capilares recubiertos para reducir al mínimo el Flujo Electroendosmótico (Guzman *et al.*, 1989)²⁵.

6.10 Electro cromatografía micelar (Cromatografía micelar electrocinética, MEEC)

6.10.1 Definición.

La cromatografía micelar electrocinética o electroforesis capilar con cromatografía micelar. Llamada también electro cromatografía, está basada en un principio cromatográfico empleando soluciones homogéneas que contienen "acarreadores" iónicos o transportadores iónicos en el mismo aparato que se utiliza en la electroforesis capilar (Nishi *et al.*, 1990)⁴³.

Las características fundamentales residen en que en la Electro cromatografía (MEEC) los analitos cargados o neutros pueden ser separados eléctricamente. La aplicación de soluciones micelares con surfactantes iónicos, la ha transformado en una de las técnicas de más amplia aplicación para la separación de pequeñas moléculas. Contiene el sistema surfactante SDS, que en determinada concentración produce micelas a las que se agregan ciclodextrinas. Se ha separado uriacimida, piridoxina, riboflavina, ácido ascórbico, cianocobalamina, ácido nicotínico y tiamina (Nishi *et al.*, 1990)⁴³.



La característica más importante es que la solución amortiguadora que contiene surfactante a una elevada concentración, que corresponde a una concentración micelar crítica, estas micelas constituyen una pseudo fase en la cual la molécula del analito es particionada por las interacciones hidrofóbicas en el interior de la micela (figura 20).

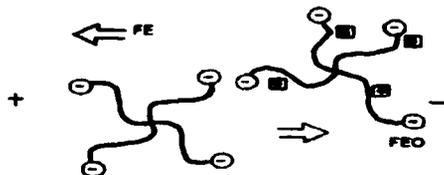


Figura 20. Micela y molécula del analito.

La Fuerza Eléctrica (FE) es empleada como una bomba transportadora de las micelas y del volumen del electrolito hacia el punto de detección. Entre las técnicas de mayor uso, el dodecilsulfato de sodio (SDS) es el surfactante más utilizado. Como las micelas están cargadas negativamente, son aniónicas. La migración electroforética está en dirección opuesta al Flujo electroosmótico (FEO), aumentando el rango de separación (Cohen & Karger, 1987)¹⁶.

De acuerdo con la importancia y magnitud del FEO, la velocidad electroforética de migración es muy grande cuando se desplaza hacia el detector. Comparando con el HPLC con fase reversa, la MEKC exhibe una elevada eficiencia, fundamentalmente vinculada con dos características del fenómeno de la electroforesis (Nishi *et al.*, 1990)⁴²:

- a. El perfil planar del frente del flujo electroosmótico, elimina el efecto de borde curvo por el roce con la pared que se produce en la columna de HPLC.
- b. El intercambio entre el surfactante monómero y los campos altamente móviles de la fase micelar es rápido. Se produce un intercambio cinético muy rápido de la masa del analito entre la fase micelar móvil y la fase no micelar.



VII. SELECCION DE SOLUCIONES AMORTIGUADORAS

Esta es una de las etapas básicas en la separación por EC. La sensibilidad del FEO al pH requiere de amortiguadores que mantengan el pH constante.

Los sistemas amortiguadores efectivos tienen un rango de aproximadamente dos unidades de pH alrededor del valor del pKa (Tabla 3). Los amortiguadores polibásicos como fósforo, citrato tienen más de un pKa para usar, y pueden ser utilizados en un rango de pH más amplio.

Tabla 3. Distintos sistemas de amortiguadores de pH para Electroforesis Capilar (Rabel y Stobaugh, 1993).

Nombre	pKa	Nombre	pKa
Fosfato	2.12(pKa ₁)	TES	7.50
Citrato	3.06(pKa ₁)	Hepes	7.55
Formiato	3.75	Hepps	8.00
Succinato	4.19(pKa ₁)	Tricina	8.15
Citrato	4.74(pKa ₂)	Glicina amida	8.20
succinato	5.57(pKa ₂)	Clorhídrico	
MES	6.15	Glicilglicina	8.25
ADA	6.60	TRIS	8.30
BIS-TRIS	6.80	Bicine	8.35
Pipes	6.80	Morfolino	8.49
ACES	6.90	Borato	9.24
MOPSO	6.90	CHES	9.50
Imidazol	7.00	Chapso	9.60
MOPS	7.20	CAPS	10.40
Fosfato	7.21(pKa ₂)	Fosfato	12.32(pKa ₃)

El amortiguador de pH que se emplea en EC debe reunir una serie de propiedades:

- 1) Buena capacidad de pH en el rango encontrado.
- 2) Baja absorbancia en la longitud de onda empleada en la detección.
- 3) Baja movilidad (para lo cual se necesita baja concentración iónica).



Las separaciones de proteínas y péptidos son regidas por las alteraciones del pH que están íntimamente ligadas al pI. Los cambios de pH afectan también al comportamiento de la electroendosmosis, pues a pH próximos a 3 la superficie interna del Capilar se encuentra cargada negativamente por los grupos silanol (Rabel y Stobaugh, 1993)⁴⁶.

Los iones positivos del amortiguador son atraídos y fijados sobre la capa negativa generando una doble capa eléctrica. Si imaginamos un corte del capilar y el plano de la hoja sumergido en el electrodo positivo, detrás tendremos el electrodo negativo. el agua migrará al polarizarse positivamente desde el plano hacia la parte posterior del plano del papel, como si lo atravesara (figura 21).

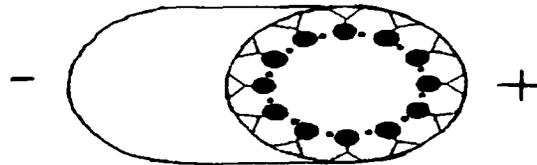


Figura 21. Corte transversal del capilar indicando la migración de polos eléctricos.

Este es el fenómeno de electroendosmosis, al cual ya se ha referido anteriormente. La magnitud de la electroendosmosis se incrementa en función del pH y en condiciones alcalinas la velocidad del FEO es usualmente mayor que la velocidad de migración de los iones de la muestra.

Esta propiedad puede ser una ventaja para analizar las muestras de especies aniónicas o catiónicas. En algunos casos experimentales, como la separación de péptidos o proteínas, los grupos hidrofóbicos poseen determinados sitios de fijación, lo que produce variaciones locales en la migración del FEO, y por consiguiente, alteran la reproducibilidad de los resultados (Altria y Simpson, 1988)⁸.



Estos problemas pueden ser minimizados trabajando a pH bajo, donde las superficies silanol no se encuentran ionizadas. En los casos en que se trabaje a pH elevado se emplean aditivos que reducen la absorción de los analitos. El empleo de uniones covalentes en la superficie del capilar puede reducir dramáticamente el Flujo Electroosmótico, sobre todo en la separación de las proteínas (figura 15). Particular cobertura en la superficie interna del capilar, en condiciones de pH alcalino o neutro, permiten muy buenas separaciones. Estos fenómenos han motivado numerosos problemas en la separación de proteínas en las distintas variantes, isoelectroenfoque, isotacoforesis, electroforesis en geles. Fundamentalmente, el control de del FEO requiere alteraciones de la superficie cargada del capilar y de la viscosidad del amortiguador. En la tabla 4 se pone en evidencia las condiciones para optimizar el FEO y la movilidad de las propiedades de los solutos (Heiger, 1997)²⁸.

La FEO puede ser afectada ajustando la concentración y la fuerza iónica del amortiguador; elevadas concentraciones del amortiguador es útil para la limitación de las interacciones iónicas, por disminución de las alteraciones iónicas contra la pared, pero el calentamiento de los capilares limita el uso de las concentraciones elevadas de las soluciones amortiguadoras de pH (figura 22).

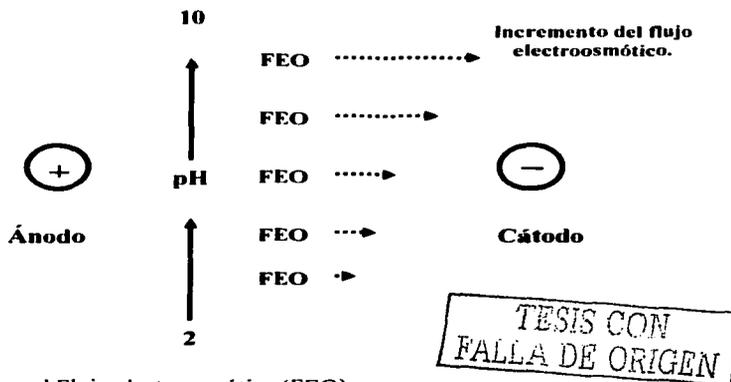


Figura 22. Efecto del pH sobre el Flujo electroosmótico (FEO).

"Implementación de la Técnica de Cuantificación de Clebuterol Clorhidrato Por Electroforesis Capilar Para el Producto Mucovibrol C".



La preparación de las soluciones amortiguadoras de pH puede ser realizada dentro de los laboratorios, centros de investigación, etc. Donde se hayan implementado las técnicas de análisis, cuantificación y separación, sin embargo existen en el mercado soluciones amortiguadoras ya preparadas y estandarizadas con la desventaja de ser muy costosas.



Kit comercial de amortiguadores de pH para electroforesis capilar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Tabla 4. Condiciones para optimizar la FEO y la movilidad de los solutos (Altria & Simpson, 1987)⁶.

Variable	Resultado	Observaciones
Campo eléctrico	FEO proporcionada al cambio	La eficiencia aumenta al aumentar el FEO. El calentamiento por efecto Joule puede modificar y dañar la separación.
Amortiguador de pH	pH aumenta → FEO aumenta pH disminuye → FEO disminuye	Puede modificar la carga o la estructura del soluto. Es el mejor método para medir el FEO.
Fuerza iónica o la concentración del amortiguador	Disminuye el potencial zeta y se incrementa el FEO	Elevada fuerza iónica genera elevada corriente y posible calentamiento por efecto Joule. Baja fuerza iónica, problemática absorción por la muestra. Puede distorsionar el ancho de los picos. Puede generar conductividad distinta en la muestra. Se reduce el condensado (<i>staking</i>) de la muestra
Temperatura	Cambia la viscosidad 2 a 3% por °C	Es importante mantener controlada la temperatura.
Modificaciones orgánicas	Cambia el potencial zeta y la viscosidad usualmente disminuye el FEO	Cambios complejos, determinables experimentalmente. Se puede alterar la selectividad.
Surfactante	Solución hidrofóbica se adsorbe a la pared del capilar por acción intrínseca	Surfactantes aniónicos aumentan la FEO. Surfactantes catiónicos pueden disminuir o invertir el FEO. Puede alterar significativamente el FEO.
Polímeros hidrofóbicos neutros	Existen interacciones hidrofóbicas en la pared del capilar	Disminuye el FEO por cambio e incremento de la viscosidad.
Cubiertas covalentes	Unión química con la pared del capilar	Pueden generarse muchas modificaciones posibles. La estabilidad puede ser problemática.

La concentración de las soluciones amortiguadoras debe oscilar entre 10 a 50 mM, aunque es posible emplear concentraciones entre 100 a 500 mM. Las modificaciones del FEO pueden ser controladas alterando la cubierta dinámica, agregando aditivos al amortiguador, o con cubiertas covalentes (Heiger, 1992)²⁹.

7.1 Tabla de soluciones amortiguadoras (Heiger, 1992)²⁹.

Una amplia variedad de amortiguadores puede ser empleada en la electroforesis capilar de zona (Capillary zone electrophoresis por sus siglas en inglés) (CZE).



Por ejemplo, el más usado es el fosfato a pH 2.5 y pH 7 y el borato a pH 9, siendo la concentración de 10-50-100 mM. El impacto del pH sobre el analito puede producir, sustancialmente, complejos *Zwitteriónicos* especialmente en péptidos y proteínas, pues la carga de esos compuestos es dependiente del pH en forma directa. Una regla de uso frecuente es que hay que seleccionar al pH, entre dos unidades de pH por arriba o por debajo del pKa del analito sometido a la ionización completa; a valor de pH altamente alcalino, puede ser muy rápida y se pueden obtener separaciones incompletas (Altria y Simpson, 1987)⁶.

Ciertas proteínas pueden ser separadas a pH ácidos, debiendo en estas condiciones, los capilares estar sin carga. En estas condiciones, están positivamente cargadas y no existen acciones electrostáticas con la pared, sin embargo, pueden ocurrir interacciones hidrofóbicas y pueden producirse precipitaciones proteicas, por ello en las tablas 5 y 6 se muestran los tipos de amortiguadores mas comúnmente usados en electroforesis capilar (Herren *et al.*, 1987)³⁰.

Tabla 5. Soluciones amortiguadoras más comúnmente usados en Electroforesis Capilar (Altria & Simpson, 1986)⁷.

Buffers	Rango de pH	Buffers	Rango de pH
	zwetteriónicos		
Fosfato	1.14-3.14	Mes	5.15-7.15
Acetato	3.76-5.76	Pipes	5.80-7.80
Fosfato	6.20-8.20	Hepes	6.55-8.55
Borato	8.14-10.14	Tricina	7.15-9.15
		Tris	7.39-9.30

108

Tabla 6. Distintos sistemas de amortiguadores aplicados en EC. (Hartwick, 1994)²⁷.

Tipos	Acción	Observaciones
Aniónicos (SDS) (dodecil sulfato de sodio)	Desactiva la superficie del capilar a través de interacción iónica e hidrofóbica	Amplia variedad de surfactantes. Fáciles de usar. Por encima de CMC* en MECK.
Catiónicos (CTAB) (Bromuro de cetil-trimetil-amonio)		Disminuye el FEO o lo invierte. Puede desnaturalizar totalmente a las proteínas
No iónico (BRIS) Esteres de polietileno Zwitteriónico (CHAPS)		Puede ser usado en conjunto con fase reversa.
3[(3-cholamidopropil)- dimetiamonio] 1 propano sulfonato aminas cuaternarias	Disminuye o revierte el FEO	También actúan formando pares iónicos.

* Concentración micelar mínima.

7.1.1 Soluciones amortiguadoras zwitteriónicas.

TRIS-MES-CAPS-Tricine-Bicine son amortiguadores zwitteriónicos y se emplean comúnmente para la separación de péptidos y proteínas, siendo sus características más importantes, su baja conductividad, ya que se utilizan alrededor de sus pI. La ventaja de estos amortiguadores reside en su baja conductividad, y por consiguiente reducen el calentamiento del capilar por efecto Joule. A veces se le agregan sales como cloruros, fosfatos y sulfatos al medio, que afectan la conformación de las proteínas e impactan sobre la separación (Perret y Ross 1992)⁴⁵.

También, la adición de las sales modifica sustancialmente el FEO, por ruptura de la doble capa iónica de las paredes del capilar. Esta modificación está limitada por la cantidad de sales que pueden agregarse y producir calentamiento por efecto joule.

7.2 Aditivos

Varias sustancias pueden ser agregadas a los amortiguadores para modificar las movibilidades electroforéticas; otros aditivos, tales como surfactantes o ciclodextrinas, forman entornos heterogéneos que pueden definir nuevos sistemas fisicoquímicos de la EC (tabla 7).



Tabla 7. Aditivos para Electroforesis Capilar y de zona (Perrett & Ross, 1992)⁴⁵.

Aditivos	Función
Sales inorgánicas	Cambio conformacional proteico.
Disolventes inorgánicos	Solubilizan y modifican la corriente endosmótica.
Urea	Desnaturaliza oligonucleótidos y solubiliza proteínas.
Ácido sulfónico	Relaciona agentes e hidrofóbicos
Surfactantes catiónicos	Producen el cambio reverso en la pared capilar
Derivados de la celulosa	Reducen la corriente electroendosmótica y actúa como tamizador.
Aminas	Cubren los grupos silanol

7.2.1 Surfactantes

Numerosos tipos de surfactantes pueden ser empleados (aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos y no iónicos).

En una concentración baja, la concentración de moléculas de surfactantes iónicos produce la concentración micelar crítica que pueda actuar como agente solubilizante por la formación de pares iónicos, o por interacciones hidrofóbicas (Perrett y Ross, 1992)⁴⁵.

Dependiendo de la carga del surfactante, puede ser que el FEO se incremente, aumente o se invierta. En la figura 23: (1) el capilar se polariza por el pasaje de la corriente eléctrica y produce el FEO; en (2) el surfactante en una determinada concentración produce la detención de la corriente electroendosmótica, y un exceso se traduce en la inversión de la corriente del FEO (3).

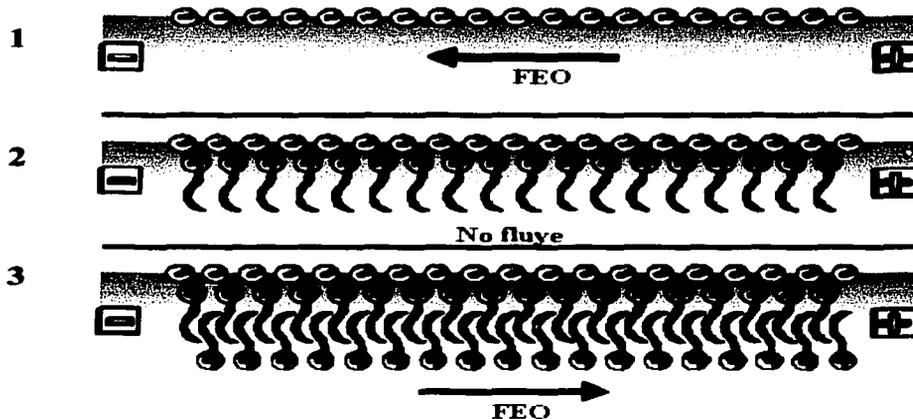


Figura 23. Representación gráfica de Flujo Electroosmótico (FEO).

7.2.2 Sectores quirales (Gozel *et al.*, 1987)²².

La separación de enantiómeros ópticos que poseen un carbono asimétrico y que permite obtener compuestos llamados quirales, que dividen el punto estereoisométrico, representan la imagen especular del compuesto como son fármacos y conservadores de alimentos en la industria.

Comúnmente, la separación para identificarlo se realiza por HPLC y EC. Estos exámenes son generalmente complicados y de elevado costo.

En oposición a la fase quiral estacionaria, el análisis por electroforesis de zona (CZE) en un medio capilar empleando amortiguadores de corrida de elevada selectividad, permite, empleando la EC y aditivos quirales, separar DL-aminoácidos y fármacos quirales.



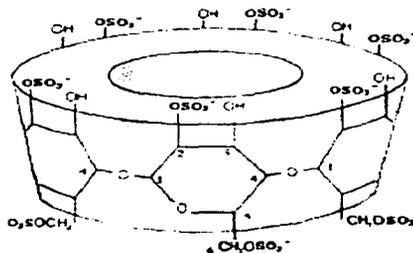
7.2.3 Ciclodextrinas.

El avance producido en las técnicas de interpretación de imagen molecular por aplicación de cristalografía de Rayos X, Resonancia magnética nuclear, espectroscopia ESR, electroquímica, medidas cinéticas y termodinámicas, termogravimetría, calorimetría de barrido, espectroscopia IR y UV, resonancia paramagnética electrónica (EPR), doble resonancia electrónica y espectroscopia Raman, han permitido el nacimiento de la química supramolecular (Lucy *et al.*, 1996)³⁶.

Este campo de la ciencia, de carácter multidisciplinario abarca aspectos químicos, físicos biológicos, y tecnologías de especies químicas de gran complejidad, las que se encuentran unidas por uniones no covalentes intermoleculares.

7.2.3.1 Ciclodextrinas (CD) o (CDs) (Lucy *et al.*, 1996)³⁶.

Cuando el almidón se degrada por la acción de la enzima glucosil-transferasa se produce una reacción intramolecular sin que intervenga una molécula de agua, formándose productos cíclicos mediante uniones α -1,4 que se conocen con el nombre de Ciclodextrina (CD). Constituyen una serie de tres oligosacáridos cíclicos formando una familia de alfa- CD, beta-CD y gamma-CD, los cuales se encuentran compuestos por 6, 7, 8 unidades de D-(+) glucopiranosas unidas en forma α -1,4 (figura 24).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 24. La forma de las ciclo dextrinas les permite conformar una serie de complejos de inclusión con una gran variedad y cantidad de especies moleculares.



7.2.3.2 Estructura espacial de las CD's

Debido a la conformación C_1 de las unidades glicopiránosicas, todos los grupos hidroxilos secundarios están ubicados en cada uno de los bordes del anillo (de mayor diámetro) y todos los primarios en el menor diámetro. La cavidad interior se encuentra revestida por los átomos de hidrógeno y los puentes de oxígeno glucosídico respectivamente. Los pares de electrones no enlazantes de estos puentes se encuentran orientados hacia el interior de la cavidad, generando una alta densidad electrónica. Esta cavidad tiene por consiguiente un marcado carácter hidrofóbico y un momento dipolar muy marcado (Desiderio y Fanali, 1995)¹⁸.

7.2.3.3 La conicidad (Lucy *et al.*, 1996)³⁶.

Inicialmente se pensó que las CDs tenían forma cilíndrica, pero la rotación de los grupos hidroxílicos primarios reduce el diámetro efectivo de la cavidad del lado donde están ubicados, lo que configura en forma más adecuada una estructura geométrica cónica.

La configuración y dimensiones aproximadas se indican en la figura 25.

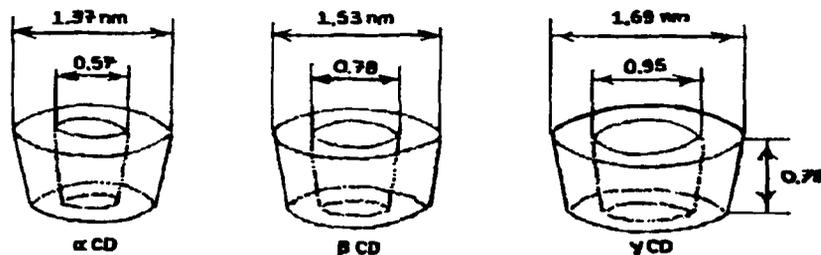


Figura 25. Dimensiones moleculares de las ciclodextrinas.

7.2.3.4 La cavidad (Guzman, 2002)²³.

Las cavidades de las CDs cristalizadas a partir de soluciones acuosas no están vacías sino que contienen en su interior de 2 a 8 moléculas de agua y otras tantas para integrar el

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



cristal. Los complejos, de inclusión de las CDs se originan por sustitución total o parcial del agua incluida por la molécula huésped apropiada, que se traduce en una modificación de los espectros de RMN, de difracción de Rayos X.

Las CD forman complejos con aquellos compuestos que satisfagan las siguientes características:

- a. Requerimientos de complementariedad estereoeléctrica.
- b. Posean dimensiones compatibles con las cavidades respectivas.
- c. Factores geométricos que definirán qué moléculas invitadas pueden penetrar en las cavidades de las CD.
- d. Sustitución de uno o más átomos de hidrógeno de los hidroxilos primarios y/o secundarios (éteres, ésteres, glucosil-CDs).
- e. Sustitución de uno o más hidroxilos primarios o secundarios (desoxi-halógenos, amino, etc).
- f. Eliminación de los átomos de hidrógeno del grupo C_5-CH_2-OH (C_5COOH).
- g. Ruptura de uno o más enlaces C2-C3 por oxidación con peryodato.

7.2.3.5 Uniones químicas entre el huésped y las CD.

Las ciclodextrinas pueden interaccionar con el huésped de la siguiente manera (Lucy *et al.*, 1996)³⁶:

- a. Interacciones del tipo Van DerWaals.
- b. Uniones por puente de hidrógeno.
- c. Interacción dipolo-dipolo.
- d. Impulsión hidrofóbica.
- e. Liberación de agua de mayor energía desde la cavidad.
- f. Desprendimiento de energía de tensión del anillo macrocíclico.
- g. Efectos de tensión disolvente-superficie.



Lo expuesto pone en evidencias las distintas fuerzas que rigen la incorporación del huésped a la CD.



En la figura 26 queda explicada la interacción y se demuestra cómo las moléculas del disolvente son expulsadas del interior de las CD para permitir la separación de los compuestos quirales

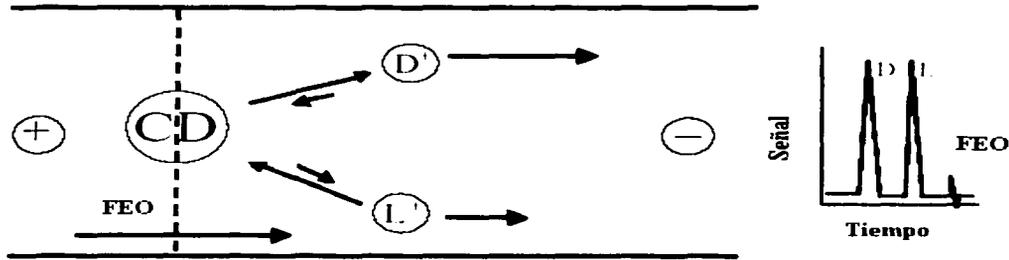


Figura 26. Mecanismo de separación de sustancias quirales por medio de ciclodextrinas.

7.2.3.6 Las principales propiedades de las ciclodextrinas (Castro y Barbirc, 1997)¹³.

La forma de las ciclodextrinas es similar al de un cono truncado con diferentes cavidades de distintas dimensiones, y que se encuentran relacionadas con las distintas unidades de glucosa. Están relacionadas con la hidrofobicidad y con los grupos no polares (tabla 8).



Tabla 8. Algunas propiedades de las ciclodextrinas.

Tipo de ciclodextrina	alfa	Beta	Gamma
No de glucopiranosas	6	7	8
Peso molecular	973	1135	1297
Diámetro interno (nm)	0.47-0.52	0.60-0.64	0.75-0.83
Profundidad (nm)	0.79-0.80	0.79-0.80	0.79-0.80
Rotación específica (α_{25}^D)	150.5	162.5	177.4
Punto de ebullición °K	551	572	540
Solubilidad en agua (g/100ml a 25 °C)	14.5	185	23.2

La solubilidad de las β -CD es relativamente más baja que la α y γ . Esto puede ser un problema para β -CD, ya que es necesario seleccionar un aditivo como elemento de fondo. Cuando se emplean concentraciones elevadas de β -CD se puede emplear metanol-agua, etanol o mezclas de urea.

La solubilidad de las β -CD en solución acuosa en urea 4-8 M de urea, puede aumentar de 0.089 a 0,226 M respectivamente. Los grupos hidroxilos se presentan en las dos entradas de las CDs en posición 2, 3 y 6 por cada glucopiranososa, puede ser modificada por reacciones químicas, es posible producir CD con derivados con propiedades diferentes.

Las reacciones con los grupos hidroxilo alteran las propiedades de las ciclodextrinas:

- Mejora la solubilidad de las CD
- Formación de diferentes uniones con analitos que pueden mejorar la complejación
- Análisis de isómeros ópticos sin carga

Distintos parámetros experimentales pueden influir en la complejación y estereoselectividad, el tipo de CD, la concentración, voltaje aplicado, temperatura, longitud del capilar, fuerza iónica, disolventes orgánicos, corriente electroendosmótica, aditivos poliméricos.



VIII. APLICACIONES.

El explosivo avance de la electroforesis capilar se ha extendido al área biomédica, en el campo de las proteínas, péptidos, ADN, análisis de líquidos de perfusión, monitoreo de fármacos, marcadores genéticos tumorales y neurobioquímicos, fármacos xenobióticos, de abuso, y aplicaciones forenses. En el área biofarmacéutica, para el control de calidad de productos farmacéuticos y biotecnológicos, quimioterapéuticos y de estructura quiral (Li, 1992)³⁵.

En el área de alimentos, se le aplica al fraccionamiento y cuantificación de aminoácidos, hidratos de carbono, ácidos orgánicos, aditivos y contaminantes. En el área de control ambiental permite: la identificación de contaminantes y sus metabolitos, pesticidas, metales pesados e hidrocarburos.

Como todo desarrollo de un área analítica nueva, la incorporación de técnicas acopladas como la espectroscopia de masa, fluorescencia inducida por láser y otras variantes permiten augurar un prometedor futuro (Li, 1992)³⁵.

IX. DESARROLLOS TECNOLÓGICOS QUE CONTRIBUYERON A LA ELECTROFORESIS CAPILAR (Li, 1992)³⁵.

Seis desarrollos tecnológicos han concurrido para el desarrollo comercial de la instrumentación, que constituye en la actualidad la electroforesis capilar.

1. Los capilares de sílica fundido revolucionaron la cromatografía gaseosa (CG) y han producido la cámara de separación de la electroforesis capilar.
2. La disponibilidad de fuentes de potencia de alto voltaje 20 a 30 kV, altamente estabilizadas y automatizadas para el mantenimiento estable de la tensión y corriente.
3. Los detectores desarrollados para la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), de absorbancia de alta sensibilidad pudieron ser aplicados con modificaciones ópticas al tubo capilar.



4. Los desarrollos obtenidos por la electroforesis en geles de tamizado molecular como los de poliacrilamida, agarosa y otros, en las técnicas de la separación de proteínas.
5. El desarrollo de los anfolitos, obtenidos por copulación del ácido acrílico y las polietilen poliaminas que han permitido generar ambientes de pH continuos y estables, donde se logra separar proteínas de puntos isoeléctricos muy próximos.
6. El análisis computacional aplicado a la resolución de productos obtenidos por separación por HPLC o CE que pueden ser estudiados, espectralmente a través de software para tal fin.

X. VENTAJAS DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR:

Las separaciones se realizan empleando mecanismos tradicionales, en un ámbito capilar, que además ofrece más facilidad y velocidad que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Mientras elimina el problema de los disolventes del HPLC, la toxicidad de los mismos y su costo, pues emplea soluciones acuosas en su gran mayoría con muy baja concentración iónica, incorporan los principios de la automatización a través de un hardware creado especialmente con un software altamente optimizado (Guzman, 1993)²⁴.

Las separaciones se obtienen en pocos minutos, obteniéndose simultáneamente resultados cuantitativos, en oposición a los procedimientos tradicionales que utilizan horas o días.



10.1 Comparación de EC vs. HPLC (Guzman, 2002)²³.

- Mayor resolución de la EC y por lo tanto mejor separación.
- Número de platos teóricos en HPLC de 100000 a 200000
- Número de platos teóricos en EC de 500 000 a 1 000 000.
- Posibilidades de separación de enantiómeros o moléculas de estructuras similares.
- Evita efectos de hombros o picos mezclados.
- Menor volumen de muestreo (de 20-100 nL vs. de 20-100 μ L).
- Límite de detección másico muy bajo (de ng, hasta unidades para enzimas).
- Límite de detección en concentración muy bajo (fg/mL con un detector de fluorescencia).
- Se aplica un rango de moléculas orgánicas e inorgánicas enorme, desde iones metálicos hasta ADN.
- Permite la separación de mezclas moleculares complejas (determinación de impurezas).
- Permite la determinación de estructuras moleculares con detector MS o secuenciador de ADN.
- Se usa poco volumen de muestra: costo de producto reducido.
- Se usa muy poco amortiguador: costo de disolventes reducido.
- La separación es más rápida: costo de tiempo reducido.
- El capilar es de tecnología muy sencilla en comparación con una columna de HPLC: costo de material e instalación reducida.



Ventajas económicas:

❖ Costos comparativos de CE y HPLC

1. Muestra HPLC: muestra (50 μ L), eluente (100 mL), columna (500 USD, para 1000-2000 corridas), tiempo (preparación de la muestra mas tiempo de corrida: 30 + 60 min)

Costo 20 pesos.

2. Muestra CE: muestra (20 nL), amortiguador (5 μ L), capilar (50 cm, 50 USD el metro, útil para 500-1000 muestras), tiempo preparación de la muestras más tiempo de corrida: 30 + 20 min).

Costo 2 pesos.

Nota: la estimación de costos para CE y HPLC fue proporcionada por Beckman Coulter de México.

Desventajas

- En la electroforesis capilar las separaciones dependen de las diferentes velocidades de los analitos, iones que migran bajo la influencia de un campo eléctrico externo.
- Por tanto esta técnica es solo aplicable a analitos que son de naturaleza iónica en el seno de una disolución amortiguadora contenida en el capilar.
- Las caídas de corriente eléctrica.
- El ruido que presentan ya que en casi ningún analito es posible registrar la basal.

10.2 Volúmenes empleados

El empleo de microvolúmenes y la rapidez de la EC en oposición a la HPLC, consumiendo microlitros de muestra y volúmenes del orden de los nanolitros para las soluciones electrolíticas, la hacen una técnica altamente versátil y económica.



10.3 Aplicaciones de la Electroforesis Capilar en la industria farmacéutica.

La electroforesis capilar estaba popularizada a mediados de los 80's, fué Jorgenson y Lukacs, (1983); quiénes demostraron que se podían obtener eficiencias excepcionales de separación utilizando la electroforesis capilar.

El desarrollo de la instrumentación comercial y la investigación en áreas de aplicación, dónde el uso de electroforesis convencional era poco frecuente. Una de estas áreas era el análisis farmacéutico dónde las pocas aplicaciones de electroforesis no eran sistemas de rutina debido a la naturaleza complicada y semicuantitativa de esta técnica. Sin embargo, la introducción del formato capilar permitió dirigir el análisis cuantitativo y automatizado de lleno al análisis de compuestos (Guzman, 2002)²³.

Para asegurar la calidad del producto así como su identidad, es importante caracterizar el fármaco en las formulaciones. La caracterización completa involucra la valoración del fármaco por métodos físicos y químicos. La medida de propiedades químicas como pureza, ensayo, pureza de quiralidad, el volumen de iones inorgánicos, y la confirmación de identidad se realizan rutinariamente por HPLC y otras técnicas cromatográficas.

Recientemente, la electroforesis capilar (EC) se ha desarrollado para realizar estas pruebas y ha demostrado ser una alternativa complementaria y atractiva para los métodos más establecidos para la mayoría de fármacos, compuestos solubles en agua con características ácidas y/o básicas y no polares pueden ser cuantificados por esta técnica (Nishi *et al.*, 1989)⁴⁴.

Un aspecto importante de análisis de fármacos, involucra la determinación de impurezas relacionadas al fármaco. Esto generalmente se realiza por HPLC que tiene una metodología establecida y la instrumentación altamente automatizada está disponible. Es importante asegurar que un perfil de impureza completo y exacto se genere. Esto puede complementarse por la correlación cruzada de resultados obtenida con aquéllos por TLC o un método de HPLC alternativo. En todos los casos, la selectividad cuenta en una interacción cromatográfica dónde coelución o la adsorción irreversible pueden ocurrir (Kuhn y Hoffstetter, 1993)³⁴.



La electroforesis capilar ofrece un proceso de selectividad completamente diferente y es, por consiguiente, una técnica complementaria y ortogonal a HPLC. Dado que un método analítico puede desarrollarse para el uso a largo plazo y así puede aplicarse múltiples muestras, la velocidad, simplicidad, y automatización son los requisitos importantes. Electroforesis Capilar y HPLC pueden ofrecer estos medios para muchas aplicaciones (Altría, 1995)⁵.

La determinación de impurezas relacionadas al fármaco es actualmente el papel principal de la electroforesis capilar dentro del análisis farmacéutico. Las técnicas cromatográficas convencionales tienen una restricción, cuando una sustancia posee isómeros estructurales así como impurezas relacionadas, resolución difícil utilizando para ello columnas especiales que además son costosas. Sin embargo, una ventaja de la electroforesis capilar por encima de los sistemas cromatográficos convencionales, es que su poder de separación y resolución son muy altos (Altría, 1995)⁵.

Los datos generados en el perfil de impurezas se comparan a menudo con los obtenidos por los métodos cromatográficos (típicamente HPLC). Los principios de separación en electroforesis capilar son completamente diferentes al HPLC y, por consiguiente, son sistemas complementarios entre ambas técnicas dan un fuerte apoyo a la integridad de los datos. Esta combinación de técnicas se establece ahora en muchos laboratorios y se ha vuelto un reemplazo conveniente para el uso convencional de TLC y HPLC en combinación (Wiktorowicz, 1992)⁵⁰.

Aparte de las investigaciones rutinarias, esta combinación de uso es de particular importancia, durante la aprobación del método analítico. Las diferencias en la selectividad entre EC y HPLC pueden producir las diferencias en los resultados con una técnica que muestra una baja estimación en los niveles de impureza siendo la electroforesis capilar un sistema mucho más selectivo que el HPLC (Wiktorowicz, 1992)⁵⁰.



10.3.1 Costos de operación

En electroforesis capilar, los gastos de consumo de reactivos y disolventes son relativamente bajos. Los métodos típicos emplean soluciones del electrolito acuosas, con 10 a 20 mL son un requisito diario común. Los costos son mínimos en comparación con el HPLC: la compra de disolventes y disposición de los mismos así como el elevado costo de las columnas. Los capilares sin recubrimiento son los más generalmente empleados ya que su costo es una fracción del costo de una columna de HPLC (Camilleri, 1993).

Tiempo de análisis, en electroforesis capilar es mucho menor en comparación con una corrida en HPLC, ya que este puede tardar 5 a 20 minutos con el respectivo consumo de disolventes, mientras que un análisis en electroforesis capilar oscila de 1 a 10 minutos, dependiendo de la complejidad de la molécula, siendo el consumo de disolventes mínimo (viales de electrolitos) así como una reducción considerable de residuos (Weinberger, 1993)⁴⁹.



XI. FICHA TÉCNICA DEL CLORHIDRATO DE CLENBUTEROL:

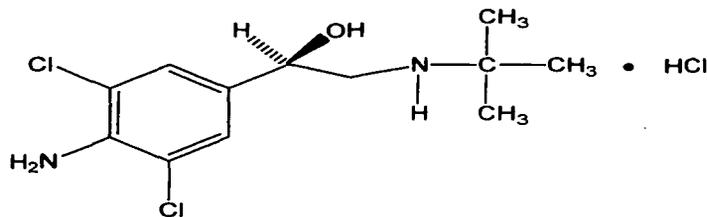
Nombre químico: (RS)-1-(4-amino-3,5-diclorofenil)-2-[(1,1-dimetiletil) amino] etanol.

1-(4amino-3-5-diclorofenil)-2-*tert*-butilamino-etanol.

4-amino- α -[(*tert*-butilamino)metil]-3,5-diclorobencil alcohol.

NAB-365.

Fórmula desarrollada:



Fórmula condensada: $C_{12}H_{19}Cl_3N_2O$

MM: 277.19

Descripción: Polvo blanco cristalino, inodoro, punto de fusión de 174-175 °C con descomposición, muy soluble en agua, metanol, etanol, ligeramente soluble en cloroformo, insoluble en benceno.

Características Físicoquímicas de la molécula:

Energía electrónica: -19687.5 eV
Energía dipolo-dipolo: 1.69006 Kcal/mol
Momento Dipolar: 4.3401 Debye
Energía de repulsión: 16454.3 eV



Reacciones de identificación: Primera identificación **A -C**

Segunda identificación **B -C**

A) Examinar por espectrometría de absorción de infrarrojo, y comparar con el espectro obtenido de Clenbuterol clorhidrato STD ya sea primario o secundario.

B) Examinar por cromatografía en capa fina, con placas de TLC silica gel F₂₅₄.

Solución de prueba: Disolver 10 mg de la sustancia problema en 10 mL de metanol.

Solución de referencia: Disolver 10 mg en 10 mL de metanol.

Aplicar separadamente en la placa 10 μ L de cada solución desarrollar la placa hasta 10 cm usando una mezcla de 0.15 volúmenes de hidróxido de amonio; 10 volúmenes de etanol y 15 volúmenes de tolueno. Secar la placa en una corriente de aire. El revelado de la placa se hace mediante la aplicación de Spray de una solución de 10 g/L de nitrito de sodio en ácido clorhídrico 1 M, dejar secar la placa en una corriente de aire por 10 minutos, posteriormente aplicar por aspersion una solución de bicloruro de naftiletildiamina en metanol, secar la placa en corriente de aire. La mancha principal en el cromatograma obtenido con la solución de prueba debe ser similar en posición, color y tamaño a la mancha del cromatograma obtenido con la solución de referencia.

C) Da reacción para cloruros.

pH: pH de una solución oscila en 5.0 a 7.0.

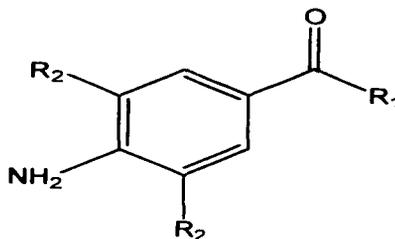
Rotación óptica: Disolver 0.30 g en agua destilada y diluir a 10 ml con el mismo disolvente. Si es necesario filtrar. El ángulo de rotación óptica es -0.10° a $+0.10^\circ$.



Valoración: Disolver 0.250 g en 50 mL de alcohol y adicionar 5 mL de ácido clorhídrico 0.01 M. Titular con Hidróxido de sodio 0.1 M, determinar el punto final de la valoración potenciométricamente, lea el volumen adicionado cuando los dos puntos de inflexión sean alcanzados.

➤ 1 mL de hidróxido de sodio 0.1 M es equivalente a 31.37 mg de $C_{12}H_{18}Cl_2N_2O \cdot HCl$.

Impurezas relacionadas:



- A) $R_1 = H, R_2 = Cl$: 4-amino-3,5-diclorobenzaldehído.
- B) $R_1 = CH_2-NH-C(CH_3)_3, R_2 = Cl$: 1-(4-amino-3,5-diclorofenil)-2-[(1,1-dimetiletil)amino]etanona (clenbuterol-cetona)
- C) $R_1 = CH_3, R_2 = Cl$: 1-(4-amino-3,5-diclorofenil)etanona
- D) $R_1 = CH_3, R_2 = H$: 1-(4-aminofenil)etanona
- E) $R_1 = CH_2Br, R_2 = Cl$: 1-(4-amino-3,5-diclorofenil)-2-bromoetanona



11.1 Farmacología del Clenbuterol (Clark y Wesley, 1992):

Indicaciones Terapéuticas: Está indicado en el tratamiento y control de broncoespasmo de etiología asmática, en bronquitis crónicas y en todas las enfermedades obstructivas agudas y crónicas con componentes de broncoconstricción.

11.2 Farmacocinética y Farmacodinamia en humanos: El Clenbuterol es un fármaco simpaticomimético con propiedades selectivas β -2 estimulantes y mínimo efecto (VÍA ORAL). Perteneciente al grupo de derivados de la Feniltanolamina. Estudios en humanos han demostrado su efecto broncodilatador de larga duración (8 a 12 horas) a dosis muy pequeñas. En humanos la dosis-respuesta por vía oral a 20, 30 y 40 μ g muestran una acción broncodilatadora (estudios espirométricos) sostenidos por 8 a 12 horas tanto a nivel de vías aéreas centrales como periféricas de pequeño calibre. Su absorción por vía oral es rápida y casi completa entre 15 y 45 minutos, alcanza niveles máximos en plasma a las 2 horas, a partir del cual su eliminación se realiza en forma bifásica. La fase de eliminación corta (curva α) muestra una vida media de 1 hora y la fase prolongada (curva β) rebasa la fase corta con una vida media de 3 a 6 horas. La eliminación se realiza predominantemente por vía renal. Su actividad broncodilatadora se asocia además a su efecto relajante directo del músculo uterino en el periodo terminal del embarazo. Sus efectos sobre el sistema cardiovascular son mínimos, ya que a nivel de receptores β -1 es insignificante; en pruebas clínicas en humanos no modifica significativamente la frecuencia cardíaca ni la presión arterial por su efecto β -2 selectivo; en algunos pacientes puede presentarse temblor e hiperglucemia transitoria poco significativa, efecto farmacodinámico común a los fármacos broncodilatadores β -2.

11.3 Contraindicaciones: Deberá tenerse especial precaución con la respuesta en pacientes con datos clínicos de hipertiroidismo, hipertensos y con extrasístoles ventriculares. En el primer trimestre del embarazo y en personas con hipersensibilidad a los componentes de la fórmula.



11.4 Precauciones o restricciones de uso durante el embarazo o la lactancia: No se recomienda el empleo durante el embarazo, no se ha establecido hasta la fecha su seguridad durante la lactancia. El uso de este medicamento queda bajo la responsabilidad del médico.

11.5 Reacciones Secundarias y Adversas: A dosis recomendadas, rara vez se pueden presentar reacciones adversas como son: temblor, palpitaciones, nerviosismo, taquicardia. En personas muy sensibles que llegan a presentar las reacciones adversas es suficiente con reducir la dosis para eliminar los efectos, o suspender el tratamiento. La administración de dosis mayores de 40 µg puede producir taquicardia, palpitaciones y excepcionalmente temblor.

11.6 Interacciones medicamentosas y de otro género: Los fármacos B-bloqueadores pueden contrarrestar o inhibir el efecto β-estimulante del Clenbuterol.

11.7 Alteraciones de pruebas de laboratorio: No hay reportes hasta la fecha.

11.8 Precauciones y relación con efectos de carcinogenesis, mutagenesis, teratogenesis y sobre la fertilidad: No se ha establecido el potencial de efectos en el ser humano.

11.9 Sobredosificación o ingesta accidental manifestaciones y manejo (antídotos): Las manifestaciones por sobredosificación con Clenbuterol son: taquicardia, palpitaciones y excepcionalmente temblor. Se deberán administrar β-bloqueadores para contrarrestar los efectos.



XII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Dentro de la industria farmacéutica la electroforesis capilar ha empezado a ser una técnica útil para la cuantificación de fármacos, análisis de pureza, separación de agentes quirales entre otras, de una manera mucho más eficiente, menos costosa y mucho más limpia en cuanto a la generación de residuos que el HPLC.

Por ello, surge la importancia de implementar una técnica que pueda cuantificar Clenbuterol Clorhidrato, ya que existen métodos por HPLC, los cuales resultan ser difíciles y costosos, además de necesitar cantidades mayores de disolventes, así como el uso de columnas para compuestos quirales, y si se requiere determinar si este compuesto viene junto con su isomero, el costo de análisis sería mucho mayor que si se implementara uno por electroforesis capilar el cual podría ser mucho más barato, fácil y rápido debido a que la industria farmacéutica requiere de este tipo de servicios: rápidos, sencillos y sobre todos que sean económicos para el control de calidad de formulaciones.

Además de implementar una técnica de cuantificación para dicho fármaco en formulaciones y medicamentos así como materia prima, esta misma podría aplicarse no solo como un análisis de rutina, también podrá utilizarse con fines sanitarios en ganadería, ya que el Clenbuterol además de ser un broncodilatador, es utilizado para la engorda de ganado vacuno, en donde dicho fármaco en productos cárnicos puede ser un foco de contaminación sanitaria hacia el hombre, si este consume la carne con Clenbuterol.



XIII. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una técnica de separación y cuantificación por EC para el principio activo presente en los productos Mucovibrol C Solución, Mucovibrol C Gotas en presentación pediátrica y adulta.

13.1 Objetivos particulares:

- Evaluar la estructura molecular del principio activo para conocer con esto la capacidad que tendrá este para ser separado y cuantificado dentro de una forma farmacéutica.
- Determinar cuales serán los parámetros o variables críticas que pudiesen afectar la cuantificación del principio activo (Clenbuterol Clorhidrato) por EC.
- Señalar cual es el pH óptimo del amortiguador realizando diferentes pruebas y ajustes hasta encontrar el pH ideal para la separación.
- Determinar con base a los parámetros óptimos encontrados de presión, voltaje, tiempo, temperatura y longitud del capilar un método de cuantificación.
- Realizar la validación del método analítico propuesto.
- Hacer una comparación costo-beneficio que surgieron al implementar la técnica de cuantificación por EC:



XIV. HIPÓTESIS.

Debido a las características fisicoquímicas del analito, será posible cuantificarlo por Electroforesis Capilar; ya que al aplicar un campo eléctrico en una solución que contenga Clenbuterol-HCl, este será separado por la interacción del campo eléctrico y el grado de ionización de la molécula, haciendo posible la migración de éste mediante el Flujo Electroosmótico y finalmente la separación por inyección Hidrodinámica.



XV. MATERIAL Y MÉTODOS.

❖ VALORACIÓN CLEMBUTEROL.

a. **Material.**

- Matracas volumétricos de 100 mL.
- Matracas volumétricos de 10 mL.
- Pipetas volumétricas de 1mL, 2mL y 5mL.
- Filtros Miller 0.45 micras.
- Jeringas.
- Perilla de seguridad.
- Capilar negativo para EC con longitud total de 60 cm y longitud efectiva de 57 cm y diámetro interno de 75 μ m. Marca Beckman Coulter.
- Espátula de acero inoxidable.
- Vial reservorio para EC.

b. **Equipo.**

- MDQ P/ACE con la estación de trabajo 32 Karat para EC.
- Mascarilla de seguridad.
- Balanza Analítica.
- Potenciómetro.
- Lentes de seguridad.
- Guantes.
- Campana de extracción.

c. **Reactivos**

- Fosfato dibásico de Sodio Marca J.T. Baker.
- Fosfato monobásico de Potasio Marca J.T. Baker.
- Borato de Sodio Marca J.T. Baker.
- Ácido Bórico Marca J.T. Baker.
- Agua Destilada (Desionizada).
- Hidróxido de Sodio Marca J. T. Baker.



Para encontrar el método de cuantificación más óptimo para el activo Clenbuterol HCl, en la forma farmacéutica de gotas y solución (Mucovibrol C solución y Mucovibrol C Gotas) se implementaron una serie de matrices en las que se desarrollaron las diferentes condiciones de trabajo y con ello establecer las condiciones óptimas de separación y cuantificación.

Como ya se mencionó anteriormente la molécula de Clenbuterol Clorhidrato según los datos reportados y calculados tiene un $pK_{a1} \text{ NH}_2\text{-Ar} = 8.18$ y $pK_{a2} \text{ NH-R}_2 = 8.82$ por lo que se propuso empezar con el diseño de matrices, en las que la molécula estuviese totalmente ionizada por el amortiguador de separación, para que al aplicar un voltaje, éste pudiese ser arrastrado y separado mediante el flujo electroosmótico que dentro del capilar se estuviese generando, de esta forma las matrices se propusieron son las siguientes:

Tabla 9. Condiciones propuestas de trabajo.

Tipo de amortiguador	Concentración (mM)	pH	Muestra	Voltaje	Presión de levantamiento (rampa)
$\text{H}_2\text{PO}_4^{-1} / \text{HPO}_4^{-2}$	30	7.5	1 $\mu\text{g/mL}$	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
$\text{H}_2\text{PO}_4^{-1} / \text{HPO}_4^{-2}$	30	7.8	1 $\mu\text{g/mL}$	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
$\text{H}_2\text{PO}_4^{-1} / \text{HPO}_4^{-2}$	30	8.0	1 $\mu\text{g/mL}$	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
$\text{H}_2\text{PO}_4^{-1} / \text{HPO}_4^{-2}$	30	8.3	1 $\mu\text{g/mL}$	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
$\text{H}_2\text{PO}_4^{-1} / \text{HPO}_4^{-2}$	30	8.5	1 $\mu\text{g/mL}$	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
$\text{H}_2\text{PO}_4^{-1} / \text{HPO}_4^{-2}$	30	8.7	1 $\mu\text{g/mL}$	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
$\text{H}_2\text{PO}_4^{-1} / \text{HPO}_4^{-2}$	30	9.0	1 $\mu\text{g/mL}$	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
$\text{H}_2\text{PO}_4^{-1} / \text{HPO}_4^{-2}$	30	9.3	1 $\mu\text{g/mL}$	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
$\text{H}_2\text{PO}_4^{-1} / \text{HPO}_4^{-2}$	30	9.5	1 $\mu\text{g/mL}$	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
$\text{H}_2\text{PO}_4^{-1} / \text{HPO}_4^{-2}$	30	9.7	1 $\mu\text{g/mL}$	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi

Inyección electrocinética: este tipo de inyección se retira uno de los extremos del capilar y el correspondiente electrodo, y se coloca en un recipiente en el que contiene la muestra, aplicando un potencial durante algún tiempo determinado, de esta forma la muestra entra en el capilar debido a la actuación conjunta de los fenómenos de migración iónica y FEO.

NOTA:

Inicialmente las condiciones del método fueron probadas de acuerdo a la referencia bibliográfica de Altria *et al.*, (1993)², como no se obtuvieron totalmente los resultados esperados de separación, se desarrollaron matrices con diferentes concentraciones de amortiguador, ya que existe la referencia del tipo de amortiguador a utilizar, para la concentración óptima se manejaron varias, hasta encontrar la idónea, el voltaje de separación y levantamiento de rampa presentaron buenos resultados según la bibliografía consultada por lo que se mantuvieron constantes, por tanto sólo se varió la concentración del amortiguador y el pH de este.

El capilar propuesto en la literatura fue de 60 cm de longitud y 57 cm de longitud efectiva y un diámetro interno de 75 μm , una temperatura de 25 °C y una longitud de lectura de 214 nm.

"Implementación de la Técnica de Cuantificación de Clenbuterol Clorhidrato Por Electroforesis Capilar Para el Producto Mucovibrol C"



Tabla 9. Continuación

Tipo de amortiguador	Concentración (mM)	pH	Muestra	Voltaje	Presión de levantamiento (rampa)
H ₂ PO ₄ ⁻¹ / HPO ₄ ⁻²	40	7.5	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₄ ⁻¹ / HPO ₄ ⁻²	40	7.8	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₄ ⁻¹ / HPO ₄ ⁻²	40	8.0	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₄ ⁻¹ / HPO ₄ ⁻²	40	8.3	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₄ ⁻¹ / HPO ₄ ⁻²	40	8.5	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₄ ⁻¹ / HPO ₄ ⁻²	40	8.7	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₄ ⁻¹ / HPO ₄ ⁻²	40	9.0	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₄ ⁻¹ / HPO ₄ ⁻²	40	9.3	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₄ ⁻¹ / HPO ₄ ⁻²	40	9.5	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₄ ⁻¹ / HPO ₄ ⁻²	40	9.7	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi

Tabla 9. Continuación

Tipo de amortiguador	Concentración (mM)	pH	Muestra	Voltaje	Presión de levantamiento (rampa)
H ₂ PO ₃ ⁻¹ / HPO ₃ ⁻²	50	7.5	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₃ ⁻¹ / HPO ₃ ⁻²	50	7.8	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₃ ⁻¹ / HPO ₃ ⁻²	50	8.0	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₃ ⁻¹ / HPO ₃ ⁻²	50	8.3	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₃ ⁻¹ / HPO ₃ ⁻²	50	8.5	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₃ ⁻¹ / HPO ₃ ⁻²	50	8.7	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₃ ⁻¹ / HPO ₃ ⁻²	50	9.0	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₃ ⁻¹ / HPO ₃ ⁻²	50	9.3	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₃ ⁻¹ / HPO ₃ ⁻²	50	9.5	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₃ ⁻¹ / HPO ₃ ⁻²	50	9.7	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi

Tabla 9. Continuación

Tipo de amortiguador	Concentración (mM)	pH	Muestra	Voltaje	Presión de levantamiento (rampa)
H ₂ PO ₄ ⁻¹ / HPO ₄ ⁻²	60	7.5	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₄ ⁻¹ / HPO ₄ ⁻²	60	7.8	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₄ ⁻¹ / HPO ₄ ⁻²	60	8.0	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₄ ⁻¹ / HPO ₄ ⁻²	60	8.3	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₄ ⁻¹ / HPO ₄ ⁻²	60	8.5	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₄ ⁻¹ / HPO ₄ ⁻²	60	8.7	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₄ ⁻¹ / HPO ₄ ⁻²	60	9.0	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₄ ⁻¹ / HPO ₄ ⁻²	60	9.3	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₄ ⁻¹ / HPO ₄ ⁻²	60	9.5	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi
H ₂ PO ₄ ⁻¹ / HPO ₄ ⁻²	60	9.7	1 µg/mL	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi



Inicialmente se probó con concentraciones de 2 $\mu\text{g/mL}$ pero se obtuvieron electroferogramas con picos no definidos, por lo que se disminuyó la concentración a 1 $\mu\text{g/mL}$.

En base a las condiciones experimentales descritas anteriormente se encontró que el método ofreció una mayor resolución y separación, es el siguiente:

Tabla 10. Condiciones optimas de separación

Tipo de amortiguador	Concentración (mM)	pH	Muestra	Voltaje	Presión de levantamiento (rampa)
$\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$	50	8.3	1 $\mu\text{g/mL}$	1.0 psi a 12 kV	0.17 psi

15.1. Variables

➤ **Control**

- Presión
- Temperatura
- Voltaje
- Capilar
- pH

➤ **Respuesta**

- Separación de picos
- Sensibilidad del método
- Selectividad
- Robustez
- Linealidad del método y sistema
- Exactitud
- Precisión
- Reproducibilidad



15.2 Preparaciones de soluciones:

- Amortiguador de Fosfatos pH 8.3 50 mM.

Solución de fosfato dibásico de sodio 50mM

- Pesar 3.54g de fosfato dibásico de sodio y aforar a 500 mL con agua destilada.

Solución de fosfato monobásico de potasio 50mM

- Pesar 3.40g de fosfato monobásico de potasio y se afora a 500mL con agua destilada.

Se mezclarán ambas soluciones, agregando el fosfato monobásico de potasio al fosfato dibásico de sodio hasta obtener el pH 8.3. Al momento de ocupar ésta debe ser filtrada mediante un filtro Miller de 0.45 micras.

- Solución regeneradora
 - Se prepara una solución de hidróxido de sodio 0.1 M (pesar 4 g de NaOH y transferir estos a un matraz volumétrico de 1000 mL y aforar con agua destilada).
- Preparación de la solución de referencia
 - Pesar exactamente 10 mg de Clenbuterol-HCl (pesar con mascarilla de seguridad ya que este activo puede provocar taquicardias) se depositó éste en un matraz volumétrico de 100 mL, se adicionó 50 mL de agua destilada, disolver y aforar.
 - Pesar 150 mg de Ambroxol-HCl, depositarlo en un matraz volumétrico de 100 mL y adicionar 50 mL de agua destilada y disolver. De la solución de Clenbuterol preparada anteriormente tomar una alícuota de 1 mL y adicionarla al matraz, se aforó con agua destilada. (concentración teórica de Ambroxol Clorhidrato 1500 µg/L, Clenbuterol Clorhidrato 1 µg/mL).



- Preparación de la muestra

Para Mucovibrol C Solución gotas:

Se tomó una alícuota de 2 mL, se depositó en un matraz volumétrico de 10 mL, adicionar agua destilada y homogeneizar. Se filtró a través de filtro Millar de 0.45 micras (concentración teórica de Clenbuterol Clorhidrato 1µg/mL).

Para Mucovibrol C solución:

Se Tomó una alícuota de 5 mL, depositarla en un matraz volumétrico de 10 mL, adicionar agua destilada y homogenizar. Filtrar a través de filtro Miller de 0.45micras (concentración teórica de Clenbuterol clorhidrato 0.5 µg/mL).

e. Condiciones de trabajo

Método: Clenbuterol Clorhidrato

El método se divide en 3 etapas (secuencia automatizada):

- 1) Lavado
- 2) Inyección
- 3) Separación.

"Implementación de la Técnica de Cuantificación de Clenbuterol Clorhidrato Por Electroforesis Capilar Para el Producto Mucovibrol C".



Secuencia automatizada.

EVENTOS	VALOR	DURACION	VIAL DE ENTRADA	VIAL DE SALIDA	RESUMEN	COMENTARIOS
Lavado-Presión	20.0 pis	2 min.	B1-F2	BO-A1	FORWARD (adelante)	Solución regeneradora
Lavado-Presión	20.0 pis	2 min.	B1-F3	BO-A1	FORWARD (adelante)	Agua
Lavado-Presión	20.0 pis	3 min.	B1-E1	BO-A1	FORWARD (adelante)	Amortiguador
Inyección- Presión	1.0 pis	5 seg.	S1-F1	BO-A1	OVERRIDE (sobre la corrida)	Muestra
Pausa	-----	0.1 min.	B1-F1	BO-A3		
Separación- Voltaje	12.0 KV	8.5 min.	B1-E2	B0-B6	0.17min. rampa polaridad normal	
Autocero		0.5 min.				
Fin		8.5 min.				

Capilar: Negativo; longitud total 60 cm con longitud efectiva 57 cm y diámetro interno 75µm

Longitud de onda: 214 nm.

Temperatura del capilar y temperatura de las muestras: 25° C

En la etapa del lavado, es necesario incluir una solución regeneradora, con la cual se restauran los enlaces silanol del capilar, después de haber sido regenerado, se realizó un enjuague con agua y posteriormente se introdujo el capilar dentro del amortiguador donde se llevó a cabo la separación.

Es indispensable no modificar la secuencia de lavado para cada inyección pues de esta depende la adecuabilidad del sistema.

Al final de cada análisis debe asegurarse que el capilar quede sumergido en agua (para humectarlo y evitar la sequedad del mismo). La etapa de inyección, se realizó por presión como ya se indicó en la tabla anterior, es importante incluir una pausa, la cual favorece la migración de la muestra.

La separación se realizó introduciendo ambos extremos del capilar en el amortiguador y debe utilizarse un vial diferente, al vial con que se realizaron los lavados. En esta etapa el voltaje se aplicó gradualmente (rampa) para evitar un daño en el capilar.



15.3 Procedimiento

Colocar los viales en sus respectivas charolas, las muestras se colocaron en la parte de trasera y estas deben programarse en la secuencia de acuerdo al número y letra que les correspondió. El agua, la solución regeneradora, el amortiguador, y el vial de desecho, en la parte delantera de acuerdo al número y letra que le correspondan. El vial de desecho se colocó vacío en F1 en la charola de salida.

Se deben colocar 3 viales con solución de amortiguadora, dos a la entrada y uno a la salida para evitar contaminación.

Se corrió el método de Clenbuterol para obtener los electroferogramas, tanto del estándar como de la muestra. Para el estándar se realizaron 3 replicas y para las muestras 2, el número de muestras dependerá de el criterio del analista, pero como mínimo se realizaron 3 muestras con dos repeticiones cada una. El método de lavado se incluyó en la secuencia, al final del análisis.

15.4 Cálculos

Calcular la cantidad de Clenbuterol en Mucovibrol C solución y Mucovibrol C gotas con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Clenbuterol Clorhidrato} = \frac{F2}{F1} \times \frac{C1}{C2} \times \text{PUREZA}$$

Donde:

F1= ABC del pico correspondiente a Clenbuterol Clorhidrato en la solución de referencia.

F2= ABC del pico correspondiente a Clenbuterol Clorhidrato en la solución de la muestra.

C1= Concentración ($\mu\text{g/mL}$) de Clenbuterol Clorhidrato en la solución de STD.

C2= Concentración ($\mu\text{g/mL}$) de Clenbuterol Clorhidrato en la solución de muestra.

Pureza = Porcentaje de pureza de la sustancia de referencia de Clenbuterol Clorhidrato.



Protocolo de Validación

Mucovibrol C Solución
Clave Interna del producto:

Fórmula

Cada frasco contiene

Ambroxol Clorhidrato.....	7.5 mg/5 mL
Clenbuterol Clorhidrato.....	0.005 mg/5 mL
Vehículo cbp.....	5 mL

Mucovibrol C solución gotas
Clave interna del producto:

Cada frasco contiene

Fórmula:

Ambroxol Clorhidrato.....	7.5 mg/5 mL
Clenbuterol Clorhidrato.....	0.005 mg/5 mL
Vehículo cbp.....	1 mL



MATERIAL Y EQUIPO.

- Instrumentos mayores: Equipo de electroforesis capilar Beckman-Coulter MDQ P/ACE.
- Balanza analítica.
- Baño de ultrasonido.
- Instrumentos menores:
 - ✓ Matraces volumétricos de 100 mL y 10 mL.
 - ✓ Pipetas volumétricas de 1 mL, 2 mL y 5 mL.
 - ✓ Jeringa de 5 mL.
 - ✓ Filtro millex-IV 0.45 μm .
 - ✓ Frascos viales de 2 mL.

DESARROLLO DE ACTIVIDADES.

A. Metodología analítica.

I. Reactivos.

- Clenbuterol Clorhidrato sustancia de referencia.
- Fosfato dibásico de Sodio.
- Fosfato monobásico de Potasio.
- Agua destilada.

II. Preparación de soluciones.

- Solución amortiguadora de Fosfatos pH 8.3 50 mM: Solución de fosfato dibásico de sodio 50 mM pesar 3.54 g de fosfato dibásico de sodio y aforar a 500 mL con agua destilada. Solución de fosfato monobásico de potasio 50 mM pesar 3.40 g de fosfato monobásico de potasio y se afora a 500 mL con agua destilada.
- Mezcla de disolventes: Se mezclan ambas soluciones hasta obtener el pH 8.3, al momento de ocuparla se filtra con el filtro miller de 0.45 micras.



- Solución regeneradora de la superficie del capilar: Se prepara una solución al 1% P/V de hidróxido de sodio, pesando 1 gramo de hidróxido de sodio, y se transfirieron un matraz volumétrico de 100 mL, disolviendo previamente con 50 mL de agua destilada y se aforó posteriormente a 100 mL con agua destilada.

III. Soluciones de referencia.

- Preparación de la solución de referencia: Pesar exactamente 10 mg de estándar de Clenbuterol Clorhidrato (utilizar mascarilla de seguridad) depositarlo en un matraz volumétrico de 100 mL adicionar 50 mL de agua, disolver sonicando por 5 minutos y aforar a 100 mL con agua destilada. Pesar 15 mg de estándar de Ambroxol Clorhidrato, depositarlo en un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 50 mL de agua y disolver por sonicación durante 10 minutos, agregar 1 mL de la solución de Clenbuterol y aforar con agua destilada. (Concentración teórica de Ambroxol clorhidrato 150 $\mu\text{g/mL}$ y para Clenbuterol-HCl 1 $\mu\text{g/mL}$).

IV. Preparación de la muestra

- Para Mucovibrol C solución gotas: Tomar una alícuota de 2 mL se depositó en un matraz volumétrico de 10 mL, adicionar agua destilada y homogeneizar. Filtrar a través de filtro millex 0.45 μm (concentración teórica de Clenbuterol Clorhidrato 1 $\mu\text{g/mL}$).
- Para Mucovibrol C solución: Tomar una alícuota de 5 mL depositarla en un matraz volumétrico de 10 mL, adicionar agua destilada y homogenizar. Filtrar a través de filtro miller 0.45 micras (concentración teórica de Clenbuterol Clorhidrato 0.5 $\mu\text{g/mL}$).

V. Sistema electroferográfico.

Condiciones de trabajo

- Capilar Negativo; longitud total 60 cm. y longitud efectiva 57 cm. diámetro interno, 75 μm
- Longitud de onda: 214 nm.
- Temperatura del capilar y temperatura de las muestras: 25° C.

"Implementación de la Técnica de Cuantificación de Clenbuterol Clorhidrato Por Electroforesis Capilar Para el Producto Mucovibrol C".



EVENTOS	VALOR	DURACION	VIAL DE ENTRADA	VIAL DE SALIDA	RESUMEN	COMENTARIOS
Lavado-Presión	20.0 pis	2 min.	B1-F2	BO-A1	FORWARD (adelante)	Solución regeneradora
Lavado-Presión	20.0 pis	2 min.	B1-F2	BO-A1	FORWARD (adelante)	Agua
Lavado-Presión	20.0 pis	3 min.	B1-E1	BO-A1	FORWARD (adelante)	Amortiguador
Inyección- Presión	1.0 pis	5 seg.	S1-F1	BO-A1	VERRIDE (sobre la corrida)	Muestra
Pausa	-----	0.1 min.	B1-F1	BO-A3		
Separación-Voltaje	12.0 kV	8.5 min.	B1-E2	B0-B6	0.17min. rampa polaridad normal	
Autocero		0.5 min.				
Fin		8.5 min.				

En la etapa del lavado, se incluyó una solución regeneradora, con la cual se restauró los enlaces del grupo silanol del capilar, después de un enjuague con agua y posteriormente la solución donde se llevó a cabo la separación. Es indispensable no modificar la secuencia de lavado para cada inyección diferente pues de esta dependerá la reproducibilidad del sistema. La etapa de inyección, se realizó por presión como ya se indicó en la tabla anterior, incluye una pausa, la cual favorece la migración de la muestra. La separación se realizó introduciendo ambos extremos del capilar en el amortiguador y debe ser un vial diferente. al vial con que se realizaron los lavados. En esta etapa el voltaje se aplicó gradualmente (rampa) para evitar daño en el capilar. Al final de cada análisis se debe asegurar que el capilar quede sumergido en agua.

Método de lavado, éste se aplicó al final de la secuencia de análisis

Evento	Valor	Duración	Vial de entrada	Vial de salida	Resumen	comentarios
Lavado- Presión	20 psi	2 min.	B1-F1	B0-A1	FORWARS (adelante)	Agua



VI. Procedimiento.

Colocar los viales en sus respectivas charolas, las muestras se programaron en la secuencia de acuerdo al número y letra que les corresponde. El agua, la solución regeneradora, el amortiguador y el vial de desecho, se colocan en la parte anterior de acuerdo al número y letra que le correspondan. El vial de desecho se colocó al vacío en F1 en la charola de salida. Correr la secuencia y obtener los electroferogramas, tanto del estándar como de la muestra. El método de lavado se debe incluir en la secuencia al final del análisis.

VII. Cálculos.

Calcular la cantidad de Clenbuterol Clorhidrato con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Clenbuterol Clorhidrato} = \frac{F2}{F1} \times \frac{C1}{C2} \times \text{PUREZA}$$

Donde:

F1= ABC del pico correspondiente a Clenbuterol Clorhidrato en la solución de referencia.

F2= ABC del pico correspondiente a Clenbuterol Clorhidrato en la solución de la muestra

C1 = Concentración $\mu\text{g/mL}$ de Clenbuterol Clorhidrato en la solución de referencia.

C2= Concentración $\mu\text{g/mL}$ de Clenbuterol Clorhidrato en la solución de muestra.

P (pureza) = Porcentaje de pureza de la sustancia de referencia de Clenbuterol-HCl.

B. Proceso de Validación (Altria et al., 1993)²:

a) Adecuabilidad del sistema

- Proceder como se indicó en el punto A Metodología analítica y se realizaron tres inyecciones de estándar de Clorhidrato de Clenbuterol y revisar los siguientes parámetros: tiempo de migración, asimetría, platos teóricos, voltaje, área y coeficiente de variación.



b) Especificidad.

- Preparar los placebos de Mucovibrol C solución y Mucovibrol C solución gotas (Un placebo es aquel que contiene todas las materias primas de la formulación, pero no contiene principio activo), de la siguiente manera:

Tabla 11. Preparación de placebos

Producto	Excipientes	Ambroxol HCl	Clenbuterol HCl
Placebo de Mucovibrol C Gotas con Ambroxol	Si	Si	No
Placebo de Mucovibrol C Gotas con Ambroxol	Si	No	No
Placebo de Mucovibrol C Solución con Ambroxol	Si	Si	No
Placebo de Mucovibrol C Solución con Ambroxol	Si	No	No

Preparación de estándares y muestras

- Preparar un estándar de Ambroxol Clorhidrato pesando 150 mg y colocarlos en un matraz de 100 mL, adicionar 50 mL de agua sonicar por 5 minutos y aforar con agua destilada. (Concentración teórica de Ambroxol Clorhidrato 1500 µg/mL).
- Preparar un estándar de Clenbuterol Clorhidrato pesando 10 mg de estándar de Clenbuterol Clorhidrato (utilizar mascarilla de seguridad) depositarlo en un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 50 mL de agua, disolver sonicando por 5 minutos y aforar con agua destilada. Tomar 1 mL y se adicionó a un matraz de 100 mL, aforar con agua destilada y homogenizar (Concentración teórica de Clenbuterol-HCl: 1 µg/mL).
- Preparar el estándar como se indica en el punto A “Metodología Analítica”.
- Preparar una muestra de Mucovibrol C solución como se indicó en el punto A “Metodología Analítica”.



- Preparar una muestra de Mucovibrol C solución gotas como se indicó en el punto A “Metodología Analítica”.
- Tomar 2 mL del placebo de Mucovibrol C solución gotas y proseguir como se indicó en el punto A (Metodología Analítica).
- Tomar 2 mL del placebo de Mucovibrol C solución gotas con Ambroxol y proseguir como se indicó en el punto A (Metodología Analítica).
- Tomar 5 mL del placebo de Mucovibrol C solución y proseguir como se indicó en el punto A (Metodología Analítica).
- Tomar 5 mL del placebo de Mucovibrol C solución con Ambroxol y proseguir como se indicó en el punto A (Metodología Analítica). Amortiguador de Fosfatos 50 mM pH 8.3.

Una vez verificado el cumplimiento de los parámetros de adecuabilidad del sistema, se realizaron tres inyecciones de cada muestra.

c) Linearidad del sistema

- Realizar la preparación por triplicado de una solución stock de la siguiente manera, se pesaron 10 mg de estándar de Clenbuterol Clorhidrato y se colocaron en un matraz volumétrico de 200 mL, agregar 100 mL de agua destilada y sonicar por 5 minutos. Aforar con agua destilada. Realizar la preparación de una solución stock de estándar Ambroxol HCl, pesar 150 mg de Ambroxol HCl, colocarlos en un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 50 mL de agua destilada y sonicar por 5 minutos, aforar con agua destilada. Tomar de las soluciones stock, la alícuota indicada en la tabla 12 y se colocó en un matraz volumétrico de 100 mL el cual aforó con agua destilada. Previamente verificados los parámetros de adecuabilidad del sistema, realizar dos inyecciones de cada nivel de concentración.



Tabla 12. Linearidad del sistema.

Nivel de concentración (%)	Volumen de la solución Stock de Std Clenbuterol (mL)	Volumen de la solución Stock de Std Ambroxol (mL)	Concentración final de Clenbuterol (µg/mL)	Concentración final de Ambroxol (µg/mL)
50	1	10	0.5	1500
100	2	10	1.0	1500
150	3	10	1.5	1500

d) Precisión del sistema.

- Se preparó la solución de referencia de Clenbuterol Clorhidrato como se indica en la metodología analítica.
- Se elaboró una solución de Clenbuterol HCl, pesando 10 mg de estándar y adicionarlos a un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 50 mL de agua destilada y sonicar por 5 minutos, aforar con agua destilada. Se tomó una alícuota de 5 mL y colocarla en un matraz de 100 mL y aforar con agua destilada (esta solución contiene 5 mg/mL de Clenbuterol-HCl). Se prepararon seis muestras al 100 % de la siguiente manera (tabla 13):

Tabla 13. Precisión del sistema

Placebo	mL de placebo	Solución de Clenbuterol	Agua destilada
Placebo de Mucovibrol c gotas con Ambroxol	2 mL	2 mL	6 mL
Placebo de Mucovibrol C solución con Ambroxol	5 mL	2 mL	3 mL

Una vez verificado el cumplimiento de los parámetros de adecuabilidad, se inyectaron las muestras en el equipo de electroforesis capilar.



c) Exactitud del método.

- Preparar la solución de referencia de Clenbuterol Clorhidrato como se indicó en la metodología analítica.
- Preparar una solución de Clenbuterol-HCl, pesando 10 mg de materia prima y adicionarlos a un matraz volumétrico de 100 mL agregar 50 mL de agua destilada y sonicar por 5 minutos, aforar con agua destilada. Se tomó una alícuota de 5 mL y colocarla en un matraz de 100 mL y aforar con agua destilada (esta solución contiene 5 mg/mL de Clenbuterol-HCl).
- Se preparó de manera independiente tres muestras de placebo cargado al 50%, 100% y 150% Las cantidades del stock de Clenbuterol-HCl y placebo adicionado son las indicadas en la tabla 14, 15 y 16, y se colocaron en matraces de 10 mL, aforar con agua destilada a 10 mL.

Tabla 14. Nivel de concentración de 50% (Concentración final de Clenbuterol HCl 0.5 µg/mL).

Placebo	mL de placebo	Solución de Clenbuterol	Agua destilada
Placebo de Mucovibrol C gotas con Ambroxol	2 mL	1 mL	7 mL
Placebo de Mucovibrol C Solución con Ambroxol	5 mL	1 mL	4 mL

Tabla 15. Nivel de concentración del 100 % (Concentración final de Clenbuterol HCl 1.0 µg/mL).

Placebo	mL de placebo	Solución de Clenbuterol	Agua destilada
Placebo de Mucovibrol C gotas con Ambroxol	2 mL	2 mL	6 mL
Placebo de Mucovibrol C Solución con Ambroxol	5 mL	2 mL	3 mL



Tabla 16. Nivel de concentración del 150 % (Concentración final de Clenbuterol HCl 1.5 µg/mL).

Placebo	mL de placebo	Solución de Clenbuterol	Agua destilada
Placebo de Mucovibrol C gotas con Ambroxol	2 mL	3 mL	5 mL
Placebo de Mucovibrol C Solución con Ambroxol	5 mL	3 mL	2 mL

Una vez verificado el cumplimiento de los parámetros de adecuabilidad, se inyectaron las muestras en el equipo de electroforesis capilar.

f) Linearidad del método.

Emplear los resultados obtenidos de las muestras inyectadas de exactitud del método.

g) Precisión del método (repetibilidad)

Se preparó la solución de referencia de Clenbuterol Clorhidrato como se indicó en la metodología analítica.

Se analizaron seis muestras independientes de Mucovibrol C gotas y Mucovibrol C solución producto terminado, preparadas como se indicó en la metodología analítica.

Una vez verificado el cumplimiento de los parámetros de adecuabilidad, se inyectaron las muestras en el equipo de electroforesis capilar.

h) Precisión del método (reproducibilidad)

Dos químicos en dos días diferentes y utilizando el mismo equipo, prepararon tres soluciones de muestra al 100 % de Mucovibrol C solución y Mucovibrol C gotas tal y como se indicó en la metodología analítica y una vez verificado el cumplimiento de los parámetros de adecuabilidad, inyectar las muestras en el equipo de electroforesis capilar tabla 17.



Tabla 17. Reproducibilidad

	Concentración día 1	Concentración día 2
Analista 1	Muestra 1	Muestra 1
	Muestra 2	Muestra 2
	Muestra 3	Muestra 3
Analista 2	Muestra 1	Muestra 1
	Muestra 2	Muestra 2
	Muestra 3	Muestra 3

i) Estabilidad de la muestra.

Se prepararon tres soluciones de muestra al 100 % tal y como se indicó en la metodología analítica, una vez verificado el cumplimiento de los parámetros de adecuabilidad, se inyectaron las muestras en el equipo de electroforesis capilar. Se realizaron tres inyecciones de las muestras a los tiempos 0, 7 y 24 horas. Utilizando estándares preparados recientemente para cada inyección.

J) Robustez

- Se preparó la solución de referencia de Clenbuterol Clorhidrato como se indicó en la metodología analítica.
- Se prepararon tres muestras independientes de placebo cargado al 100 %
- Se realizaron tres inyecciones de cada muestra con las siguientes variantes:
 - ✓ Utilizando como mezcla de separación, solución amortiguadora de fosfatos 20 mM, pH 8.3.
 - ✓ Utilizando como mezcla de separación, solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 6.7.
 - ✓ Utilizando como mezcla de separación, solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 8.3 con un voltaje de 15 kV.



Se realizaron las inyecciones que fueron necesarias de estándar de Clenbuterol, hasta que en el electroferograma se observó la deformación del pico o algún otro evento que impida la separación o lectura correcta del pico de interés.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.

a) Adecuabilidad del sistema.

Al ser un método nuevo no se cuenta con parámetros predefinidos de adecuabilidad del sistema, por lo cual con este estudio se definieron, aunque se deberá cumplir un coeficiente de variación no mayor a 2.

b) Especificidad

No debe existir interferencia de ninguno de los excipientes o disolventes. El tiempo de migración debe ser similar al del estándar.

c) Linealidad del sistema

Se debe obtener un coeficiente de correlación mayor o igual a 0.98 y una ordenada de origen de ≈ 0 . Coeficiente de variación menor a 2.0 %.

d) Precisión del sistema

Porcentaje de recobro al 100 % $\pm 2.0\%$. Coeficiente de variación menor a 2.0 %

e) Exactitud del método.

Se debe obtener un coeficiente de correlación mayor o igual a 0.98 y una ordenada de origen de ≈ 0 . Coeficiente de variación menor a 2.0 %

f) Linealidad del método

Se debe obtener un coeficiente de correlación mayor o igual a 0.98 y una ordenada de origen de ≈ 0 . Coeficiente de variación menor a 2.0 %.



g) Precisión del sistema (repetibilidad)

Porcentaje de recobro al 100 % \pm 2.0%. Coeficiente de variación menor a 2.0 %.

h) Precisión del método (reproducibilidad)

$F_{cal} < F_{tab}$ con un 95.0 % de confiabilidad, Coeficiente de variación menor al 2.0 %

j) Estabilidad de la muestra

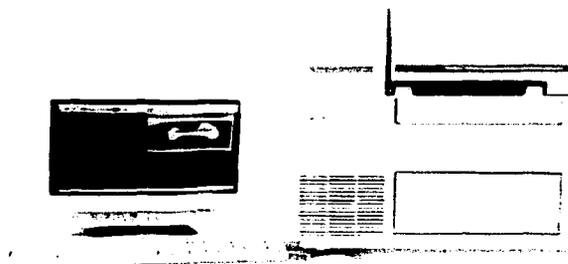
Esta prueba se realiza para saber el tiempo en el cual la muestra tratada para el análisis se encuentra sin degradarse, por lo cual el tiempo depende del resultado obtenido. Deberá ser estable al menos el tiempo que tarda el análisis. Coeficiente de variación menor a 2.0 %.

l) Robustez

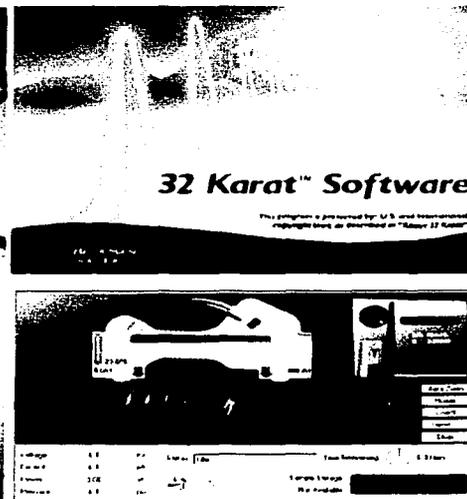
El Pico obtenido debe de ser el mismo que el estándar, no debe de estar partido, colead o pegado a algún otro. Coeficiente de Variación menor o igual a 2.0 %. El número máximo de inyecciones por vial de amortiguador dependerá de la naturaleza de este, por lo que este dato se obtuvo del resultado de la validación.



15.5 Sistema de electroforesis capilar MDQ P/ACE de Beckmann Coulter con estación de trabajo 32 KARAT software (figura 26):

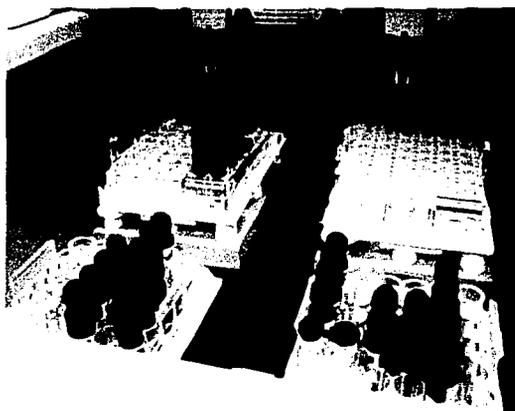


Parte Interna del equipo

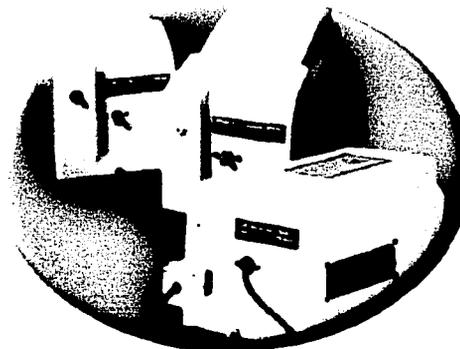


Presentación de la estación de trabajo

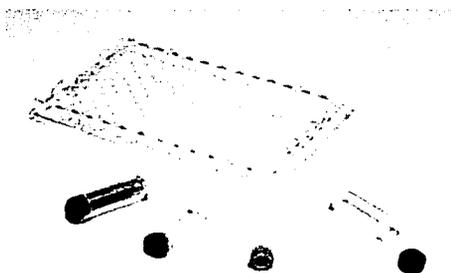
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



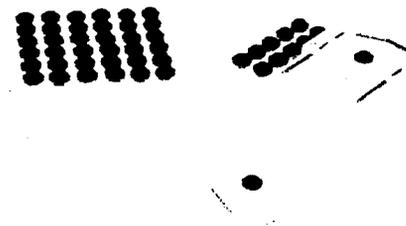
Parte frontal del Equipo de EC



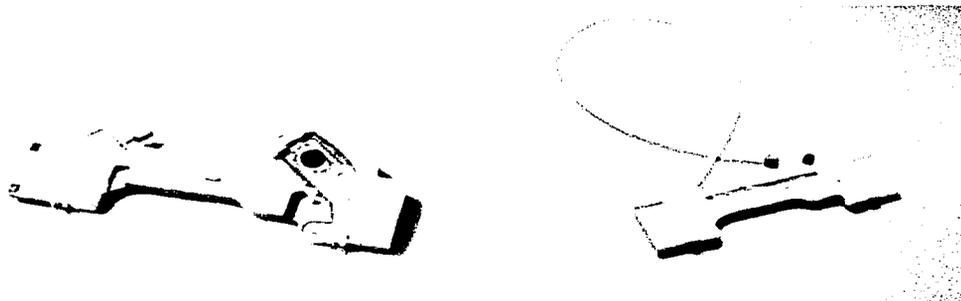
Detectores de UV y Arreglo de Diodos



Charola del sistema de viales para contención de muestras y buffers.



"Implementación de la Técnica de Cuantificación de Clonbuterol Clorhidrato Por Electroforesis Capilar Para el Producto Mucovibrol C".



Cartucho porta Capilar para el equipo de EC

File Edit View Method Data Sequence Analysis Control Reports Window Help

UV 214nm

Run #	Sample Inject Inlet	Sample Inject Outlet	Sample Inject Duration	Other Inject Inlet	Other Inject Outlet
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					

A8	B8	C8	D8	E8	F8
A7	B7	C7	D7	E7	F7
A6	B6	C6	D6	E6	F6
A5	B5	C5	D5	E5	F5
A4	B4	C4	D4	E4	F4
A3	B3	C3	D3	E3	F3
A2	B2	C2	D2	E2	F2
A1	B1	C1	D1	E1	F1

OK

Cancel

Print

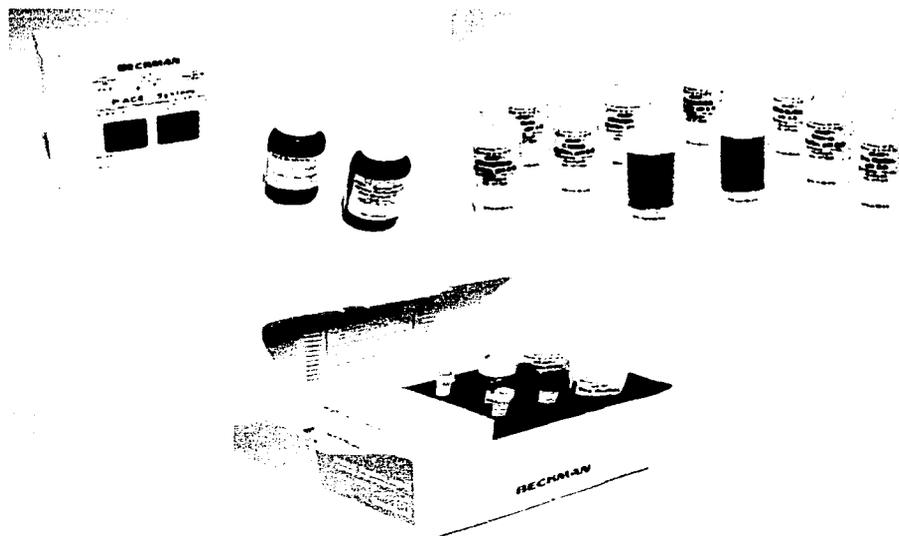
Help

Vial Legend

- Selection
- Separation
- Rinse
- Sample inject
- Other inject
- Fraction collect
- Multiple

Tablero de control de muestras de EC

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Kit de buffers comerciales para el desarrollo de métodos analíticos por EC.

15.6 Análisis estadístico.

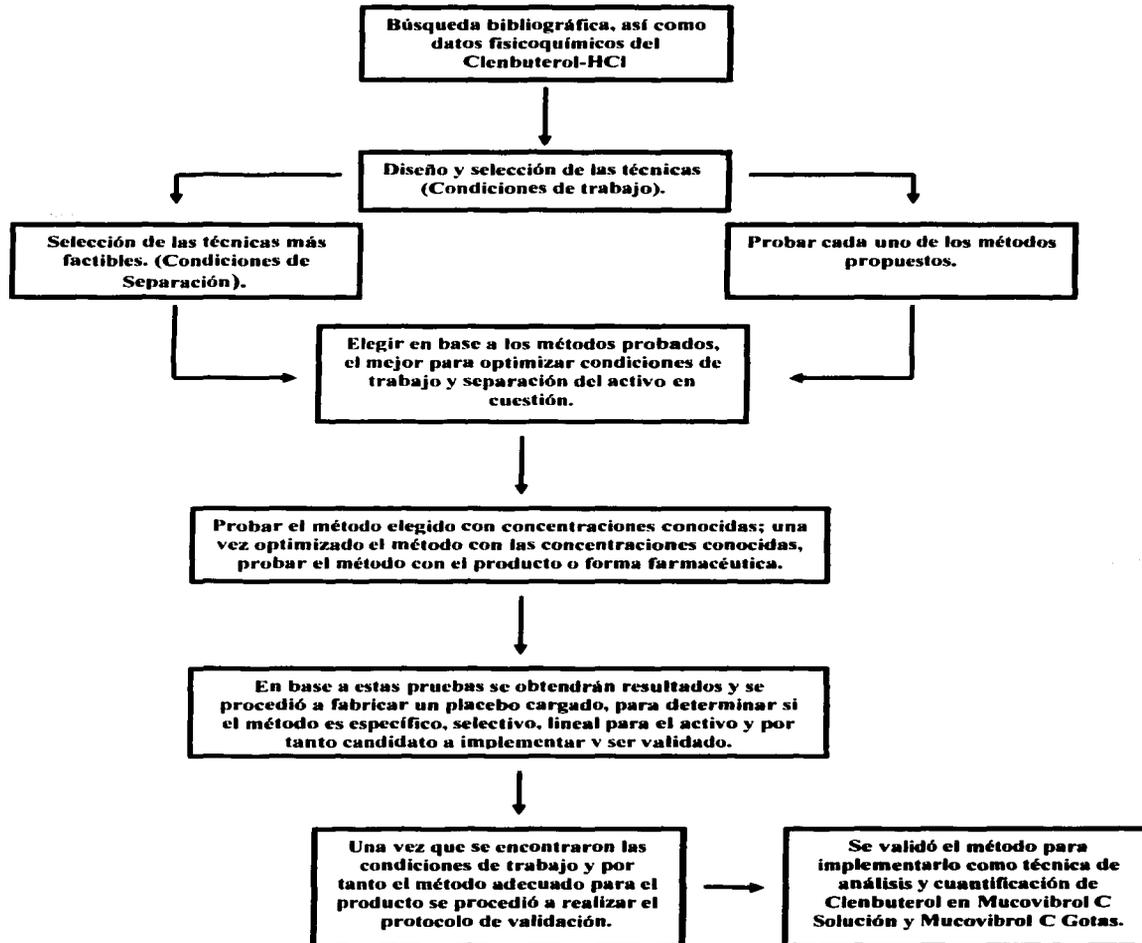
El análisis estadístico de esta técnica contemplará la validación de la misma en la cual se realizarán los siguientes puntos:

- A) Linealidad del sistema
- B) Precisión
- C) Exactitud
- D) Reproducibilidad
- E) Selectividad
- F) Robustez
- G) Adecuabilidad

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



15.7 Diagrama de Flujo.



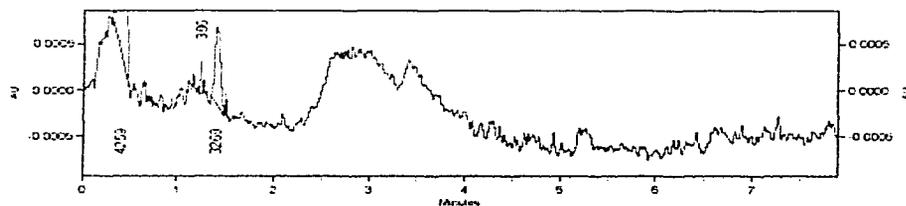


XVI. RESULTADOS

Electroferogramas que se obtuvieron de las condiciones de trabajo propuestas.

➤ Electroferograma 1

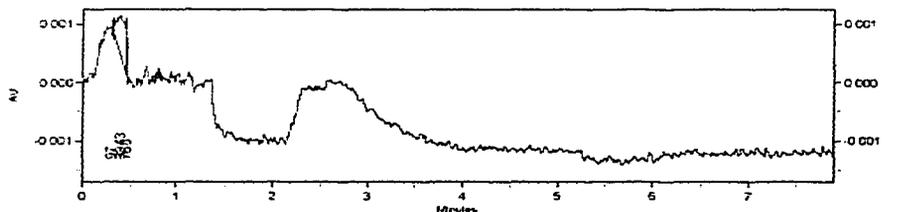
Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 30 mM, pH 7.5, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



UV - 214nm

➤ Electroferograma 2

Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 30 mM, pH 7.8, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



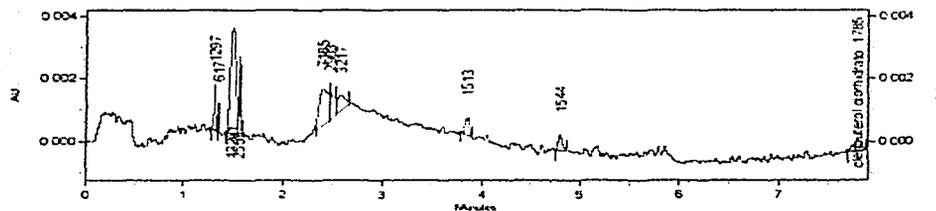
UV - 214nm

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACION



➤ Electroferograma 3

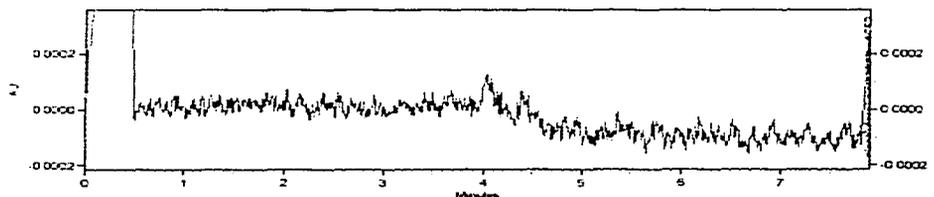
Condiciones de trabajo: Amortiguador (H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}) 30 mM, pH 8.0, concentración 1 $\mu\text{g/mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



UV - 214nm

➤ Electroferograma 4

Condiciones de trabajo: Amortiguador (H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}) 30 mM, pH 8.3, concentración 1 $\mu\text{g/mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



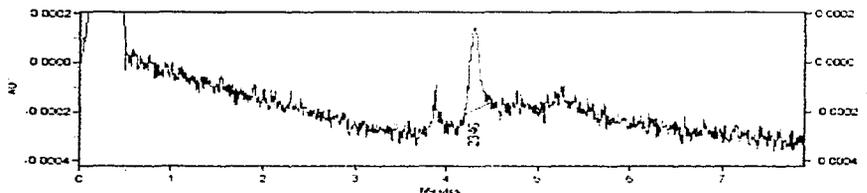
UV - 214nm

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



➤ **Electroferograma 5**

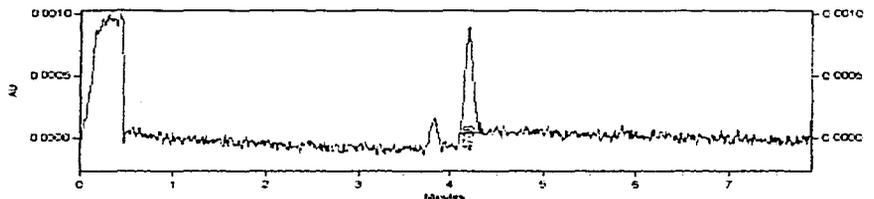
Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 30 mM, pH 8.5, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



UV - 214nm

➤ **Electroferograma 6**

Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 30 mM, pH 8.7, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



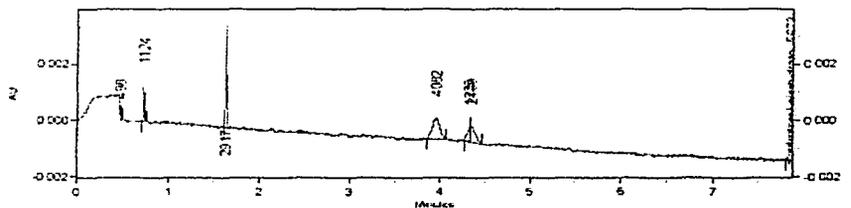
UV - 214nm

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



➤ Electroferograma 7

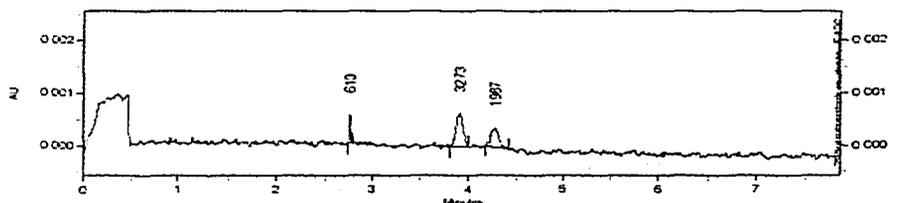
Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 30 mM, pH 9.0, concentración 1 $\mu\text{g/mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



UV - 214nm

➤ Electroferograma 8

Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 30 mM, pH 9.3, concentración 1 $\mu\text{g/mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



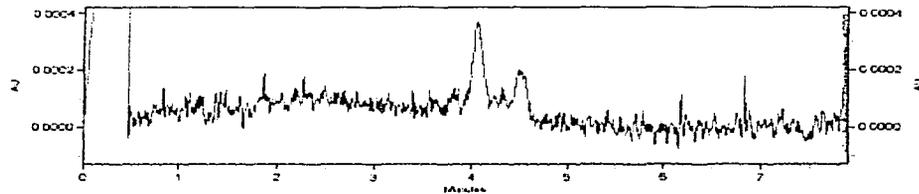
UV - 214nm

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



➤ **Electroferograma 9**

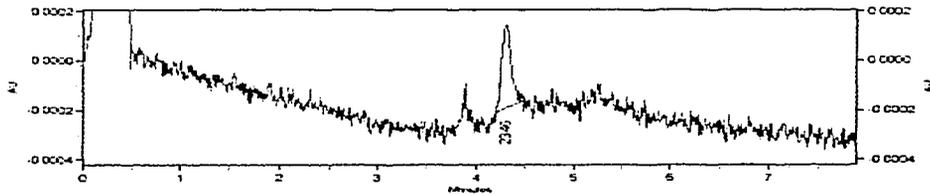
Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 30 mM, pH 9.5, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



UV - 214nm

➤ **Electroferograma 10**

Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 30 mM, pH 9.7, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.

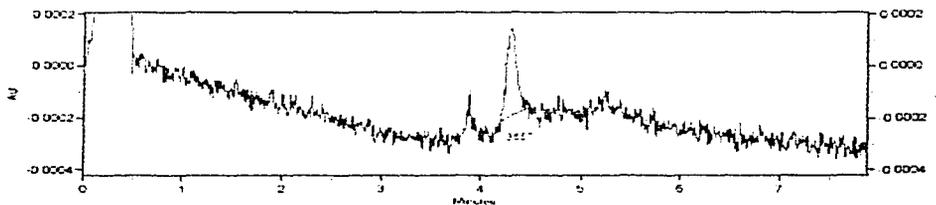


UV - 214nm



➤ Electroferograma 11

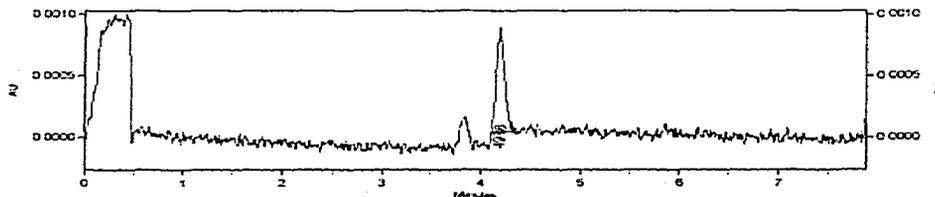
Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 40 mM, pH 7.5, concentración 1 $\mu\text{g/mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



UV - 214nm

➤ Electroferograma 12

Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 40 mM, pH 7.8, concentración 1 $\mu\text{g/mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.

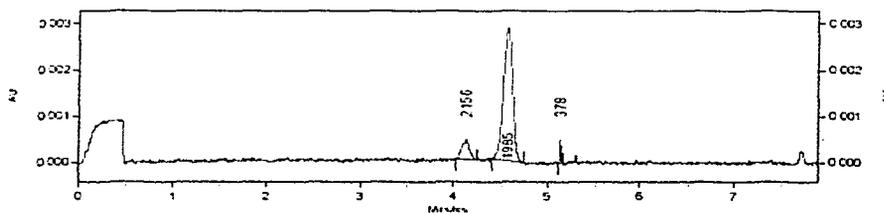


UV - 214nm



➤ Electroferograma 13

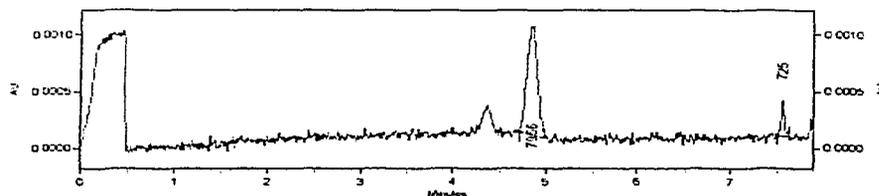
Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 40 mM, pH 8.0, concentración 1 $\mu\text{g/mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



UV - 214nm

➤ Electroferograma 14

Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 40 mM, pH 8.3, concentración 1 $\mu\text{g/mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.

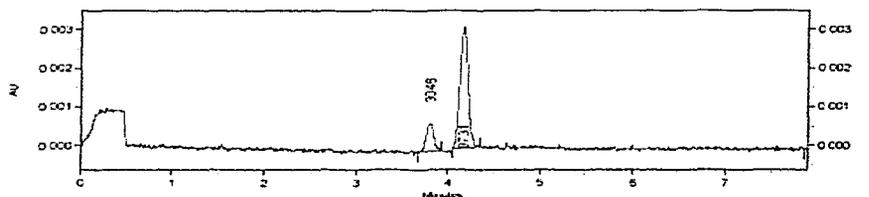


UV - 214nm



➤ **Electroferograma 15**

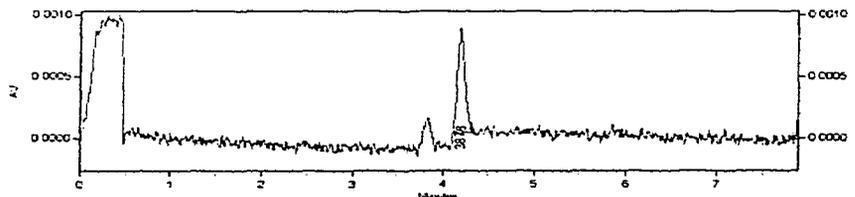
Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 40 mM, pH 8.5, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



UV - 214nm

➤ **Electroferograma 16**

Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 40 mM, pH 8.7, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.

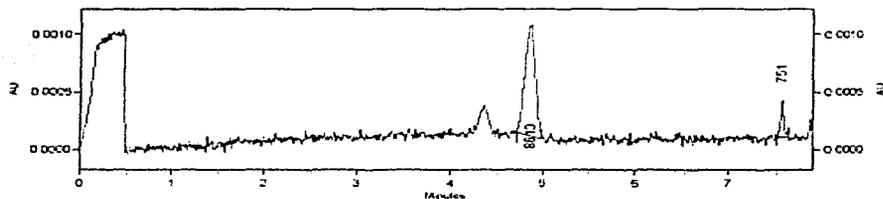


UV - 214nm



➤ **Electroferograma 17**

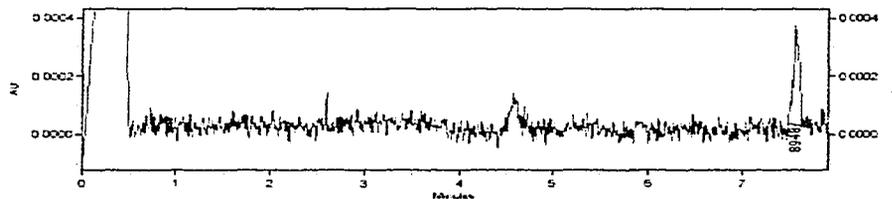
Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 40 mM, pH 9.0, concentración 1 $\mu\text{g/mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



UV - 214nm

➤ **Electroferograma 18**

Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 40 mM, pH 9.3, concentración 1 $\mu\text{g/mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



UV - 214nm



➤ **Electroferograma 19**

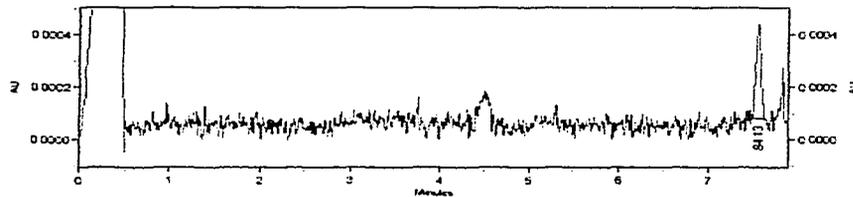
Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 40 mM, pH 9.5, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



UV - 214nm

➤ **Electroferograma 20**

Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 40 mM, pH 9.7, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.

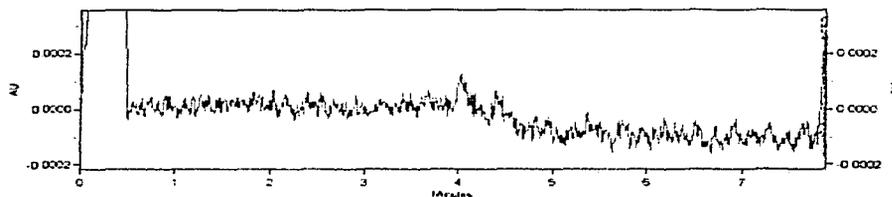


UV - 214nm



➤ **Electroferograma 21**

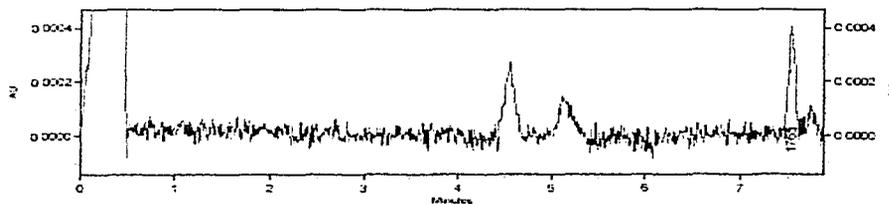
Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 50 mM, pH 7.5, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



UV - 214nm

➤ **Electroferograma 22**

Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 50 mM, pH 7.8, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.

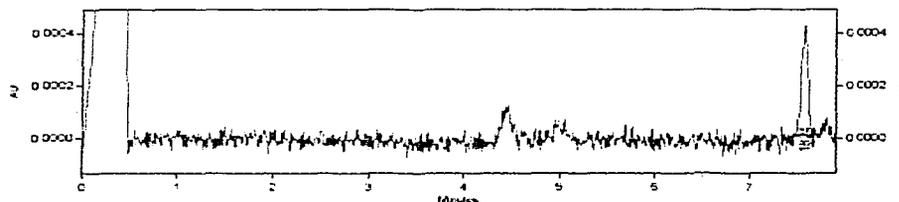


UV - 214nm



➤ Electroferograma 23

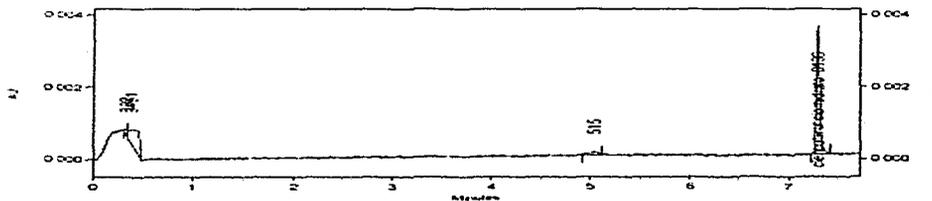
Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 50 mM, pH 8.0, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



UV - 214nm

➤ Electroferograma 24

Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 50 mM, pH 8.3, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.

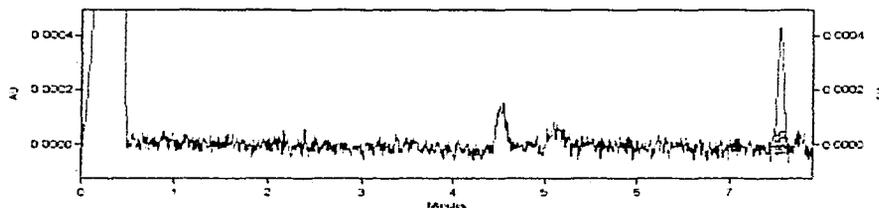


UV- 214 nm



➤ **Electroferograma 25**

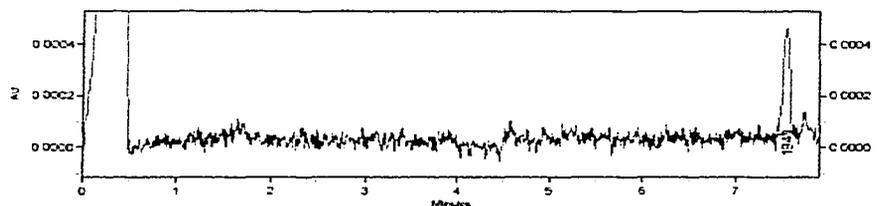
Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 50 mM, pH 8.5, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



UV - 214nm

➤ **Electroferograma 26**

Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 50 mM, pH 8.7, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.

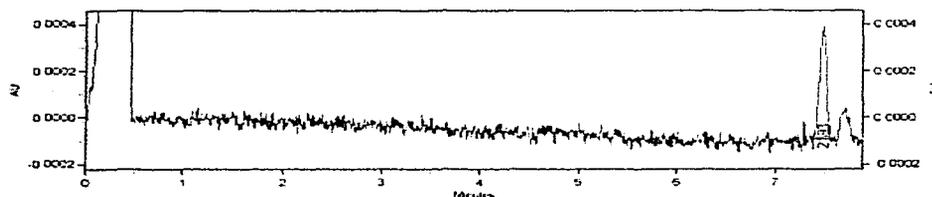


UV - 214nm



➤ **Electroferograma 27**

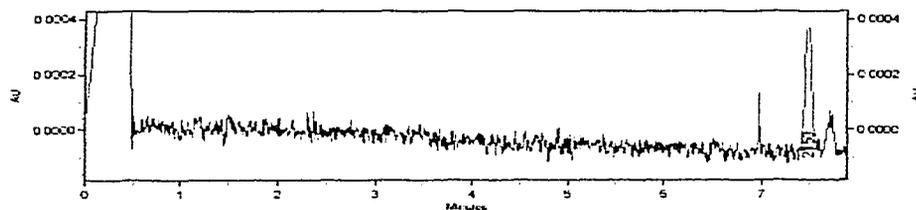
Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 50 mM, pH 9.0, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



UV - 214nm

➤ **Electroferograma 28**

Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 50 mM, pH 9.3, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.

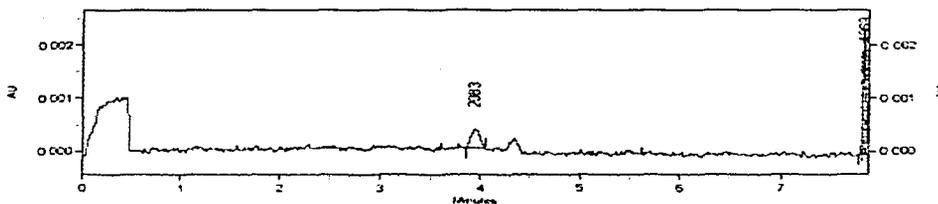


UV - 214nm



➤ **Electroferograma 29**

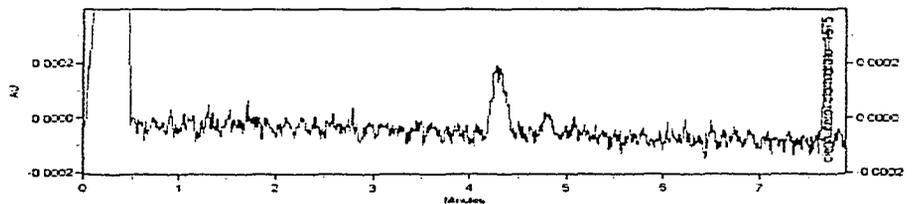
Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 50 mM, pH 9.5, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



UV - 214nm

➤ **Electroferograma 30**

Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 50 mM, pH 9.7, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



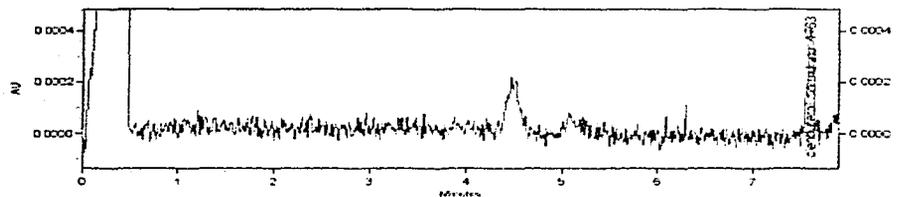
UV - 214nm

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



➤ Electroferograma 31

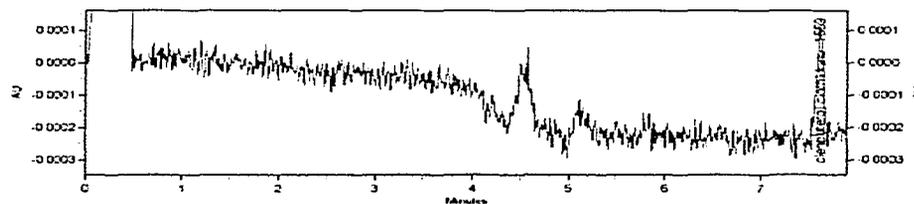
Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 60 mM, pH 7.5, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



UV - 214nm

➤ Electroferograma 32

Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 60 mM, pH 7.8, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



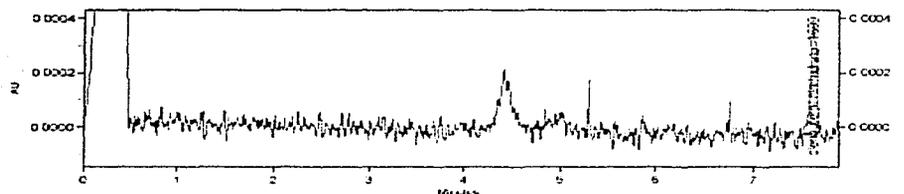
UV - 214nm

TESIS CON
FALLA DE CENCEN



➤ **Electroferograma 33**

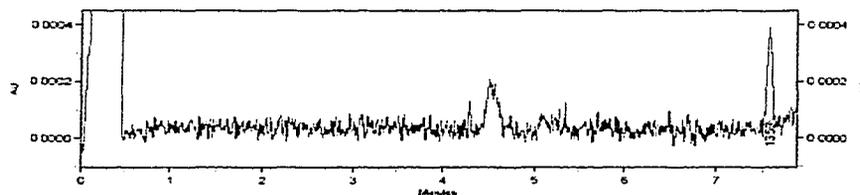
Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 60 mM, pH 8.0, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



UV - 214nm

➤ **Electroferograma 34**

Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 60 mM, pH 8.3, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.

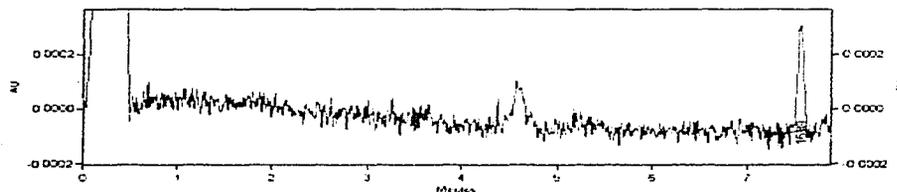


UV - 214nm



➤ **Electroferograma 35**

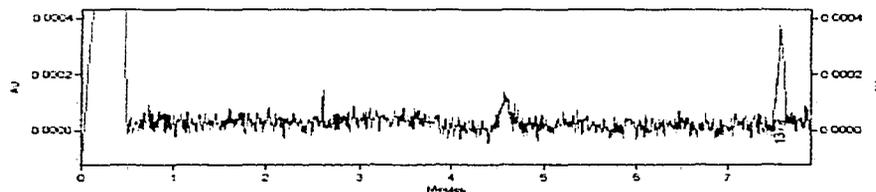
Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 60 mM, pH 8.5, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



UV - 214nm

➤ **Electroferograma 36**

Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 60 mM, pH 8.7, concentración 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.

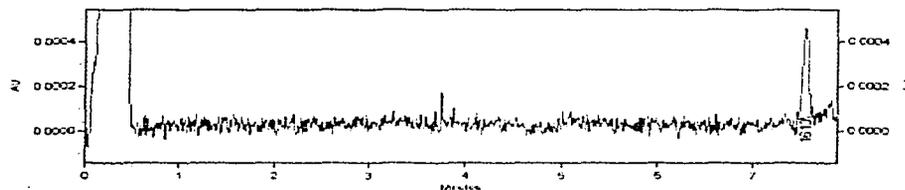


UV - 214nm



➤ **Electroferograma 37**

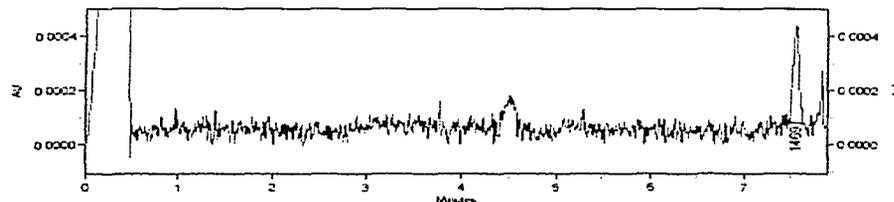
Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 60 mM, pH 9.0, concentración 1 $\mu\text{g/mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



UV - 214nm

➤ **Electroferograma 38**

Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ / HPO_4^{-2}) 60 mM, pH 9.3, concentración 1 $\mu\text{g/mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.

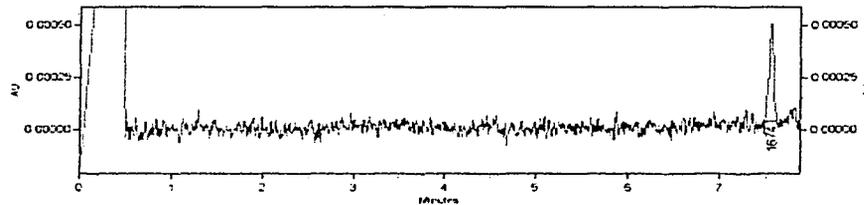


UV - 214nm



➤ **Electroferograma 39**

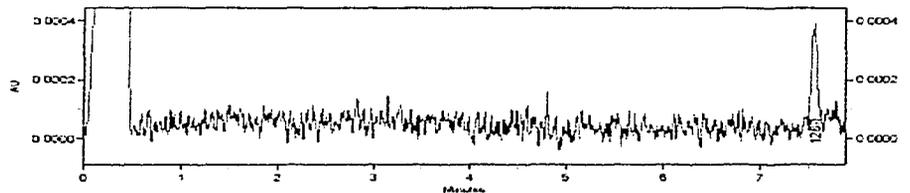
Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$) 60 mM, pH 9.5, concentración 1 $\mu\text{g/mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



UV - 214nm

➤ **Electroferograma 40**

Condiciones de trabajo: Amortiguador ($\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$) 60 mM, pH 9.7, concentración 1 $\mu\text{g/mL}$ de analito, voltaje 1.0 psi a 12 kV, rampa de 0.17, lectura 214 nm, capilar de vidrio con una longitud de 60 cm y 57 cm de longitud efectiva, temperatura 25 °C, inyección electrocinética.



UV - 214nm



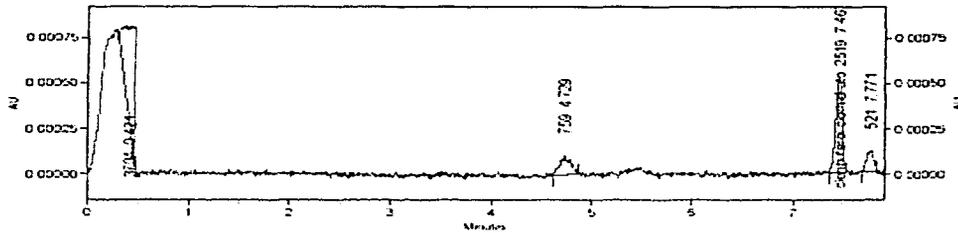
Resultados de la validación de Mucovibrol C

Clenbuterol clorhidrato.

Antes que nada, se debe demostrar la especificidad del método, con el fin de establecer si existen interferencia de excipientes o productos de degradación. En los siguientes electroferogramas se muestra que no existe interferencia de ningún excipiente ni producto de degradación.

Electroferogramas de Mucovibrol C solución:

➤ Electroferograma 41



UV - 214nm Results

Name	Migration Time	Area	Theoretical plates (USP)
clenbuterol clorhidrato	7.467	2519	50306
Totals		2519	

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



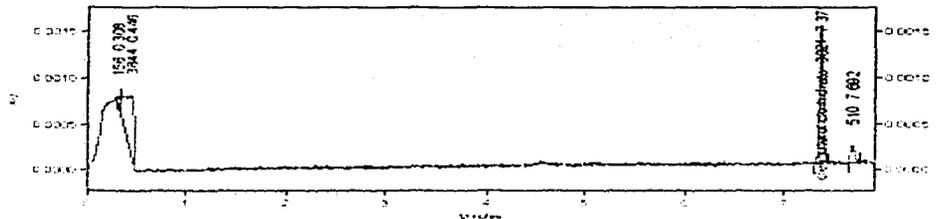
➤ **Electroferograma 42**



UV - 214nm Results				
Name	Migration Time	Area	Theoretical plates (USP)	
clenbuterol clorhidrato	7.467	2516		58913
Totals		2516		

Electroferogramas de Mucovibrol C gotas:

➤ **Electroferograma 43**

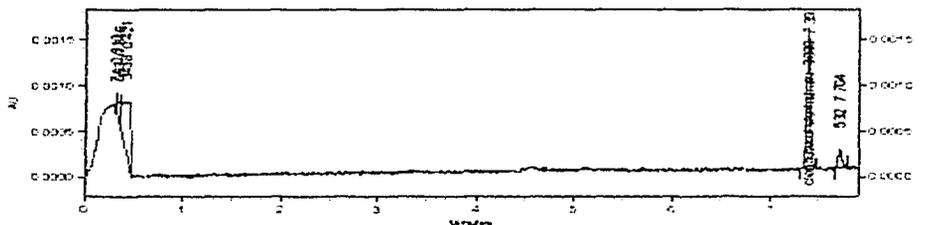


UV - 214nm Results				
Name	Migration Time	Area	Theoretical plates (USP)	
clenbuterol clorhidrato	7.379	3821		198133
Totals		3821		

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



➤ Electroferograma 44



UV - 214nm Results			
Name	Migration Time	Area	Theoretical plates (USP)
clenbuterol clorhidrato	7.392	3830	208371
Totals		3830	

16.1 Linealidad del sistema.

Adecuabilidad del sistema.

En la Tabla 18 y 19 se muestran los resultados obtenidos a partir de tres curvas de calibración y la gráfica correspondiente.

Tabla 18. Curvas de calibración.

Parámetro de adecuabilidad	Especificación	Resultado			% RSD
		1	2	3	
Área bajo la curva	-----	4688	4745	4671	0.824
Eficiencia (tp)	Mayor a 100000	258243	255605	256138	0.543
Asimetría	0.8-1.2	1.17249	1.2397	1.14853	3.982
Voltaje	11500-12500 V	11912.3	11903	11901.5	0.049
Tiempo de migración	-----	7.329	7.325	7.333	0.055

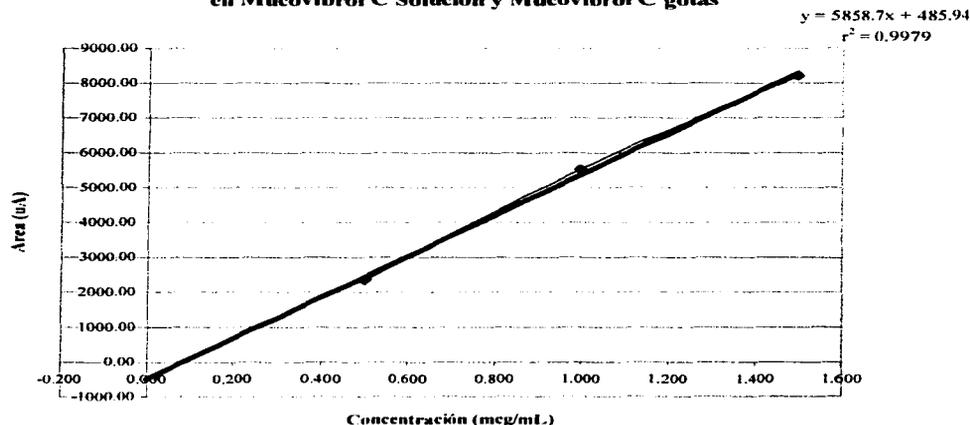
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Tabla 19. Prueba analítica.

Muestra	Nivel 100 %	Peso de Clenbuterol HCl (mg)	Cantidad adicionada de Clenbuterol-HCl	Area bajo la curva Clenbuterol-HCl		
1	50	10.0	0.496	2265.0	2324.0	2294.5
2	50	10.1	0.501	2447.0	2235.0	2341.0
3	50	10.1	0.501	2445.0	2456.0	2450.0
1	100	10.0	0.992	5443.0	5519.0	5481.0
2	100	10.1	1.002	5578.0	5681.0	5629.5
3	100	10.1	1.002	5458.0	5458.0	5458.0
1	150	10.0	1.488	8257.0	8279.0	8268.0
2	150	10.1	1.503	8252.0	8246.0	8249.0
3	150	10.1	1.503	8116.0	8136.0	8126.0

Linealidad del sistema. Validación del método para cuantificar Clenbuterol en Mucovibrol C Solución y Mucovibrol C gotas



La curva promedio obtenida para la cuantificación de Clenbuterol Clorhidrato presente en las muestras de Mucovibrol C solución y Mucovibrol C gotas, presentaron una linealidad satisfactoria en el rango de concentración de 0.5 a 1.5 $\mu\text{g/mL}$ con una pendiente de 5858.7, intercepto de 485.94 y coeficiente de determinación de 0.9979%.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Tabla 20. Análisis de varianza del modelo $y = 5858.7x + 485.94$

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F _{cal}	P(F _{cal})
Regresión	1	5.1366E+07	5.1366E+07	2238.3382	5.5900
Error de regresión	7	1.61E+05	22948.3876		
Falta de ajuste	1	1.19E+0.5	1.1859E+05	16.9236	5.9900
Error puro	6	4.20E+04	7.0076E+03		

CRITERIOS DE ACEPTACION PARA LA LINEALIDAD DEL SISTEMA

1. La relación entre la concentración y la respuesta debe ser altamente significativa

- Si $F_{cal} > = F_{tab}$ Existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida
- Si $F_{cal} < = F_{tab}$ Existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida
- Si $F_{cal} > = F_{tab}$ Existe una falta de ajuste a la relación lineal simple, cantidad adicionada-propiedad medida
- Si $F_{cal} < = F_{tab}$ No existe una falta de ajuste a la relación lineal simple, cantidad adicionada-propiedad medida

Por lo tanto:

- Existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida.
- Existe falta de ajuste a la relación lineal simple, cantidad adicionada-propiedad medida.



2. Criterios de aceptación para la ordenada.

H₀: La ordenada al origen es igual a cero

H_a: La ordenada al origen es diferente de cero

$$(\sum(X_i - \text{Med}x))^2 = 0.502258$$

$$SXY = 1.34E+02$$

$$t_{\text{cal}} = -3.1325$$

Región de aceptación: Si $t(\text{tab}; n-2; 0.975)$

-2.306 -3.13E+00 2.3060

Por lo tanto:

- La ordenada al origen diferente de cero

3. Criterios de aceptación para la correlación

Coefficiente de Determinación (r) mayor o igual a 0.98 %

r² obtenido 0.9969

Por lo tanto:

- Existe correlación

CONCLUSIONES: El sistema de medición es lineal

16.2 Especificidad del sistema.

Tabla 21. Adecuabilidad del sistema:

Parámetro de adecuabilidad	Especificación	Resultados			% RSD
		1	2	3	
Área bajo la curva	-----	3930	3888	3888	0.621
Eficiencia (tp)	Mayor a 100000	282822	276980	276980	1.209
Asimetría	0.8-1.2	1.11038	1.12161	1.12161	0.580
Voltaje	11500-12500 V	11916.3	11915.1	11915.1	0.006
Tiempo de migración	-----	7.454	7.463	7.463	0.070



Tabla 22. Prueba analítica:

Muestra	Peso de Clenbuterol HCl (mg)	Placebo (mL)	Área de pico			Observaciones
Blanco de disolventes (agua diluyente)			0	0	0	No presenta interferencia
Blanco de disolventes (búffer de fosfatos)		5	0	0	0	No presenta interferencia
Placebo Mucovibrol C solución sin Ambroxol		2	0	0	0	No presenta interferencia
Placebo Mucovibrol C gotas sin Ambroxol		5	0	0	0	No presenta interferencia
Placebo Mucovibrol C solución con Ambroxol		2	0	0	0	No presenta interferencia
Placebo Mucovibrol C gotas con Ambroxol		5	0	0	0	No presenta interferencia
Mucovibrol C solución lote: C10075		2	2519	2516	2517.5	El pico corresponde
Mucovibrol C solución gotas lote: C 03064			3821	3830	3825.5	El pico corresponde
Estándar de Ambroxol			0	0	0	No presenta interferencia
Estándar de referencia	10.2				3902	

16.3 Precisión del Sistema:

Mucovibrol C solución:

Tabla 23. Adecuabilidad del sistema.

Parámetro de adecuabilidad	especificación	Resultado			% RSD
		1	2	3	
Área bajo la curva	-----	3930	3888	3888	0.621
Eficiencia (tp)	Mayor a 100000	282822	276980	276980	1.209
Asimetría	0.8-1.2	1.11038	1.12161	1.12161	0.580
Voltaje	11500-12500 V	11916.3	11915.1	11915.1	0.006
Tiempo de migración	-----	7.454	7.463	7.463	0.070

108
12

Tabla 24. Prueba analítica:

Muestra	Nivel 100 %	Peso de Clenbuterol clorhidrato (mg)	Placebo (mL)	Cantidad adicionada de Clenbuterol HCl (µg/mL)	Área bajo la curva Clenbuterol-HCl	
1	100	10.2	5.0	0.51	2469.0	2469.0
2	100	10.2	5.0	0.51	2469.0	2460.0
3	100	10.2	5.0	0.51	2475.0	2492.0
4	100	10.2	5.0	0.51	2473.0	2298.0
5	100	10.2	5.0	0.51	2432.0	2437.0
6	100	10.2	5.0	0.51	2442.0	2406.0
Estándar de referencia		10.2		0.51		

Mucovibrol C solución gotas:

Tabla 25. Adecuabilidad del sistema

Parámetro de adecuabilidad	Especificación	Resultado			% RSD
		1	2	3	
Área bajo la curva	-----	4808	4768	4640	1.852
Eficiencia (tp)	Mayor a 100000	261661	294928	286150	6.137
Asimetría	0.8-1.2	1.18648	1.13879	1.09892	3.841
Voltaje	11500-12500 V	11910.9	11907.5	11906.8	0.018
Tiempo de migración	-----	7.454	7.463	7.463	0.070

Tabla 26. Prueba analítica.

Muestra	Nivel 100 %	Peso de Clenbuterol clorhidrato (mg)	Placebo (mL)	Cantidad adicionada de Clenbuterol-HCl (µg/mL)	Área bajo la curva Clenbuterol-HCl	
1	100	10.2	2.0	1.01	5263.0	5341.0
2	100	10.2	2.0	1.01	5332.0	5164.0
3	100	10.2	2.0	1.01	5089.0	5054.0
4	100	10.2	2.0	1.01	5204.0	5274.0
5	100	10.2	2.0	1.01	5111.0	5112.0
6	100	10.2	2.0	1.01	5205.0	4966.0
Estándar de referencia		10.2		1.01		



16.4 Linealidad del método.

Los resultados obtenidos de las tres curvas para el producto Mucovibrol C solución y Mucovibrol C gotas se muestran en la tabla 27-30.

Mucovibrol C solución:

Tabla 27. Adecuabilidad del sistema.

Parámetro de adecuabilidad	Especificación	Resultado			% RSD
		1	2	3	
Área bajo la curva	-----	4139	4269	4276	1.825
Eficiencia (tp)	Mayor a 100000	282211	271284	266517	2.944
Asimetría	0.8-1.2	1.1591	1.12561	1.08786	3.170
Voltaje	11500-12500 V	11906.8	11908.6	11908	0.008
Tiempo de migración	-----	7.208	7.204	7.200	0.056

Tabla 28. Prueba analítica.

Muestra	Nivel 100 %	Peso de Clenbuterol clorhidrato (mg)	Placebo (mL)	Cantidad adicionada de Clenbuterol-HCl (µg/mL)	Área bajo la curva Clenbuterol-HCl	
1	50	10.3	5.0	0.511	2385.0	2294.0
2	50	10.2	5.0	0.506	2322.0	2101.0
3	50	9.9	5.0	0.491	2349.0	2302.0
1	100	10.3	5.0	1.022	5761.0	5672.0
2	100	10.2	5.0	1.012	5694.0	5474.0
3	100	9.9	5.0	0.982	5398.0	5517.0
1	150	10.3	5.0	1.533	8210.0	7628.0
2	150	10.2	5.0	1.518	8020.0	7965.0
3	150	9.9	5.0	1.474	8344.0	8138.0



Mucovibrol C solución Gotas:

Tabla 29. Adecuabilidad del sistema.

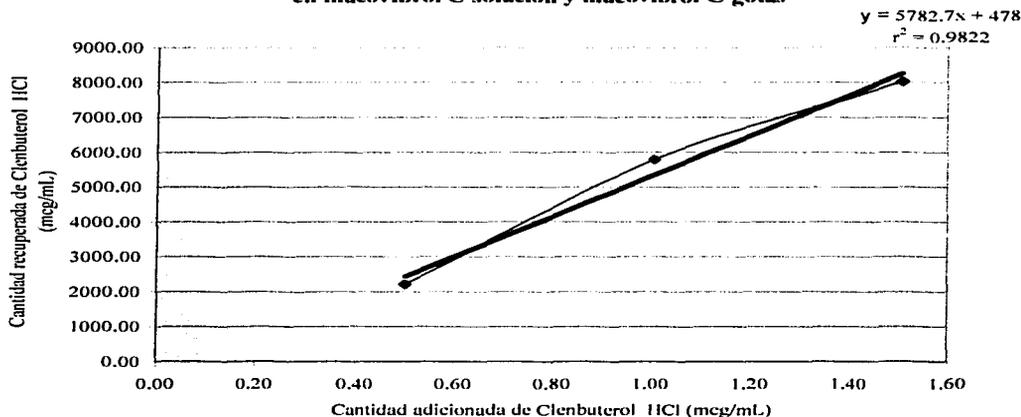
Parámetro de adecuabilidad	Especificación	Resultado			% RSD
		1	2	3	
Área bajo la curva	-----	4139	4269	4276	1.825
Eficiencia (tp)	Mayor a 100000	282211	271284	266517	2.944
Asimetría	0.8-1.2	1.1591	1.12561	1.08786	3.170
Voltaje	11500-12500 V	11906.8	11908.6	11908	0.008
Tiempo de migración	-----	7.208	7.204	7.200	0.056

Tabla 30. Prueba analítica.

Muestra	Nivel 100 %	Peso de Clenbuterol Clorhidrato (mg)	Placebo (mL)	Cantidad adicionada de Clenbuterol HCl (µg/mL)	Área bajo la curva Clenbuterol HCl	
1	50	10.3	5.0	0.511	2022.0	2342.0
2	50	10.2	5.0	0.506	2083.0	2208.0
3	50	9.9	5.0	0.491	2283.0	2283.0
1	100	10.3	5.0	1.022	5858.0	5784.0
2	100	10.2	5.0	1.012	5651.0	5581.0
3	100	9.9	5.0	0.982	5928.0	5928.0
1	150	10.3	5.0	1.533	8170.0	7899.0
2	150	10.2	5.0	1.518	7931.0	7873.0
3	150	9.9	5.0	1.474	8157.0	8079.0



Linealidad del método. Validación del método para cuantificar Clenbuterol en mucovibrol C solución y mucovibrol C gotas



Linealidad del método de cuantificación de Clenbuterol HCl presente en el producto Mucovibrol C solución y Mucovibrol C gotas.

El análisis de varianza del modelo de regresión lineal simple para la linealidad del método de Clenbuterol HCl se presenta en la Tabla 31.

Tabla 31. Análisis de varianza del modelo $y = 5782.7 x + 478$

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F _{cal}	P(F _{cal})
Regresión	1	5.0508E+07	5.0508E+07	292.2990	4.6700
Error de regresión	7	1.21E+06	172796.0681		
Falta de ajuste	1	1.13E+06	1.1254E+06	80.2468	3.7100
Error puro	6	8.41E+04	1.4025E+04		



CRITERIOS DE ACEPTACION PARA LA LINEALIDAD DEL METODO

1. La relación entre la concentración y la respuesta debe ser altamente significativa

Si $F_{cal} > = F_{tab}$	Existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida
Si $F_{cal} < = F_{tab}$	Existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida
Si $F_{cal} > = F_{tab}$	Existe una falta de ajuste a la relación lineal simple, cantidad adicionada-propiedad medida
Si $F_{cal} < = F_{tab}$	No existe una falta de ajuste a la relación lineal simple, cantidad adicionada-propiedad medida

Por lo tanto:

- *Existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida.*
- *Existe falta de ajuste a la relación lineal simple, cantidad adicionada-propiedad medida*

2. Criterios de aceptación para la ordenada.

H_0 : La ordenada al origen es igual a cero

H_a : La ordenada al origen es diferente de cero

$$(Xi-Medx)^2= 0.512843$$

$$SXY= 3.67E+02$$

$$t_{cal}= -1.0917$$

$$\text{Región de aceptación: Si } t(t_{abs}; n-2; 0.025) < t_{cal} > t(t_{tab}; n-2; 0.975)$$

-2.306 -1.09E+00 2.3060

Por lo tanto:

- La ordenada al origen es igual a cero



3. Criterios de aceptación para la correlación

Coefficiente de Determinación (r) mayor o igual a 0.98 %
 r^2 obtenido 0.9822

Por lo tanto:

- Existe correlación

CONCLUSIONES: El sistema de medición es lineal

16.5 Precisión del método (Repetibilidad y Reproducibilidad)

- *Tabla 32. Repetibilidad Mucovibrol solución*

a) Mucovibrol C Solución

Lote: C10075

µg/mL Adicionados de Clenbuterol HCl	Área bajo la curva de Clenbuterol HCl	% Recuperado	µg/mL Recuperado de Clenbuterol	(Y ²)
0.5000	2246.5000	99.2	0.50	9833.6972
0.5000	2259.5000	99.7	0.50	9948.0676
0.5000	2251.0000	99.4	0.50	9872.4096
0.5000	2302.0000	101.6	0.51	10325.6082
0.5000	2303.5000	101.7	0.51	10338.8224
0.5000	2288.0000	101.0	0.51	10201.0000

Tabla 33. Adecuabilidad del método.

Parámetro de adecuabilidad	Especificación	Resultado			% RSD
		1	2	3	
Área bajo la curva	-----	4417	4489	4496	0.979
Eficiencia (tp)	Mayor a 100000	278517	288764	297623	3.316
Asimetría	0.8-1.2	0.99846	1.13243	1.09194	6.396
Voltaje	11500-12500 V	11909.5	11898.2	11903.5	0.047
Tiempo de migración	-----	7.237	7.242	7.254	0.121



Suma de $Y^2 = 60519.6015$
 Media de $Y = 100.4267$
 Desviación Estándar = 1.1413
 Número de datos = 6
 Limite inferior del I.C. para el porciento recuperado = 99.2289
 Suma de $Y = 602.5600$
 Raíz de 6 = 2.4495
 t Studen(tab) = 2.5706
 t calculada = -0.9157
 Limite superior del I.C. para el porciento recuperado = 101.6244

Contraste de hipótesis:

H_0 : La media es igual al 100 %
 H_a : La media es diferente del 100 %

Limites de aceptación:

Si $t(\text{tab};n-1; 0.025) < t_{\text{cal}} < t(\text{tab};n-1;0.975)$
 -2.5706 -0.9157 2.5706 *Por lo tanto cumple*

Si % Recuperado Mínimo <98 %
 % Recuperado promedio 100.4267%
 < % recuperado máximo 102.0000% *Por lo tanto cumple*

CONCLUSION: El método es exacto, dado que el coeficiente de variación para las seis inyecciones es menor a 2 %.

Tabla 34. Repetibilidad Mucovibrol C Gotas

b) Mucovibrol C solución gotas
 Lote: C03064

$\mu\text{g/ml}$ Adicionados de Clenbuterol HCl	Área bajo la curva de Clenbuterol HCl	% Recuperado	$\mu\text{g/mL}$ Recuperados de Clenbuterol HCl	(Y^2)
1.0000	3668.0000	102.0	1.02	10395.3994
1.0000	3573.5000	99.3	0.99	9866.7122
1.0000	3632.5000	101.0	1.01	10196.1331
1.0000	3601.5000	100.1	1.00	10021.6985
1.0000	3675.0000	102.2	1.02	10435.9763
1.0000	3602.0000	100.1	1.00	10025.3172



Tabla 35. Adecuabilidad del sistema.

Parámetro de adecuabilidad	Especificación	Resultado			% RSD
		1	2	3	
Área bajo la curva	-----	4231	4361	4301	1.514
Eficiencia (tp)	Mayor a 100000	256755	271424	267208	2.849
Asimetría	0.8-1.2	1.05723	1.13577	1.13113	3.977
Voltaje	11500-12500 V	11906.5	11897.4	11907.3	0.046
Tiempo de migración	-----	7.221	7.196	7.2	0.186

Suma de $Y^2 = 60941.2367$

Media de $Y = 100.7761$

Desviación Estándar = 1.1223

Número de datos = 6

Limite inferior del I.C. para el porciento recuperado = 99.2289

Suma de $Y = 604.6566$

Raíz de 6 = 2.4495

t studen(tab) = 2.5706

t calculada = -0.9157

Limite superior del I.C. para el porciento recuperado = 101.6244

Contraste de hipótesis:

H_0 : La media es igual al 100 %

H_a : La media es diferente del 100 %

Limites de aceptación:

Si $t(\text{tab};n-1; 0.025) < t_{\text{cal}} < t(\text{tab};n-1;0.975)$
 -2.5706 -0.9157 2.5706

Por lo tanto cumple

Si % Recuperado Mínimo <98 %
 % Recuperado promedio 100.7761%
 < % recuperado máximo 102.0000%

Por lo tanto cumple

CONCLUSION: El método es exacto, dado que el coeficiente de variación para las seis inyecciones es menor a 2 %.



16.6 Reproducibilidad

➤ *Mucovibrol C Solución Lote C10075.*

**Tabla 36. Día 1
Químico 1**

Parámetro de adecuabilidad	Especificación	Resultado			% RSD
		1	2	3	
Área bajo la curva	-----	4417	4489	4496	0.979
Eficiencia (tp)	Mayor a 100000	278517	288764	297623	3.316
Asimetría	0.8-1.2	0.99846	1.13243	1.09194	6.396
Voltaje	11500-12500 V	11903.7	11897.4	11907.3	0.042
Tiempo de migración	-----	7.237	7.242	7.254	0.121

**Tabla 37. Día 1
Químico 2**

Parámetro de adecuabilidad	especificación	Resultado			% RSD
		1	2	3	
Área bajo la curva	-----	5082	5165	5032	1.319
Eficiencia (tp)	Mayor a 100000	216123	213811	212435	0.870
Asimetría	0.8-1.2	1.16595	1.09959	1.18346	3.848
Voltaje	11500-12500 V	11908.5	11973.1	11905.6	0.320
Tiempo de migración	-----	7.237	7.242	7.254	0.121

Tabla 38. Prueba analítica.

Muestra	Peso muestra (mL)	% Recuperado		
Químico 1				
1	5.0	101.6	98.7	100.15
2	5.0	101.07	100.4	100.735
3	5.0	99.82	100.89	100.355
Estándar de referencia	10.1 mg			100.4
Químico 2				
4	5.0	96.31	99.51	97.9
5	5.0	99.26	96.39	97.8
6	5.0	100.12	100.12	100.1
Estándar de referencia	10.4 mg			98.6



**Tabla 39. Día 2
Químico 1**

Parámetro de adecuabilidad	Especificación	Resultado			% RSD
		1	2	3	
Área bajo la curva	-----	4553	4425	4479	1.433
Eficiencia (tp)	Mayor a 100000	278484	269378	273435	1.666
Asimetría	0.8-1.2	1.08072	1.16972	1.20769	5.654
Voltaje	11500-12500 V	11900.5	11901.9	11908.4	0.035
Tiempo de migración	-----	7.221	7.233	7.233	0.096

**Tabla 40. Día 2
Químico 2**

Parámetro de adecuabilidad	Especificación	Resultado			% RSD
		1	2	3	
Área bajo la curva	-----	4356	4217	4368	1.946
Eficiencia (tp)	Mayor a 100000	234827	233146	219164	3.754
Asimetría	0.8-1.2	1.07005	1.13588	1.10976	2.999
Voltaje	11500-12500 V	11908.5	11973.1	11905.6	0.320
Tiempo de migración	-----	7.142	7.142	7.154	0.097

Tabla 41. Prueba analítica.

Muestra	Peso muestra (mL)	% Recuperado		
Químico 1				
1	5.0	99.86	103.78	101.82
2	5.0	102.78	94.48	98.63
3	5.0	95.91	95.91	95.61
Estándar de referencia	10.7 mg			98.8
Químico 2				
4	5.0	92.77	94.02	93.4
5	5.0	102.03	100.04	101.0
6	5.0	100.41	96.33	98.4
Estándar de referencia	10.2 mg			97.6



Análisis de varianza del modelo $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \delta_{j(i)} + \epsilon_{k(ij)}$

Tabla de análisis de varianza					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F _{cal}	F _{tab}
Químico	1	5.2470	5.2470	18.9046	161.40
Día	1	6.6678	6.6678	24.0234	161.40
Interacción Q-D	1	0.2776	0.2776	0.3330	5.32
Error	8	6.6678	0.8335		

Media total = 98.8546

Desviación estándar total = 2.3994

CV. Total = 2.4272

Criterio de aceptación para la reproducibilidad

- 1) Si $F_{qcal} < F_{qtab}(glq; glqd; 0.05)$ No existe efecto por Químico
- 2) Si $F_{qcal} < F_{qtab}(gld; glqd; 0.05)$ No existe efecto por día
- 3) Si $F_{qdc} < F_{qdt}(glqd; gle; 0.05)$ No existe efecto por interacción Químico-Día
- 4) Coeficiente de variación menor a 2%

CONCLUSIONES:

- No existe efecto por químico
- No existe efecto por día
- No existe interacción químico-día
- Coeficiente de variación total 2.4272
- Por lo tanto el método analítico es reproducible por químicos distintos en días diferentes



➤ **Mucovibrol C Gotas Lote D03137.**

**Tabla 42. Día 1
Químico 1**

Parámetro de adecuabilidad	Especificación	Resultado			% RSD
		1	2	3	
Área bajo la curva	-----	4183	4254	4308	1.476
Eficiencia (tp)	Mayor a 100000	220308	220876	215132	1.447
Asimetría	0.8-1.2	1.1777	1.2226	1.3419	6.803
Voltaje	11500-12500 V	11903.8	11900.9	11901.6	0.013
Tiempo de migración	-----	7.121	7.112	7.096	0.178

**Tabla 43. Día 1
Químico 2**

Parámetro de adecuabilidad	Especificación	Resultado			% RSD
		1	2	3	
Área bajo la curva	-----	5569	5592	5441	1.470
Eficiencia (tp)	Mayor a 100000	240484	248311	239564	1.980
Asimetría	0.8-1.2	1.19835	1.15384	1.17936	1.897
Voltaje	11500-12500 V	11914.7	11907.9	11918.8	0.046
Tiempo de migración	-----	7.412	7.487	7.558	0.975

Tabla 44. Prueba analítica.

Muestra	Peso muestra (mL)	% Recuperado		
Químico 1				
1	2.0	99.17	100.9	100.035
2	2.0	99.29	100.9	100.095
3	2.0	101.12	95.87	98.495
Estándar de referencia	10.7 mg			99.5
Químico 2				
4	2.0	93.31	95.08	94.2
5	2.0	99.49	101.28	100.4
6	2.0	102.47	96.87	99.7
Estándar de referencia	10.9 mg			98.1



**Tabla 45. Día 2
Químico 1**

Parámetro de adecuabilidad	Especificación	Resultado			% RSD
		1	2	3	
Área bajo la curva	-----	4897	5060	5054	1.847
Eficiencia (tp)	Mayor a 100000	286376	285778	286025	0.105
Asimetría	0.8-1.2	1.13622	1.11912	0.99526	7.099
Voltaje	11500-12500 V	11908.8	11896.1	11905.8	0.056
Tiempo de migración	-----	7.279	7.279	7.283	0.032

**Tabla 46. Día 2
Químico 2**

Parámetro de adecuabilidad	Especificación	Resultado			% RSD
		1	2	3	
Área bajo la curva	-----	5082	5156	5032	1.319
Eficiencia (tp)	Mayor a 100000	216123	213811	212435	0.870
Asimetría	0.8-1.2	1.16595	1.09959	1.18346	3.848
Voltaje	11500-12500 V	11908.5	11973	11905.6	0.320
Tiempo de migración	-----	7.45	7.438	7.438	0.093

**Tabla 47.
Prueba analítica.**

Muestra	Peso muestra (mL)	% Recuperado		
Químico 1				
1	2.0	104.75	103.5	104.125
2	2.0	100.28	96.97	98.626
3	2.0	100.05	102.91	101.48
Estándar de referencia	10.8 mg			101.4
Químico 2				
4	2.0	99.94	98.76	99.4
5	2.0	95.67	98.59	97.1
6	2.0	96.08	97.42	96.8
Estándar de referencia	10.4 mg			97.7



Análisis de varianza del modelo $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \delta_{j(i)} + \epsilon_{k(ij)}$

Tabla de análisis de varianza					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F _{cal}	F _{tab}
Químico	1	0.0800	0.0800	0.8548	161.40
Día	1	8.0197	8.0197	85.6498	161.40
Interacción Q-D	1	0.0936	0.0936	0.0934	5.32
Error	8	8.0197	1.0025		

Media total = 98.7308

Desviación estándar total = 2.5538

CV. Total = 2.5867

Criterio de aceptación para la reproducibilidad

- 1) Si $F_{qcal} < F_{qtab}(glq; glq; 0.05)$ No existe efecto por Químico
- 2) Si $F_{dcal} < F_{dtab}(gld; gld; 0.05)$ No existe efecto por día
- 3) Si $F_{dqcal} < F_{dqtab}(glq)$ No existe efecto por interacción Químico-Día
- 4) Coeficiente de variación menor a 2%

CONCLUSIONES:

- No existe efecto por químico
- No existe efecto por día
- No existe interacción químico-día
- Coeficiente de variación total 2.5867

16.7 Exactitud del método.

Los datos correspondientes a este parámetro son los mismos de linealidad del método, tanto como para Mucovibrol C solución como para Mucovibrol C gotas.

Análisis de Varianza para la exactitud del método

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F _{cal}	F _{tab}
Regresión	1	5.0508E+07	5.0508E+07	292.2990	5.59
Error de regresión	7	1.21E+06	172796.0681		
Falta de ajuste	1	1.13E+06	1.1254E+06	80.2468	5.99
Error puro	6	8.41E+04	1.4025E+04		

TENE CON
FALLA DE ORIGEN



Criterios de aceptación para la exactitud del método (Linealidad del sistema)

1. La relación entre la concentración y la respuesta debe ser altamente significativa

- Si $F_{cal} \geq F_{tab}$ Existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida.
- Si $F_{cal} < F_{tab}$ No existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida.
- Si $F_{cal} \geq F_{tab}$ Existe falta de ajuste a la relación lineal simple-cantidad adicionada-propiedad medida.
- Si $F_{cal} < F_{tab}$ No existe falta de ajuste a la relación lineal simple-cantidad adicionada propiedad medida.

POR LO TANTO:

- Existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida.
- Existe falta de ajuste a la relación lineal simple cantidad adicionada - propiedad medida.

2. CRITERIO DE ACEPTACIÓN PARA LA ORDENADA.

H_0 : La ordenada al origen es igual a cero.

H_a : La ordenada al origen es diferente de cero.

$(\sum (X_i - \text{Med } x))^2 = 0.512843$

$S_{x,y} = 3.67E+02$

Región de aceptación: Si $t(t_{abs}; n-2; 0.025) < t_{cal} < t(t_{ab}; n-2; 0.975)$

-2.306 -1.09E+00 2.3060

Por lo tanto:

La ordenada al origen es igual a cero.

3. Criterio de aceptación para la correlación.

Coefficiente de determinación (r) mayor o igual a 0.98

r^2 obtenido 0.9820

CONCLUSION: El método de medición es exacto y lineal.

TARDE CON
FALLA DE ORIGEN



16.8 Estabilidad de la muestra

➤ **Mucovibrol C solución Lote C10075**

Tabla 48. Tiempo transcurrido: **0 Horas (inicial)**

- Adecuabilidad del sistema

Parámetro de Adecuabilidad	Especificación	Resultado			% RSD
		1	2	3	
Area bajo la curva	-----	4553	4425	4479	1.433
Eficiencia (tp)	Mayor a 10000	278484	269378	273435	1.666
Asimetría	0.8-1.2	1.0807	1.16972	1.20769	5.654
Voltaje	11500 a 12500 v	11901	11901.9	11908.4	0.035
Tiempo de migración	-----	7.221	7.233	7.233	0.096

- **Tabla 49.** Prueba analítica

Muestra	Condición	Peso muestra (mL)	% Recuperado		
			1	2	3
1	Temperatura amb.	5.0	99.5600	103.7800	101.7
2	Temperatura amb.	5.0	95.0100	94.4800	98.6
3	Temperatura amb.	5.0	95.9100	95.9100	95.9
STD Referencia	Temperatura amb.	10.7 mg			98.7

Tiempo transcurrido: **7 Horas (inicial)**

- **Tabla 50.** Adecuabilidad del sistema

Parámetro de Adecuabilidad	Especificación	Resultado			% RSD
		1	2	3	
Area bajo la curva	-----	4895	4807	4938	1.368
Eficiencia (tp)	Mayor a 10000	255595	246717	272403	5.052
Asimetría	0.8-1.2	1.3329	1.13477	1.24859	8.027
Voltaje	11500 a 12500 v	11912	11907.1	11910.8	0.020
Tiempo de migración	-----	7.242	7.242	7.229	0.104

- **Tabla 51.** Prueba analítica

Muestra	Condición	Peso muestra (mL)	% Recuperado		
			1	2	3
1	Temperatura amb.	5.0	99.33	99.12	99.2
2	Temperatura amb.	5.0	99.12	102.86	101.0
3	Temperatura amb.	5.0	99.93	99.12	99.5
STD Referencia	Temperatura amb.	10.7 mg			99.9

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Tabla 52. Tiempo transcurrido: 24 Horas (inicial)

- Adecuabilidad del sistema

Parámetro de Adecuabilidad	Especificación	Resultado			% RSD
		1	2	3	
Area bajo la curva	-----	4183	4254	4308	1.476
Eficiencia (tp)	Mayor a 10000	220308	220876	215132	1.447
Asimetría	0.8-1.2	1.1777	1.22262	1.34192	6.803
Voltaje	11500 a 12500 v	11904	11900.9	11901.6	0.013
Tiempo de migración	-----	7.121	7.112	7.096	0.178

- **Tabla 53. Prueba analítica**

Muestra	Condición	Peso muestra (mL)	% Recuperado		
1	Temperatura amb.	5.0	103.08	97.96	100.5
2	Temperatura amb.	5.0	101.76	100.59	101.2
3	Temperatura amb.	5.0	104.91	100.64	102.8
STD Referencia	Temperatura amb.	10.2 mg			101.5

➤ *Mucovibrol C gotas Lote D03137*

Tabla 54. Tiempo transcurrido: 0 Horas (inicial)

- Adecuabilidad del sistema

Parámetro de Adecuabilidad	Especificación	Resultado			% RSD
		1	2	3	
Area bajo la curva	-----	4183	4254	4308	1.476
Eficiencia (tp)	Mayor a 10000	220308	220876	215132	1.447
Asimetría	0.8-1.2	1.1777	1.22262	1.34192	6.803
Voltaje	11500 a 12500 v	11904	11900.9	11901.6	0.013
Tiempo de migración	-----	7.121	7.112	7.096	0.178

- **Tabla 55. Prueba analítica**

Muestra	Condición	Peso muestra (mL)	% Recuperado		
1	Temperatura amb.	2.0	97.1400	98.0800	97.6
2	Temperatura amb.	2.0	97.5100	97.3200	97.4
3	Temperatura amb.	2.0	94.8700	95.2100	97.6
STD Referencia	Temperatura amb.	10.2 mg			97.6

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Tabla 56. Tiempo transcurrido: 7 Horas (inicial)

- Adecuabilidad del sistema

Parámetro de Adecuabilidad	Especificación	Resultado			% RSD
		1	2	3	
Área bajo la curva	-----	41.83	4254	4308	1.476
Eficiencia (tp)	Mayor a 10000	220308	220876	215132	1.447
Asimetría	0.8-1.2	1.1777	1.2226	1.34192	6.803
Voltaje	11500 a 12500 v	11904	11900.9	11901.6	0.013
Tiempo de migración	-----	7.121	7.112	7.096	0.178

- **Tabla 57. Prueba analítica**

Muestra	Condición	Peso muestra (mL)	% Recuperado		
1	Temperatura amb.	2.0	104.76	100.32	102.5
2	Temperatura amb.	2.0	102.46	104.11	103.3
3	Temperatura amb.	2.0	104.46	98.53	101.5
STD Referencia	Temperatura amb.	10.1 mg	-----	-----	102.4

Tabla 58. Tiempo transcurrido: 24 Horas (inicial)

- Adecuabilidad del sistema

Parámetro de Adecuabilidad	Especificación	Resultado			% RSD
		1	2	3	
Área bajo la curva	-----	4229	4238	4210	0.338
Eficiencia (tp)	Mayor a 10000	288277	290290	277021	2.507
Asimetría	0.8-1.2	1.0889	1.1102	1.07523	1.615
Voltaje	11500 a 12500 v	11910	11909.7	11900.8	0.044
Tiempo de migración	-----	7.171	7.2	7.208	0.271

- **Tabla 59. Prueba analítica**

Muestra	Condición	Peso muestra (mL)	% Recuperado		
1	Temperatura amb.	2.0	95.29	102.15	98.7
2	Temperatura amb.	2.0	100.69	101.12	100.9
3	Temperatura amb.	2.0	100.96	100.96	101.0
STD Referencia	Temperatura amb.	10.0 mg	-----	-----	100.2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



16.9 Robustez

➤ **Tabla 60.** Adecuabilidad del sistema

Parámetro de Adecuabilidad	Especificación	Resultado			%RSD
		1	2	3	
Área bajo la curva	-----	4695	4615	4660	0.861
Eficiencia (tp)	Mayor a 100000	266883	284073	267288	3.597
Asimetría	0.8-1.2	1.0567	1.0782	1.07206	1.036
Voltaje	11500 a 12500 V	11907	11904.2	11908.9	0.020
Tiempo de migración (min.)	-----	7.271	7.342	7.379	0.749

➤ **Tabla 61.** Prueba analítica

Muestra	Condición	Peso muestra (mL)	% Recuperado				Promedio	Comentario
Mucovibrol C Solución	Corrido con amortiguador de fosfatos 20 mM a pH 8.3 con 12 kV de separación	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	El pico del Ambroxol HCl oculta al del Clenbuterol con un tiempo de migración menor.
Mucovibrol C Gotas	Corrido con amortiguador de fosfatos 20 mM a pH 8.3 con 12 kV de separación	2.0	0.00	0.00	0.0	0.0	0.0	El pico del Ambroxol HCl oculta al del Clenbuterol con un tiempo de migración menor.
Mucovibrol C Solución	Corrido con amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 6.7 con 12 kV de separación	5.0	0.00	0.00	0.0	0.0	0.0	El pico del Ambroxol HCl oculta al del Clenbuterol con un tiempo de migración mayor.
Mucovibrol C Gotas	Corrido con amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 6.7 con 12 kV de separación	2.0	0.00	0.00	0.0	0.0	0.0	El pico del Ambroxol HCl oculta al del Clenbuterol con un tiempo de migración mayor.
Mucovibrol C Solución	Corrido con amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 8.3 con 15 kV de separación	5.0	0.00	0.00	0.0	0.0	0.0	El pico del Ambroxol HCl oculta al del Clenbuterol con un tiempo de migración menor.
Mucovibrol C Gotas	Corrido con amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 8.3 con 15 kV de separación	2.0	0.00	0.00	0.0	0.0	0.0	El pico del Ambroxol HCl oculta al del Clenbuterol con un tiempo de migración menor.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



XVII. ANALISIS DE RESULTADOS

El fármaco bajo análisis involucró una amina básica alifática, la cual es un importante prerrequisito para la aplicación de cualquier método de electro-migración, para el respectivo análisis de control de calidad, así como la determinación de masa de principio activo en preparados farmacéuticos. Acorde a lo reportado por Altria *et al.*, (1993)², el valor de pKa del clenbuterol es de 8.82 (valor generado por el grupo Bencilamino de la molécula), el clenbuterol clorhidrato es ionizado en agua, ya que una solución de este fármaco tiene un pH de 5 a 7).

Con base a estas características de la molécula, se decidieron trabajar con soluciones amortiguadoras de pH (boratos, acetatos y fosfatos); siendo la solución amortiguadora de fosfatos la que presentó respuesta de electro-migración, ya que con boratos y acetatos no se observó migración alguna de la sustancia en el capilar, por lo que se procedió a justar las condiciones de separación con la solución amortiguadora de fosfato; siendo inicialmente las concentraciones 30 mM e intervalos de pH de 7.5 a 9.7, las cuales se observaron en la Tabla 9, así como condiciones constantes de muestra de 1 µg/mL y un voltaje de 12 kV, los electroferogramas obtenidos, los cuales se encuentran reportados del No 1 al 10, en donde no se aprecia que exista migración de la sustancia. Solamente se detecta la señal de ruido del equipo debido a la presencia del flujo electroosmótico, por lo que se probó una segunda matriz con concentración molar de amortiguador de 40 mM y los mismos intervalos de pH así como de muestra y voltaje, bajo estas nuevas condiciones sólo observó respuesta a un pH de 9 a 9.7 (electroferogramas 17 al 20), pero con demasiado ruido y picos no definidos, por tal motivo se probó la tercera matriz propuesta, obteniéndose picos asimétricos y con ruido excesivo (electroferograma 21 al 23), a concentración de 50 mM y pH de 8.3 bajo las mismas condiciones de inyección se obtuvo un pico simétrico, definido con un tiempo de migración aproximado de 7.3 minutos pero al ir incrementando el pH de 8.5 a 9.7 el pico perdió definición, hasta la pérdida de la detección (electroferogramas 24 a 30), por ello queda demostrado que la separación óptima para cualquier analito debe realizarse en una solución amortiguadora que oscile entre el valor de pKa del analito, es importante mencionar que todo



el proyecto fue realizado por electroforesis capilar de zona ya que se cuenta dentro del producto Mucovibrol C. con otro activo (Ambroxol-HCl) y excipientes (nipagin y nipasol) que absorben a longitudes de onda muy cercanas a Ambroxol y Clenbuterol, por lo que se aplicó dicha técnica para lograr obtener picos que fuesen migrando en base a su carga neta y tamaño a través del capilar negativo, ya que como se mencionó en la teoría, en el capilar negativo se encuentran los grupos silanoles cargados negativamente, y al ionozar el analito con amortiguador y pH idóneo, mediante el flujo electroosmótico estos serán arrastrados a través del capilar y el campo eléctrico migrando hacia el detector para ser cuantificado. Por último se probó una cuarta matriz de concentración (electroferogramas 30 al 40) para asegurar que el pico obtenido a la concentración de 50 mM y pH de 8.3 fueran las adecuadas, por lo que en estos electroferogramas se logró observar el pico de cuantificación asimétrico, no bien definido y con mucho ruido, por lo cual no se logró apreciar una línea base para que el pico pueda ser cuantificado correctamente.

Antes de proceder con la validación de este método analítico se realizaron varias pruebas para confirmar que las condiciones propuestas fueran reproducibles y que el método de cuantificación fuese específico para el producto Mucovibrol C y que no existiese interferencia de ningún excipiente, ni producto de degradación por lo que esto se muestra en los electroferogramas 41 y 42 para Mucovibrol C solución y 43 y 44 para Mucovibrol C gotas. Posteriormente se procedió a validar el método de cuantificación propuesto apeguándose al protocolo de validación implementado en el que se cubrieron los siguientes puntos:

Linealidad del sistema se realizó dicha prueba encontrando resultados de adecuabilidad reportados en la Tabla 18 con dichos resultados se obtuvo que el equipo era confiable y que mantenía un margen de detección aceptable para el método propuesto. Para verificar que el equipo fuese lineal se construyeron curvas de calibración con niveles de concentración desde 50% 100% y 150% obteniendo que en cada una de ellas el área bajo la curva del analito oscila entre 2200 aproximadamente y va incrementando de forma proporcional a la concentración, la curva promedio obtenida para la cuantificación de Clenbuterol-HCl presente en las muestras de Mucovibrol C solución y Mucovibrol C gotas, presentaron una linealidad satisfactoria en el rango de concentraciones de 0.5 a 1.5 $\mu\text{g/mL}$ con una pendiente de 5858.7, un intercepto de



485.94 y un coeficiente de determinación de 0.997%, de esta forma existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida, por lo que existe una falta de ajuste a la relación lineal simple, cantidad adicionada-propiedad medida, por lo que al ser el coeficiente de correlación mayor a 0.98% existe una correlación óptima. En las Tablas 21 a la 26 se muestran los resultados obtenidos para Mucovibrol C solución y Mucovibrol C gotas en cuanto a la especificidad de esta forma quedó demostrado que el método propuesto es lineal y específico para los productos antes mencionados.

Linealidad del método En las Tablas 27 a la 30 se muestran los resultados obtenidos para la linealidad del método con tres niveles de concentración (50% 100% y 150%) para Mucovibrol C solución y Mucovibrol C gotas con una pendiente de 5782.7, un intercepto de 478 y un coeficiente de determinación de 0.9822%, de esta forma se tiene que existe una relación altamente significativa entre la cantidad adicionada y la propiedad medida, existiendo una falta de ajuste entre la relación simple, cantidad adicionada-propiedad medida, por lo que al ser el coeficiente de correlación mayor a 0.98 existe una correlación óptima.

Precisión del método en la Tabla 32 se muestra la repetibilidad que se tuvo en en el producto Mucovibrol C solución lote C10075, teniendo que el método es exacto, dado que el coeficiente de variación para las seis inyecciones es menor a 2%. En la Tabla 34 se muestra la repetibilidad que se obtuvo para Mucovibrol C gotas lote C03064, teniendo que el método es exacto, dado que el coeficiente de variación para las seis inyecciones es menor a 2%.

Reproducibilidad del método en la Tabla 36-37 y 39-40 se muestran los resultados obtenidos para Mucovibrol C solución Lote C10075 en las que se probó el método con dos químicos diferentes en dos días distintos obteniendo en la Tabla 38 y 41 los resultados de la prueba analítica por lo que se tiene que no existe efecto por químico, no existe efecto por día, no existe interacción químico-día, el coeficiente de variación total se encuentro de 2.42, por lo que el método analítico es reproducible por químicos distintos en días diferentes.



En la Tabla 42-43 y 45-46 se muestran los resultados obtenidos para Mucovibrol C gotas Lote D03137 en las que se probó el método con dos químicos diferentes en dos días distintos obteniendo en la Tabla 44 y 47 los resultados de la prueba analítica por lo que se tiene que no existe efecto por químico, no existe efecto por día, no existe interacción químico-día, el coeficiente de variación total se encuentra 2.58, por lo que el método analítico es reproducible por químicos distintos en días diferentes.

Exactitud del método los resultados correspondientes para este parámetro son los mismos de linealidad del método tanto para Mucovibrol C solución y Mucovibrol c gotas, de esta forma el método es exacto para ambos productos.

Estabilidad de la muestra los resultados obtenidos para Mucovibrol C solución Lote C10075 se encuentran en la Tabla 48 a la 52 un tiempo inicial de 0 horas, 7 y 24 horas encontrando que la muestra se comporta de una manera estable y es cuantificable a dichas condiciones con un margen de error de menos del 2 % por lo que se tiene que el producto Mucovibrol C solución es estable bajo las condiciones de trabajo a las que fue sometido.

En cuanto a Mucovibrol C gotas Lote D03137, al que se sometía a las mismas condiciones se observa en las tablas 54 a la 59 que las condiciones a las que se sometió, mantienen de igual forma que el producto Mucovibrol C solución, un margen de error de menos del 2 % de esta forma el parámetro propuesto en el protocolo de validación quedo cubierto aceptando que las muestras mantienen su pureza aun sometidas a diversas concentraciones y condiciones.

Robustez En la Tabla 60 se muestran los parámetros con los que se debe trabajar el método a validar, de esta forma con los resultados obtenidos en dicha Tabla se construye la tabla 61 en la que se tienen las condiciones a las que serán sometidos los productos (variación de condiciones para ver cuanto es factible modificar el método, o cuanto tolera el método alguna modificación) obteniendo que si probamos para ambos productos las siguientes condiciones:



Un amortiguador de fosfatos 20 mM a pH 8.3 y 12 kV, el pico detectable del Ambroxol oculta el pico de Clenbuterol con un tiempo de migración menor si se realiza la corrida con un amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.7 y 12 kV, el pico del Ambroxol oculta al pico de Clenbuterol con un tiempo de migración mayor y por último si se prueba con un amortiguador de fosfatos 50 mM a un pH de 8.3 y un voltaje de 15 kV el pico del Ambroxol oculta al pico de Clenbuterol con un tiempo de migración mayor. De esta forma al modificar la concentración, el pH, el voltaje de separación se verá afectado el método de cuantificación de Clenbuterol Clorhidrato.



XVIII. CONCLUSIONES

- El método analítico de electroforesis capilar para la cuantificación de Clenbuterol Clorhidrato, fue lineal, selectivo, específico, exacto, reproducible y repetible a intervalos de concentración de 0.5 a 1.5 $\mu\text{g/mL}$.
- La adición de un estándar interno o marcador como es considerado el activo Ambroxol Clorhidrato dentro del producto Mucovibrol C solución y gotas, permite mayor resolución, por tanto mayor sensibilidad y una alta eficiencia del analito Clenbuterol Clorhidrato, ya que este activo se encuentra en una mínima cantidad presente en el producto Mucovibrol C solución y Mucovibrol C gotas, lo que hace que al encontrarse el Ambroxol en una mayor concentración el pico correspondiente salga asimétrico, coleado y no definido, dándole una sensibilidad considerable a el Clenbuterol y mayor eficiencia al pico.
- No se requirió de una columna especializada, ya que los capilares para electroforesis capilar ofrecen un alto poder de separación y el consumo de reactivos, disolventes y amortiguadores es mínimo.
- El pico es definido y simétrico ya que en HPLC la fase móvil es arrastrada mediante el bombeo de esta a través de la columna cromatográfica a una determinada presión lo cual hace que los picos tengan una forma de campana gaussiana de esta forma el flujo viaja en forma de parábola teniendo mayor fuerza y velocidad en el centro, contrario a lo que sucede en electroforesis capilar ya que en esta técnica el flujo del amortiguador viaja a través del capilar de forma pareja y constante lo cual hace que los picos sean más afilados ofreciendo una mayor selectividad y eficiencia.



Perfil de flujo en electroforesis capilar en presencia de flujo electrosmótico.



Perfil de velocidades en cromatografía de líquidos (introducción del solvente usando una bomba).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- ✓ Es importante conocer los distintos tipos de electroforesis capilar que existen para poder seleccionar el más adecuado, en nuestro caso se optó por utilizar electroforesis capilar de zona (ECZ) ya que en ésta, los analitos se separan en base a su movilidad, carga neta total, tamaño, estructura molecular y la capacidad que tienen éstos para ionizarse, de esta forma saldrán primero las moléculas de menor peso, carga neta, estructura molecular y mayor capacidad de ionización.
- ✓ Fué de gran utilidad la implementación de la técnica de cuantificación de Clenbuterol-HCl por electroforesis capilar ya que la técnica con la que se contaba para cuantificar Clenbuterol se realiza por extracciones y HPLC y al ser inyectada ésta a través de la columna cromatográfica el pico de Ambroxol Clorhidrato, Nipagin, Nipasol y Clenbuterol Clorhidrato, no tienen buena definición y en muchas ocasiones el pico del Clenbuterol se juntaba con el pico de Ambroxol no logrando cuantificar ambos activos de forma independiente ya que estos se absorben casi a la misma longitud de onda.



XIX. PROPUESTAS

- ✓ Se propone modificar el método, eliminando la fase de lavado entre muestras cuando sean inyectadas éstas al capilar; ya que se pierde demasiado tiempo entre cada inyección, debido a dicho lavado, por lo que se sugiere se realicen pruebas modificando dicho punto para ver si el método se comporta de igual forma o se ve alterado por ello, si fuese el caso de que el método se mantuviese en las mismas condiciones sería de gran ayuda para el analista y la empresa la reducción de este tiempo, ya que disminuirá de una forma considerable el tiempo de análisis y por tanto, menor costo para la empresa y menor tiempo de preparación de muestras para el químico analista. Por el contrario si el método sufriese alguna modificación o alteración se tendría que validar nuevamente dicho método.



XX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Altria K. D., Filbey S. D.: (1993); Quantitative Pharmaceutical análisis By capillary Electrophoresis, *Journal of Liquid Chromatography*, **16**, 2281-2292.
2. Altria K. D., Harden R. C., Hart M., Hailey P. A.: (1993); An Inter-Company Cross-Validation Exercise on Capillary Electrophoresis: A Chiral Analysis of Clenbuterol. *Journal of Chromatography*, **641**, 147-153.
3. Altria K. D., Regan M. M.: (1994); Comparison of Capillary Electrophoresis and HPLC in the Pharmaceutical Industry. *Chromatography and Analysis*, April/May, 3-8.
4. Altria K. D.: (1993); Capillary Electrophoresis for Pharmaceutical Research and Development, *LC-GC Magazine*, **6**, 616-620.
5. Altria, K. D. (1995); Capillary Electrophoresis Guidebook, Chapman & Hall, London, 560-578.
6. Altria, K. D., Simpson, C. F.: (1987); High Voltage Capillary Zone Electrophoresis: Operating Parameters Effects on Electroosmotic Flows and Electrophoretic Mobilities, *Chromatographia* **24**, 527-532.
7. Altria, K. D.; Simpson, C. F.: (1986); Measurement of Electroosmotic Flows in High-Voltage Capillary Zone Electrophoresis, *Analytics Proceedings*. (London) **23**, 453-454.
8. Altria, K. D.; Simpson, C. F.: (1988); The Effect of Electrolyte Chain Length on Electroosmotic Flow in High Voltage Capillary Zone Electrophoresis, *Analytics Proceedings*. (London) **25**, 85-97.
9. Beckman Coulter.: (1989); Separation of Chiral Amino Acids and Peptides by CE Using P/ ACE 2000.
10. Beckman Coulter.: (1999); Manual del Usuario Hardware P / ACE 5000 Series.
11. Bio Rad laboratory: (2000); An Introduction to Capillary Electrophoresis, Bulletin. **1701**, US/EG. 1-6.
12. Camilleri, P. (Ed.): (1993) "Capillary Electrophoresis: theory and practice." CRC, Boca Raton, 22-80.
13. Castro E.A., Barbiric J.D.: (1997); Estudios teóricos de las Ciclodextrinas y sus Complejos de Inclusion. *Anales de la Sociedad Científica de Argentina*. **227**, 93-111, 1997.



14. Chee G. I., Wan T. S.: (1993) Reproducible and High-Speed Separation of Basic Drugs by Capillary Zone Electrophoresis, *Journal of Chromatography*, **612**, 172-177.
15. Chrambach A.: (1985): *The Practice of Quantitative Gel Electrophoresis* Weinheim: Deerfield Beach, FL, VCH, 56-80; 269-287.
16. Clark C., Wesley. R.: (1992) *Farmacología Médica*, Ed Mosby, Barcelona España, 145-150.
17. Cohen, A. S.; Karger, B. L.: (1987); High-performance Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Capillary Electrophoresis of Peptides and Proteins, *Journal of Chromatographr.* **397**, 409-417.
18. Compton, S.W.; Brownlee, R. G.: (1988); *Capillary Electrophoresis*, *BioTechniques* **6**, 432-440.
19. Desiderio C., and Fanali, S.: (1995); Use of negatively charged sulfobutyl ether- β -cyclodextrin for enantiomeric separation by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, **716**: 183-196.
20. Evaerest F.M., Beckers J.L., Verheggen E.M.: (1976); *Isotachophoresis, Theory, Instrumentation and Applications* Elsevier Publishing Company, 23-40.
21. Evaerest F.M.: (1980); *Analytical Simposia Seric. Analytical Isotachophoresis*, Elsevier Publishing Company 123-152.
22. Foley, J. P.: (1990); Optimization of Micellar Electrokinetic Chromatography, *Analytical Chemistr.* **62**, 1302-1308.
23. Gozel, P.; Gassmann, E.; Michelsen, H.; Zare, R. N.: (1987); Electrokinetic Resolution of Amino acid Enantiomers With Copper (II)- Aspartame Support Electrolyte, *Analytical Chemistry*, **59**, 44-49.
24. Guzman N.: (2002); *Capillary Electrophoresis*, Marcel Dekker, Inc. Las Vegas New Mexico, 1391-1412.
25. Guzman, N. A., (Ed.): (1993); *Capillary Electrophoresis Technology*, Marcel Dekker, New York, 123-137.
26. Guzman, N. A., Hernandez, L., Hoebel, B. G.: (1989); *Capillary Electrophoresis: A New Era in Microseparations*, *BioPharmaceutics*, **2**: 22-37.



27. Guzman, N.:(1997); New approaches in Clinical Chemistry: on fine analyte concentration and microreaction capillary electrophoresis for the determination of drugs, metabolic intermediates and biopolymers in biological fluids. *Journal of chromatography B*, **697**, 37-66.
28. Hartwick, R. A.: (1994): Introduction to Capillary Electrophoresis. CRC, Boca Raton, 49-58.
29. Heiger, D.: (1997); High Performance Capillary Electrophoresis an Introduction. Hewlett Packard CMBH, 45-46.
30. Heiger, D.: (1992); Hewlett Packard. High Performance Capillary Electrophoresis (An Introduction) No. 12-5001-6199-E Prólogo J. Jorgensen, USA.
31. Herren, B. J.; Shafer, S. G.; Van Alstine, J.; Harris, J. M. Snyder, R. S.: (1987); Control of Electroosmosis in Coated Quartz Capillaries. *Journal of Colloid Interface Science*. **115**, 46-55.
32. Jenkins M., Guerin M.: (1996); Capillary Electrophoresis as a Clinical Tool. *Journal of chromatography B*, **682**, 23-34.
33. Jorgenson J., Lukacs K. : (1993) ; Capillary Zone Electrophoresis. *Science*, **222** 266-272.
34. Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D.: (1981); High-resolution Separations Based on Electrophoresis and Electroosmosis, *Journal of Chromatograph*, **218**, 209-216
35. Kuhn, R., and Hoffstetter-Kuhn.: (1993); Capillary electrophoresis: principles and practice. Springer Verlag, Berlin, 111-126.
36. Li, S. F. Y.: (1992); Capillary Electrophoresis: principles, practice and applications. Elsevier, Amsterdam, 19-40.
37. Lucy, C. A., Brown, R., and Yeung, K.: (1996); Separation of positional and structural isomers by cyclodextrin-mediated capillary zone electrophoresis, *Journal of Chromatography. A*, **745**, 9-15.
38. Lukacs K., Jorgenson J.: (1985); Capillary Zone Electrophoresis. "Effect of Physical Parameters on Separation Efficiency and Quantitation, *Journal of High Resolution Chromatography*, **8**, 407-411.
39. Lux, J. A., Yin, H. F., Schomburg, G.: (1990); Construction, evaluation and analytical operation of a modular capillary electrophoresis instrument. *Chromatographia*. **30**, 7-15.



40. McCormick, R. M.: (1988): Capillary Zone Electrophoretic Separation of Peptides and Proteins Using Low pH Buffers in Modified Silica Capillaries. *Analytical Chemistry*. **60**, 2322-2328.
41. McLaughlin, G., Palmieri, R., Anderson, K. (1991): Benefits of Automation in the Separation of Biomolecules by High Performance Capillary Electrophoresis. *Techniques in Protein Chemistry II*, Academic Press, 3-19.
42. Nesse A., Castagnino J.M.: (1971): Fraccionamiento de Aminoácidos Empleando Electroforesis por Alto Voltaje (EAV). *Bioquímica Clínica*. **2**. 78-89.
43. Nishi, H.; Fukuyama, T.; Matsuo, M.; Terabe, S.: (1990) Effect of Surfactant Structures on the Separation of Cold Medicine Ingredients by Micellar Electrokinetic Chromatography. *Journal Pharmaceutical Sciences*. **79**, 519-523.
44. Nishi, H.; Fukuyama, T.; Matsuo, M.; Terabe, S.: (1990); Separation and determination of the Ingredients of a Cold Medicine by Micellar Electrokinetic Chromatography With Bile Salts. *Journal of Chromatography*. **498**, 313-323.
45. Nishi, H.; Tsumagari, N.; Kakimoto, T.; Terabe, S.: (1989); Separation of β -lactam Antibiotics by Micellar Electrokinetic Chromatography. *Journal of Chromatography*. **477**, 259-270.
46. Perrett, D., Ross, G.: (1992); Capillary Electrophoresis: a powerful tool for biomedical analysis and research? *Trends Analytical Chemistry* **11** 156-163.
47. Rabel, S. R., and Stobaugh, J. F.: (1993): Applications of Capillary Electrophoresis in Pharmaceutical Analysis. *Pharmaceutical Research*; **10**, 171-186.
48. Reinoud N. J., Ijaden U.R., van der Greef J.: (1994); Automated on Capillary Isotachophoresis Reaction Cell for Fluorescence Derivation of Small Sample Volume at Ice Concentrations Followed by Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of Chromatography C*. **673**, 225-266.
49. Svensson, H.: (1962): Isoelectric Fractionation. Analysis and Characterization of Ampholytes in Natural pH Gradients". *Acta Chemica Scandinava* **16**, 546-466.
50. Weinberg, R.: (1993); Practical Capillary Electrophoresis Academic Press. 65-89; 456-500
51. Wiktorowicz, J. E., (Ed.): (1992); Capillary Electrophoresis. Academic Press New York, 19-22.



52. Yeung, E. S.; Kuhr, W. G. :(1991); Indirect Detection Methods for Capillary Separations, *Analytical Chemistry*. **63**, 275A-282A.
53. Zimmerman, A. Baldesten, J.: (1980) Isotachophoresis Separations of Middle Molecule Peptides in Uremic Body Fluids. Biochemical and Biological Applications of Isotachophoresis. *Analytical Series*. Elsevier Scientific Publishing Company, 141-150.



➤ ***Bibliografía Adicional***

- USP 25
- F.E.U.M. 7ª Edición.
- Application of extraction disks in dissolution tests of clenbuterol and levothyroxine tablets by capillary electrophoresis. *Journal of chromatography A*, 730 (1996) 313-319.
- ECQ016 "Elaboración de métodos específicos para análisis en general".
- ISO0505 "Elaboración de procedimientos normalizados de operación y procedimientos administrativos"
- ECI-011 "Muestreo en línea"
- ECQ-014 Codificación de métodos generales y específicos de materia prima, producto en proceso y producto terminado.
- ECQ-016 Elaboración de métodos específicos para análisis en general.
- ECQ-021 Instructivo de Operación para el uso de la balanza Sartorius AC-009
- ECQ-022 Instructivo de Operación para el uso de la balanza AC-100
- ECQ-028 Instructivo de Operación para el uso del Cromatógrafo de Líquidos HPLC
- ECQ-040 Instructivo de Operación para el uso Cromatógrafo de Líquidos Sistema Gold AC-038E
- ECQ-042 Instructivo de Operación para el uso DE pH / Conductivity Mettler AC-312
- ECQ-043 Instructivo de Operación para el uso de la bomba de vacío
- ECQ-054 Instructivo de Operación para el Equipo de electroforesis capilar
- Video de capacitación para EC
- Manual del usuario de la estación 32 Karat del sistema MDQ P/ACE de EC.