



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN
DE BROMHEXINA Y AMOXICILINA EN FORMULACIONES FARMACÉUTICAS
POR ELECTROFORESIS CAPILAR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A N:

DENISE ARELI CRUZ OLIVA
KARINA GUADALUPE TORRES VELEZ

ASESORA: DRA. ALMA LUISA REVILLA VÁZQUEZ

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ÍNDICE GENERAL :

Índice de figuras	3
Índice de tablas	4
Índice de gráficas	6
Símbolos y Abreviaturas	7
1. INTRODUCCIÓN	9
2. OBJETIVOS	12
3. MARCO TEÓRICO	
3.1 Propiedades Físicoquímicas de principios activos	
3.1.1 Amoxicilina	14
3.1.2 Bromhexina	17
3.2 Generalidades de Electroforesis	
3.2.1 Historia	20
3.2.2 Definición de electroforesis	22
3.2.3 Electroforesis capilar (EC)	23
3.2.3.1 Fundamento de la separación	24
3.2.3.2 Modos de EC	24
3.2.3.3 Instrumentación	26
3.2.3.4 Aplicaciones	28
3.2.3.5 Ventajas de EC sobre HPLC	29
3.2.4 Parámetros de aptitud del sistema	30
3.3 Tratamiento de las muestras	33
3.4 Parámetros estadísticos de desempeño	34
4. PARTE EXPERIMENTAL	
4.1 Material y equipo	37
4.2 Reactivos y estándares	37
4.3 Etapas del desarrollo del método analítico	38
4.4 Formulaciones de las muestras comerciales	39
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	
5.1 Determinación de las condiciones electroforéticas de separación:	
5.1.1 Solubilidad de los principios activos	41
5.1.2 Longitud de onda de detección	44
5.1.3 Características del electrolito soporte	
5.1.3.1 pH	46
5.1.3.2 Naturaleza del buffer	50
5.1.3.3 Concentración	52
5.1.4 Introducción de la muestra	
5.1.4.1 Tipo de introducción	55
5.1.4.2 Longitud de la introducción	57
5.1.5 Diámetro interno del capilar	58
5.1.6 Tiempo de lavado entre corridas	61

5.1.7 Efecto del Voltaje	64
5.1.8 Condiciones electroforéticas de separación (1)	66
5.2 Tratamiento de la muestra y parámetros estadísticos de desempeño	
5.2.1 Solubilidad de excipientes	67
5.2.2 Especificidad	68
5.2.3 Límite de detección de bromhexina	74
5.2.4 Límite de cuantificación de bromhexina	75
5.2.5 Linealidad del sistema	77
5.2.6 Exactitud y Repetibilidad del Método	78
5.2.6.1 Optimización del tratamiento de las muestras	
A) Tiempo de agitación	80
B) Volumen de disolución	81
C) Tipo de agitación	83
D) Medio de dilución	85
D) Evaluación de condiciones de tratamiento de muestra	87
5.2.7 Condiciones electroforéticas de separación (2)	89
5.2.7.1 Límite de detección de bromhexina	91
5.2.7.2 Límite de cuantificación de bromhexina	92
5.2.7.3 Linealidad del sistema	93
5.2.7.3 Exactitud y Repetibilidad del método	95
5.2.8 Determinación de Estándar Interno	96
5.2.8.1 Tetraciclina	
5.2.8.1.1 Linealidad del sistema	97
5.2.8.1.2 Exactitud y Repetibilidad del método	98
5.2.8.2 Loperamida	
5.2.8.2.1 Linealidad del sistema	101
5.2.8.2.2 Exactitud y Repetibilidad del método	102
5.2.8.2.3 Cuantificación en Amoxicibrón suspensión	102
5.2.8.2.4 Cuantificación en Amoxicibrón cápsulas	103
5.2.8.2.5 Aplicación en medicamentos comerciales	104
6. CONCLUSIONES	107
7. BIBLIOGRAFÍA	109
8. GLOSARIO	114
9. ANEXO	118

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura	Título	Pág
1	Benzilpenicilina	14
2	Estructura General de una penicilina	15
3	Estructura Química de la vasicina	18
4	Proceso de electroforesis en solución	21
5	Esquema de electroforesis en placa	22
6	Equipo de Electroforesis	22
7	Fundamento de la separación	24
8	Separación por ECZ	25
9	Esquema con los componentes básicos de un equipo de EC	27
10	Equipo de EC P/ACE™ MQD (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), equipado con un detector UV-VIS de arreglo de diodos	27
11	Electroferograma ejemplo	30
12	Espectro de absorción de la Amox	45
13	Espectro de absorción de la Brom	45
14	Brom y Amox 24µg/ml-70µg/ml respectivamente a 214nm	46
15	Brom y Amox 45µg/ml cada una, en buffer de fosfatos 25mM, pH de 6.24	47
16	Brom y Amox 45µg/ml cada una, en buffer de fosfatos 25mM, pH de 4.42	48
17	Brom y Amox 45µg/ml cada una, en buffer de fosfatos 25 mM, pH 3.09	48
18	Brom (1) y Amox (2), 45µg/ml cada una en un intervalo de pH 2.5–3.5	49
19	Brom (1) y Amox (2) en, fosfatos (25mM), ftalatos y citratos (50mM)	51
20	Diferentes concentraciones de buffer de citratos pH 3	53
21	Brom y Amox con introducción hidrodinámica 0.5 psi por 5s	56
22	Estudio de la introducción electrocinética. 10kV: 5 s (A1), 15 s (A2), 25 s (A3)	56
23	Diferentes tiempos de introducción idrodinámica (5 y 8s) a 0.5psi	57
24	Comparación de capilares de 50 y 75µm de diámetro interno	59
25	Brom(1) y Amox(2) con diferentes voltajes aplicados (25 y 30kV)	64
26	Excipientes 1,2,3,4,5 y 6 a alta concentración	68
27	Brom (Sol. A) y Amox (Sol. B) en placebos cargados (P1, P2 y P3)	70
28	Excipientes 7,8 y 9 a alta concentración	71
29	Brom con excipientes del 1 al 6 (B-1 al B-6) concentrados.	72
30	Placebos blancos. (P1, P2, P3)	72
31	Brom en 2 concentraciones de ácido 50 y 15mM, blanco MeOH:ácido (50mM)	73
32	Primer tratamiento propuesto para la muestra de suspensión Brom-Amoxi	79
33	Variación del medio de dilución	86
34	Comparación de 2 condiciones electroforéticas	90
35	Tratamiento de la muestra final	95
36	Brom y Amox con tetraciclina y oxitetraciclina como estándar interno	97
37	Loperamida y lercandipina en mezcla con Brom-Amox	100

ÍNDICE DE TABLAS :

Tabla	Título	Pág.
1	Resistencia de algunos microorganismos a las aminopenicilinas	15
2	Propiedades fisicoquímicas de la Amoxicilina	15
3	Solubilidad de la Amox	16
4	Propiedades fisicoquímicas de la Bromhexina	19
5	Solubilidad de Brom	19
6	Medicamentos que contienen Amox yBrom en mezcla	20
7	Parámetros a evaluar para determinar condiciones óptimas de separación	38
8	Resultados de solubilidad de Brom a pH ácidos	41
9	Resultados de solubilidad de Brom en disolventes orgánicos	42
10	Resultados de solubilidad de Amox en disolventes orgánicos	42
11	Resultados de solubilidad de Amox en agua desionizada en un intervalo pH 1-10	43
12	Resultados de solubilidad de Brom-Amoxi en mezclas MeOH:agua	43
13	Resultados de orden de adición de disolventes	44
14	Resultados usando buffer de fosfatos 25 mM, pH=3.0 ± 0.1	50
15	Resultados buffer de citratos 50 mM, pH 3	52
16	Resultados buffer citratos 80 mM, pH 3	54
17	Resultados Buffer de citratos 50mM pH= 3	54
18	Resultados con capilar de 75 µm de diámetro interno y 38 cm de longitud	60
19	Resultados con capilar de 50 µm de diámetro interno y 38 cm de longitud	60
20	Condiciones impuestas para el acondicionamiento del capilar al inicio de la jornada de trabajo	61
21	Repetibilidad de Tm. y áreas lavando 1 minuto entre corridas	62
22	Repetibilidad deTm. y áreas lavando 3 minutos entre corridas	63
23	Resultados aplicando 25kV	65
24	Resultados aplicando 30kV	65
25	Condiciones electroforéticas de separación establecidas (1)	66
26	Resultados de Solubilidad de Excipientes	67
27	Disoluciones de Brom y blanco MeOH:agua	73
28	Cálculo del Límite de Detección	75
29	Cálculo del Límite de Cuantificación	76
30	Preparación de Curva de calibración 1	77
31	Recobro en placebos cargados empleando el primer tratamiento	80
32	Variación del tiempo de agitación en placebos cargados	80
33	Efecto del tiempo de agitación en el recobro	81
34	Variación del volumen de metanol en placebos cargados	82
35	Efecto del volumen de metanol en el recobro	82

Tabla	Título	Pág.
36	Variación de agua pH 1 en placebos cargados	82
37	Efecto del volumen de agua pH 1 en el recobro	83
38	Tipo y tiempo de agitación de placebos cargados	83
39	Recobro con agitación magnética de 15 minutos en cada disolvente	84
40	Recobro con agitación ultrasónica 5 minutos en cada disolvente	84
41	Recobro con agitación magnética 10 minutos y ultrasónica 10 minutos	84
42	Recobro con agitación ultrasónica 10 minutos en cada disolvente	84
43	Repetibilidad (muestras diluidas con buffer de citratos 50mM, pH= 3)	86
44	Repetibilidad diluyendo las muestras con agua desionizada	87
45	Exactitud y Repetibilidad en placebos cargados empleando el tratamiento optimizado	88
46	Nuevas Condiciones de separación electroforéticas (2)	89
47	Promedio de corriente y tiempos de migración de los principios activos bajo las condiciones de tabla 46	90
48	Repetibilidad de tiempos de migración y áreas en las condiciones (2)	91
49	Cálculo del Límite de Detección	92
50	Cálculo del Límite de Cuantificación	93
51	Repetibilidad y Recobro en condiciones tabla 46	95
52	Resultados de Principios Activos propuestos como estándar interno	96
53	Parámetros de linealidad con y sin estándar interno	98
54	Repetibilidad y Recobro con estándar interno	99
55	Resultados de los principios activos	100
56	Exactitud y Repetibilidad con estándar interno	102
57	Cuantificación de Amoxicibrón Suspensión	103
58	Cuantificación de Amoxicibrón Cápsulas	104
59	Cuantificación en otros medicamentos comerciales	105

ÍNDICE DE GRAFICAS:

Gráfica	Título	Pág.
1	Comportamiento de Tm Vs buffer de citratos pH = 3.0	55
2	Comportamiento de Tm contra diámetro interno de capilar	61
3	Comportamiento de Tm contra tiempo de lavado entre Corridas con Buffer	63
4	Comportamiento de Tm contra voltaje aplicado	66
5	Curva de calibración de Brom	78
6	Curva de calibración de Amox	78
7	Curva de calibración de Brom	94
8	Curva de calibración de Amox	94
9	Curva de calibración Brom con tetraciclina como estándar interno	98
10	Curva de calibración Amox con tetraciclina como estándar interno	98
11	Curva de calibración Brom con loperamida como estándar interno	101
12	Curva de calibración Amox con loperamida como estándar interno	101

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS:

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	SIGNIFICADO
Amox	Amox
Brom	Brom
EC	EC
susp.	Suspensión
Exp.	Experimental
t.	Tiempo
nm	Nanómetros
g	Gramos
Ml	Mililitros
Mm	Milimolar
µg	Microgramos
Min	Minutos
Vol.	Volumen
Tm.	Tiempo de migración
M	Molar
KV	kilovoltios
Desvest.	Desviación Estándar
C.V.	Coficiente de Variación
µA	Microampers
λ	Longitud de onda
UV	Ultravioleta
S	segundos
Sol.	Solución
Conc.	Concentración
c/u	Cada uno
Tetra	Tetraciclina
loper	Loperamida
N	Platos teóricos
MeOH	Metanol
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución



INTRODUCCION

1. INTRODUCCIÓN

Cuando se tiene interés en medir uno o varios componentes en una muestra, es necesario contar con una metodología de medición (método analítico). Por ello, las empresas de transformación (incluyendo a las industrias farmacéuticas) requieren de este tipo de metodologías, generalmente se utilizan metodologías farmacopeicas o bien se puede dedicar tiempo para el desarrollo de metodologías alternativas, partiendo del hecho de que deben cumplir el atributo de confiabilidad.

La industria farmacéutica es un sector regulado y controlado estrictamente por Secretaria de Salud, por lo cual debe de hacer un control de calidad exhaustivo a los productos farmacéuticos. Cualquier producto antes de salir al mercado debe analizarse a fin de asegurar que contenga una cantidad adecuada de los principios activos que lo componen a fin de evitar algún daño a la comunidad que impacte. Por lo tanto, es vital que la industria farmacéutica cuente con metodologías analíticas que aseguren el adecuado control químico de los medicamentos. Los métodos cromatográficos son hasta el momento los más empleados para la cuantificación de principios activos en mezclas complejas, sin embargo, algunas formulaciones farmacéuticas son un reto difícil de resolver, dadas las propiedades de las sustancias empleadas y las limitantes inherentes de la técnica, siendo necesario contar con métodos analíticos alternativos que resuelvan una problemática existente y que además resulten ser económicos, rápidos, eficientes y confiables con el fin de asegurar la calidad del producto que colocan en el mercado y la confianza de la sociedad.

El control de calidad en la industria farmacéutica es especialmente riguroso porque el producto final está destinado a consumo humano. La determinación del contenido de principio activo, impurezas relacionadas, la uniformidad de contenido por unidad de dosis o las pruebas de estabilidad son ensayos habituales en un laboratorio farmacéutico. El elevado poder de resolución de la electroforesis capilar (EC) la hace una técnica adecuada

para este tipo de ensayos donde es habitual la separación de compuestos con una estructura química muy parecida. ¹

En el presente trabajo se reporta el desarrollo de una nueva metodología analítica que permite la cuantificación de bromhexina (Brom) en mezcla con amoxicilina (Amox) empleando EC como método instrumental de análisis. La problemática de la cuantificación simultánea de estos dos principios activos se debe a la incompatibilidad que se presenta entre ellos cuando se disuelven en agua.

La Brom es poco soluble en agua, y se precipita a valores de pH superiores a 6, mientras que la Amox es más soluble en medios básicos. La primera parte de este trabajo se enfocará por un lado en hacer estudios de solubilidad de los principios activos pero también de los excipientes de las formulaciones a estudiar (suspensión), a fin de asegurar la disolución total de los analitos de interés en presencia de una gran cantidad de excipientes que además se encuentran en mayor proporción.

Por otro lado, se estudiarán los parámetros involucrados con la separación por EC a fin de encontrar las condiciones óptimas de separación. Finalmente se evaluarán algunos parámetros estadísticos que aseguren que la metodología analítica establecida es adecuada para su implementación como método alternativo de control en una industria farmacéutica.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Desarrollar una metodología analítica para determinar bromhexina y amoxicilina en formulaciones farmacéuticas por electroforesis capilar, como un método alternativo al presente en la farmacopea (HPLC), el cual sea rápido, económico y confiable, para realizar el control de calidad en dichas formulaciones.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar la solubilidad de los principios activos y excipientes, mediante pruebas de solubilidad en varios medios de disolución.
- Determinar las condiciones de separación óptimas, que aseguren la separación de bromhexina y amoxicilina, por EC, con una buena resolución ($R_s > 1.5$).
- Establecer el procedimiento de tratamiento de las muestras que garantice la disolución total de los principios activos y porcentajes de recobro entre 98 y 102%.
- Aplicar el método desarrollado para la cuantificación de los principios activos en muestras farmacéuticas comerciales.
- Evaluar algunos parámetros estadísticos del método analítico desarrollado a fin de asegurar su confiabilidad.



MARCO TEORICO

3. MARCO TEÓRICO

3.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE PRINCIPIOS ACTIVOS

3.1.1 AMOXICILINA

La amoxicilina (Amox) es un antibiótico que pertenece al grupo de las penicilinas. Un antibiótico es cualquier compuesto químico utilizado para eliminar o inhibir el crecimiento de organismos infecciosos a través de una toxicidad selectiva, es decir, su efecto tóxico en los organismos invasores es superior al que provoca en el huésped. Su origen puede ser natural, metabolito secundario o sintético².

Con base en su estructura química, los antibióticos se pueden clasificar en los siguientes grupos:

1. Betalactámicos
2. Macrólidos
3. Aminoglicósidos
4. Tetraciclinas
5. Polipeptídicos
6. Polienos

Las penicilinas pertenecen al grupo de los antibióticos betalactámicos y se caracterizan por poseer en su estructura el anillo betalactámico que está compuesto por 3 átomos de carbono y 1 átomo de nitrógeno³. Dicha estructura se observa en la primera penicilina descubierta (figura 1).

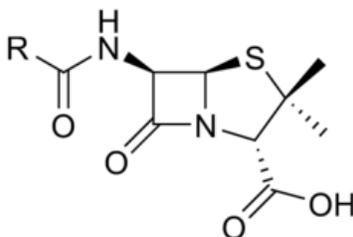


Figura 1. Benzilpenicilina⁴

Debido a que la bencilpenicilina presentaba muchas limitaciones, como un espectro de acción reducido y el ser demasiado sensible a los ácidos, fue necesario modificarla químicamente sustituyendo diferentes elementos de la molécula original. La modificación conserva el núcleo causante del efecto farmacológico, es decir, el ácido 6-aminopenicilánico, que está constituido por una estructura β -lactámico-tiazolidínica anillada la cual se une a una cadena lateral variable.

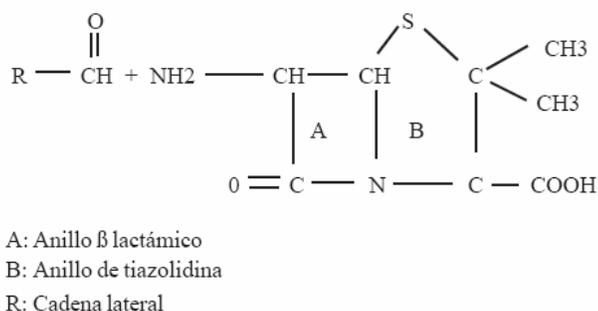


Figura 2. Estructura general de una penicilina⁵

Por esta razón, existe una gran variedad de penicilinas⁶:

- ❖ Penicilina G y V.
- ❖ Aminopenicilinas.
- ❖ Penicilinas antipseudomonas: carboxipenicilinas y ureidopenicilinas.

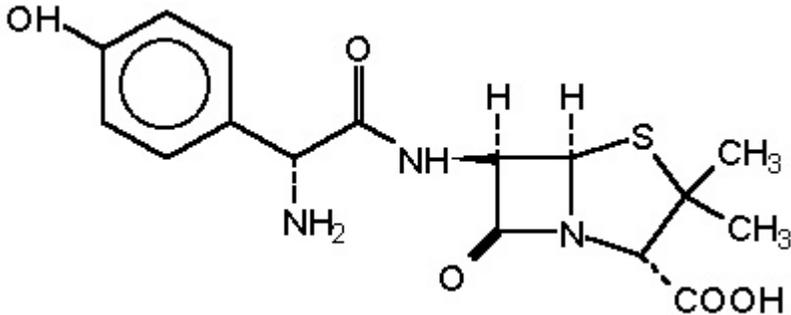
Actualmente el grupo de las aminopenicilinas es muy importante debido a que poseen un amplio espectro contra bacterias gram positivas y gram negativas, por lo que se emplean como primer remedio en infecciones de diferente gravedad, tanto en medicina humana como en veterinaria. En la tabla 1 se muestra la resistencia que presentan algunos microorganismos contra estos compuestos⁷.

Tabla 1. Resistencia de algunos microorganismos a las aminopenicilinas⁴

Tipo de Microorganismo	Resistencia
Meningococos, Listeria monocytogenes	Muy sensible
Neumococos	Resistente
Haemophilus influenzae, Streptococcus viridans	Son inhibidos por bajas concentraciones
Enterococos	Poco resistentes
Neumococcus gonorrhoeae, E. coli Pseudomonas mirabilis, Salmonella Shigella, Enterobacter	Han aumentado notablemente su resistencia en los últimos treinta años
Pseudomonas, Klebsiella, Serratia, Acinetobacter, Ameba proteus	Muy resistentes

Dentro de este grupo de antibióticos (aminopenicilinas) se encuentra la Amoxicilina (Amox). La tabla 2 muestra sus principales propiedades fisicoquímicas.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de la Amoxicilina^{8, 9,10}

Nombre químico IUPAC	7-[2-amino-2-(4-hidroxifenil)-acetil]amino-3,3-dimetil-6-oxo-2-tia-5-azabicyclo[3.2.0]heptano-4-ácido carboxílico.
Nombre común	Amoxicilina
Formula condensada	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S
Peso molecular	365.41 g/mol
Constantes de disociación (pKa)	2.8, 7.2, 9.6
Máximos de Absorción	230, 272 nm (en soluciones ácidas) 247, 291 nm (en soluciones alcalinas)
Formula estructural	

Apariencia, color y sabor: es un polvo cristalino blanco o casi blanco muy higroscópico; presenta un sabor amargo e inodoro.

Solubilidad: Es muy soluble en soluciones acuosas al 10% con un valor de pH entre 8 y 10. En su forma trihidratada presenta la siguiente solubilidad:

Tabla 3. Solubilidad de la Amox^{10, 11}

Disolvente	Solubilidad (mg/ml)
Agua	1:400
Metanol	1:200
Etanol	1:1000
Éter	Insoluble
Cloroformo	Insoluble

Actividad farmacológica:

La amoxicilina está indicada principalmente para el tratamiento de infecciones del aparato respiratorio por lo que suele asociarse a agentes mucolíticos como la bromhexina (Brom) o ambroxol que ayudan a liberar el tracto respiratorio disminuyendo la viscosidad de las secreciones bronquiales para facilitar su expulsión¹².

También se utiliza entre otras cosas para una gran variedad de infecciones por gérmenes sensibles. Éstas incluyen actinomicosis, la bronquitis, la endocarditis, la enfermedad de Lyme, la fiebre tifoidea y paratifoidea, la gastroenteritis, la gonorrea, las infecciones de la boca, del conducto biliar, de las vías urinarias; la neumonía y las enfermedades del bazo.

3.1.2 BROMHEXINA

La Bromhexina (Brom) fue descubierta tras la investigación de la planta asiática *Adhatoda vasica* como un derivado sintético de la vasicina (figura 3) un componente alcaloide de la planta. Se trata de un fármaco mucolítico y expectorante utilizado para contrarrestar el efecto de infecciones respiratorias que provocan una hipersecreción bronquial, es decir un aumento en la viscosidad del moco que va a disminuir su elasticidad y una adherencia muy marcada a las paredes de las vías respiratorias provocando su obstrucción¹³.

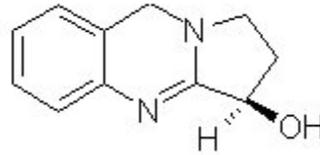


Figura 3. Estructura Química de la Vasicina¹⁴

Los agentes mucolíticos son aquellas sustancias que tienen la capacidad de destruir las distintas estructuras químico-físicas de la secreción bronquial anormal, consiguiendo una disminución de la viscosidad y de esta forma una rápida y fácil eliminación¹³.

Los mecanismos de acción por los que actúan son:

- ❖ Disminución de la tensión superficial
- ❖ Alteración de las fuerzas de asociación intermolecular
- ❖ Ruptura de las fuerzas de cohesión intramolecular

Se clasifican en cuatro grupos¹³:

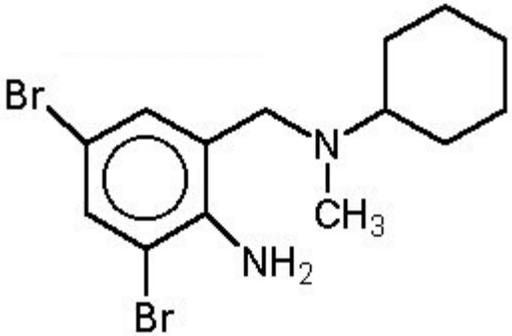
- ❖ Agentes tensoactivos: Propilenglicol y Tyloxapol.
- ❖ Derivados de los aminoácidos: Carboximetilcisteína y N-acetilcisteína.
- ❖ Enzimas: Tripsina, quimiotripsina, etc.
- ❖ Derivados sintéticos: Brom y Ambroxol.

Por otro lado, los fármacos expectorantes son aquellas sustancias que aumentan la eliminación del moco de las vías bronquiales a través de distintos mecanismos¹⁵:

- ❖ Mecanismo reflejo
- ❖ Estimulación vagal a nivel bulbar
- ❖ Estimulación a nivel bronquial con parasimpaticomiméticos
- ❖ Actuación directa a nivel bronquial y células caliciformes.

La tabla 4 muestra las principales propiedades fisicoquímicas de la Bromhexina.

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de la Bromhexina^{10, 11, 16,17}

<i>Nombre químico IUPAC</i>	2,4-dibromo-6-[(ciclohexil-metil-amino)metil]anilina
<i>Nombre común</i>	Bromhexina
<i>Formula condensada</i>	C ₁₄ H ₂₀ Br ₂ N ₂
<i>Peso molecular</i>	376.1 g/mol
<i>pKa</i>	8.5
<i>Máximos de absorción</i>	254 nm (en soluciones ácidas) 262 nm (en soluciones alcalinas)
<i>Formula estructural</i>	

Apariencia, color y olor: es un polvo cristalino blanco o casi blanco, inodoro, sensible a la luz y con un punto de fusión de 235°C.

Solubilidad: el clorhidrato de Bromhexina es muy poco soluble en agua, alcohol y cloruro de metileno. La tabla 5 muestra los datos de solubilidad.

Tabla 5. Solubilidad de Brom^{10, 11}

Disolvente	Solubilidad (mg/ml)
Agua	1:250
Metanol	1:50
Etanol	1:100
Cloroformo	1:300
Acetona	Insoluble

Debido a que la bromhexina ayuda a descongestionar las vías respiratorias, la industria farmacéutica la asocia con algunos antibióticos utilizados en el tratamiento de dichas enfermedades con el fin de acelerar la recuperación del individuo enfermo. Las presentaciones farmacéuticas que existen en México que asocian la amoxicilina a la bromhexina como agente mucolítico son las siguientes¹⁸:

Tabla 6. Medicamentos que contienen Amox y Brom en mezcla¹⁸

Nombre Comercial	Fabricante	Formulación
Acroxil-C	QUIM.SON'S	Suspensión
Ambrexin	IVAX	Suspensión
Amoxibrón	GLAXO SMITHKLINE	Suspensión y cápsulas
Bromel inf.	AMSA	Suspensión
Bromel adt.	AMSA	Suspensión
Bromixen	MAVER	Suspensión y cápsulas
Bromoxil	VITAE	Suspensión y cápsulas
Lumoxbron S	IQFA	Suspensión
Mucoxina	BRULUAGSA	Suspensión y cápsulas
Penamox M	SANFER	Suspensión y cápsulas

3.2 GENERALIDADES DE ELECTROFORESIS

3.2.1 HISTORIA

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 (Moscow)¹. Allí se describe la experiencia, donde se observa el comportamiento migratorio de pequeñas partículas de arena en un ámbito de agua transparente contenido en un recipiente de vidrio con un lecho de arena fina en su fondo y dos tubos conteniendo electrodos de una batería. 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 EC.

Varios años más tarde, en 1816, fue observado el transporte del agua por acción de la corriente generada por la polarización negativa del capilar que une los dos recipientes electródicos¹⁹.

En la figura 4 se ilustra la migración de los iones en solución con carga positiva al cátodo y los aniones al ánodo.

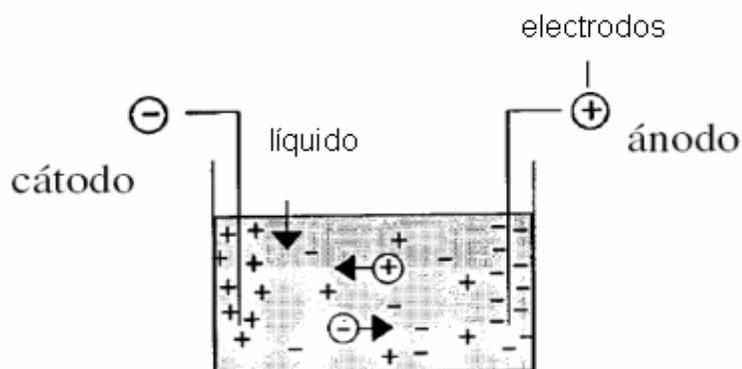


Figura 4. Proceso de electroforesis en solución²⁰

En 1909, Michaelis sugiere el nombre de electroforesis, pero es hasta 1937 donde Anie Tiselius perfecciona un instrumento para llevar a cabo la electroforesis de zona, él separó mezclas de proteínas en una solución reguladora, en un tubo en forma de “U” aplicando un campo eléctrico de corriente continua, no pulsante, estudios que lo hicieron acreedor al Premio Nobel en Química en 1948¹⁹.

Sin embargo, la eficiencia de la separación en solución libre se vio limitada por que al aplicar energía se calentaba el sistema y no se obtenían resultados reproducibles, por ello se comenzó a utilizar medios anti-convectivos como el papel y después los geles de poliacrilamida y agarosa, a la cual se le denominó electroforesis convencional.¹

Las técnicas electroforéticas que más se han desarrollado están en la actualidad aplicadas al campo de las proteínas y productos de la biología molecular, como son los geles de agarosa y poliacrilamida en placas o películas de distinto espesor verticales u horizontales. Dicha separación se ilustra en la figura 5.

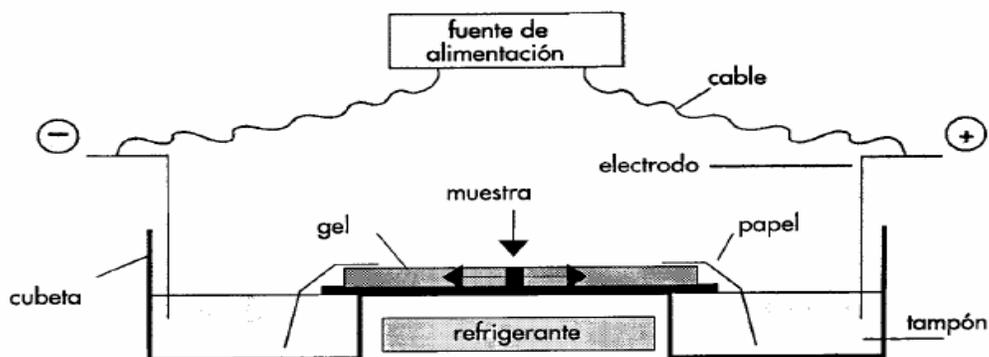


Figura 5. Esquema de Electroforesis en placa²⁰

La electroforesis convencional ha sido y continua siendo de gran utilidad, sin embargo, este tipo de separación electroforética es lenta, laboriosa, difícil de automatizar y además no proporciona resultados cuantitativos precisos.

3.2.2. DEFINICIÓN DE ELECTROFORESIS

El término electroforesis es empleado para describir la migración de partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico²¹; representa una de las técnicas de separación más ampliamente utilizadas en el área de la química. En la figura 6, se representa un equipo de electroforesis sencillo, donde al aplicar un campo eléctrico, los cationes migran al cátodo y los aniones al ánodo.

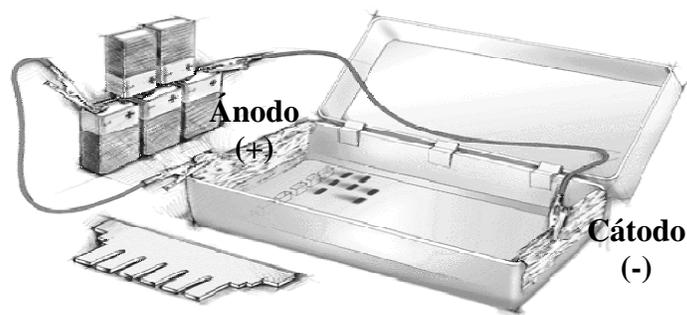


Figura 6. Equipo de Electroforesis²²

3.2.3 ELECTROFORESIS CAPILAR (EC)

Lo que revolucionó esta técnica de separación fue la investigación y aplicación de la electroforesis llevada a cabo en capilares de diámetro muy pequeño. El trabajo inicial en lo que hoy se conoce mundialmente como electroforesis capilar (EC) en tubo abierto fue descrito por Hjertén en 1967.²¹

En 1974 Virtanen hizo una publicación sobre electroforesis en tubos de cristal de 200-500µm; en 1979 Mikkers, Everaerts y Verheggen, realizaron la electroforesis en capilares de cristal y teflón de 200µm de diámetro interno. En 1981, Jorgenson y Luckas realizaron separaciones electroforéticas usando tubos capilares de 75µm de sílice fundida.¹⁹

El uso de capilares de sílice fundida de diámetro interno tan pequeño ha permitido un progreso excepcional en la electroforesis puesto que el uso de capilares mejora en mucho la disipación del calor generado al aplicarse un cierto potencial hasta 30,000 voltios. Este incremento en el voltaje tuvo como consecuencia que los tiempos de análisis se disminuyan drásticamente, además de aumentar la resolución y poder hacer la detección en línea puesto que la sílice no absorbe la luz ultravioleta o visible, lo que ha dado un crecimiento explosivo con la aparición de varios instrumentos en el mercado²¹.

Otro paso significativo fue hecho por Terabe y colaboradores en 1984, ya que desarrollaron la Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar, la cual involucra la adición de surfactantes al electrolito soporte, para formar micelas y así permitir la separación de sustancias neutras y aumentar la resolución de otros compuestos.

Desde entonces la EC ha crecido rápidamente como técnica analítica; sobretodo con la introducción de equipos comerciales automáticos a finales de los años 80.

Esta técnica se caracteriza por su alta eficiencia de separación, su rapidez, así como por el bajo consumo de reactivos y disolventes orgánicos. Con esta técnica ha sido posible separar cationes, aniones y sustancias no cargadas, en forma simultánea.¹

3.2.3.1 FUNDAMENTO DE LA SEPARACIÓN

Las especies cargadas (iones) se mueven y se separan bajo la influencia de un campo eléctrico en función de su distinta velocidad de migración. Dichas movilidades electroforéticas son resultado de la diferencia entre partículas de su relación masa/carga y de la conformación estructural de las mismas.

Esta separación se ilustra en la figura 7, si se hace una corrida normal, es decir, que el flujo vaya de ánodo a cátodo, los cationes con mayor carga salen primero, luego en conjunto todos los neutros con el FEO y al final los aniones. Los iones cargados se separan a su vez por su diferencia de masa, es decir, primero los más ligeros y después los más pesados¹. El FEO es definido como el flujo de líquido en el interior del capilar originado por la carga eléctrica negativa existente en la pared interna del capilar. En el caso de los capilares de sílice fundida esta superficie de carga es generada por la ionización de los grupos silanol a valores de pH mayores de 3²¹.

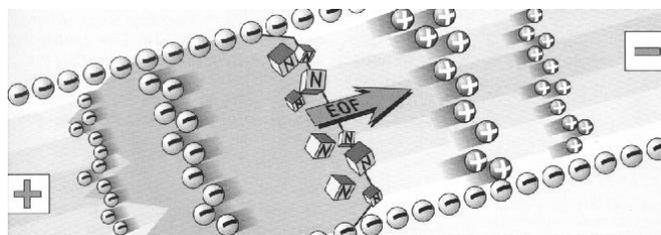


Figura 7. Fundamento de la separación²³

3.2.3.2 MODOS DE EC

La EC es una poderosa técnica analítica para la separación, determinación y cuantificación de moléculas grandes y pequeñas. Gracias a las ventajas que presenta, ha permitido que sea utilizada en varias áreas tales como química, bioquímica clínica y general, biotecnología, farmacia, industria alimenticia, ambiental, ciencias médicas, ciencias veterinarias, ciencias forenses, etc¹⁹.

La necesidad de optimizar separaciones para una gran variedad de compuestos tiene como resultado diferentes modalidades de trabajo que se han desarrollado para expandir el número de aplicaciones de esta técnica con la gran ventaja de que se pueden realizar usando el mismo equipo. Las diferentes modalidades que se trabajan hasta el momento son¹:

- Electroforesis Capilar de Zona (ECZ)
- Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar (MEKC o MECC)
- Electroforesis Capilar de Enfoque Isoeléctrico (CIEF o ECEI)
- Electroforesis Capilar de Gel (CGE o ECG)
- Isotacoforesis Capilar (CITP o ITC)
- Electro cromatografía Capilar (ECC)

A continuación solo se comentará de la modalidad utilizada para el desarrollo del método analítico la cual fue la Electroforesis Capilar de zona (ECZ):

Esta modalidad es por mucho la más utilizada como modo de separación, debido a la simplicidad de operación y su versatilidad. El capilar es llenado sólo con un electrolito soporte y la migración de los analitos se da en zonas discretas y a diferentes velocidades. La migración de las especies iónicas, es posible debido a la influencia del campo eléctrico generado y su separación se debe a su distinta movilidad, la cual está vinculado a su relación carga/masa, generando zonas iónicas¹, (figura 8).

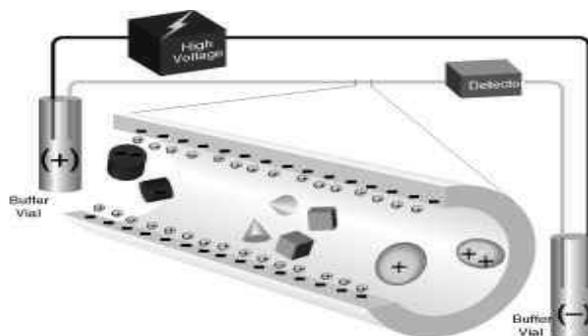


Figura 8. Separación por ECZ²⁴

3.2.3.3. INSTRUMENTACIÓN

Los equipos comerciales aparecieron en 1988, y en el primer simposio internacional de 1989 se mostraron los avances extraordinarios de este logro analítico¹.

El equipo está constituido por:

- Fuente de poder (FP) de alto voltaje (5 a 30kV) y hasta 300 μ A de corriente.
- Capilar de sílice fundida de 25 a 200 μ m de diámetro interno y de 300 a 400 μ m de diámetro externo.
- Sistema de enfriamiento, que puede ser por líquido refrigerante o por aire.
- Electrodo de platino que se encuentran ubicados en el recipiente que contiene el buffer, que además de servir para su contacto recibe los extremos del capilar.
- Depósitos o viales, donde se colocan los buffers o muestras en solución.
- Charolas que contiene los buffers y las muestras. Con un movimiento de ascenso y descenso pueden enviar cada una de las soluciones empleadas en la corrida al capilar o a los recipientes electródicos.
- Detector, para la identificación de los compuestos separados por EC.
- Terminales de salida que 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 computadora.

En la figura 9, se pueden ver los componentes básicos de un equipo de EC.

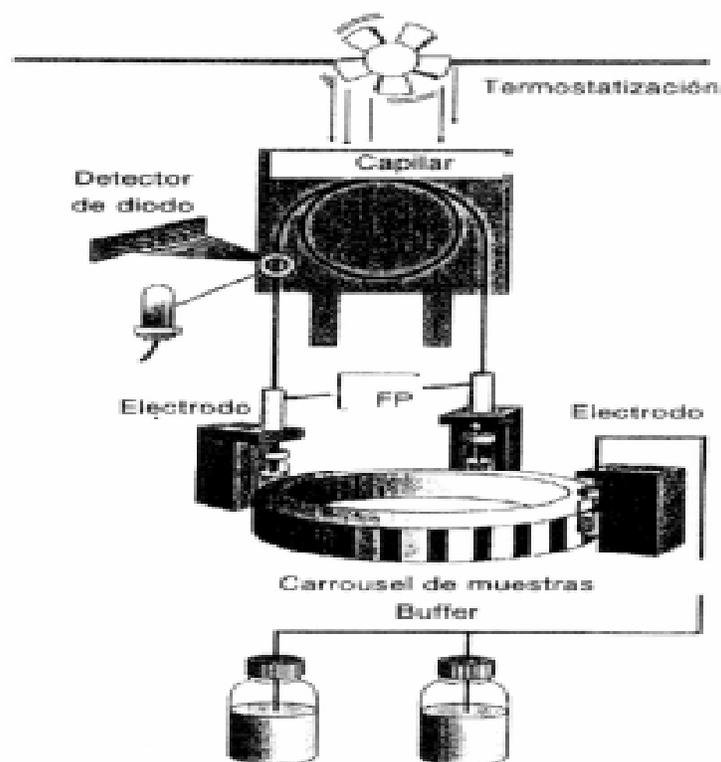


Figura 9. Esquema con los componentes básicos de un equipo de EC¹⁹

Como ya se ha dicho una de las ventajas de la EC es su automatización, en la figura 10 se muestra el equipo de EC en el cual se llevó a cabo el desarrollo del método, así como su sistema de salida computarizado.



Figura 10. Equipo de EC P/ACE™ MQD (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) equipado con un detector UV-VIS de arreglo de diodos²⁵

3.2.3.4. APLICACIONES

El incremento necesario de técnicas analíticas poderosas y la disponibilidad comercial de los instrumentos de EC recientemente ha ofrecido estímulos para mejorar técnicas y explotar nuevas áreas de aplicaciones prácticas. Algunas de las aplicaciones han sido agrupadas en categorías para ilustrar las metodologías y aprobar el desarrollo basado en este rápido crecimiento analítico de la técnica. En este apartado sólo se mencionarán algunas aplicaciones en la industria farmacéutica, las cuales son afines al método desarrollado en la presente tesis.

INDUSTRIA FARMACÉUTICA:

El área farmacéutica es uno de los campos de acción donde la electroforesis es muy empleada. Esta técnica se puede utilizar en cada uno de los pasos de producción de los medicamentos: en la caracterización y control de las materias primas, cuantificación del (los) principio(s) activo(s) a lo largo de todo el proceso de producción y en el producto final. Además, durante el desarrollo y prueba de nuevos medicamentos, en estudios farmacocinéticos, en el monitoreo terapéutico de los principios activos y sus metabolitos²¹.

Las cantidades de medicamentos que son analizados en sus diferentes formulaciones farmacéuticas utilizando alguna de las modalidades de EC es casi interminable. Las aplicaciones reportadas se pueden dividir en dos grandes categorías:

Medicamentos solubles en agua (Amox), o medicamentos insolubles en agua (Brom). Los compuestos con características básicas (Brom y Amox), se pueden analizar por ECZ en un medio ácido (pH 2-4) mientras que los compuestos ácidos se analizan entre un pH de 6 a 10. Cuando estos compuestos no se separan bajo condiciones simples de ECZ, el uso de tensoactivos puede ayudar a su separación²¹.

La industria farmacéutica necesita para la determinación de impurezas relacionadas con el principio activo (impurezas de síntesis o productos de degradación) una técnica con sensibilidad y poder de resolución suficiente.

La EC es una técnica muy exitosa en el campo de las separaciones quirales por su alta eficacia y por la variedad de selectores quirales disponibles. Se desarrollan métodos analíticos en condiciones quirales y aquirales que permiten determinar, respectivamente, el contenido total de principio activo y del enantiómero minoritario. De lo anterior, se deduce que la EC es una técnica válida y en muchos casos ventajosa para desarrollar métodos analíticos para compuestos de interés farmacéutico²¹.

Entiéndase por método analítico como la descripción de la secuencia de actividades; recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra y como todo proceso de medición, éste debe ser confiable para ser utilizado con un propósito definido⁸.

3.2.3.5 VENTAJAS DE EC sobre HPLC¹⁹

- La cantidad de muestra necesaria se reduce a unos cuantos microlitros (5-10µl).
- El gasto en disolventes, aditivos y demás reactivos es mínimo, de ahí sus bajos costos y los casi nulos daños al ambiente.
- La utilización de medios acuosos como electrolito soporte, facilita la predicción de las especies dentro del capilar.
- La disipación del calor en el tubo capilar es buena y, por lo tanto, los cambios de temperatura son muy pequeños y los resultados presentan mayor reproducibilidad.
- Dada la rápida disipación del calor, es posible utilizar voltajes muy altos (hasta 30kV), lo cual disminuye los tiempos de análisis y aumenta la resolución entre los picos.
- El costo de cada capilar es insignificante en comparación con el de una columna cromatográfica u otra columna en general.
- Una eficiencia mayor de 10^4 a 10^6 platos teóricos, debido al flujo plano que se genera, en comparación con el flujo parabólico producido en HPLC.

3.2.4 PARÁMETROS DE APTITUD DEL SISTEMA

En el caso de la EC la señal del detector como función del tiempo es la base de la obtención del “electroferograma” el cual muestra el registro de la composición de la muestra, mediante bandas o picos²⁶.

El electroferograma se define como una imagen que traduce visualmente en una pantalla la evolución, en función del tiempo, de un parámetro que depende de la concentración instantánea del soluto a la salida del capilar²⁶.

La línea base corresponde al trazado obtenido en ausencia del compuesto analizado. La separación se completa cuando el electroferograma presenta tantos picos que vuelven a la línea base como compuestos hay en la mezcla de análisis, como se observa en el electroferograma de la figura 11.

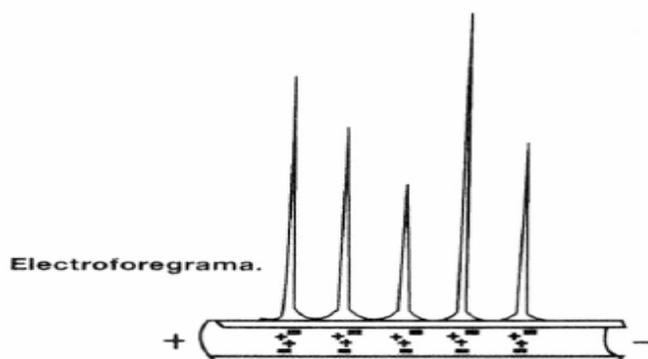


Figura 11. Electroferograma ejemplo¹⁹

Un compuesto se caracteriza por su tiempo de migración t_m que representa el tiempo transcurrido entre el instante de introducción y el determinado cuando el pico correspondiente en el electroferograma alcanza su máximo¹.

En el análisis cuantitativo hay que conformarse a menudo con separar de la mezcla él o los componentes a cuantificar. Si la señal enviada por el detector varía linealmente con la concentración de un compuesto, lo mismo ocurrirá con el área del pico correspondiente en el electroferograma.

Los parámetros de aptitud del sistema puede determinarse utilizando mezclas de muestras estándar, y se pueden establecer a partir de los electroferogramas obtenidos, dichos parámetros son²⁷:

a) Forma del Pico: Idealmente, el pico debería ser simétrico, sin hombros y sin excesiva asimetría, es decir, el mismo aspecto que la función representativa de la ley de distribución normal (curva de Gauss), aunque en electroferogramas reales están lejos muchas veces de presentar picos con ésta forma tan perfecta, se deben tomar acciones correctivas antes de seguir con el desarrollo del método, aunque es aceptable utilizar picos muy asimétricos siempre y cuando sean reproducibles y no comprometan la selectividad de la separación²⁷.

b) Resolución: Constituye una medida cuantitativa de su capacidad para separar 2 analitos. Para definir numéricamente el que una separación entre 2 componentes sea más o menos buena, se emplea el factor Rs (o simplemente resolución), que se calcula a partir de los datos obtenidos del electroferograma²⁶:

$$R_s = 2(t_{m(2)} - t_{m(1)}) / (W_1 + W_2)$$

donde: $t_{m(2)}$ = Tiempo de migración del analito 2

$t_{m(1)}$ = Tiempo de migración del analito 1

W_2 = Ancho del pico del analito 2

W_1 = Ancho del pico del analito 1

Analito 2 para el pico con la migración más lenta y Analito 1 para el pico con la migración más rápida.

A partir de $R_s > 1.5$ se considera una buena resolución

c) Factor de separación (o de selectividad) entre 2 solutos: Este factor, α , permite precisar las posiciones relativas de 2 picos adyacentes en un electroferograma; se define a través de la siguiente expresión²⁶:

$$\alpha = t_{m(2)} / t_{m(1)}$$

Se considera que existe una buena selectividad cuando $\alpha > 1$

d) Eficiencia o eficacia: Término general usado para expresar el pico producido por una separación, este parámetro es medido en número de platos teóricos a partir del electroferograma con la utilización de una simple regla de medir longitudes²⁶.

Platos teóricos:

Se calculan a partir de un electroferograma utilizando la siguiente ecuación²⁸:

$$N = \frac{(\mu \pm \mu_{eo})V}{2D}$$

donde: N = el número de platos teóricos
 μ = movilidad electroforética
 μ_{eo} = movilidad del FEO
D = Promedio de coeficientes de difusión
V = Voltaje aplicado

La medida de la eficiencia reside en que mientras mayor sea el número de platos teóricos el proceso de separación es más eficiente²⁸.

e) Repetibilidad

Es la concordancia de los valores de tiempo de migración y áreas entre cada corrida de una misma solución, los cuales deben presentar una desviación estándar menor al 0.5% o un Coeficiente de Variación menor al 2%.⁸

Para esto se emplean datos de 5 o más introducciones repetidas.

$$CV = \left(\frac{S}{\bar{x}} \right) * 100$$

donde:
CV = coeficiente de variación
S = Desviación estándar
 \bar{X} = Promedio

A menor CV hay mayor repetibilidad.

3.3 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS:

Para llevar a cabo un análisis químico con ayuda de un instrumento la muestra que va a ser medida debe estar bajo una forma adaptada al mismo. Dependiendo de los equipos y los métodos utilizados, la puesta a punto del proceso de acondicionamiento puede requerir diversas clases de tratamientos. La calidad de un análisis depende a menudo de la forma en la que se haya realizado esta etapa preliminar. Su influencia sobre el resultado es incluso más importante que la medida en sí misma o la precisión del instrumento utilizado. Este acondicionamiento de la muestra para el análisis, que se realiza a continuación del muestreo propiamente dicho, puede ser laborioso, delicado y llevar un cierto tiempo. Constituye, por lo tanto, un campo activamente estudiado en la actualidad que se beneficia de toda clase de hallazgos recientes en los campos de la química y de la robotización. Los instrumentos actuales, para los que son suficientes muestras muy pequeñas, han favorecido la aparición de nuevos procedimientos que tienden sobre todo a reducir los tiempos de preparación.

La aplicación de un método analítico es siempre más fácil cuando no hay interferencia entre la especie o especies a medir y la matriz que compone la muestra. En caso contrario, previamente al análisis, es necesario separar los compuestos a medir, que se denominan genéricamente analitos. Un analito se define como un componente específico en una muestra a medir en un análisis.⁸

Los analitos se encuentran dispersos en el seno de una matriz sólida o líquida, y raramente se presentan bajo una forma que permita hacer una medida directa. Por tanto, se requiere eliminar todos aquellos materiales que podrían producir interacciones, también llamadas interferencias, un fenómeno indeseable y de importancia muy variable según la técnica de medida aplicada, pero que pueden ser muy significativas cuando se trata de medir trazas en el seno de otros compuestos mayoritarios.

Para aumentar la selectividad y la sensibilidad, los analistas han reconocido desde hace mucho tiempo la necesidad de disponer de procesos de tratamientos de la muestra, eficaces y reproducibles, previos a la medida. Existen, por tanto, numerosos protocolos específicos cuya descripción va desde la toma de la muestra bruta hasta la presentación de resultados²⁶.

Este trabajo previo a la medida conlleva un consumo excesivo de tiempo y por ello algunos procedimientos clásicos, basados en métodos tradicionales como la absorción, la extracción, la filtración o la precipitación, han tenido que ser mejorados. Otros han sido introducidos para ganar tiempo²⁹.

Esta tesis está, en gran medida, destinada al tratamiento realizado a las muestras antes del análisis por EC²⁶. En este caso se echará mano de las propiedades fisicoquímicas, como la solubilidad de los analitos y la técnica de filtración por vacío, para eliminar cualquier interferencia de la matriz insoluble en el medio.

3.4 PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DE DESEMPEÑO

Como es bien sabido, todo producto farmacéutico debe reunir atributos de identidad, pureza, concentración, potencia, inocuidad y disponibilidad para cumplir con los aspectos normativos oficiales e internos y no menos importantes, los éticos, por lo que, la industria se auxilia de los métodos analíticos ya sea farmacopéicos o desarrollados por ellos mismos, para realizar dichas evaluaciones a las características críticas de calidad del producto, y de esta forma se evita el riesgo de afectar al usuario final que es un paciente⁸.

Dicha confiabilidad puede ser justificada evaluando algunos parámetros estadísticos de desempeño (parámetro específico a estudiar en un método analítico) como:

- a) Linealidad del sistema: Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado⁸.

-
-
- b) Especificidad: Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra⁸.
 - c) Exactitud: Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia⁸.
 - d) Límite de detección: Concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas⁸.
 - e) Límite de cuantificación: Concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas⁸.
 - f) Recobro: Cantidad del analito determinada en el placebo cargado o muestra cargada, empleando el método analítico⁸.
 - g) Repetibilidad: Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y métodos⁸.

PARTE
EXPERIMENTAL

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiales y Equipo

- ❖ Material de cristalería (vasos de precipitados, pipetas volumétricas y graduadas, matraces volumétricos, probetas, matraz kitazato, etc.)
- ❖ Embudo Buchner
- ❖ Papel filtro
- ❖ Viales
- ❖ Manguera para vacío
- ❖ Barra magnética
- ❖ Tapones para viales
- ❖ Espátula
- ❖ Propipetas
- ❖ EC P/ACE™ MQD (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), equipado con un detector UV-VIS de arreglo de diodos.
- ❖ Agitador magnético (Thermolyne, MIRAK™)
- ❖ Ultrasonido (Transsonic 570, ELMA)
- ❖ Bomba de vacío (Alltech, Benchtop Vaccum Station).
- ❖ Balanza analítica (BOECO Germany con 0.0001g de precisión)
- ❖ Equipo desionizador de agua tipo 1 (MilliQplusMillipore®)
- ❖ PH meter HI 931401 (Hanna Instruments)

4.2 Reactivos y Estándares

- ❖ Ácido cítrico (J.T. Baker Xalostoc, Edo. de Méx., México)
- ❖ Hidróxido de sodio (J.T. Baker Xalostoc, Edo. de Méx., México)
- ❖ Fosfato de sodio monobásico (J.T. Baker Xalostoc, Edo. de Méx., México)
- ❖ Metanol (J.T. Baker Xalostoc, Edo. de Méx., México)
- ❖ Ácido clorhídrico (Técnica Química, DF, México).
- ❖ Agua desionizada
- ❖ Estándar primario de Clorhidrato de Brom clave 18, Grimann, Lote BRX-02706-C, pureza = 99.9%
- ❖ Estándar secundario de Trihidrato de Amox clave 16, Grimann, Lote HPLCESAXT-006, pureza = 88.7%

4.3 ETAPAS DEL DESARROLLO DEL MÉTODO

ETAPA 1. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE SEPARACIÓN ELECTROFORETICA

Para el desarrollo del método para la separación de Brom y Amox por EC, se realizó el estudio de cada uno de los factores involucrados en la separación (tabla 7):

Tabla 7. Parámetros a evaluar para determinar condiciones óptimas de separación

Objetivo	Factores De Estudio	Criterio De Selección
Solubilidad de Brom y Amox	Medio de disolución	Solución o mezcla de soluciones en donde ambas sean solubles.
Selección de la longitud de onda óptima para la detección	Máximo de absorción	Obtener una longitud de onda donde ambos compuestos absorban y den una buena señal.
pH, naturaleza y concentración del electrolito soporte	pH en un rango de 2 a 6 Naturaleza (citratos, fosfatos, ftalatos, mixto) Concentración (25, 50, 75, 100mM)	Obtener la respuesta analítica con una mayor eficiencia, resolución, picos gaussianos, menor tiempo de migración y reproducibilidad.
Tipo y tiempo de introducción	Electrocinética ó Hidrodinámica (5 y 8 s)	
Tiempo de lavado	Variar minutos de lavado con buffer entre corridas	
Diámetro y largo del capilar	Diámetro interno 50 y 75 μ m y Largo 39 y 30cm	
Voltaje	25 y 30kV	

ETAPAS 2 y 3. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA y EVALUACIÓN DE PARÁMETROS ESTADÍSTICOS:

Una vez desarrolladas las condiciones óptimas de separación electroforética de los analitos, se evaluó el tratamiento de la muestra, se realizaron pruebas de solubilidad para los excipientes, debido a que no todos fueron solubles, se utilizó filtración por vacío para separarlos, al mismo tiempo se evaluó la especificidad del método, es decir evitar interferencias de los excipientes que fueron solubles; finalmente se optimizaron los volúmenes de disolventes agregados a la muestra, hasta obtener % de recobro entre el 98 y 102%, para la cual se tuvo que evaluar la linealidad del método, con curva de calibración para la cuantificación en placebos cargados.

4.4. FORMULACIONES DE LAS MUESTRAS COMERCIALES

Amoxibrón suspensión (250/8mg)

Amoxicilina Trhidratada polvo	3,750mg
Clorhidrato de Bromhexina	120mg
10 Excipientes (conocidos)	c.b.p. 37,500 mg

NOTA: La proporción existente entre la cantidad de Amoxicilina y Bromhexina es de 31.25:1mg respectivamente, dicha proporción es la que se utiliza para la preparación de las disoluciones con estándares para el desarrollo del método. Así como también durante todas las pruebas realizadas con excipientes, éstos se utilizan en la misma proporción que se encuentran en la muestra comercial.

Amoxibrón cápsulas (500/8mg)

Amoxicilina Trhidratada polvo	500mg
Clorhidrato de Bromhexina	8mg
1 Excipiente (conocido)	c.b.p. 1 cápsula

RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ELECTROFORETICAS DE SEPARACIÓN.

5.1.1 SOLUBILIDAD DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS

Como se sabe una de las condiciones para poder hacer un análisis de una muestra por EC, es que los analitos de interés se encuentren en disolución, por lo que es muy importante tener solubles y por lo tanto saber su solubilidad, y en el caso de que no se conozca, realizar las pruebas de solubilidad correspondientes. Por lo tanto uno de los objetivos de este proyecto, es encontrar un disolvente o una mezcla de disolventes que permitan solubilizar tanto a la Amox, como a la Brom, ya que se encuentran presentes en la misma muestra, para lo que se realizaron las siguientes pruebas de solubilidad.

Brom:

Ya que la bibliografía indica que la Brom se precipita a pH mayor de 6¹⁷, se decidió hacer pruebas de solubilidad en soluciones ácidas, con valores de pH menores a 6, para lo cual, se realizaron pesadas independientes de 6 mg de Brom (Materia Prima = m.p.), y se probó la solubilidad en agua desionizada ajustada a un intervalo de valores de pH de 1 a 6, poniendo como máximo 15ml adicionados en 30 minutos de agitación magnética (barra magnética), los resultados obtenidos fueron los siguientes (tabla 8):

Tabla 8. Resultados de solubilidad de Brom a pH ácidos

pH	Volumen (ml)	Agitación (min)	Resultado
1.01	10	20	Insoluble
2.00	10	20	Parcialmente soluble
3.02	10	20	Parcialmente soluble
4.01	15	30	Parcialmente soluble
5.02	15	30	Insoluble
6.02	15	30	Insoluble

Debido a que la Brom no fue soluble a pH ácido, se decidió hacer las pruebas de solubilidad ahora con disolventes orgánicos. Se realizaron pruebas, pesando 6mg de Brom m.p; aproximadamente y se agregó el disolvente, poniendo como máximo 15ml y 20 minutos de agitación (tabla 9).

Tabla 9. Resultados de solubilidad de Brom en disolventes orgánicos

Disolvente	Volumen (ml)	Agitación (min)	Resultado
MeOH	1	2	Soluble
EtOH	3	5	Soluble
Acetonitrilo	15	20	Parcialmente soluble

Ya que la Brom se solubilizó totalmente en MeOH (metanol), en poco volumen y tiempo, se decidió usar a éste como su disolvente y ahora hacer la prueba de solubilidad a la Amox.

Amox:

Se hicieron las pruebas de solubilidad de Amox en los mismos disolventes orgánicos que Brom, pesando 174.0 mg aprox.; los resultados se presentan en la tabla 10:

Tabla 10. Resultados de solubilidad de Amox en disolventes orgánicos

Disolvente	Volumen (ml)	Agitación (min)	Resultado
MeOH	30	30	Insoluble
EtOH	30	30	Insoluble
Acetonitrilo	30	30	Parcialmente soluble

Ya que en ninguno de los disolventes orgánicos probados fue soluble la Amox, se decide probar su solubilidad ahora en agua desionizada ajustada a diferentes valores de pH en un intervalo de 1-10, agregando un máximo de 40ml y 20 minutos de agitación mecánica, (tabla 11):

Tabla 11. Resultados de solubilidad de Amox en agua desionizada en un intervalo de pH de 1 - 10

pH	Volumen (ml)	Agitación (min)	Resultado
10	40	20	Insoluble
9	40	20	Insoluble
8	40	20	Insoluble
7	40	20	Insoluble
6	40	20	Insoluble
5	40	20	Insoluble
4	40	20	Insoluble
3	40	20	Insoluble
2	35	20	Parcialmente soluble
1	20	10	Soluble

Ya que la Amox fue soluble en agua desionizada ajustada a pH de 1, se eligió éste como su disolvente óptimo. Sin embargo, como ambos principios activos están juntos en la muestra comercial, es necesario comprobar que la Brom no precipite al agregar el agua pH 1 o que, la Amox lo haga al agregar el metanol, por lo que se realizó una mezcla de Brom y Amox (5.4 y 174.3mg respectivamente, proporción en la que se encuentran en la muestra comercial), a la cual se le agregó 5ml de MeOH para disolver la Brom, después 40ml de agua pH 1 y la Brom permanece soluble, así que se agregan otros 20 ml de agua pH 1 y ambos permanecieron solubles, por lo tanto, podía ser posible su solubilización en mezcla.

Se decidió probar la solubilidad empleando mezcla de MeOH:agua, en diferentes proporciones, (tabla 12).

Tabla 12. Resultados de solubilidad de Brom-Amox en mezclas MeOH:agua

MeOH:Agua	Volumen (ml)	Agitación (min)	Resultado
1:20	30	20	Insolubles
1:10	30	20	Insolubles
1:5	30	20	Insolubles
1:1	30	20	Insolubles

Como se puede observar en la tabla 12, ambos principios activos fueron insolubles en las mezclas de MeOH:agua, por lo que se decidió hacer una prueba más, pero ahora agregando por separado cada uno pero variando el orden de adición del agua pH=1 y MeOH, (tabla 13):

Tabla 13. Resultados de orden de adición de disolventes

Adición 1	Adición 2	Agitación (min)	Resultado
5ml MeOH	20ml de agua pH= 1	20	Ambos solubles
20ml agua pH=1	5ml MeOH	20	Soluble solo Amox

Con base a lo anterior la forma de solubilizar 6mg de Brom y 175mg de Amox en mezcla, es primero agregar 5ml de MeOH, agitar por 5 minutos, después agregar 20ml de agua pH 1 y agitar por 15 minutos más; para que ambos principios activos estén solubles y sea posible su análisis por EC.

5.1.2 LONGITUD DE ONDA DE DETECCIÓN

La absorción espectrofotométrica UV-visible es la más usada como método de detección en EC; primeramente debido a su naturaleza casi universal en la detección, ya que los capilares de sílice fundida permiten la detección por debajo de 200nm (hasta 180nm) o por arriba, cubriendo el espectro visible (325-800)¹ ya que los analitos, que dentro de su estructura química cuentan con un grupo cromóforo o enlaces π , tienen la capacidad de absorber energía de longitudes de onda de esta región. La Brom y Amox cumplen con estas características, por lo que se decide realizar su espectro de absorción en un intervalo de 200 a 300 nm para determinar la longitud de onda óptima para la detección de ambos.

Se prepara una disolución de Brom y una de Amox (24 μ g/ml-70 μ g/ml respectivamente) y se realiza la corrida obteniéndose el espectro de absorción en el equipo de EC con el detector de arreglo de diodos.

Los espectros de absorción obtenidos se muestran en las figuras 12 y 13.

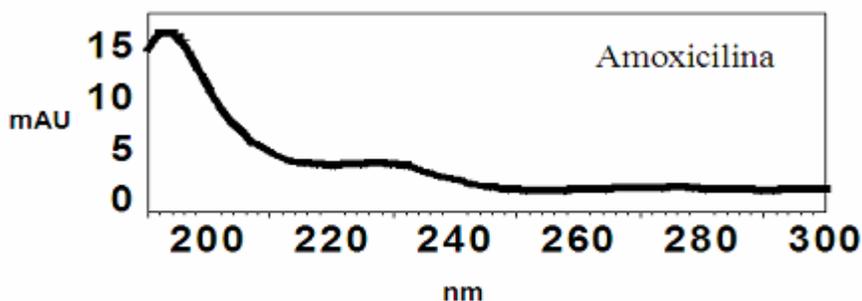


Figura 12. Espectro de absorción de la Amox

En la figura 12, se observa el espectro de absorción de Amox, la cual presenta un máximo de absorción en 190 y 230nm.

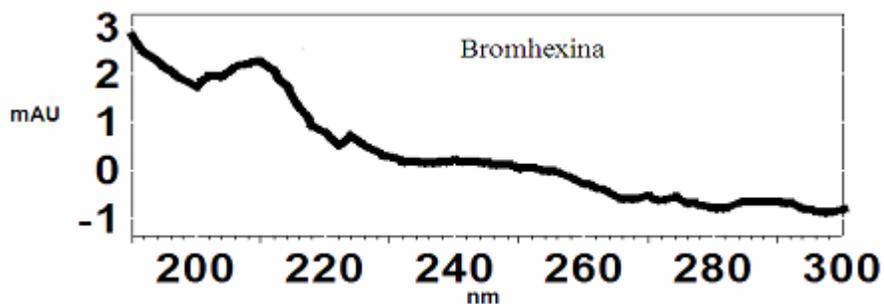


Figura 13. Espectro de absorción de la Brom

En la figura 13, se observa el espectro de absorción de la Brom, la cual presenta 2 máximos de absorción 210 y 222 nm.

Siendo que el equipo utilizado permite obtener el electroferograma a diferentes longitudes de onda y se observó que a una longitud de 214nm ambos analitos presentan la mejor forma de pico, con mayor altura y poco ruido, ya que a esta longitud la línea base se observa uniforme, debido a que el buffer no absorbe demasiado a ésta longitud. Por lo que se elige 214nm como longitud de onda óptima para el análisis (figura 14).

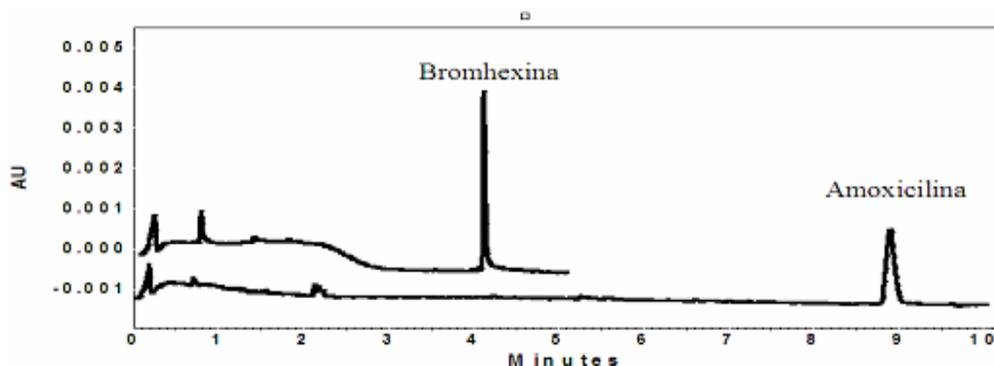


Figura 14. Brom y Amox (24 μ g/ml-70 μ g/ml respectivamente) a 214nm.
 Condiciones: capilar 75 μ m de D.I. y 39cm de largo, buffer fosfatos 25mM pH 3, 25kV
 e introducción hidrodinámica 5seg, 0.5psi.

5.1.3 CARACTERÍSTICAS DEL ELECTROLITO SOPORTE

El buffer determina y estabiliza el pH del medio y las especies químicas predominantes de los analitos con propiedades ácido-base, por lo que afecta a la velocidad de migración de los compuestos en diversas formas, además de proporcionar un medio conductor.¹

5.1.3.1 pH

En los compuestos orgánicos el pH determina la magnitud de la ionización de los ácidos orgánicos, es decir, aumenta con el pH, mientras que lo inverso ocurre con las bases orgánicas, lo cual es el caso de nuestros analitos; por lo tanto, su velocidad de migración depende del pH.¹

Para observar el efecto del pH del electrolito en la separación se tomó como referencia de nuevo que la Brom se precipita a valores de pH mayores de 6¹⁷, por lo tanto, se decidió estudiar la separación en un intervalo de pH de 3 – 6 \pm 0.5 . Ya que el buffer de fosfatos presenta 3 pKa's (2.12, 7.21 y 12.32) y los sistemas efectivos de buffer tienen un intervalo de 2 unidades de pH aproximadamente centradas alrededor del valor de pKa²¹, se elige a éste como primer buffer de prueba. Se empleo un buffer de fosfatos 25mM a partir de fosfato de sodio monobásico, ajustando el pH con HCl 0.1M o NaOH 0.1M según se requiriera.

Se realizó una disolución de Brom y otra de Amox (45µg/ml cada una), las cuales se corrieron con los 3 buffer (pH 6.24, 4.42 y 3.09 valores experimentales) dando los resultados siguientes.

- **pH = 6.24**

En la figura 15 se observa el comportamiento individual de los principios activos con buffer de fosfatos a pH= 6.24. Se puede observar que el pico de la Brom aparece en un tiempo de 2 minutos, sin embargo, el pico no es simétrico, por lo tanto no es eficiente y por otro lado, el pico de la Amox, se ve dobleteado, al parecer con el flujo electroosmótico, por lo que este pH no es el indicado para realizar el análisis.

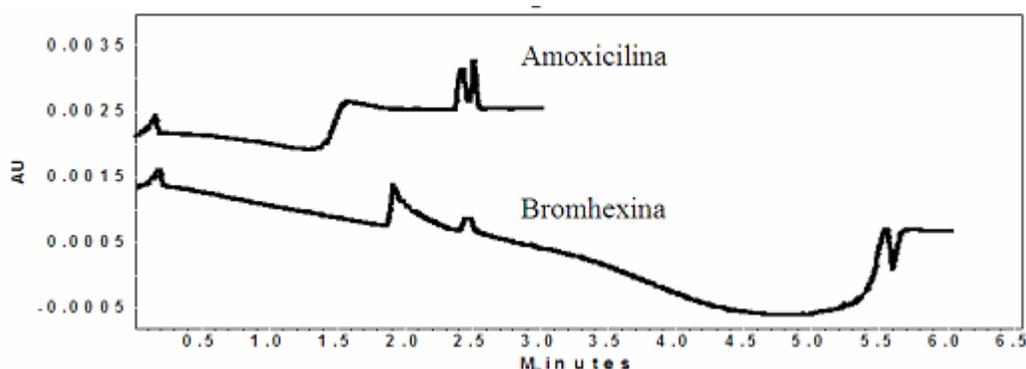


Figura 15. Brom y Amox 45µg/ml cada una, en buffer de fosfatos 25mM, pH de 6.24.
Condiciones: capilar 75µm de D.I. y 39cm de largo, 214nm, 25kV e introducción hidrodinámica 5seg, 0.5psi.

- **pH = 4.42**

En la figura 16 se observa el comportamiento individual de los principios activos a un pH de 4.42 y como se puede ver el pico de la Brom está más simétrico, aunque a un tiempo de 2.35 minutos, es decir, mayor que en pH 6.24, mientras que el pico de Amox se observa muy ancho y al parecer junto con el FEO, por lo tanto, este pH tampoco es el óptimo para la separación.

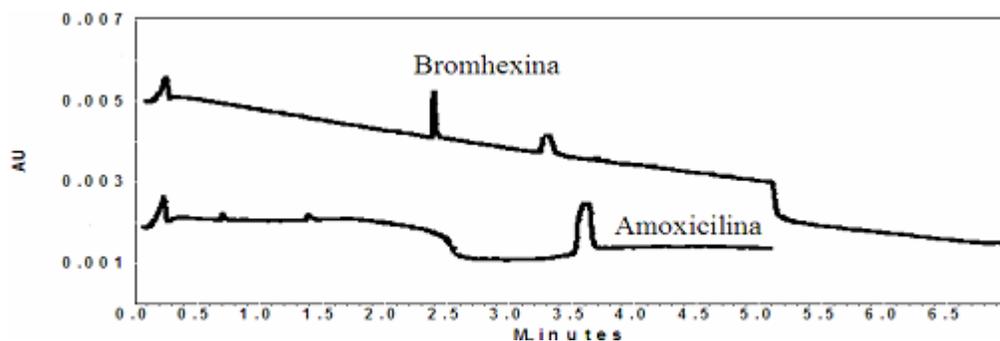


Figura 16. Brom y Amox 45µg/ml cada una, en buffer de fosfatos 25mM, pH de 4.42.
 Condiciones: capilar 75µm de D.I. y 39cm de largo, 214nm, 25kV e introducción hidrodinámica 5seg, 0.5psi.

- pH = 3.09

En la figura 17 se observa el comportamiento individual de los principios activos a un pH aproximado de 3 y se observa que ambos picos tienen forma simétrica, con buena resolución ($R_s = 24.7 > 1.5$), además de una separación eficiente, ya que se obtuvo un coeficiente $\alpha = 2.15 > 1$, con tiempo de migración para Brom de 4.2 min y para Amox de 9 min, aunque el tiempo de corrida es mayor (9.5 minutos), las señales son mejores.

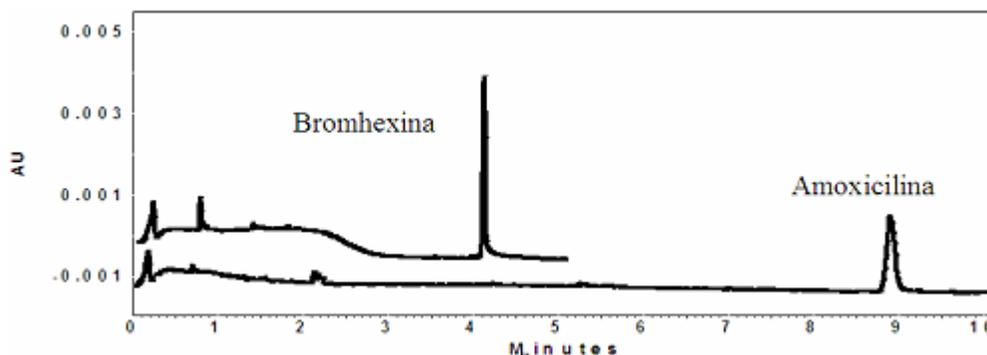


Figura 17. Brom y Amox 45µg/ml cada una, en buffer de fosfatos 25 mM, pH 3.09.
 Condiciones: capilar 75µm de D.I. y 39cm de largo, 214nm, 25kV e introducción hidrodinámica 5seg, 0.5psi.

Ya que se determinó, que con buffer de fosfatos 25mM a un pH de 3.09 se tenían picos simétricos, con buena resolución, se decidió evaluar un intervalo de pH más cerrado de 2.5 a 3.5 ± 0.1 , para optimizarlo.

Para esto se preparó una disolución de Brom y Amox ($45\mu\text{g/ml}$ cada una), dicha disolución se corrió en los 3 buffer con pH de 2.5, 3.09 y 3.5 (valores experimentales). En la figura 18 se observa el comportamiento de la separación en los 3 valores de pH estudiados.

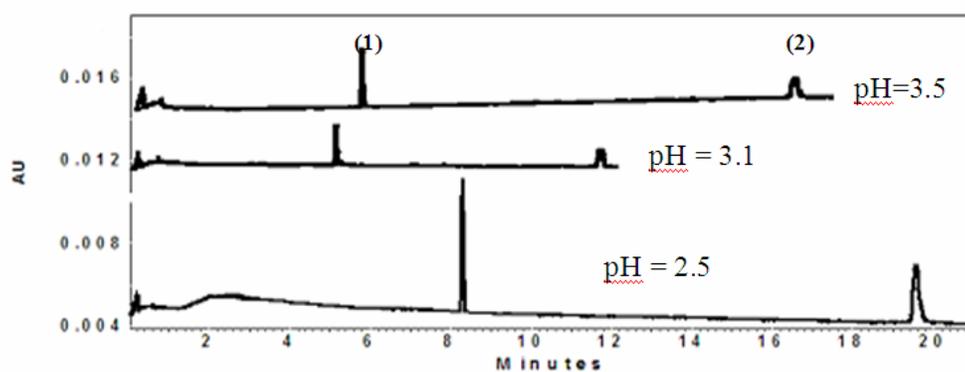


Figura 18. Brom (1) y Amox (2), $45\mu\text{g/ml}$ cada una en un intervalo de pH 2.5 – 3.5. Condiciones: Buffer fosfatos 25mM, capilar $75\mu\text{m}$ de D.I. y 39cm de largo, 214nm, 25kV e introducción hidrodinámica 5seg, 0.5psi.

Como se puede ver en la figura 18, en los tres valores de pH se obtienen picos simétricos y con buena resolución ($R_s > 1.5$), pero a un pH de 3.5 y 2.5 se tienen tiempos de corrida mayores (20 y 17 min respectivamente), y esto nos llevaría a que se aumente el tiempo de análisis, lo cual no es conveniente por que aumentaría el tiempo de análisis de una muestra y en la industria farmacéutica es muy importante que estos tiempos sean lo más cortos posibles para realizar a tiempo el análisis de todas las muestras y tener los resultados a tiempo. Por lo que se elige $\text{pH} = 3.0 \pm 0.1$ como el óptimo.

Se evalúa la repetibilidad de áreas y tiempo de migración tanto de Brom como de Amox a este pH (3.0 ± 0.1), empleando la introducción por sextuplicado de la disolución Brom-Amox $45\mu\text{g/ml}$ cada una, con buffer de fosfatos 25mM , se calcularon los C.V. y los resultados obtenidos se presentan en la tabla 14.

Tabla 14. Resultados usando buffer de fosfatos 25mM pH= 3.0 ± 0.1

Corrida	Tm. Amox (min)	Tm. Brom (min)	Área Brom	Área Amox
1	8.64	3.04	52646	2298124
2	8.22	2.99	40126	2163572
3	6.95	2.95	38268	1962906
4	7.39	3.01	46917	2104254
5	8.01	2.96	36627	1985181
6	7.83	2.94	37310	1929614
Promedio	7.84	2.98	41982.33	2107275.17
Desvest.	0.604	0.039	6415.88	187799.79
C.V. (%)	7.69	1.30	15.28	6.83

Como se puede ver el tiempo de migración de la señal de Amox es muy variable, es decir, presenta un C.V. alto y por lo tanto también hay variación en sus áreas, mientras que la señal de Brom presenta un C.V. menor en tiempo de migración, pero mayor en áreas. Esto puede ser debido a que el buffer no está amortiguando lo suficiente, lo que provoca tanta variación en tiempos de migración y por lo tanto de áreas, lo que nos lleva a hacer un análisis de la naturaleza del buffer, para disminuir esta variación.

5.1.3.2 Naturaleza del buffer

Ya que el pH elegido para la separación es de 3 y que los buffer amortiguan en un intervalo de 2 unidades de pH aproximadamente centradas alrededor del valor de pKa²¹, se buscó en bibliografía sistemas de buffer que presentaran pKa cercano a 3 y los que se eligieron fueron los siguientes^{30, 31, 32}:

1.- Fosfatos (pKa 2.12, 7.12 y 12.32)

2.- Citratos (pKa 3.06, 4.74 y 5.40)

3.- Ftalatos (pKa 2.83)

Dichos buffer se prepararon a una concentración considerable para el caso de la electroforesis capilar, de 50mM, esperando que al aumentar su concentración haya mayor capacidad de amortiguamiento y así disminuir la variación de el tiempo de migración y áreas de ambos principios activos.

Se realizó una disolución de Brom y Amox 24 – 700µg/ml respectivamente (proporción en la que se encuentran en las muestras) y se realizó la corrida en los 3 buffer de diferente naturaleza. En la figura 19 se presenta la comparación de los 3 electroferogramas obtenidos.

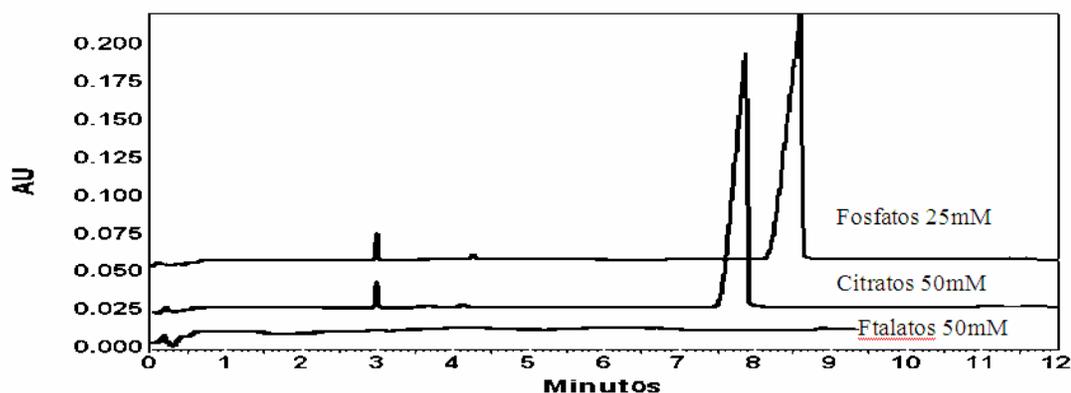


Figura 19. Brom (1) y Amox (2), fosfatos (25mM), ftalatos (50mM) y citratos (50mM).
Condiciones: pH 3.0, capilar 75µm de D.I. y 39cm de largo, 214nm, 25kV e introducción hidrodinámica 5seg, 0.5psi.

Se puede observar que con el buffer de ftalatos no se puede realizar el análisis, debido a que éste absorbe demasiado a la longitud de detección (214nm), por lo que no deja que se detecte la señal de Brom, ni de Amox. Con el buffer de citratos se tiene una separación eficiente, en un tiempo de corrida menor (8.5min) que con buffer de fosfatos, donde la Brom tiene un Tm. de 3min y la Amox de 8 min, resolución, $R_s = 12.5 > 1.5$ y buena separación con un $\alpha = 2.67 >$, los picos son simétricos y una corriente de 70µA, por

lo que se elige al buffer de citratos para continuar con el desarrollo del método. Además que el buffer de fosfatos 50mM no se puede utilizar ya que la corriente generada es mayor a 150 μ A y se tiene que usar a una concentración menor (25mM) y como ya se había estudiado antes con éste buffer a ésta concentración se tiene gran variación en tiempos de migración y áreas.

Para evaluar la repetibilidad en tiempos de migración y en áreas con el buffer ya elegido, se introduce por sextuplicado la disolución de Brom y Amox 24 – 700 μ g/ml respectivamente con dicho buffer para calcular sus C.V. En la tabla 15 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 15. Resultados buffer de citratos 50mM pH=3

Corrida	Tm. Amox (min)	Tm. Brom (min)	Área Brom	Área Amox
1	8.64	2.94	42646	2198124
2	8.22	2.99	40126	2063572
3	7.95	2.95	38268	1962906
4	8.39	3.01	36917	2104254
5	8.01	2.96	36627	1985181
6	7.83	2.94	37310	1929614
Promedio	8.17	2.98	38649	2040608
Desvest.	0.305	0.039	2331.69	100815.54
C.V. (%)	3.73	0.95	6.03	4.94

Como se puede ver en la tabla 15, los C.V. tanto de áreas como de Tm. de Amox siguen siendo altos; sin embargo, son menores que cuando se utiliza el buffer de fosfatos 25mM pH 3, esto quiere decir, que éste buffer está amortiguando más, pero no lo suficiente, por lo que se decide seguir con el buffer de citratos pH= 3 para el análisis y ahora estudiar diferentes concentraciones del mismo, con la finalidad de disminuir los C.V.

5.1.3.3 Concentración

Al aumentar la concentración del buffer, la proporción de corriente conducida por éste crece y la participación de la muestra en dicha conducción de corriente disminuye, con lo que se reduce la velocidad de migración. Además que una elevada fuerza iónica del buffer

incrementa la intensidad global de corriente y, consecuentemente, la producción de calor, por lo que la selección de la concentración del buffer es de suma importancia²¹.

Ya que el buffer de citratos 50mM pH 3 da una corriente de 70 μ A, permite incrementar la concentración sin riesgo a llegar al límite de corriente permitida que es de 150 μ A, de esta forma se aumenta el amortiguamiento esperando mejorar la repetibilidad. Se realizan corridas utilizando el buffer de citratos a diferentes concentraciones: 100, 80 y 50 mM.

Los buffer a dichas concentraciones, se prepararon por dilución a partir de un buffer stock de citratos 100mM pH = 3, ajustando el pH con HCl 0.1N. Se realiza una disolución de Brom con Amox de concentración 23 y 702.4 μ g/ml respectivamente. En la figura 20 se muestra la comparación de los electroferogramas.

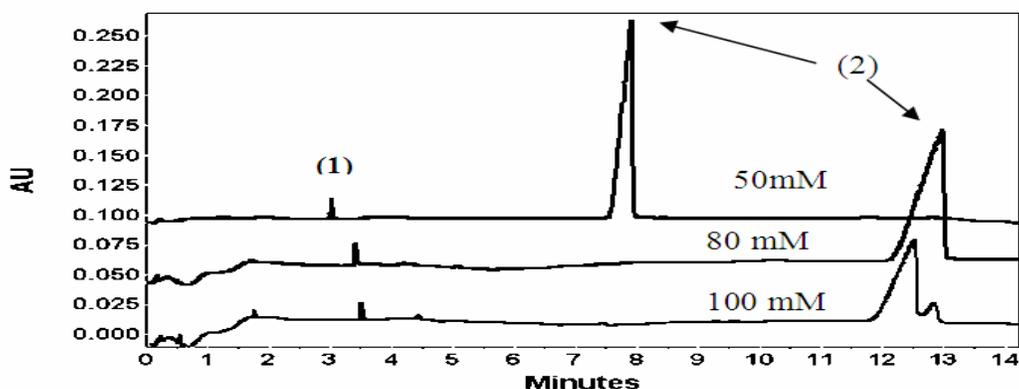


Figura 20. Diferentes concentraciones de buffer de citratos pH 3.

Condiciones: capilar 75 μ m de D.I. y 39cm de largo, 214nm, 25kV e introducción hidrodinámica 5seg, 0.5psi. Brom(1) y Amox(2).

Se puede observar que al tener el buffer a una concentración de 100mM, este absorbe mucho a la longitud de onda de trabajo por lo que el pico de Brom es muy pequeño y además, el pico de Amox se deforma apareciendo un hombro del lado derecho; por lo que se descarta el uso de ésta concentración del buffer.

En el buffer de citratos 80mM y 50mM los picos de ambos principios activos tienen una forma más simétrica, aunque en 80mM el pico de Amox se colea un poco. Se evaluó la

repetibilidad en estas dos últimas concentraciones corriendo por sextuplicado la disolución de Brom-Amox y los resultados se observan en las tablas 16 y 17. Además, se observa que en una concentración de 50mM los C.V. de tiempo de migración y áreas son menores que en el buffer de concentración 80mM.

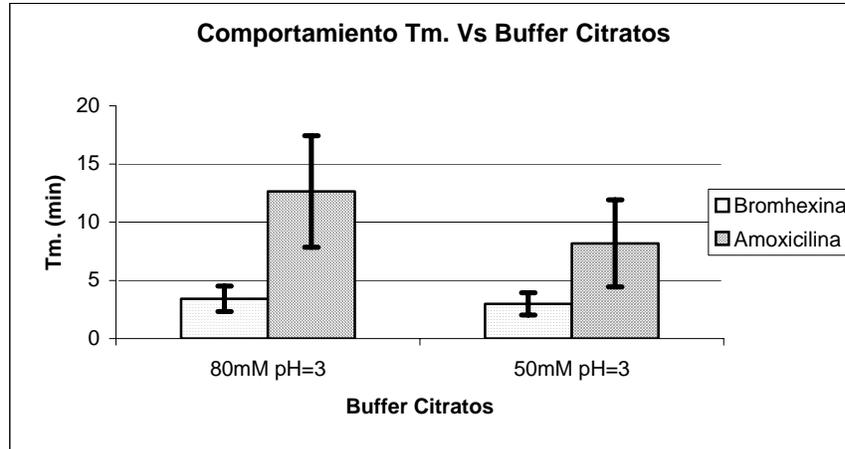
Tabla 16. Resultados Buffer citratos 80mM pH 3

Corrida	Tm. Amox (min)	Tm. Brom (min)	Área Brom	Área Amox
1	13.62	3.37	35965	2163291
2	12.94	3.38	48003	2828819
3	12.73	3.40	53929	2773661
4	12.39	3.42	51995	2764340
5	12.22	3.45	48855	2643346
6	11.91	3.47	20255	2688829
Promedio	12.64	3.41	43167	2643714
Desvest.	0.604	0.038	12855.52	244353.21
C.V. (%)	4.78	1.09	29.78	9.24

Tabla 17. Resultados Buffer de citratos 50mM pH= 3.0

Corrida	Tm. Amox (min)	Tm. Brom (min)	Área Brom	Área Amox
1	8.64	2.94	42646	2198124
2	8.22	2.99	40126	2063572
3	7.95	2.95	38268	1962906
4	8.39	3.01	36917	2104254
5	8.01	2.96	36627	1985181
6	7.83	2.94	37310	1929614
Promedio	8.17	2.98	38649	2040608
Desvest.	0.305	0.039	2331.69	100815.54
C.V. (%)	3.73	0.95	6.03	4.94

En la gráfica 1 se representa el comportamiento de el Tm contra la concentración de buffer de citratos pH = 3.0 (50 y 80mM), así como su variación.



Gráfica 1. Comportamiento de Tm Vs Buffer de Citratos pH = 3.0

Se puede observar en el gráfico No. 1 que a una concentración de buffer de 50mM pH=3.0 se tienen Tm menores y las barras de variación un poco más pequeñas en ambos principios activos, en comparación con el buffer 80mM, por lo tanto se decide seguir el análisis con buffer de citratos 50mM pH = 3.0

5.1.4 INTRODUCCIÓN DE LA MUESTRA

El objetivo de la introducción de la muestra es lograr que ésta entre al capilar de una manera adecuada y reproducible, por lo que es muy importante su estudio al desarrollar un método. Existen 2 tipos de introducción: hidrodinámica y electrocinética.³³

5.1.4.1 Tipo de introducción

La introducción hidrodinámica, se realiza mediante diferencia de presión, por bombeo o por vacío, es decir, forzando la entrada de la muestra al capilar.³³

La introducción electrocinética se realiza mediante electro migración de los iones presentes en la muestra al aplicarse un campo eléctrico.³³

El estudio del tipo de introducción se evaluó realizando la corrida, con los 2 tipos de introducción de una disolución de Brom y Amox de concentraciones (25 μ g/ml – 77.6 μ g/ml).

La introducción hidrodinámica de la muestra fue a 0.5psi por 5 segundos, la figura 21 muestra el comportamiento presentado.

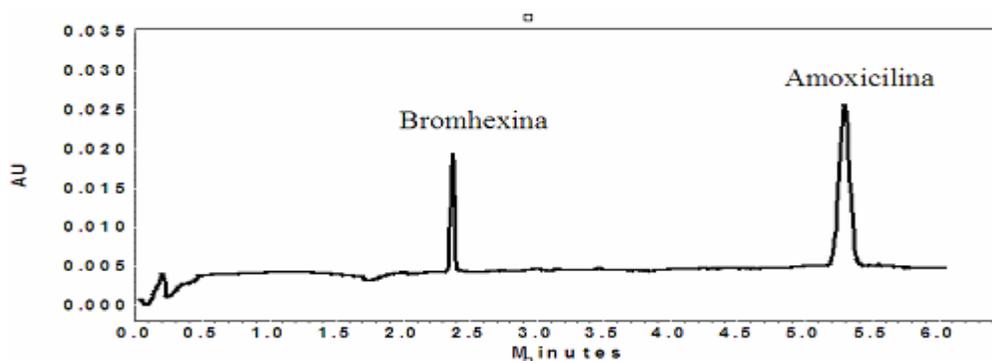


Figura 21. Brom y Amox con introducción hidrodinámica 0.5 psi por 5 s. Condiciones: Buffer de citratos 50mM, pH 3, capilar 75 μ m de D.I. y 39cm de largo, 214nm, 25kV.

Después se realizó el estudio con introducción electrocinética por 5, 15 y 25 segundos con un voltaje de introducción de 10kV; los comportamientos se muestran en la figura 22.

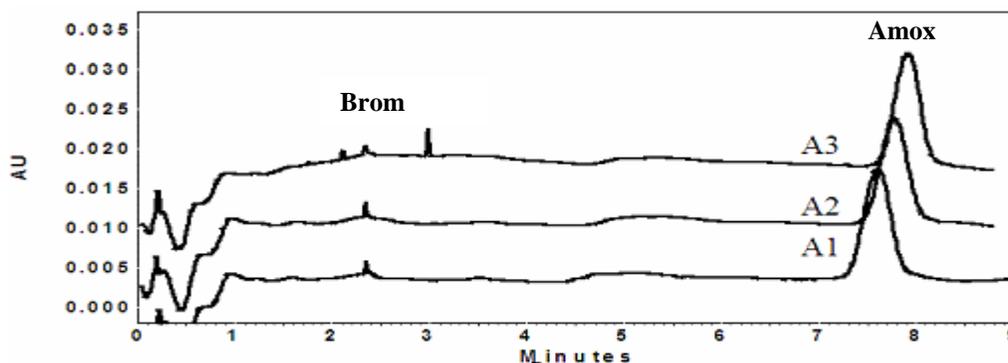


Figura 22. Estudio de la introducción electrocinética. 10kV: A1) 5 s., A2) 15 s., (A3) 25 s. Condiciones: Buffer de citratos 50mM, pH 3, capilar 75 μ m de D.I. y 39cm de largo, 214nm, 25kV.

Introduciendo la muestra de forma hidrodinámica se obtuvieron picos con forma simétrica y picos altos. Con la introducción electrocinética se observa que el pico de la Brom es más pequeño y aunque se trató de aumentar el tamaño, aumentando la longitud de la introducción, aumentado el tiempo de introducción, se puede observar en la figura 22, que conforme aumentamos el tiempo de la introducción el pico de Brom no aumenta, y los tiempos de migración de la Amox aumentan y su pico es muy ancho. Por lo tanto se decide seguir el desarrollo del método con introducción hidrodinámica.

5.1.4.2 Longitud de la introducción

El término longitud de la introducción se refiere a la cantidad de muestra que es introducida en el capilar para realizar la separación electroforética³³. Dicha cantidad varía de forma proporcional al modificar el tiempo de introducción.

Durante la introducción es importante que la longitud de la muestra sea pequeña ya que si es muy larga provocará que la eficiencia y resolución en los picos sean afectados considerablemente.³³

Para lo cual se prepara una mezcla Brom-Amox (25µg/ml – 77.6µg/ml), introducida a 2 diferentes tiempos de introducción 5 y 8 segundos a 0.5 psi., utilizando como buffer de corrida citratos 50 mM a pH 3, los electroferogramas obtenidos se presentan en la figura 23.

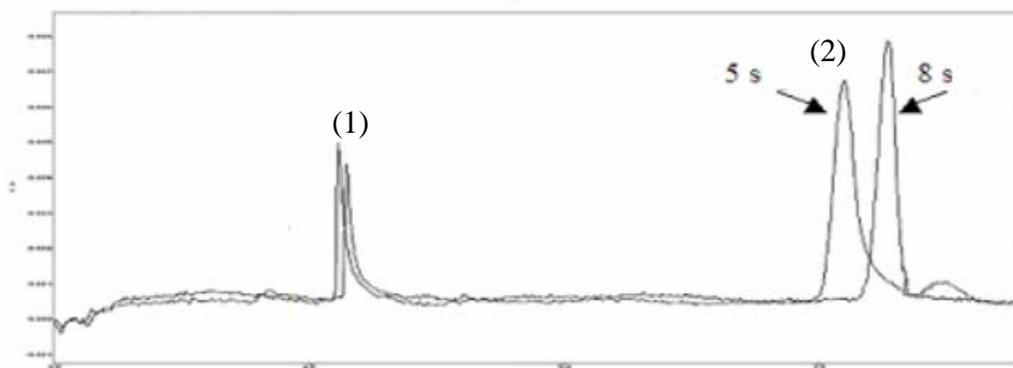


Figura 23. Diferentes tiempos de introducción hidrodinámica (5 y 8s) a 0.5psi. Condiciones: Buffer de citratos 50mM, pH 3, capilar 75µm de D.I. y 39cm de largo, 214nm, 25kV. Brom(1) y Amox(2).

El electroferograma de la figura 23 muestra que al aumentar el tiempo de introducción, los picos empiezan a presentar mayor deformación, es decir, el pico de Brom se colea y el de Amox presenta un hombro, además de incrementarse el tiempo de la corrida, por ello se continua el desarrollo del método con introducción hidrodinámica 5s a 0.5psi.

5.1.5 DIAMETRO INTERNO DEL CAPILAR

La longitud total de los capilares comúnmente utilizada en la actualidad es de 30 a 70cm, con un diámetro interno de 50 a 75 μ m. La miniaturización de los capilares en EC incrementa la proporción superficie-volumen, por lo que aumenta la influencia de las propiedades físicas y químicas de la superficie del capilar sobre el proceso de separación. Esta proporción puede influenciar, ya sea el FEO o las interacciones pared-analito, y ésta a su vez depende de las propiedades fisicoquímicas de la pared del capilar, la naturaleza del analito y las propiedades del buffer empleado.¹

Con el fin de comparar y elegir el capilar con un diámetro interno en el cual haya una separación eficiente y una corriente moderada, se analizaron dos capilares de diferente diámetro.

Se sabe que al tener un capilar con un diámetro interno pequeño, la corriente que se va a generar será pequeña por que disipa más el calor, lo que sería conveniente para evitar dañar el equipo de EC, sin embargo, también se presenta una disminución en la sensibilidad y un incremento en la adsorción de la muestra lo que va a provocar un posible ensanchamiento de los picos, además de aumentar los tiempos de corrida, por lo que es muy importante realizar la evaluación de este parámetro.³⁴

Por tal motivo se analizó el efecto del diámetro interno del capilar en las señales de la Brom y Amox, utilizando un capilar de 50 μ m y otro de 75 μ m de diámetro, ambos con 38 cm de longitud total.

Se preparó una mezcla Brom-Amox con una concentración de 25 y 76 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente y se realizan las corridas bajo las condiciones electroforéticas de separación ya establecidas hasta el momento. La comparación de los electroferogramas en ambos diámetros internos se observa en la figura 24.

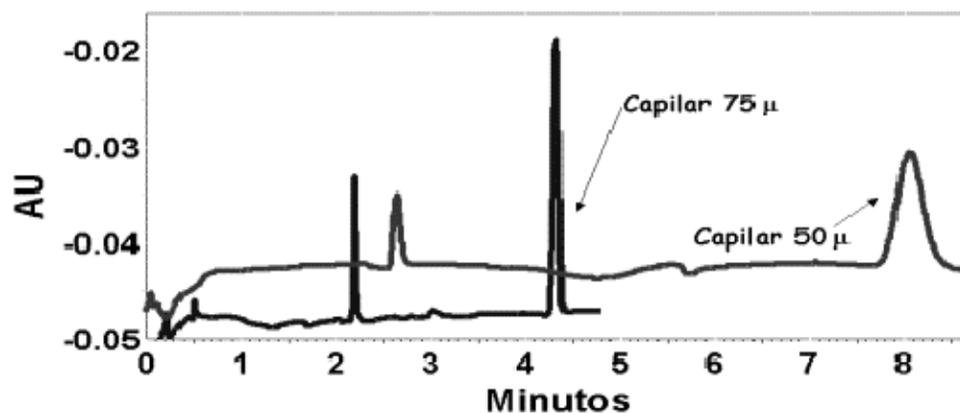


Figura 24. Comparación de capilares de 50 y 75 μm de diámetro interno.
Condiciones: Buffer de citratos 50mM, pH 3, 214nm, 25kV, introducción hidrodinámica 5s, 0.5 psi.

En los electroferogramas de la figura 24 se observa que al correr en un capilar con diámetro interno de 50 μm , los picos son más anchos y el tiempo de análisis aumenta (9.0min), En cambio en el capilar de 75 μm los picos son más finos, de forma simétrica y con un tiempo de análisis menor (5min).

Se corre la disolución Brom-Amox por sextuplicado en cada capilar y se calcularon los coeficientes de variación de tiempos de migración y áreas y la eficiencia en cada uno de los diámetros internos del capilar, los resultados se muestran en las tablas 18 y 19.

Tabla 18. Resultados con capilar de 75 μm de diámetro interno y 38 cm de longitud

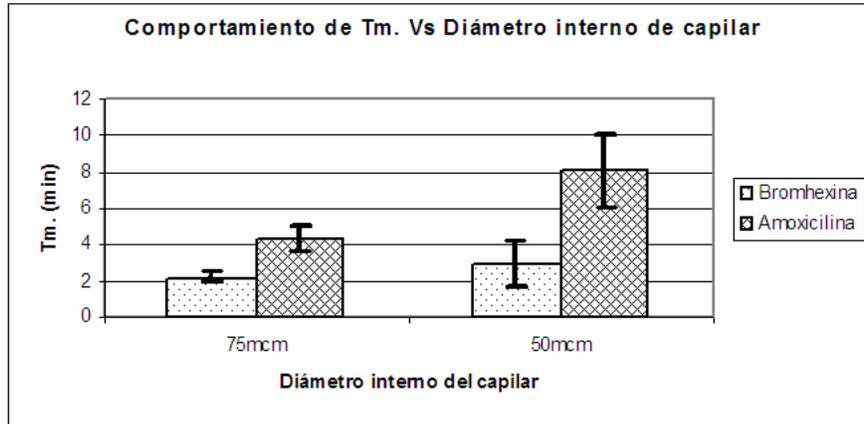
Corrida	Tm. (min)		Área		Número de Platos Teóricos (N)	
	Brom	Amox	Brom	Amox	Brom	Amox
1	2.14	4.31	29559	111229	3274.89	6149.41
2	2.14	4.32	28429	108889	3066.99	6183.67
3	2.14	4.33	30040	112561	2549.65	6206.57
4	2.13	4.26	29700	112324	2856.90	6007.65
5	2.14	4.34	27813	106638	2878.32	6840.07
6	2.15	4.35	28936	109475	2282.71	7582.92
Promedio	2.14	4.32	29079	110186	2818.24	6495.05
Desvest.	0.004	0.032	846.79	2283.66		
C.V. (%)	0.19	0.74	2.91	2.07		

Tabla 19. Resultados con capilar de 50 μm de diámetro interno y 38 cm de longitud

Corrida	Tm. (min)		Área		Número de Platos Teóricos (N)	
	Brom	Amox	Brom	Amox	Brom	Amox
1	2.87	8.18	19470	85646	1316.06	4008.33
2	2.84	7.96	18449	80823	1082.52	4426.27
3	2.88	7.89	11893	85636	1089.37	3861.59
4	2.93	8.32	19736	85526	1025.39	2522.67
5	2.84	8.04	15484	86439	1137.91	3471.06
6	2.85	8.00	14949	87651	1373.80	3659.22
Promedio	2.87	8.06	16663	85286.83	1170.84	3658.19
Desvest.	0.036	0.159	3085.22	2330.26		
C.V. (%)	1.25	1.96	18.51	2.73		

Se puede observar que el valor promedio de N, que muestra la eficiencia, es mayor al correr los principios activos en capilar de 75 μm , así como lo coeficientes de variación tanto de tiempos de migración como de área son menores en éste diámetro.

Para observar mejor la diferencia y hacer el análisis se realizó la gráfica de comparación de tiempos de migración en función del diámetro interno del capilar, así como los coeficientes de variación de Tm gráfica 2.



Gráfica 2. Comportamiento del Tm contra Diámetro interno de capilar.

Al observar la gráfica 2 se puede observar mejor que en un diámetro de 75µm los Tm son menores, teniéndose un tiempo de análisis de 5 min. y las barras de variación son más pequeñas, por lo tanto se sigue el desarrollo del método en capilar de 75µm de diámetro interno.

5.1.6 TIEMPO DE LAVADO ENTRE CORRIDAS

Uno de los parámetros esenciales es determinar el tiempo adecuado para el lavado del capilar, con el fin de garantizar que exista repetibilidad de tiempo de migración de los picos y asegurar que no se acumulen sobre la superficie del capilar ciertas impurezas ajenas al mismo.³⁴

Antes de realizar cualquier otro tipo de ensayo y al inicio del día es necesario acondicionar el capilar de sílice fundida (tabla 20).

Tabla 20. Condiciones impuestas para el acondicionamiento del capilar al inicio de la jornada de trabajo

Solvente	Tiempo (min)	Presión (psi.)
Agua	5	20
HCl 0.1N	5	20
Agua	7	20
Buffer*	15	20

*El Buffer con el que se lava, es el utilizado para las corridas que se realizaran durante la jornada, en este caso fue Citratos 50mM pH 3.

El primer lavado con agua es para eliminar cualquier residuo que haya quedado dentro del capilar; debido a que el pH de trabajo es ácido (pH= 3) se lava con HCl 0.1N para disminuir el pH dentro del capilar. Posteriormente, el lavado con agua es para eliminar el HCl 0.1N del lavado anterior. Y finalmente se lava con buffer para acondicionarlo al medio.³⁴

Además por bibliografía se sabe que un factor que afecta a la repetibilidad, es cambios en la composición del buffer de corrida, esto puede ser por que cambia el pH debido a la electrólisis, ya que el agua se puede oxidar o reducir y por lo tanto modifica el pH o puede haber una evaporación del buffer por el calor generado al aplicar voltajes tan altos (kV). Debido a esto, se decide cambiar los viales de buffer de corrida cada tres corridas.³⁴

Una vez acondicionado el capilar al inicio del día, se procedió a evaluar el tiempo óptimo de lavado con buffer entre corridas. Para esto se realizó las corridas por sextuplicado de una disolución de Brom y Amox de concentraciones 22.8 y 77.6 µg/ml respectivamente, lavando 1 minuto con buffer entre cada corrida a 20 psi. Se evaluaron los coeficientes de variación tanto de tiempos de migración como de áreas y los resultados obtenidos se presentan en la tabla 21.

Tabla 21. Repetibilidad de Tm. y áreas lavando 1 minuto entre corridas

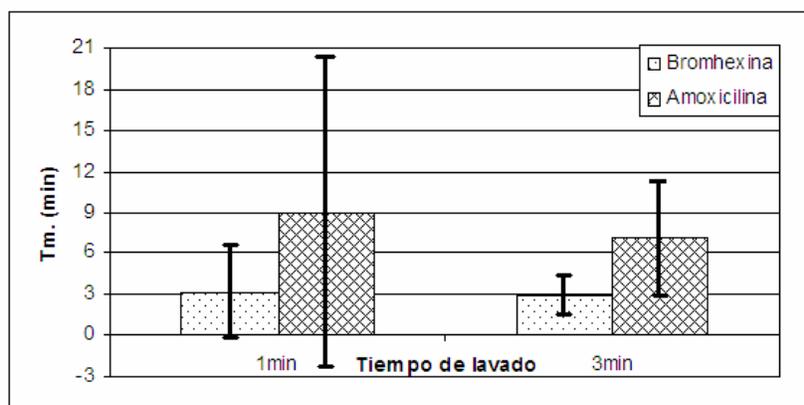
Corrida	Tm. Brom (min)	Tm. Amox (min)	Área Brom	Área Amox
1	3.33	10.47	39576	224501
2	3.27	9.82	34673	171204
3	3.21	9.14	36585	185013
4	3.13	8.41	43957	217955
5	3.10	8.16	41790	202348
6	3.05	7.86	40194	191807
Promedio	3.18	8.98	39462	198804
Desvest.	0.110	1.020	3387.77	20201.81
C.V. (%)	3.37	11.36	8.58	10.16

Después la misma disolución de Brom y Amox de concentraciones conocidas, se corrió por sextuplicado, lavando 3 minutos a 20 psi. entre cada corrida. Se evaluaron los coeficientes de variación tanto de tiempos de migración como de áreas, los resultados obtenidos se presentan en la tabla 22.

Tabla 22. Repetibilidad de Tm. y áreas lavando 3 minutos entre corridas

Corrida	Tm. Brom (min)	Tm. Amox (min)	Área Brom	Área Amox
1	3.02	7.50	40098	178562
2	2.99	7.36	37013	166285
3	2.97	7.20	37649	161979
4	2.95	7.01	37203	158779
5	2.92	6.86	36500	158163
6	2.90	6.74	35945	152150
Promedio	2.96	7.11	37401	162653
Desvest	0.044	0.296	1446.15	9079.90
C.V. (%)	1.49	4.16	3.86	5.58

A continuación se presenta el gráfico de comparación de tiempos de migración contra el tiempo de lavado (gráfica 3).



Gráfica 3. Comportamiento del Tm contra tiempo de lavado entre corridas con buffer

Es así que analizando las tablas 25 y 26 y el gráfico 3, se observa que al realizar el lavado de 3 minutos y 20psi con buffer de corrida los C.V. son menores que cuando se lava 1 minuto. Por lo que se decide realizar la rutina de lavado con buffer por 3 minutos a 20psi. entre cada corrida.

5.1.7 EFECTO DEL VOLTAJE

El efecto del voltaje en la separación es importante porque la velocidad de migración es inversamente proporcional al voltaje, ya que, al aplicar un campo eléctrico mayor el analito consume menor tiempo en el capilar y evita un ensanchamiento en los picos por lo que la eficiencia aumenta²¹, mientras que si el campo eléctrico disminuye ocurre todo lo contrario.

Ahora bien, la diferencia entre los picos de Brom y Amox es de 5 minutos, lo que permite disminuir el tiempo de análisis al aumentar el voltaje, además de que el buffer de citratos 50mM pH 3 da una corriente de 70 μ A aplicando 25 kV lo que indica que al aumentar el voltaje a 30kV no se llegará al límite permitido.

De esta forma, se estudian dos distintas magnitudes de voltaje y se analiza su efecto en los tiempos de corrida. Se prepara una mezcla Brom-Amox (23 μ g/mL – 70 μ g/ml respectivamente) y se realiza la corrida aplicando un voltaje de 25 kV y 30kV por sextuplicado cada uno.

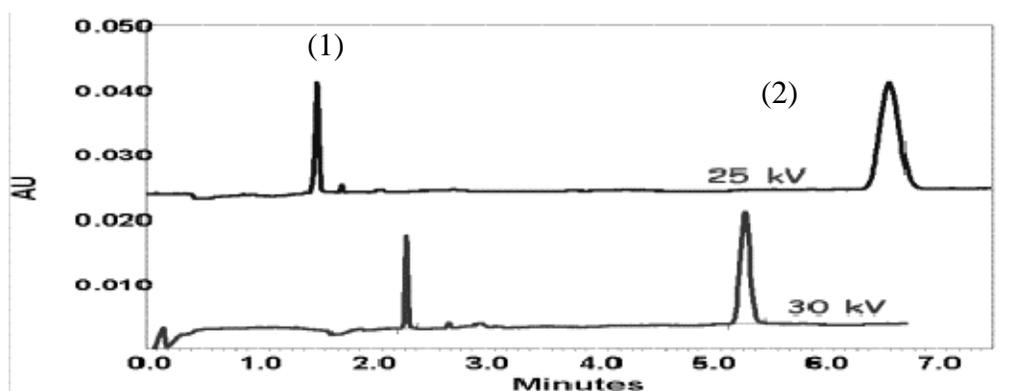


Figura 25. Brom(1) y Amox(2) con diferentes voltajes aplicados (25 y 30kV).
Condiciones: Buffer de citratos 50mM, pH 3, capilar 75 μ m de D.I. y 39cm de largo, 214nm, introducción hidrodinámica 5s, 0.5 psi.

En la figura 25 se observan los electroferogramas de las corridas a 2 diferentes voltajes aplicados y se observa que al aplicar un voltaje de 30kV el tiempo de corrida disminuye de 6.8 min a 5.3min, lo que disminuye el tiempo de análisis, sin afectar a la resolución ya que se tiene un $R_s = 8.25$ que aún es mayor a 1.5; además los picos se observan con un ancho menor.

Se corre por sextuplicado la disolución de Brom y Amox y se calculan los C.V. En las Tablas 23 y 24 se muestran los C.V. de Tm. y áreas obtenidos aplicando un voltaje de 25 y 30 kV.

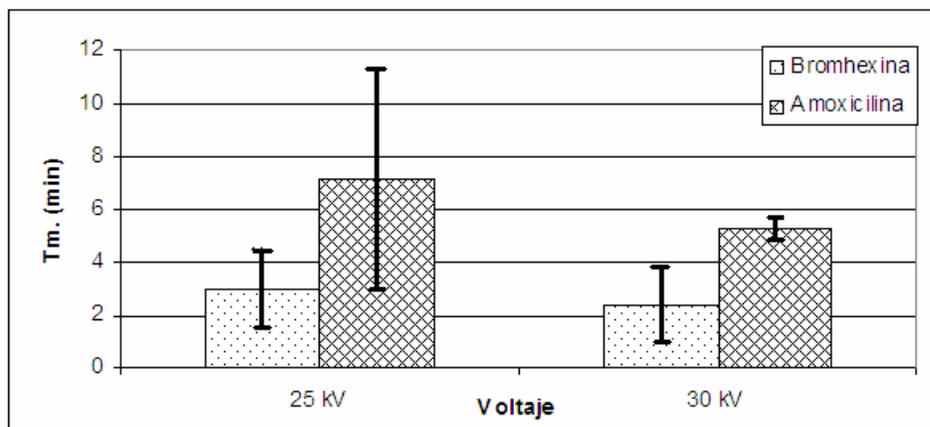
Tabla 23. Resultados aplicando 25kV

Corrida	Tm. (min)		Área		Corriente (μ A)
	Amox	Brom	Amox	Brom	
1	7.50	3.021	40098	178562	66.9
2	7.36	2.99	37013	166285	66.7
3	7.20	2.97	37649	161979	66.5
4	7.01	2.95	37203	158779	66.9
5	6.86	2.92	36500	158163	66.6
6	6.74	2.90	35945	152150	66.5
Promedio	7.11	2.96	37401	162653	
Desvest.	0.296	0.044	1446.15	9079.90	
C.V. (%)	4.16	1.48	3.86	5.58	

Tabla 24. Resultados aplicando 30kV

Corrida	Tm. (min)		Área		Corriente (μ A)
	Amox	Brom	Amox	Brom	
1	5.27	2.32	26312	103839	84.9
2	5.14	2.30	28459	112078	85.3
3	5.31	2.31	26691	107013	83.7
4	5.17	2.32	26561	103797	88.7
5	5.29	2.31	27222	110851	84.1
6	5.30	2.32	28774	113651	83.4
Promedio	5.25	2.31	27336	108538	
Desvest.	0.072	0.008	1039.92	4263.98	
C.V. (%)	1.38	0.35	3.80	3.92	

Se realizó la gráfica de comportamiento de los tiempos de migración en función del voltaje aplicado, así como sus barras de variación para cada uno.



Gráfica 4. Comportamiento de Tm contra voltaje aplicado.

Los resultados muestran que los tiempos de migración disminuyen al aplicar 30kV, lo que provoca que el tiempo de análisis disminuya, además que, los coeficientes de variación de los tiempos de migración y áreas de pico son menores con éste voltaje, es decir hay menor variación. Por lo tanto se elige aplicar un voltaje de 30 kV durante el desarrollo del método.

5.1.8 CONDICIONES ELECTROFORÉTICAS DE SEPARACIÓN (1)

Hasta este momento se han determinado las condiciones electroforéticas mostradas en la tabla 25 para una separación eficiente de los principios activos en disolución.

Tabla 25. Condiciones electroforéticas de separación establecidas (1)

Longitud de onda	214nm
Electrolito soporte	Buffer de Citrato 50mM pH=3
Inyección	Hidrodinámica 5s, 0.5psi.
Capilar	Sílice fundida de 75µm de d.i.y 38cm long. total.
Tiempo de lavado entre corridas	3 min a 20psi. con buffer
Cambio de buffer de corrida	Cada 3 corridas
Voltaje	30kV

5.2 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA y PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DE DESEMPEÑO

Muestra Amoxicilón suspensión (Amox 250mg y Brom 8mg en 5ml)

5.2.1 SOLUBILIDAD DE EXCIPIENTES

Ya que se determinó que la Brom es soluble en metanol (6mg en 5ml) y que la Amox es soluble en agua pH=1 (174mg en 20ml), se realizan las pruebas de solubilidad de los excipientes presentes en la muestra de Amoxicilón suspensión, para saber cuales son solubles a estas condiciones y puedan interferir en el análisis de la muestra.

Dicha suspensión contiene 9 excipientes diferentes, los cuales por cuestiones de confidencialidad no se indicarán los nombres y solo se nombrará cada excipiente diferenciándolos entres sí con un número (1-9).³⁵

Para esta evaluación se pesaron los excipientes guardando las proporciones que presentan en la formulación, y se les agrega 5ml de metanol agitando por 5 minutos, después se adicionan 20ml de agua pH=1 y se agitan por 10 minutos más. Los resultados de solubilidad se presentan en la tabla 26.

Tabla 26. Resultados de Solubilidad de Excipientes

Excipiente	MeOH	Agua pH 1
1	Soluble	-
2	Soluble	-
3	Soluble	-
4	Soluble	-
5	Insoluble	Soluble
6	Insoluble	Parcialmente soluble
7	Insoluble	Insoluble
8	Insoluble	Insoluble
9	Insoluble	Insoluble

Como se puede ver en la tabla 26, 6 de 9 excipientes son solubles en las condiciones de disolución establecidas para los principios activos, y sólo 3 son insolubles, por lo tanto, es necesario evaluar si los excipientes disueltos no interfieren en las señales de los principios activos de interés.

5.2.2 ESPECIFICIDAD

La especificidad o selectividad que como ya se había mencionado es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra⁸. Se realizaron 2 estudios:

1.- Realizar el análisis por EC bajo las condiciones ya establecidas de los excipientes que fueron solubles en dichas condiciones.

Se pesaron los excipientes 1,2,3,4,5 y 6, (solubles en las condiciones establecidas) por separado, en las proporciones de la formulación y preparados en las mismas condiciones que se pretende tratar a la muestra inicialmente:

- 1.- Agregar 5ml de metanol y agitar por 5 minutos
- 2.- Agregar 20ml de agua pH = 1 y agitar por 10 minutos más
- 3.- Todo se lleva a un volumen de 50ml con agua desionizada (Sol. A).

En la Sol. A todos los excipientes tienen una concentración final 10 veces mayor a la que se encuentran en la muestra, con el fin de poder observar una señal más grande, si es que la tienen. En la figura 26 se presentan los electroferogramas del comportamiento de los excipientes, del 1 al 6.

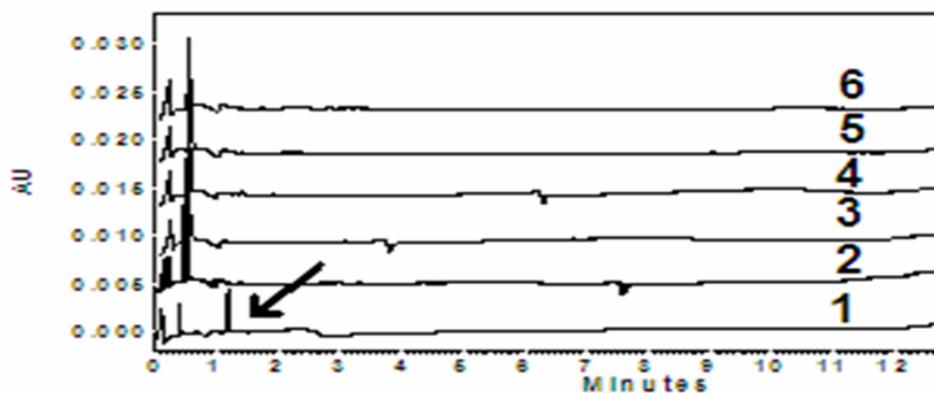


Figura 26. Excipientes 1,2,3,4,5 y 6 a alta concentración.

Condiciones EC: Buffer de citratos 50mM, pH 3, capilar 75 μ m de D.I. y 39cm de largo, 214nm, 30kV, introducción hidrodinámica 5s, 0.5 psi.

Se puede observar que en todos los electroferogramas hay un pico constante con Tm. de 0.5 min, que pertenece al ácido cítrico con el que se prepara el buffer. En el único electroferograma que se observa una señal o pico considerable es del excipiente 1 el cual tiene un Tm. de 1.2 min pero que no causa alguna interferencia en el pico de la Brom que tiene un Tm de 2.5min

Por lo tanto ningún excipiente interfiere en las señales de los principios activos en las mismas condiciones de análisis, a pesar de haberse analizado una disolución concentrada. Por lo que ahora es necesario evaluar la disolución de los principios activos en presencia de todos los excipientes.

2.- Realizar la solubilización y el análisis por EC de Brom y Amox en presencia de los excipientes presentes.

Se prepararon 3 placebos cargados con 1.5mg de Brom y 37mg de Amox en cada uno, guardando las proporciones presentes en la formulación, a los que se les realiza el siguiente tratamiento:

- 1.- Agregar 5ml de metanol y agitar por 5 minutos
- 2.- Agregar 20ml de agua pH = 1 y agitar por 10 minutos más
- 3.- Filtrar la disolución a vacío (para eliminar solutos insolubles)
- 4.- Todo el filtrado se lleva a un volumen de 50ml con agua (Sol. A).
- 5.- Se toma una alícuota de 2ml de la Sol. A y se afora a 10ml (Sol. B).

La medición de Brom se lleva a cabo en la Sol. A con una concentración final de 30µg/ml de Brom y en la Sol. B se hará la medición de Amox con una concentración final de 74µg/ml .

Las Sol. A y B de cada placebo se analizan, bajo las condiciones de separación ya establecidas (ver tabla 25), y a continuación se presentan los electroferogramas obtenidos.

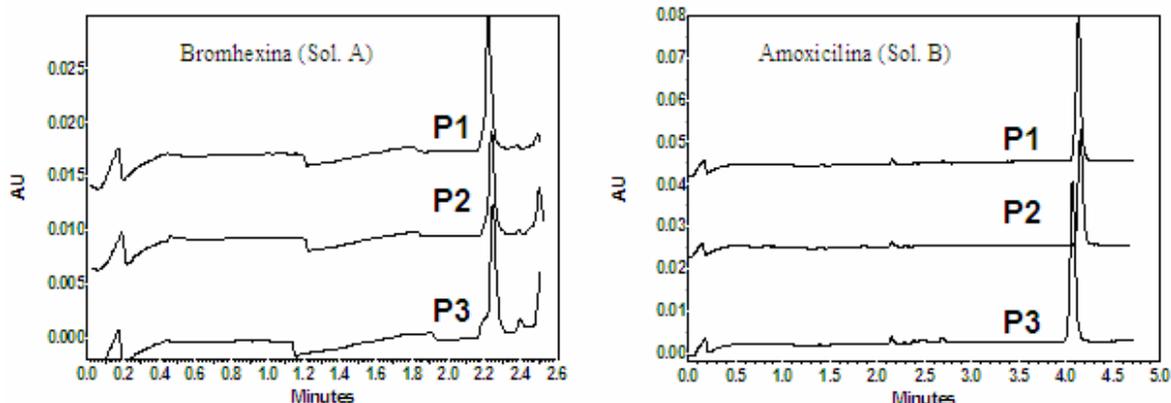


Figura 27. Brom (Sol. A) y Amox (Sol. B) en placebos cargados (P1, P2 y P3).
 Condiciones EC: Buffer de citratos 50mM, pH 3, capilar 75 μ m de D.I. y 39cm de long. total, 214nm, 30kV, introducci3n hidrodin3mica 5s, 0.5 psi.

En todos los placebos podemos observar las se1ales correspondientes a los principios activos, Brom (2.2min) y Amox (4.0min). De esta forma se demuestra que bajo este tratamiento de preparaci3n, los analitos son solubles en el mismo medio, a3n en presencia de los excipientes, ya que se logran detectar ambas se1ales en los placebos cargados.

Sin embargo, se puede ver que la forma del pico de la Amox se mantiene sim3trica, pero cuando analizamos la Sol. A de Brom, su pico se observa con un hombro de lado izquierdo, que se cree es de alg3n excipiente presente en la muestra y que interfiere con la se1al de Brom, pero como ya se hab3an analizado los excipientes solubles (1-6), a pesar de que los electroferogramas mostraban que no hab3a ninguna interferencia con las se1ales, se piensa que pueda ser la interferencia de alguno de los excipientes 7, 8 y/o 9 ya que son parcialmente solubles interfiriendo con la Brom y por eso se observa la deformaci3n en su pico.

Por lo tanto se decidi3 analizar estos excipientes bajo las mismas condiciones de an3lisis; se pesaron en las proporciones que se encuentran en la muestra, por separado y se prepararon de la siguiente manera:

- 1.- Agregar 5ml de metanol y agitar por 5 minutos
- 2.- Agregar 20ml de agua pH = 1 y agitar por 10 minutos más
- 3.- Filtrar la disolución a vacío (para eliminar solutos insolubles)
- 4.- Todo el filtrado se lleva a un volumen de 50ml con agua. (Sol. P)

En la Sol. P todos los excipientes tienen una concentración final 10 veces mayor a la que se encuentran en la muestra, con el fin de poder observar una señal más grande, si es que la tienen. En la figura 28 se presentan los electroferogramas del comportamiento de los excipientes 7,8 y 9.

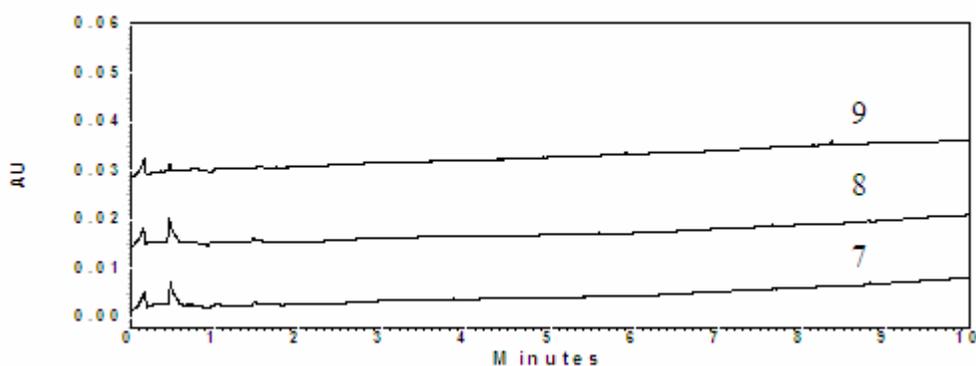


Figura 28. Excipientes 7, 8 y 9 a alta concentración.

Condiciones EC: Buffer de citratos 50mM, pH 3, capilar 75 μ m de D.I. y 39cm de long. total, 214nm, 30kV, introducción hidrodinámica 5s, 0.5 psi.

Como podemos ver en la figura 28, ninguno de los 3 excipientes dan señal, en las condiciones de separación establecidas, por lo tanto no pueden interferir en la señal de Brom. Se decide ahora, hacer el análisis por EC para cada uno de los excipientes solubles (1-6) pero en mezcla con la Brom, para observar la forma del pico y así determinar, cual de estos causa alguna interferencia o deformación.

Para esto se realizaron mezclas de Brom con cada uno de los excipientes del 1 al 6, respetando las proporciones de la formulación. En la figura 29 se observa el comportamiento del pico con cada uno de los excipientes.

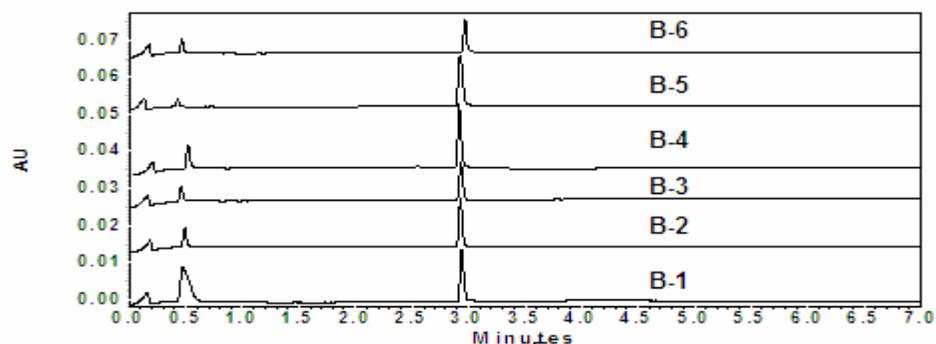


Figura 29. Brom con Excipientes del 1 al 6 (B-1 al B-6) concentrados.

Condiciones EC: Buffer de citratos 50mM, pH 3, capilar 75 μ m de D.I. y 39cm de largo, 214nm, 30kV, introducción hidrodinámica 5s, 0.5 psi.

Observando los electroferogramas de la figura 29, en ninguna de las mezclas analizadas Brom-excipiente, se observa el pico de la Brom deformado, sino que en todos los casos tiene una forma simétrica, lo que indica que la deformación no es provocada por estos excipientes. Se piensa que tal vez todos los excipientes juntos presenten un pico con un tiempo de migración tal que interfiera con la señal de Brom. Por lo que se decidió correr por triplicado un placebo blanco, para evaluar la aparición de algún pico al presentarse todos los excipientes juntos. Para esto se pesaron todos los excipientes, a la misma proporción en la que se encuentran en la formulación y lo equivalente a 2.0g de muestra. Se preparó la disolución como ya se ha mencionado antes y se hizo el análisis por EC a las condiciones ya establecidas (ver tabla 25), los electroferogramas obtenidos, se presentan en la figura 30.

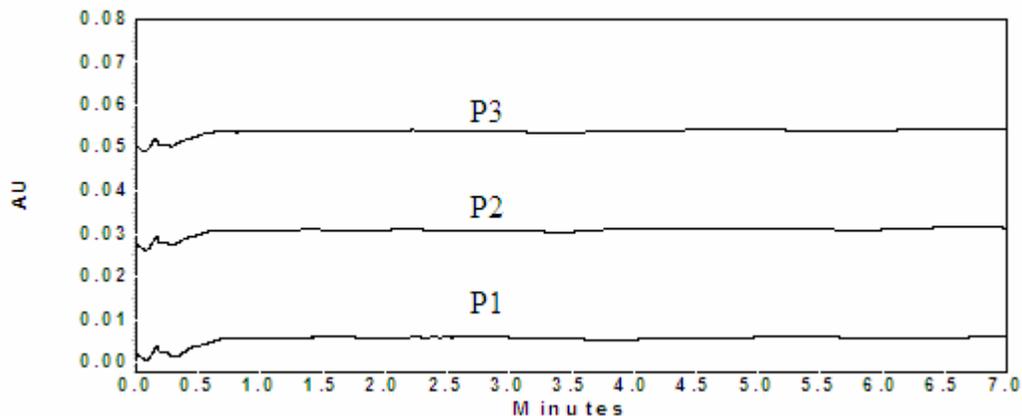


Figura 30. Placebos blancos (P1, P2, P3).

Condiciones EC: Buffer de citratos 50mM, pH 3, capilar 75 μ m de D.I. y 39cm de long. total, 214nm, 30kV, introducción hidrodinámica 5s, 0.5 psi.

Se observa que ninguno de los 3 placebos blancos (P1, P2 y P3) presentan alguna señal, por lo que se concluye que la deformación del pico de la Brom no es provocada por los excipientes presentes en la muestra.³⁵

Se hizo un estudio, para ver si la deformación del pico de Brom en la muestra es debida a la alta concentración de ácido (agua pH = 1 agregada) presente en ella. La concentración final de ácido en la Sol. A donde se lee la Brom es de 50mM, mientras que la concentración de ácido en la disolución de Brom y Amox estándar con la que se desarrollo todo el método era de 15mM. Para hacer el estudio se prepararon 2 soluciones de Brom con las 2 concentraciones de ácido y un blanco de medio de disolución (MeOH:agua), de la siguiente manera (tabla 27):

Tabla 27. Disoluciones de Brom y blanco MeOH:agua

Disolución	Brom ($\mu\text{g/ml}$)	Ácido (mM)	MeOH (ml)
1	32	15	5
2	36	50	5
3	0	50	5

Cada disolución se corrió por triplicado bajo las condiciones de separación establecidas. En la figura 31 se compara la forma del pico de Brom en las 2 concentraciones de ácido.

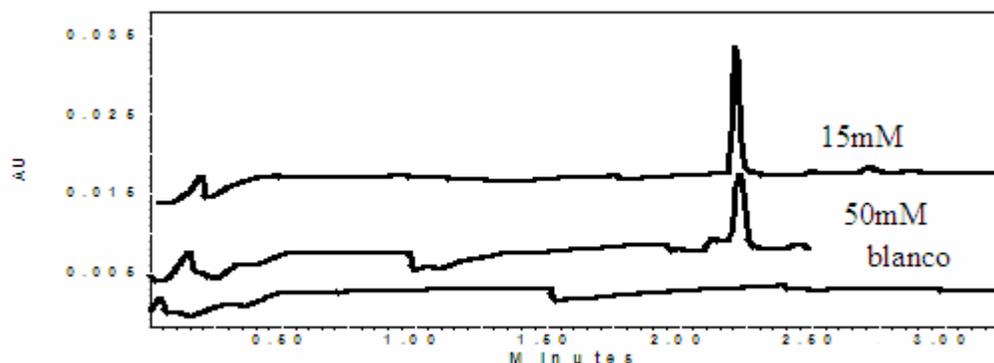


Figura 31. Brom en 2 concentraciones de ácido 50 y 15mM, blanco MeOH:ácido (50mM). Condiciones EC: Buffer de citratos 50mM, pH 3, capilar 75 μm de D.I. y 39cm de largo, 214nm, 30kV, introducción hidrodinámica 5s, 0.5 psi.

Como se puede ver en el electroferograma, el pico de Brom en una concentración de ácido de 15mM es simétrico, mientras que en una concentración de 50mM el pico se observa con un hombro en la parte izquierda, y al observar el electroferograma resultante del blanco con concentración de ácido de 50mM, no se observa ningún pico que interfiera con el pico de Brom, por lo tanto, la deformación del pico de Brom no es debido a ninguna interferencia, sino es sólo el comportamiento de dicho pico a esta concentración de ácido. Ya que la respuesta del método es debida únicamente a los analitos, *se puede decir que el método es Específico.*⁸

5.2.3 LÍMITE DE DETECCIÓN DE BROMHEXINA

En las muestras comerciales, que contienen Brom y Amox, la primera de éstas se encuentra en menor proporción que la segunda (1:31), es decir como analito limitante, por lo que es necesario saber, cuál es el límite de detección de la Brom a las condiciones de separación establecidas, para así determinar el tamaño de muestra a analizar. Este límite de detección es la cantidad mínima de analito que pueda ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de separación electroforéticas establecidas.⁸

Para evaluar este parámetro se siguió el procedimiento establecido en la Guía de Validación de Métodos Analíticos.⁸ El método que se siguió es la determinación del límite de detección con base en la curva de calibración y desviación estándar de regresión, de la siguiente manera:

Se prepararon 5 sistemas con concentraciones de Brom de 1 a 5 µg/ml, por dilución, los cuales se corrieron, bajo las condiciones de separación electroforéticas establecidas. Y se calcularon los siguientes valores: Pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2), la desviación estándar de regresión ($S_{y/x}$) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$). Las fórmulas de cómo se obtuvo cada uno de los anteriores parámetros se encuentran al final de la tesis como Anexo (Formulario).

El límite de detección se calculó con la siguiente fórmula.

$$LD = (3.3 \times S_{y/x}) / b_1$$

Los criterios de aceptación del límite de detección es $r^2 > 0.98$ y $(IC(\beta_1))$ no debe incluir el cero. En la siguiente tabla se muestra los resultados obtenidos para cada parámetro estadístico y el LD.

Tabla 28. Cálculo del Límite de Detección

Parámetro estadístico	Resultado obtenido
Pendiente (b_1)	921.40
Coefficiente de determinación (r^2)	0.983
Desviación Estándar de regresión ($S_{y/x}$)	218.76
Intervalo de Confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$).	700.79 , 1142.01
Límite de detección (LD)	0.784 $\mu\text{g/ml}$

Como se puede observar en la tabla 28, el límite de detección calculado es de 0.784 $\mu\text{g/ml}$, dicho parámetro cumple con los criterios de aceptación ya que la r^2 es mayor a 0.98 y el $IC(\beta_1)$ no incluye al cero.

5.2.4 LÍMITE DE CUANTIFICACION DE BROMHEXINA

Como ya se había mencionado el analito limitante es la bromhexina, por lo que es importante también evaluar el límite de cuantificación, para así determinar el intervalo de concentración a la cuál se hará la curva de calibración. Este límite de cuantificación es la cantidad mínima de analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptable, bajo las condiciones de separación electroforéticas ya establecidas (ver tabla 25).⁸

Para evaluar este parámetro se siguió el procedimiento establecido en la Guía de Validación de Métodos Analíticos⁸. el método que se siguió es la determinación del límite de cuantificación con base en la curva de calibración y desviación estándar de regresión, de la siguiente manera:

Se prepararon 5 sistemas con concentraciones de Brom de 1 a 5 µg/ml, por dilución, los cuales se corrieron, bajo las condiciones de separación electroforéticas establecidas. Y se calcularon los siguientes valores: Pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2), la desviación estándar de regresión ($S_{y/x}$) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$). Las fórmulas de cómo se obtuvo cada uno de los anteriores parámetros se encuentran al final de la tesis como Anexo (Formulario). Y se calculó el límite de cuantificación con la siguiente fórmula.

$$LC = (10 \times S_{y/x}) / b_1$$

Los criterios de aceptación del límite de cuantificación es $r^2 > 0.98$ y $IC(\beta_1)$ no debe incluir el cero. En la siguiente tabla se muestra los resultados obtenidos para cada parámetro y el LC

Tabla 29. Cálculo del Límite de Cuantificación

Parámetro	Resultado obtenido
Pendiente (b_1)	921.4
Coeficiente de determinación (r^2)	0.983
Desviación Estándar de regresión ($S_{y/x}$)	218.76
Intervalo de Confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$).	700.79 , 1142.01
Límite de cuantificación (LC)	2.37µg/ml

Como se puede observar en la tabla 29, el límite de cuantificación calculado es de 2.37µg/ml, dicho parámetro cumple con los criterios de aceptación ya que la r^2 es mayor a 0.98 y el $IC(\beta_1)$ no incluye al cero.

5.2.5 LINEALIDAD DEL SISTEMA

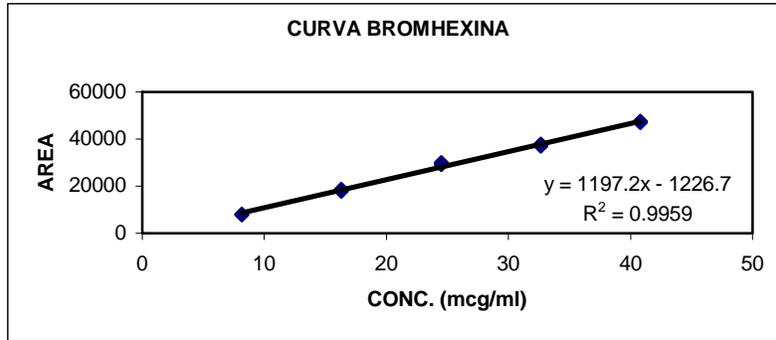
Para seguir optimizando el tratamiento de la muestra es necesario evaluar los recobros en placebos cargados al estudiar diferentes variables del tratamiento. Estos porcentajes de recobro se calculan a partir de concentraciones teóricas y concentraciones experimentales de los analitos calculadas a partir de una curva de calibración. Por lo que es necesario analizar la linealidad del sistema y de esta forma asegurar que los resultados obtenidos directamente (área): son proporcionales a la concentración de los analitos en un intervalo determinado.⁸

Ya que el LC fue de 2.37 μ g/ml, se determinó realizar el primer sistema de la curva 3 veces más concentrada para tener un pico de la bromhexina fácilmente detectable y fácil de integrar. Para esto se preparó una serie de 5 sistemas con 5 niveles de concentración por dilución a partir de una disolución Stock de Brom 200 μ g/ml y una sol. Stock de Amox de 500 μ g/ml, quedando con un intervalo de concentración de 8 a 40 μ g/ml para Brom y de 20 a 100 μ g/ml para Amox (tabla 30), cada sistema se corre por triplicado, bajo las condiciones ya establecidas (ver tabla 25).

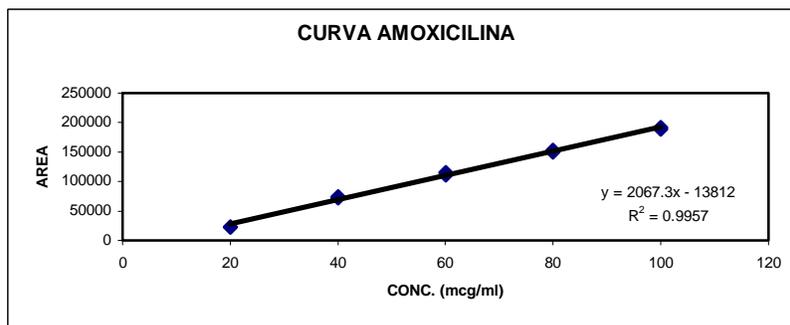
Tabla 30. Preparación de Curva de calibración 1

Sist.	Brom Stock (ml)	Amox Stock (ml)	Aforo (ml)	Conc. Brom (μg/ml)	Conc. Amox (μg/ml)
1	1	1	25	8	20
2	2	2	25	16	40
3	3	3	25	24	60
4	4	4	25	32	80
5	5	5	25	40	100

A continuación se presentan las gráficas 5 y 6 las cuales representan las curvas de calibración, con su respectiva ecuación para cada uno de los principios activos. En este caso está graficados los 3 datos de cada sistema.



Gráfica 5. Curva de calibración de Brom



Gráfica 6. Curva de calibración de Amox

Se observa que para ambos principios activos se obtienen curvas de calibración con un valor de coeficiente de correlación r^2 mayor a 0.98, es decir, se cumple con lo especificado en la guía de validación,⁸ con esto se comprueba la linealidad del sistema y por lo tanto las cuantificaciones que se hagan a partir de ellas serán confiables.

5.2.6 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Se evalúa la exactitud en placebos cargados para verificar si con las condiciones establecidas del tratamiento de la muestra permiten obtener el 100% de los principios activos de la muestra.⁸

Según la guía de Validación de métodos analíticos ⁸, el criterio de aceptación para la exactitud es obtener porcentajes de recobro entre 98 y 102%, y para la repetibilidad indica un C.V. < 2.0%, esto es para métodos cromatográficos, ya que no se cuenta con una especificación para métodos de electroforesis capilar y ya que ésta es comparada con la cromatografía pero no igual, tratamos de acercarnos lo más posible a estos valores. Para realizar la evaluación de estos parámetros se realizó el siguiente método.

Preparación de 3 placebos cargados de Amoxibrón suspensión (250/8mg):

1. Preparar “placebo blanco”, es decir, pesar las cantidades de excipientes proporcionales a la formulación de la suspensión y homogeneizar manualmente.
2. Pesar aproximadamente 1.5 mg de Brom y 47.00 mg de Amox materia prima en un vaso de precipitados.
3. Pesar dentro del mismo vaso una cantidad de “placebo blanco” equivalente a 1.5 mg de Brom y 47.00 mg de Amox.

Posteriormente se realiza el tratamiento mostrado en la siguiente figura 32:

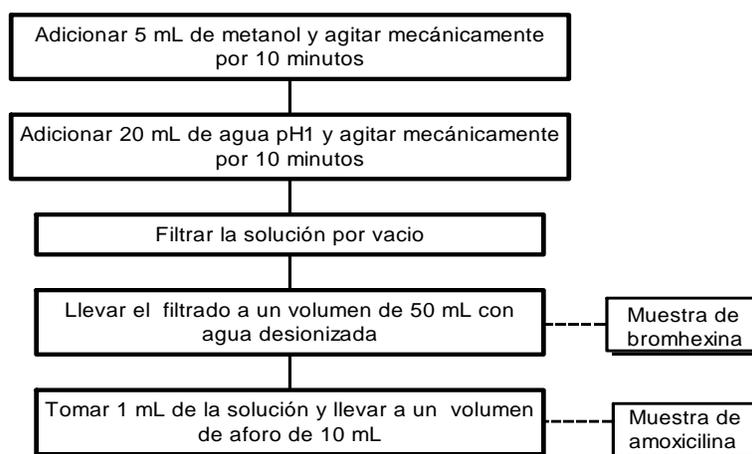


Figura 32. Primer tratamiento propuesto para la muestra de suspensión Brom-Amox

Se realiza el análisis de las muestras tanto de Brom, como de Amox, bajo las condiciones de separación ya establecidas (ver tabla 25). La cuantificación se realizó mediante la interpolación del área de los picos obtenidos dentro de la curva de calibración correspondiente.

Los resultados obtenidos (tabla 31) muestran que se obtienen recobros muy bajos, lo cual indica que el tratamiento propuesto no es el adecuado, ya que no se logra recuperar el 100% de los principios activos, además se tienen C.V. altos. Por lo que se hizo necesario optimizar el tratamiento de la muestra.

Tabla 31. Recobro en placebos cargados empleando el primer tratamiento

Placebo	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)				Área		Recobro (%)	
	Teórica		Experimental		Brom	Amox	Brom	Amox
	Brom	Amox	Brom	Amox				
1	22.4	70.16	14.70	39.55	17706	85999	65.6	56.4
2	22.4	70.16	13.77	38.02	16573	82848	61.6	54.2
3	22.4	70.16	14.35	36.24	17284	79186	64.2	51.7
Promedio					17187.7	82677.7	63.80	54.10
Desviación estándar					572.61	3409.69	2.03	2.35
Coefficiente de variación (%)					3.33	4.12	3.18	4.35

5.2.6.1 OPTIMIZACIÓN DEL TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

A) Tiempo de agitación

Para optimizar el tiempo de agitación y verificar si afecta en la disolución total de los principios activos en la muestra, se preparan dos placebos cargados y se tratan bajo el procedimiento ya planteado (ver figura 32), únicamente se varía el tiempo de agitación de acuerdo a la tabla 32.

Tabla 32. Variación del tiempo de agitación en placebos cargados

	Placebo 1	Placebo 2
Volumen de metanol (mL)	5	5
Volumen de agua pH 1 (mL)	20	20
Tiempo de agitación (min)	10	15

Se analizan los 2 placebos cargados a las condiciones de separación ya establecidas en la tabla 25.

La cuantificación se realizó mediante la interpolación del área de los picos obtenidos dentro de la curva de calibración correspondiente y los promedios de los recobros se presentan en la tabla 33.

Tabla 33. Efecto del tiempo de agitación en el recobro

T. de agitación (min)	Recobro (%)	
	Brom	Amox
10	63.80	54.10
15	105.19	97.63

Los resultados obtenidos (tabla 33) muestran que al aumentar el tiempo de agitación se obtienen mayores porcentajes de recobro debido a que hay mayor tiempo para que se lleve a cabo una disolución completa de los principios activos, aunque nos dan % fuera de las especificaciones pero se acercan más al intervalo, por lo que se sigue optimizando el tratamiento para cumplir con las especificaciones (98 al 100%)⁸. Se decidió que el tiempo de agitación óptimo para el tratamiento de la muestra era de 15 minutos.

B) Volumen de disolución

Para optimizar el volumen de disolución se decide realizar la siguiente metodología:

1. Variar el volumen de metanol para optimizar la disolución de la Brom manteniendo constante el volumen de agua pH 1.
2. Encontrar el volumen óptimo de metanol y posteriormente variar el volumen de agua pH 1 para optimizar la disolución de la Amox.

1.- Volumen de metanol

Se preparan dos placebos cargados y se tratan bajo el procedimiento ya establecido (ver figura 32); únicamente se varía el volumen de metanol adicionado según la tabla 34.

Tabla 34. Variación del volumen de metanol en placebos cargados.

	Placebo 1	Placebo 2
Volumen de metanol (mL)	5	10
Volumen de agua pH 1 (mL)	25	25
Tiempo de agitación (min)	15	15

Se realizó el análisis de los 2 placebos cargados, bajo las condiciones ya establecidas (tabla 25). La cuantificación se realiza mediante la interpolación del área de los picos obtenidos dentro de la curva de calibración correspondiente.

Tabla 35. Efecto del volumen de metanol en el recobro

Vol. de MeOH (ml)	Recobro (%)	
	Brom	Amox
5	81.56	100.62
10	97.60	97.95

La tabla 35 demuestra que al aumentar el volumen de metanol, la Brom se disuelve en mayor proporción logrando obtener porcentajes de recobro más cercanos al 100% .

2.- Volumen de agua pH 1

Una vez establecido el volumen de metanol (10ml) se decide variar el volumen de agua pH 1 en dos placebos cargados de acuerdo a la tabla 38. Dichos placebos se tratan bajo el procedimiento ya planteado (ver figura 32) , únicamente se varía el volumen de agua pH=1.

Tabla 36. Variación de agua pH 1 en placebos cargados

	Placebo 1	Placebo 2
Volumen de metanol (mL)	10	10
Volumen de agua pH 1 (mL)	25	30
Tiempo de agitación (min)	15	15

Se analizan los 2 placebos cargados bajo las condiciones ya establecidas (ver tabla 25) y la cuantificación se realizó mediante la interpolación del área de pico obtenida dentro de una curva de calibración.

Los porcentajes de recobro obtenidos (tabla 37) muestran que no existe diferencia al agregar 25 o 30ml de agua pH 1, ya que los porcentajes de recobro de Amox no aumentan, por lo que se elige agregar 25ml

Tabla 37. Efecto del volumen de agua pH 1 en el recobro

Vol. Agua pH=1 (ml)	Recobro (%)	
	Brom	Amox
25	108.60	97.68
30	105.40	96.61

C) Tipo de agitación

Con el fin de cumplir con los criterios de aceptación de los porcentajes de recobro en los placebos cargados, se realizó un estudio comparativo del tipo de agitación: magnética y ultrasónica. Dichos placebos se tratan bajo el procedimiento ya planteado (ver figura 32), sólo se varió el tipo (magnética y/o ultrasónica) y tiempo de agitación.

Hay que señalar que en la agitación ultrasónica hay un aumento de temperatura debido a el fenómeno de cavitación que se presenta provocando que la muestra se caliente; por lo que se controla la temperatura con bolsas de gel congeladas. Se preparan 4 placebos cargados, variando el tipo y tiempo de agitación como se indica en la tabla 38, los cuáles se corrieron por duplicado cada uno.

Tabla 38. Tipo y tiempo de agitación de placebos cargados

<i>Placebo</i>	<i>Agitación</i>	<i>T. (min)</i>
1	<i>Magnética</i>	15
2	<i>Ultrasónica</i>	5
3	<i>Magnética y Ultrasónica</i>	10 y 10 c/u
4	<i>Ultrasónica</i>	10

La cuantificación en los 4 placebos se realizó a partir de la interpolación en una curva de calibración. En las tablas siguientes (39 - 42) se presentan los resultados de los 4 placebos corridos por duplicado y su promedio de % de recobro y C.V.

Tabla 39. Recobro con agitación magnética de 15 minutos en cada disolvente.

Conc. Teórica ($\mu\text{g/ml}$)		Conc. Exp. ($\mu\text{g/ml}$)		Recobro (%)	
Brom	Amox	Brom	Amox	Brom	Amox
36.51	75.90	32.28	75.96	88.41	100.07
36.51	75.90	34.06	75.82	93.30	99.89
Promedio		33.17	75.89	90.86	99.98
Desvest.		1.263	0.099	3.460	0.130
C.V. (%)		3.80	0.13	3.80	0.13

Tabla 40. Recobro con agitación ultrasónica 5 minutos en cada disolvente.

Conc. Teórica ($\mu\text{g/ml}$)		Conc. Exp. ($\mu\text{g/ml}$)		Recobro (%)	
Brom	Amox	Brom	Amox	Brom	Amox
36.51	75.90	32.05	77.42	87.80	102.00
36.51	75.90	31.53	77.25	86.38	101.78
Promedio		31.79	77.34	87.09	101.89
Desvest.		0.367	0.120	1.007	0.158
C.V. (%)		1.15	0.15	1.15	0.15

Tabla 41. Recobro con agitación magnética 10 minutos y ultrasónica 10 minutos.

Conc. Teórica ($\mu\text{g/ml}$)		Conc. Exp. ($\mu\text{g/ml}$)		Recobro (%)	
Brom	Amox	Brom	Amox	Brom	Amox
36.51	75.90	30.52	77.26	83.59	101.57
36.51	75.90	29.92	77.32	81.96	101.66
Promedio		30.22	77.29	82.78	101.62
Desvest.		0.420	0.045	1.150	0.059
C.V. (%)		1.38	0.05	1.38	0.05

Tabla 42. Recobro con agitación ultrasónica 10 minutos en cada disolvente.

Conc. Teórica ($\mu\text{g/ml}$)		Conc. Exp. ($\mu\text{g/ml}$)		Recobro (%)	
Brom	Amox	Brom	Amox	Brom	Amox
27.55	79.22	25.96	76.56	75.07	102.15
27.55	79.22	26.38	74.44	76.29	99.32
Promedio		26.17	75.50	75.68	100.74
Desvest.		0.297	1.500	0.859	2.002
C.V. (%)		1.13	1.98	1.13	1.98

Los resultados obtenidos muestran que los porcentajes de recobro de la Amox no varían con el tipo de agitación que se realice ya que los porcentajes obtenidos son similares (99.98 – 101-89%); sin embargo, se observa que el porcentaje de recobro de la Brom se ve afectado por que al agitar ultrasónicamente aumenta la temperatura y un porcentaje de Brom se degrada (según Reportes de los Laboratorios Grimann) provocando que se obtengan porcentajes de recobro bajos, aún colocando las bolsas de gel.

Por lo tanto, es conveniente que la agitación sea de tipo magnética y a temperatura ambiente para evitar la degradación de la Brom. Aunque todavía no se cumple con las especificaciones de C.V.

D) Medio de dilución

Si la concentración de ácido en la muestra de Brom es de 50mM y 5mM en la de Amox debido a que la muestra de Amox se obtiene por dilución 1 en 10 de la muestra de Brom, entonces el buffer de citratos que se usa para la separación no amortigua el pH en la muestra de Brom, a pesar de tener una concentración de 50mM, provocando que haya todavía variación.

Se decide evaluar la repetibilidad de tiempos de migración y recobro al variar el medio de dilución de las muestras (agua desionizada y buffer de citratos 50mM pH =3), esperando que al diluir con buffer de citratos, éste amortigüe el pH aún en una concentración alta de ácido.

De esta forma, se preparan dos placebos cargados variando el medio de dilución según la figura 32, los cuales se corrieron por triplicado cada uno.

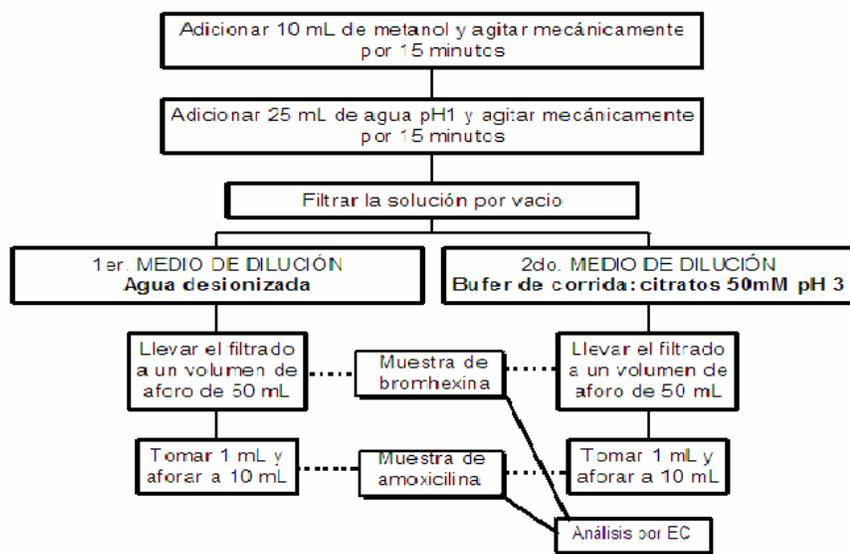


Figura 33. Variación del medio de dilución

La cuantificación se realizó mediante la interpolación del área de pico obtenida dentro de una curva de calibración y los resultados de cada corrida y promedio son los siguientes:

Tabla 43. Repetibilidad (muestras diluidas con buffer de citratos 50mM, pH= 3)

Corrida	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)				Tm. (Min)		Recobro (%)	
	Teórica		Experimental		Brom	Amox	Brom	Amox
	Brom	Amox	Brom	Amox				
1.0	20.00	62.50	21.67	60.26	2.21	4.15	108.32	93.43
2.0	20.00	62.50	21.54	58.31	2.20	4.16	107.69	93.30
3.0	20.00	62.50	21.66	55.69	2.20	4.15	108.30	89.12
Promedio					2.20	4.15	108.10	92.94
Desviación estándar					0.002	0.004	0.359	3.669
Coefficiente de variación (%)					0.10	0.11	0.33	3.94

Tabla 44. Repetibilidad diluyendo las muestras con agua desionizada

Corrida	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)				Tm. (Min)		Recobro (%)	
	Teórica		Experimental		Brom	Amox	Brom	Amox
	Brom	Amox	Brom	Amox				
1.0	24.00	75.00	14.70	39.55	2.20	4.12	114.00	100.57
2.0	24.00	75.00	13.77	38.02	2.20	4.13	116.74	99.72
3.0	24.00	75.00	14.35	36.24	2.18	4.15	114.84	101.59
Promedio					2.19	4.13	115.19	100.63
Desviación estándar					0.010	0.012	1.405	0.933
Coefficiente de variación (%)					0.45	0.30	1.22	0.92

Las tablas 43 y 44 muestran la repetibilidad en tiempos de migración y recobro obtenidos y se puede observar que diluyendo con el buffer de citratos los C.V. son menores. Esto debido a que al utilizar el buffer como medio de dilución se genera un mayor amortiguamiento del pH en la separación por que se aumenta la concentración del buffer en la muestra, lo cual no sucede al diluir con agua desionizada. De esta forma, las condiciones óptimas para el tratamiento de la muestra, equivalente a 1.5mg de Brom y 47mg de Amox, son las siguientes:

Volumen de disolución: 10 ml de metanol + 25 mL de agua pH 1

Tiempo de agitación: 15 minutos con c/u de los medios de disolución

Tipo de agitación: magnética

Medio de dilución: buffer de citratos 50 mM, pH 3

D) Evaluación de condiciones de tratamiento de muestra

Una vez realizado todos los estudios para optimizar el tratamiento de las muestras, se decide evaluar la exactitud y repetibilidad a estas nuevas condiciones de tratamiento. Para verificar si en dichas condiciones se logran porcentajes de recobro dentro de las especificaciones (98 - 102%) y C.V. menor al 2%.⁸

Se prepararon seis placebos cargados, los cuales se trataron con las condiciones antes mencionadas y se analizaron bajo las condiciones electroforéticas ya establecidas como óptimas (ver tabla 25), éstos placebos se corrieron una sola vez, los resultados se muestran en la tabla 45.

Tabla 45. Exactitud y Repetibilidad en placebos cargados empleando el tratamiento optimizado

Placebo	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)				Tm. (min)		Recobro (%)	
	Teórica		Experimental		Brom	Amox	Brom	Amox
	Brom	Amox	Brom	Amox				
1	32.51	90.26	28.88	79.98	2.58	8.39	88.82	88.61
2	34.43	90.45	34.11	83.61	2.53	8.43	99.08	92.43
3	36.34	90.45	40.60	86.84	2.50	8.45	111.71	96.00
4	36.34	93.13	34.46	85.88	2.49	8.69	94.82	92.21
5	36.34	91.22	30.90	81.73	2.49	9.01	85.02	89.59
6	36.34	91.41	35.15	95.57	2.48	9.08	96.72	104.55
Promedio					2.51	8.67	96.03	93.90
Desviación estándar					0.036	0.304	9.278	5.819
Coefficiente de variación (%)					1.45	3.50	9.66	6.19

Los resultados muestran que los porcentajes de recobro están por debajo de las especificaciones y tienen una gran variación.

Esto lo atribuimos a que el tratamiento de la muestra establecido genera un sistema con una concentración de ácido muy alta (50mM), que aún llevando a volumen con buffer de citratos, no se logra amortiguar el pH. Lo que provoca gran variabilidad en los tiempos de migración, áreas de pico y porcentajes de recobro.

Por lo que se decide hacer algunos cambios en las condiciones de separación, a fin de mejorar la exactitud y repetibilidad.

5.2.7 CONDICIONES ELECTROFORÉTICAS DE SEPARACIÓN (2)

Se prueba un buffer mixto de fosfatos-citratos 50-50mM, con concentración final de 100mM, lo que implica un aumento en la corriente en un capilar de 75 μ m corriendo el riesgo de llegar al límite permitido, por lo que se decide utilizar un capilar de 50 μ m de diámetro, que genera valores de corriente menor, debido a que disipa más el calor.

Además, cuando se compararon los 2 diámetros internos del capilar en estudios anteriores, el capilar de 50 μ m se rechazó debido a que el tiempo de corrida era mayor que en 75 μ m, sin embargo, la distancia que existe entre el pico de Brom y Amox, permite realizar el estudio en un capilar de longitud más corta, es decir, de 31cm para disminuir el tiempo de corrida debido a que la distancia entre el lugar de inyección y detección es menor. En la tabla 46 se presentan las condiciones electroforéticas (2).

Tabla 46. Nuevas Condiciones de separación electroforéticas (2).

LONGITUD DE ONDA	214nm
Electrolito soporte	Buffer de Citratos 50mM-fosfatos 50mM, pH=3
Inyección	Hidrodinámica 5s, 0.5psi.
Capilar	Sílice fundida de 50 μ m de d.i. y 31cm de long. total.
Tiempo de lavado entre corridas	3 min con buffer
Cambio de buffer de corrida	Cada 3 corridas
Voltaje	30kV

Para evaluar el comportamiento de la separación bajo estas nuevas condiciones electroforéticas, se corrió por triplicado una disolución de Brom-Amox con concentración de 30.8 y 960 μ g/ml respectivamente.

En tabla 47, se presentan los resultados obtenidos de la separación con estas condiciones y en la figura 34 se observan los electroferogramas de los principios activos en las 2 condiciones electroforéticas.

Tabla 47. Promedio de corriente y tiempos de migración de los principios activos bajo las condiciones de tabla 46

Parámetro	Resultado
Corriente	131 μ A
Tiempo de migración de Brom	1.39 min
Tiempo de migración de Amox	3.46 min
Tiempo de análisis	4.00 min

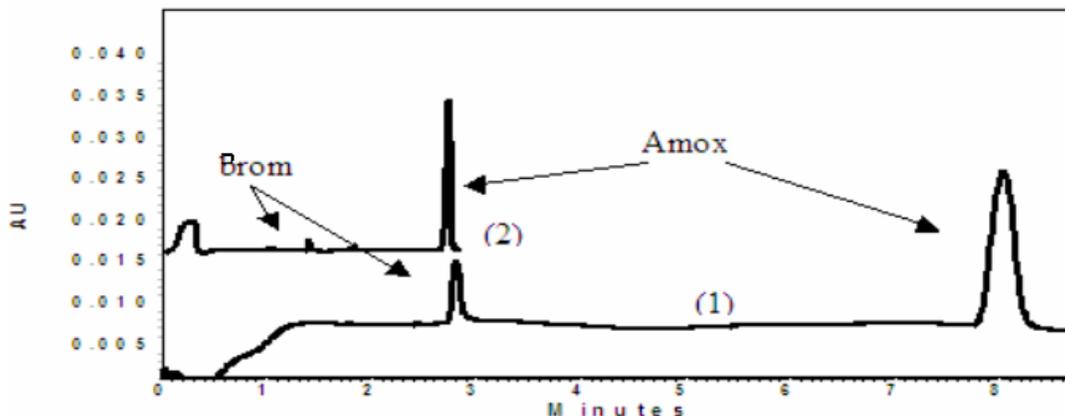


Figura 34. Comparación de 2 condiciones electroforéticas.

- (1).-Capilar de 38cm de largo, 75 μ m de I.D; buffer de citratos 50mM pH 3. y
 (2).- Capilar de 30cm de largo, 50 μ m de I.D; buffer de citratos-fosfatos 50mM, pH 3

Los tiempos de migración de ambos principio activos son menores y por lo tanto el tiempo de análisis se reduce a 4 minutos, los picos de ambos principios activos son más pequeños, sobre todo el de Brom, por lo que se puede hacer la cuantificación de ambos en la misma muestra, aunque la Amox está 10 veces más concentrada, ya no será necesaria la dilución 1 en 10 de la muestra de Amox. Se decide seguir el análisis electroforético de los placebos bajo estas condiciones.

Se realiza el estudio de C.V. de tiempos de migración y áreas de los picos analizando por sextuplicado una disolución de Brom-Amox (36 y 1010 μ g/ml respectivamente), los resultados se presentan en la tabla 48.

Tabla 48. Repetibilidad de tiempos de migración y áreas en las condiciones (2)

Corrida	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)		Tm. (min)		Área	
	Brom	Amox	Brom	Amox	Brom	Amox
1	36.170	883.97	1.35	2.66	2915	66654
2	36.170	883.97	1.37	2.74	2990	70061
3	36.170	883.97	1.36	2.70	2985	68542
4	36.170	883.97	1.36	2.72	2955	69384
5	36.170	883.97	1.35	2.65	2930	67895
6	36.170	883.97	1.36	2.66	2963	68323
Promedio			1.36	2.70	2952	68357
Desviación estándar			0.009	0.055	53.033	2409.113
Coefficiente de variación(%)			0.67	2.06	1.79	3.52

Como podemos ver la mayoría de los C.V. calculados son menores del 2%, entonces se decide seguir el análisis bajo estas condiciones y estudiar la linealidad a estas nuevas concentraciones.

5.2.7.1 LÍMITE DE DETECCIÓN DE BROMHEXINA

Es necesario volver a evaluar el límite de detección de la Brom en estas condiciones debido a que al realizar el análisis en un capilar de $50\mu\text{m}$ hay una disminución en el paso de luz óptica provocando que el límite de detección sea mayor al de $75\mu\text{m}$.⁸

Para evaluar este parámetro se siguió el procedimiento establecido en la Guía de Validación de Métodos Analíticos.⁸ El método que se siguió es la determinación del límite de detección con base en la curva de calibración y desviación estándar de regresión, de la siguiente manera:

Se prepararon 5 sistemas con concentraciones de Brom de 1 a $5\mu\text{g/ml}$, por dilución, los cuales se corrieron, bajo las condiciones de separación electroforéticas establecidas (ver tabla 48). Y se calcularon los siguientes valores: Pendiente (b_1), el coeficiente de

determinación (r^2), la desviación estándar de regresión ($S_{y/x}$) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$).

Las fórmulas de cómo se obtuvo cada uno de los anteriores parámetros se encuentran al final de la tesis como Anexo (Formulario). Y se calculó el límite de detección con la siguiente fórmula.

$$LD = (3.3 \times S_{y/x}) / b_1$$

Los criterios de aceptación del límite de detección es $r^2 > 0.98$ y ($IC(\beta_1)$) no debe incluir el cero. En la siguiente tabla se muestra los resultados obtenidos para cada parámetro estadístico y el LD

Tabla 49. Cálculo del Límite de Detección

Parámetro estadístico	Resultado obtenido
Pendiente (b_1)	640.80
Coefficiente de determinación (r^2)	0.988
Desviación Estándar de regresión ($S_{y/x}$)	131.41
Intervalo de Confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$).	508.29 , 773.32
Límite de detección (LD)	0.677μg/ml

Como se puede observar en la tabla 49, el límite de detección calculado es de 0.677 μ g/ml, dicho parámetro cumple con los criterios de aceptación ya que la r^2 es mayor a 0.98 y el $IC(\beta_1)$ no incluye al cero.

5.2.7.2 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN DE BROMHEXINA

Como ya se había mencionado el analito limitante es la bromhexina, por lo que es importante también evaluar el límite de cuantificación, para así determinar el intervalo de concentración a la cuál se hará la curva de calibración.

Para evaluar este parámetro se siguió el procedimiento establecido en la Guía de Validación de Métodos Analíticos⁸. el método que se siguió es la determinación del límite

de cuantificación con base en la curva de calibración y desviación estándar de regresión, de la siguiente manera:

Se prepararon 5 sistemas con concentraciones de Brom de 1 a 5 µg/ml, por dilución, los cuales se corrieron, bajo las condiciones de separación electroforéticas establecidas (ver tabla 48). Y se calcularon los siguientes valores: Pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2), la desviación estándar de regresión ($S_{y/x}$) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$). Las fórmulas de cómo se obtuvo cada uno de los anteriores parámetros se encuentran al final de la tesis como Anexo (Formulario). Y se calculó el límite de cuantificación con la siguiente fórmula.

$$LC = (10 \times S_{y/x}) / b_1$$

Los criterios de aceptación del límite de cuantificación es $r^2 > 0.98$ y ($IC(\beta_1)$) no debe incluir el cero. En la siguiente tabla se muestra los resultados obtenidos para cada parámetro y el LC.

Tabla 50. Cálculo del Límite de Cuantificación

Parámetro	Resultado obtenido
Pendiente (b_1)	640.80
Coeficiente de determinación (r^2)	0.988
Desviación Estándar de regresión ($S_{y/x}$)	131.41
Intervalo de Confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$).	508.29 , 773.32
Límite de cuantificación (LC)	2.05µg/ml

Como se puede observar en la tabla 50, el límite de cuantificación calculado es de 2.05µg/ml, dicho parámetro cumple con los criterios de aceptación ya que la r^2 es mayor a 0.98 y el $IC(\beta_1)$ no incluye al cero.

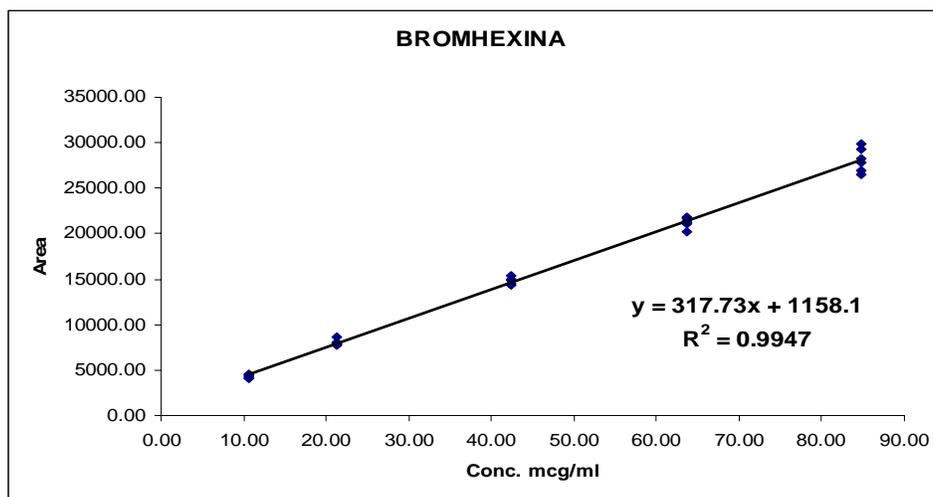
5.2.7.3 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Ya que el LC fue de 2.05µg/ml, se determinó realizar el primer sistema de la curva 5 veces más concentrada para tener un pico de la bromhexina fácilmente detectable y fácil

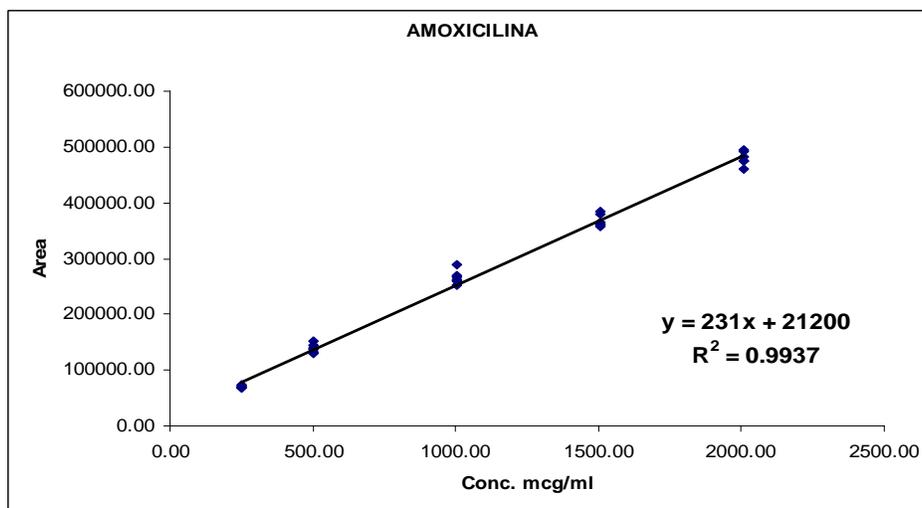
de integrar. Para esto se preparó una serie de 5 sistemas con 5 niveles de concentración por dilución a partir de una disolución Stock.

El intervalo de concentraciones fue de Brom 11-60µm/ml y de Amox 887-1,209µg/ml. Los cuáles se corrieron por triplicado.

Las gráficas obtenidas se muestran a continuación, así como su ecuación de linealidad, los datos graficados fueron 3 datos para cada sistema.



Gráfica 7. Curva de calibración de Brom.



Gráfica 8. Curva de calibración de Amox.

Los resultados muestran una linealidad ($r^2 > 0.98$) en ambas curvas a pesar de tener altas concentraciones de Amox.⁸

5.2.7.4 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Se evalúan los C.V. de porcentajes de recobro en 3 placebos cargados, tratados según la figura 35 y analizados bajo las condiciones electroforéticas (2) (ver tabla 46). Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 51.

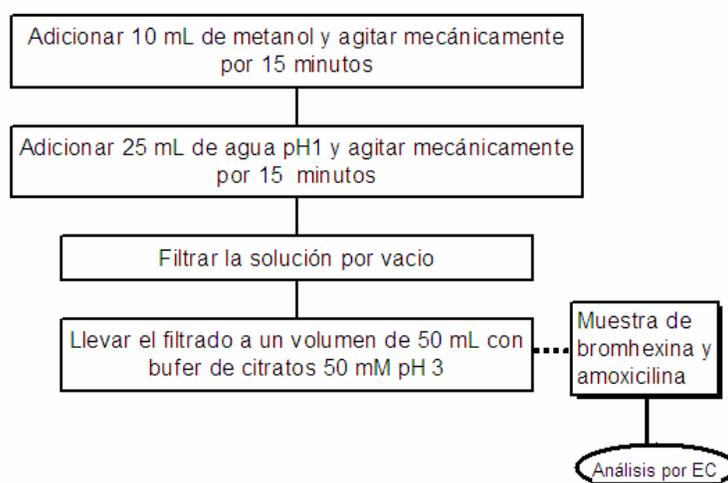


Figura 35. Tratamiento de la muestra final

Tabla 51. Repetibilidad y Recobro (condiciones tabla 46)

Placebo	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)				Tm (Min)		Recobro (%)	
	Teórica		Experimental		Brom	Amox	Brom	Amox
	Brom	Amox	Brom	Amox				
1	36.17	883.97	37.72	730.04	1.35	2.66	104.29	92.58
2	38.07	883.99	38.78	793.00	1.37	2.74	101.85	99.70
3	36.20	881.56	37.61	769.22	1.35	2.64	103.89	97.25
Promedio					1.36	2.70	103.07	96.14
Desviación estándar					0.009	0.056	1.723	5.034
Coefficiente de variación (%)					0.67	2.06	1.67	5.84

Como se puede ver los C.V. de tiempos de migración, y recobros ya son más pequeños, con excepción del C.V. de % de recobro de Amox. Debido a esto se planteo utilizar un estándar interno para disminuir la variabilidad.

5.2.8 DETERMINACIÓN DE ESTÁNDAR INTERNO

Para hacer mejorar la repetibilidad en los porcentajes de recobro de Amox se decide utilizar un estándar interno que debe dar una señal entre Brom y Amox o bien, al final de la corrida.³⁶

Se prueban diferentes principios activos preparados a una concentración de 100µg/ml aproximadamente y se realiza su análisis electroforético, en un tiempo de análisis límite de 7 minutos. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 52.

Tabla 52. Resultados de Principios Activos propuestos como estándar interno

Principio Activo	Concentración (µg/ml)	Tm. (min)
BROM	36	1.39
AMOX	1010	2.79
Ácido difenilamino-4-sulfónico de bario	102	No sale
Acido tauroteoxecolico	100	No sale
Adenina	104	1.08
Brucina	100	1.63
Clorhidrato de tetraciclina	108	2.17
Difenilcarbazona	102	No sale
Guanina	128	1.70
Hidroclorotiazida	98	No sale
Maleato de clorfenamina	102	1.00
Metilcitosina	92	1.04
Oxacilina sódica	100	No sale
Oxitetraciclina	108	2.33
Penicilina G	100	1.12
Ranitidina	80	1.36
Riboflavina	100	No sale
Succinato de doxilamina	98	0.80
Sulfametoxazol	98	No sale
Trimetoprim	102	1.40

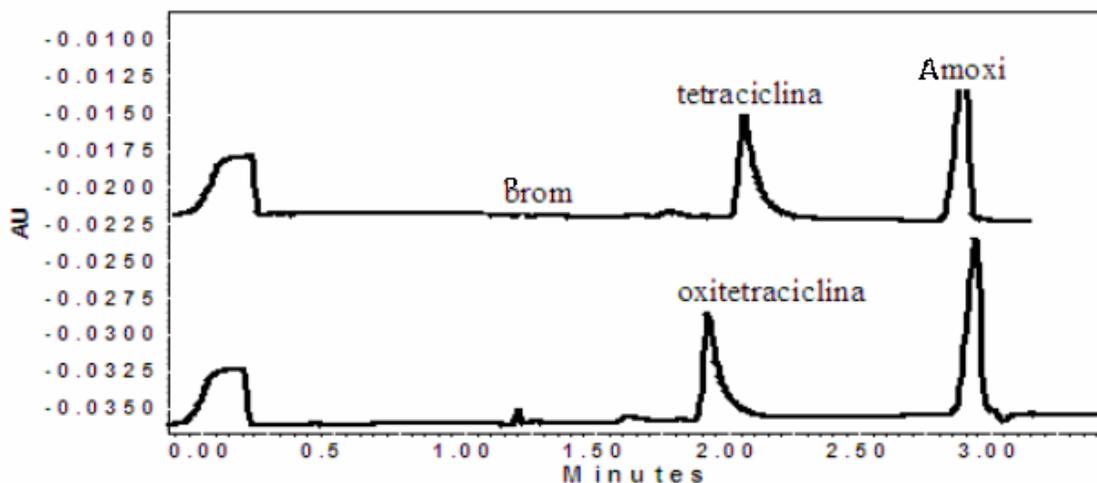


Figura 36. Brom y Amox con tetraciclina y oxitetraciclina como estándar interno.
 Condiciones: Capilar de 30cm de long. total, 50 μ m de I.D, buffer de citratos-fosfatos 50mM, pH 3, 30kV, introducción hidrodinámica 5s a 0.5psi

De todos los principios activos analizados, únicamente la oxitetraciclina y la tetraciclina dan señal en un tiempo de 2.07 y 2.13min respectivamente, sin embargo, el electroferograma de la figura 36 muestra que los picos de tetraciclina y oxitetraciclina están coaleados. Aún así, se realizó una evaluación a la tetraciclina como estándar interno con el fin de observar si mejora los parámetros estadísticos.

5.2.8.1 TETRACICLINA

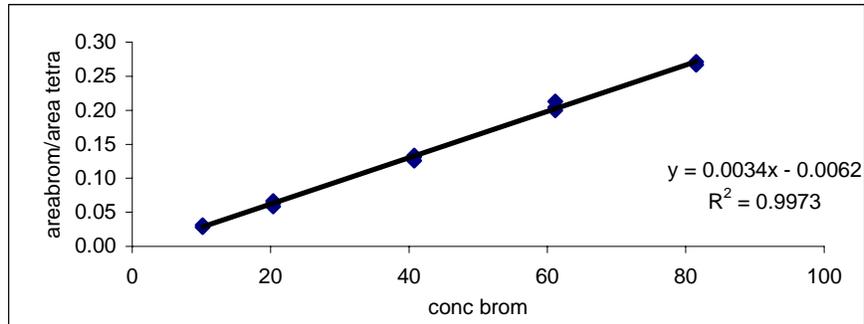
5.2.8.1.1 Linealidad del sistema

Se realiza una curva de calibración donde los intervalos de concentración de los sistemas son para Brom de 10-81 μ g/ml, y Amox de 250-1990 μ g/ml mientras que la concentración de tetraciclina es constante de 22.8 μ g/ml

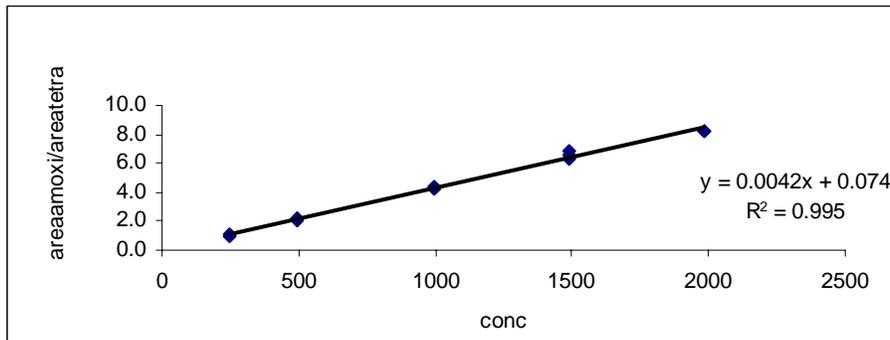
En la tabla 53 se presenta la comparación de los parámetros de linealidad entre 2 curvas de calibración: con estándar interno y sin estándar interno. En las gráficas 9 y 10 se presentan las curvas corregidas con estándar interno y sus parámetros de linealidad.

Tabla 53. Parámetros de linealidad con y sin estándar interno.

Parámetro	Sin Estándar Interno		Con Estándar Interno	
	Brom	Amox	Brom	Amox
m	317.73	231.00	0.0034	0.0042
b	1158.10	21200.00	0.0062	0.0740
r ²	0.995	0.994	0.997	0.995



Gráfica 9. Curva de calibración Brom con tetraciclina como estándar interno



Gráfica 10. Curva de calibración Amox con tetraciclina como estándar interno

Se cumple con los criterios de linealidad $r^2 > 0.98$ y se observa que el uso del estándar interno mejora los parámetros de linealidad.

5.2.8.1.2 Exactitud y Repetibilidad del método con tetraciclina

Se realizan 3 placebos cargados y se tratan bajo las condiciones ya establecidas (ver figura 35), adicionando 5ml de tetraciclina (228 μ g/ml). Posteriormente se analizan bajo las condiciones electroforéticas (2). En la tabla 54 se presentan los resultados obtenidos de C.V. de % de recobro.

Tabla 54. Repetibilidad y Recobro con estándar interno

Placebo	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)				$\frac{\text{Área}_{\text{analito}}}{\text{Área}_{\text{std Interno}}}$		Recobro (%)	
	Teórica		Experimental		Brom	Amox	Brom	Amox
	Brom	Amox	Brom	Amox				
1	38.07	864.51	38.63	869.49	0.138	3.726	101.47	100.57
2	38.01	864.51	38.20	911.00	0.136	3.900	100.50	105.37
3	41.88	885.55	41.50	951.85	0.147	4.049	99.11	107.48
Promedio					0.140	3.892	100.30	104.48
Desviación estándar					0.006	0.162	1.182	3.542
Coefficiente de variación (%)					2.17	2.15	1.17	3.39

Como se puede observar se disminuyó el C.V. de % de recobro de Amox, sin embargo, no son menores a 2%, esto lo atribuimos a que la forma del pico del estándar interno está coleado, lo que provoca que la integración no sea reproducible o debido a que el estándar interno no sirve porque su tiempo de migración es menor al de la Amox que es el analito con mayor variación.

Por lo que es necesario que el estándar interno ideal cumpla con las siguientes especificaciones:³⁶

- Poseer una sola carga positiva al pH de trabajo para que se encuentre en las mismas condiciones que los analitos.
- Tener un peso molecular mayor o cercano al de la Amox (419.45 g/mol) y de la Brom (412.6 g/mol) para que su señal salga después o en medio de ambas.
- Su señal debe ser un pico fino, simétrico y de buena resolución para tener una mejor integración.
- Que en la medida de lo posible tenga un tiempo de migración mayor al de Amox pero menor a 7 minutos, bajo las condiciones electroforéticas (2), Para evitar que el análisis sea muy largo.

En la tabla 55 se presentan los principios activos encontrados en bibliografía que cumplen con las 2 primeras características antes mencionadas, los cuales fueron analizados bajo las condiciones de separación de la tabla 46 y los resultados son los siguientes:

Tabla 55. Resultados de los principios activos

Principios Activos	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Tm. (min)
BROM	36	1.39
AMOX	1010	2.79
Ketoconazol	100	1.40
Lercandipina	100	1.90
Gentamicina	100	no sale en 6 min
Ciprofloxacina	100	1.40
Difenidol	100	1.40
Loperamida	100	1.96
Neomicina	100	1.20
Ofloxacina	100	no sale en 6 min
Furosemida	100	no sale en 6 min
Dicloxacilina en polvo	100	no sale en 6 min
Dicloxacilina compactada	100	no sale en 6 min

De estos principios activos analizados, la lercandipina y la loperamida tienen un tiempo de migración entre el de la Brom y la Amox, por lo que se decide preparar una mezcla de las tres sustancias para observar el comportamiento.

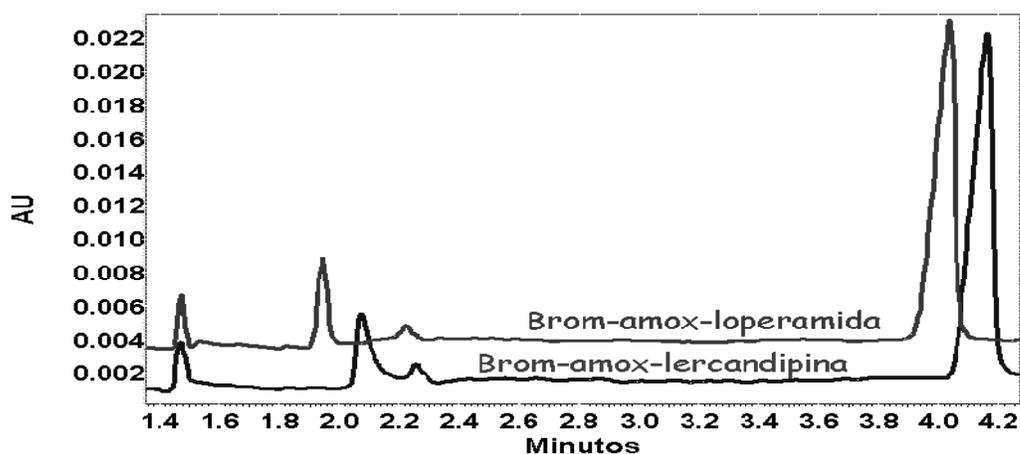


Figura 37. Loperamida y lercandipina en mezcla con Brom-Amox.

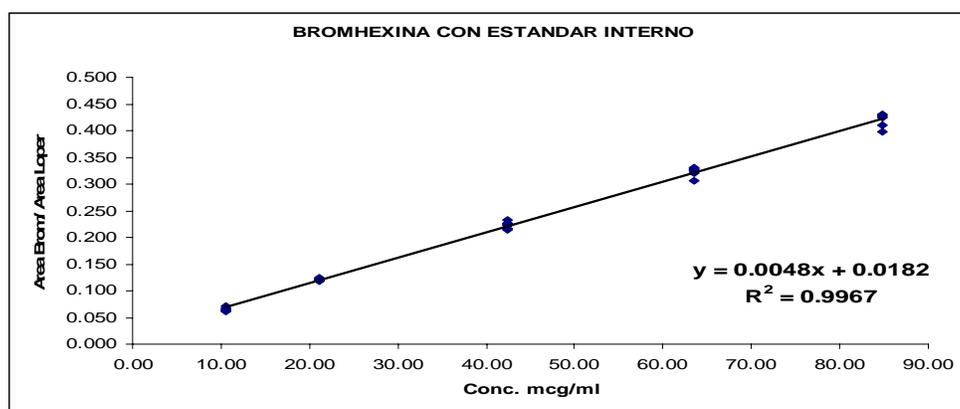
Condiciones: Capilar de 30cm de long., $50\mu\text{m}$ de I.D, buffer de citratos-fosfatos 50mM, pH 3, 30kV, introducción hidrodinámica 5s a 0.5psi

La figura 37 muestra el comportamiento de las señales. Se puede observar que el pico de la lercandipina se deforma a causa de una posible degradación o interacción con los analitos, por lo que se decide utilizar la loperamida como estándar interno con el fin de repetibilidad.

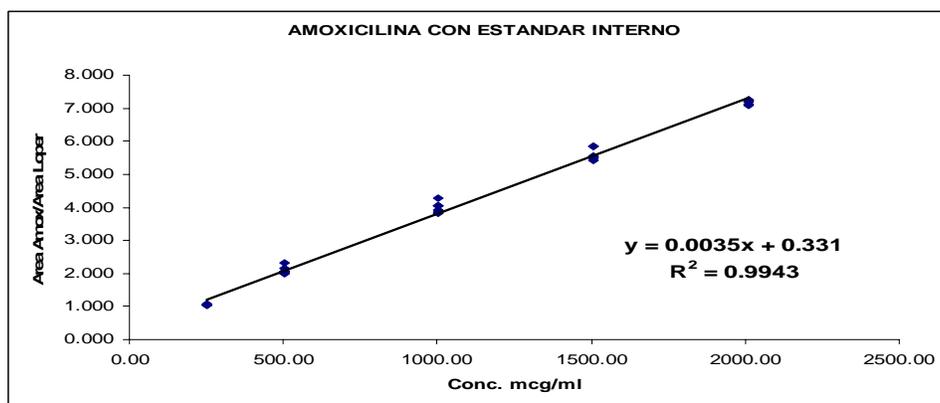
5.2.8.2 LOPERAMIDA

5.2.8.2.1 Linealidad del sistema

Se realiza una curva de calibración con intervalos de concentración de Brom de 10-85µg/ml y de Amox de 250-2000 µg/ml, donde la concentración de loperamida es constante de 202.4µg/ml en todos los sistemas. Las gráficas 11 y 12 con su respectiva ecuación de linealidad se muestran a continuación:



Gráfica 11. Curva de calibración Brom con loperamida como estándar interno.



Gráfica 12. Curva de calibración Amox con loperamida como estándar interno.

Los parámetros de linealidad cumplen, ya que los coeficientes de correlación son mayores al 0.98, además que el pico de loperamida presenta una forma más simétrica que la tetraciclina.

5.2.8.2.2 Exactitud y Repetibilidad del método con loperamida

Se evaluaron los porcentajes de recobro y su coeficiente de variación en 3 placebos cargados, los cuales se trataron bajo las condiciones ya establecidas (ver figura 35) y se corrieron por duplicado, bajo las condiciones electroforéticas óptimas (ver tabla 46). Los resultados individuales y promedio obtenidos se presentan en la tabla 56.

Tabla 56. Exactitud y Repetibilidad con estándar interno

	Conc. Exp. ($\mu\text{g/ml}$)		Recobro (%)	
	Brom	Amox	Brom	Amox
1.1	48.54	1040.22	105.53	98.89
1.2	47.34	1019.37	102.92	96.82
2.1	43.70	1039.87	95.01	98.01
2.2	44.54	1039.65	96.82	101.88
3.1	44.59	967.10	96.92	95.47
3.2	46.57	949.46	101.24	96.98
Promedio	45.92	1012.59	99.74	98.01
Desvest	3.460	40.740	4.160	2.220
C.V.(%)	7.54	4.023	4.13	2.26

Se observa que se cumplen con las especificaciones de exactitud ya que los porcentajes de recobro están dentro del intervalo del 98 al 102 %. Aunque los C.V. no son menores a 2 % que es lo especificado para métodos cromatográficos, sin embargo son aceptables para el método de electroforesis capilar.

5.2.8.2.3 Cuantificación en Amoxicilón Suspensión (250/8mg)

Se analizaron 3 suspensiones de Amoxicilón (250/8mg) con No. de lote 001GF046, tomando una muestra de 625mg de polvo por duplicado, las cuáles se prepararon y analizaron bajo las condiciones de pretratamiento (ver figura 35) y separación electroforéticas ya establecidas (ver tabla 46); se realizó la cuantificación de ambos

principios activos en cada una por sustitución del área en la ecuación de linealidad obtenida en la curva de calibración respectiva (ver gráficos 11 y 12); utilizando loperamida como estándar interno.³⁷ Los resultados se presentan en la tabla 57:

Tabla 57. Cuantificación de Amoxicilina Suspensión

Muestra	Conc. Exp. (µg/ml)		Porcentaje Exp.		Cantidad Exp. (mg/5ml)	
	Brom	Amox	Brom	Amox	Brom	Amox
1.1	40.87	1164.16	102.17	93.06	8.17	232.65
1.2	40.32	1154.33	100.81	92.27	8.06	230.68
2.1	38.84	1137.51	97.09	90.94	7.77	227.36
2.2	38.75	1158.65	96.87	92.63	7.75	231.58
3.1	43.21	1175.92	98.01	94.04	7.84	235.11
3.2	41.16	1147.49	102.91	91.77	8.23	229.42
Promedio	40.53	1156.34	99.64	92.45	7.97	231.13
Desvest	1.659	13.317	2.653	1.070	0.210	2.671
C.V.(%)	4.09	1.15	2.66	1.16	2.66	1.15

Se observa que los porcentajes obtenidos de la Amox están dentro de el intervalo de aceptación de 90 - 120%^{30, 32}, por lo que cumple con las especificaciones de la FEUM y USP, mientras que para la Brom no existen especificaciones en dichas referencias, pero los porcentajes obtenidos están muy cerca del 100% (99.64%), por lo que en ambos casos la suspensión cumple con las especificaciones de Valoración, con C.V. cercanos al 2% que es lo especificado para métodos cromatográficos.

5.2.8.2.4 Cuantificación en Amoxicilina Cápsulas (500/8mg)

Se realizó la cuantificación de Brom y Amox en cápsulas de Amoxicilina (500/8mg) con No. de lote 002FG034 de la siguiente manera. Se tomaron 2 cápsulas al azar de cada caja (3 cajas en total) para un total de 6 cápsulas. Se tomó una muestra de 145mg de polvo de cada cápsula la cual se trató igual que la suspensión (ver figura 35) y se analizó bajo las condiciones separación electroforéticas ya establecidas (ver tabla 46). Se realizó la cuantificación de ambos principios activos en cada una por sustitución en la ecuación de linealidad obtenida en la curva de calibración respectiva (ver gráficos 11 y 12); utilizando loperamida como estándar interno.³⁷ Los resultados se presentan en la tabla 58:

Tabla 58. Cuantificación de Amoxibrón Cápsulas

Cápsula	Conc. Exp. (µg/ml)		Porcentaje Exp.		Cantidad Exp. (mg/cápsula)	
	Brom	Amox	Brom	Amox	Brom	Amox
1.1	41.90	1195.28	103.94	99.33	8.31	496.68
1.2	41.19	1187.39	103.20	92.53	8.25	462.65
2.1	39.86	1191.51	102.23	100.26	8.17	501.30
2.2	40.53	1191.81	104.42	100.48	8.35	502.41
3.1	40.69	1191.08	99.53	98.96	7.96	494.84
3.2	39.14	1197.18	98.26	100.54	7.86	502.72
Promedio	40.55	1192.38	101.93	98.68	8.15	493.43
Desvest	0.972	3.438	2.496	3.084	0.199	15.419
C.V.(%)	2.39	0.28	2.44	3.12	2.44	3.12

Se observa que los porcentajes obtenidos para la Amox están dentro del intervalo de aceptación del 90 - 120%^{30, 32}, por lo que cumple con las especificaciones de la FEUM y USP, mientras que para la Brom como ya se había mencionado no existen especificaciones en dichas referencias, pero los porcentajes obtenidos están muy cerca del 100% (101.9%), por lo que en ambos casos el lote de cápsulas cumple con las especificaciones de Valoración con un C.V. muy cercano al 2% que es el indicado para métodos cromatográficos.

5.2.8.2.5 Aplicación en medicamentos comerciales.

Se realizó la cuantificación de Brom y/o Amox en diferentes medicamentos comerciales. Tomando por triplicado una muestra de cada medicamento equivalente a 2mg de Bromhexina y/o 62.5mg de Amoxicilina, el tratamiento se realizó como se indica en la figura 35 y se analizaron bajo las condiciones separación electroforéticas ya establecidas (ver tabla 46); utilizando loperamida como estándar interno.³⁷ Los resultados se presentan en la tabla 59.

Tabla 59. Cuantificación de los analitos en otros medicamentos comerciales

Medicamentos Comerciales Principio(s) activos	Tusibrón Susp.		Lumoxbron-S Susp.		Bisolvon Jbe. BROM	Servamox CLV Tab. AMOX	Ormocyn T-S Cáp. AMOX	Clavulin 12H Tab. AMOX
	BROM	AMOX	BROM	AMOX				
Promedio de Recobro Exp.	98.72	103.29	100.94	108.15	96.85	101.82	110.07	101.29
Desvest. de Recobro Exp.	±1.90	±1.14	±5.26	±2.95	±2.42	±2.33	±4.24	±1.22
C.V. de Recobro Exp.	±1.92	±1.11	±5.21	±2.73	±2.49	±2.29	±3.86	±1.21
mg/tab ò 5ml Exp.	3.95	258.21	8.075	270.36	3.87	509.11	550.35	886.31



CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- Se desarrolló una metodología analítica para determinar Brom y Amox en formulaciones farmacéuticas por EC, como un método alternativo al presente en la farmacopea mexicana (HPLC); siendo rápido, económico y confiable, por lo que puede utilizarse para realizar el control de calidad en dichas formulaciones.
- Se determinó la solubilidad de ambos principios activos, mediante pruebas de solubilidad en disoluciones acuosas y solventes orgánicos a fin de establecer el tratamiento óptimo de la muestra.
- Se establecieron las condiciones óptimas de separación, en conjunto con las condiciones de tratamiento de las muestras, obteniéndose un tiempo de análisis por ECZ de 5 minutos.
- Para mejorar los resultados se decidió adicionar un estándar interno; se evaluaron varios y finalmente la tetraciclina y la loperamida, eran los mejores candidatos, pero la loperamida dió mejores resultados en cuanto a forma de pico.
- El método demostró ser específico, lineal, exacto y repetible, ya que cumplió con las especificaciones correspondientes de métodos cromatográficos presentes en la FEUM.
- Se realizó la cuantificación de Brom y Amox en 3 muestras de Amoxibrón suspensión (250/8mg) y cápsulas (500/8mg) por duplicado, los porcentajes de cada principio activo están dentro de las especificaciones de la FEUM y USP.
- La aplicabilidad del método se comprobó al poderse cuantificar los analitos en diversas formulaciones farmacéuticas.



BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Castillo, M; Revilla, L; López, R; Rivera, R. “ Fundamentos de la EC”, UNAM, DF., México, 2005
2. N.http://www.science.oas.org/Simbio/mbio_ind/cap9_mi.pdf#search=%22importancia%2Bpenicilinas%22, UNAM, México, 20-agosto-2006
3. Mateos F. <http://coli.usal.es/Web/educativo/micro2/tema20.html>, Universidad de Salamanca, España, 22-agosto-2006
4. Wikipedia. <http://es.wikipedia.org/wiki/Penicilina>, México, 28-agosto-2006
5. Lozano,D.http://bvs.sld.cu/revistas/act/vol8_1_98/act04198.pdf#search=%22clasificaci%C3%B3n%2Bpenicilinas%22, UCIM-P., 22- agosto-2006
6. Tutromedico. <http://www.tutromedico.com/temas/antibioticos.htm> 29-agosto-2006
7. Universidad de Navarra, <http://www.viatusalud.com/documento.asp?ID=172>, España, 28-agosto-2006
8. García, Ma; et al. “ Guía de validación de métodos analíticos”. C.N.Q.F.B., Ed. Lambda Científica, México, 2002.
9. Harris, “Análisis Químico Cuantitativo”, 2a edición, Ed. Reverté, Barcelona, 2001
10. A.C. Moffat, "Clarke's Isolation and identification of drugs". 2a ed. Edit. Staff. London, 1986.
11. “The Merck Index”, 13a ed., Ed. Merck &CO, USA, 2001
12. Remington. “Farmacia” Tomo 2, 20ª edición. Ed. Medica Panamericana, Argentina, 2003
13. UAM.http://www.uam.es/departamentos/medicina/farmacologia/especifica/F_General/FG_T47.pdf#search=%22mucoliticos%22, UAM, México, 29-agosto-2006
14. nyfikenvital. http://www.nyfikenvital.org/files/images/Adhatoda_vasica_1, México, 29-agosto-2006
15. Huerto N. <http://www.cfnavarra.es/WebGN/SOU/publicac/bj/textos/v4n1.htm>, Hospital de Navarra, España, 28-agosto-2006

-
16. Pajchel, G; Pawloski, K. y Tysky S. (2002). "CE Versus LC for simultaneous determination of amoxicillin/clavulanin acid and ampicillin/sulbactam in pharmaceutical formulations for injections". *Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29: 75-81
 17. Berzas, J; Castañeda, G. y Guzmán, F.J. (2001). Determination of sulfametoxazole, sulfadiazide and associated compounds in pharmaceutical preparations by capillary zone electrophoresis. *Journal of chromatography*. 912: 205,210
 18. Vademécum. <http://www.prvademecum.com/PRData/NEWPrincipioActivo.asp?D=692>, México, 29-agosto-2006
 19. Asociación de Química y Farmacia. http://www.aqfu.org.uy/nueva/revistas/29/revista_N29_noviembre_2000_electroforesis_capilar_01, Asociación de Química y Farmacia, Uruguay, 28-agosto-2006
 20. Salgado, M. <http://www.uv.es/~salgado/medicina/.files/Practica4.pdf#search=%22electroforesis%20%22>, UV, México, 12-agosto-2006
 21. Castillo, M. "Fundamentos de Electroforesis Capilar". Tesis Q.F.B.; FESC-UNAM, México, 2000.
 22. Shawn's S. <http://www.scifair.org/images/Electrophoresis.gif>, EUA, 01-octubre-2006
 23. javeriana.edu.com. <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/electroforesis.html>, México, 29-agosto-2006
 24. Chemical Sciences. <http://www.dcu.ie/chemistry/ssg/images/Techni1.jpg>, Irlanda, 01-octubre-2006
 25. Cifuentes A. <http://www.ifi.csic.es/pagperso/cifu/Equipos.htm#PACE-MDQ>, CSIC, España, 30-agosto-2006
 26. Rouessac, F. "Análisis químico", Ed. Mc Graw Hill, España, 2003.
 27. Skoog, D; James, L. "Análisis instrumental", 4ta. Ed. McGrawill, España, 1994.
 28. Skoog, D; Holler, F.; Nieman, T. "Principios de análisis instrumental", Capítulo 30: EC y electrocromatografía, 5ta. Ed. McGrawill, Madrid, España, 2001
 29. Cohen, "Análisis químicos farmacéuticos de medicamentos". Editores Noriega-Limusa, México, 1998

-
30. "The United States Pharmacopeia", USP 29. Rockville Maryland: United States Pharmacopeial Convection. 2005.
 31. " The United States Pharmacopeia", USP 28: The National Formulary: NF 23. Rockville Maryland: United States Pharmacopeial Convention, 2004.
 32. "Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos". 8va. ed.; Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados unidos Mexicanos. México, Secretaria de salud, 2004.
 33. Weston, A; Phyllis, B. "HPLC and CE: principles and practice." San Diego: Academic, 1997.
 34. Pérez, T; Martínez, C; Sanz, A.; Bravo, E. (1997). Determination of bromhexine and ambroxol in pharmaceutical dosage forms, urine and blood serum. *Journal of chromatography*. 692: 199-205
 35. Weiner, M. "Handbook of excipients". New York. Edit. M. Dekker, 1989.
 36. Horwitz, W. " Oficial Methods of Análisis". 17a. ed; Edit. AOAC International, Vol 2. U.S.A, 2000
 37. BoehringerIngelheim,http://www.bisolvon.com/com_es/Main/bisolvon/history/index.jsp, Alemania, 29-agosto-2006
 38. Wikipedia. <http://es.wikipedia.org/wiki/Analito>, México, 13-septiembre-2006
 39. UBA.<http://www.q1.fcen.uba.ar/materias/ai/calibracion1.pdf#search=%22est%C3%A1ndar%20interno%22>, México, 13-septiembre-2006
 40. Ruiz, M. <http://www.eumed.net/cursecon/dic/oc/pearson.htm>, EMVI, México, 13-septiembre-06
 41. Sánchez, S. <http://www.eumed.net/cursecon/dic/oc/mediaritm.htm>, EMVI, México, 13-septiembre-2006
 42. NOM-177-SSA1998 "Pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable", México, 1998
 43. Wikipedia. http://es.wikipedia.org/wiki/Desviaci%C3%B3n_est%C3%A1ndar, México, 13-septiembre-2006
 44. Wikipedia. <http://es.wikipedia.org/wiki/Excipiente>, México, 13-septiembre -2006
 45. NOM-164-SSA1-1998 "Buenas prácticas de fabricación para fármacos", México, 1998

-
46. Alvarez, R. <http://www.monografias.com/trabajos10/antib/antib.shtml>, Monografias.com, México, 12-agosto-2006
 47. Universidadabierta.http://www.universidadabierta.edu.mx/SerEst/MAP/METODOS%20CUANTITATIVOS/Pye/tema_12.htm#Desviacion%20Estandar, México, 13-septiembre-2006
 48. Vázquez,E.<http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/constantes%20de%20disociacion.html>, UNAM, México, 13-septiembre-2006
 49. Elergonomista. <http://www.elergonomista.com/galenica/suspensiones.htm>, México, 13-septiembre-2006
 50. Castagnio, J. M. (1999).”Bioquímica y Físicoquímica: EC”. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* . [3], 33: 297,329.
 51. Sandoval, Ma. “Informe de servicio social-titulación”, Tesis Q.F.B., FESC, UNAM, 2003.
 52. Olivera, A. “Caracterización y cuantificación de compuestos de selenio en una levadura enriquecida mediante EC”. Tesis Q.F.B., FESC, UNAM, 2004
 53. ECyT XXI. <http://www.fcen.uba.ar/ecyt/agua/agua24.htm>, México, 13-septiembre-2006
 54. Pontificia Universidad católica de Puerto Rico. <http://www.pucpr.edu/titulo/Q420/Cap%201.pdf#search=%22est%C3%A1ndar%20interno%22>, Puerto Rico, 13-septiembre-2006

GLOSARIO

8. GLOSARIO

Analito. Es el componente (elemento, compuesto o ión) de interés analítico de una muestra³⁸.

Calibración. Es el conjunto de operaciones que determinan, bajo condiciones específicas, la relación entre las señales producidas por un instrumento analítico y los correspondientes valores de concentración del juego de patrones de calibrado⁷. Los factores que determinan la calidad de una calibración son: la precisión de las medidas: estimada a través de la repetitividad y reproducibilidad de las medidas. La repetitividad se evalúa a través del cálculo de la desviación estándar relativa (RSD%) de la medida de los patrones de calibrado³⁹.

Coefficiente de variación. Es un parámetro estadístico adimensional que indica la relación existente entre la desviación típica de una muestra y su media en términos de porcentaje. Su principal objetivo es calcular el grado de dispersión en un conjunto de observaciones, es decir un coeficiente de variación pequeño indica una menor dispersión en los datos obtenidos⁴⁰.

$$CV = \left(\frac{S}{\bar{x}} \right) * 100$$

Concentración milimolar (mM). Unidades de concentración que expresan milimoles por litro.

Curva de calibración. Conjunto de concentraciones que describen el rango en el cual se cuantifica el compuesto por analizar⁴¹.

Desviación estándar o típica (S ó σ). Es una medida de dispersión que nos dice cuánto tienden a alejarse los valores puntuales del promedio en una distribución. Mientras mayor es la desviación estándar, mayor es la dispersión, por lo tanto, la desviación estándar mide el grado de variabilidad¹¹. Matemáticamente se define como la raíz cuadrada de los cuadrados de las desviaciones de los valores de la variable respecto a su media⁴².

$$S = \frac{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2}}{N} \quad \text{datos no agrupados}$$

$$S = \frac{\sqrt{\sum f(x - \bar{X})^2}}{N} \quad \text{datos agrupados}$$

Estándar interno. Es una sustancia que se añade a todas las muestras en una cantidad constante y cuyas características químicas son similares a las de la especie a determinar. La función del estándar interno es compensar distintos tipos de errores indeterminados y sistemáticos. La señal producida por el estándar interno es producida en las mismas condiciones que la de los analitos porque se encuentran juntos en la muestra⁴³.

Excipiente. Es una sustancia inactiva usada como vehículo para el principio activo. Determina la consistencia, forma o volumen de las preparaciones farmacéuticas.⁴⁴

Materia prima. Sustancia de cualquier origen que se use para la elaboración de medicamentos o fármacos naturales o sintéticos⁴⁵.

Muestra. Cantidad de material cuya composición es representativa del lote que va a ser examinado⁴².

pKa. Matemáticamente es el logaritmo cambiado de signo de la constante de equilibrio de disociación de un ácido de Bronsted (especie química que tiende a ceder protones). Es propio de un grupo, no de una molécula. Indica la fuerza de un ácido o una base: un ácido es tanto más fuerte cuanto más bajo es su pKa: una base es tanto más fuerte cuanto más alto es su pKa.⁴⁶

Placebo blanco. Muestra que contiene todos los componentes de un producto a excepto del analito⁴².

Placebo cargado. Muestra de un placebo blanco al cual se le adiciona una cantidad conocida del analito⁴².

Promedio. (\bar{X}). Es el número obtenido al dividir la suma de todos los valores de la variable entre el numero total de observaciones, y se define por la siguiente expresión⁴⁷:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i n_i}{N}$$

Solubilidad. Es la cantidad máxima de una sustancia que se disuelve en una cierta cantidad del disolvente en condiciones normales de presión y temperatura.⁴⁸

Suspensión. Forma farmacéutica que contiene principios activos insolubles o poco solubles que constituyen la fase interna interpuesta de forma homogénea en un vehículo apropiado de consistencia líquida y viscosidad variable que constituye la fase externa. Son sistemas difásicos.⁴⁹

Valoración. La prueba de valoración proporciona un resultado exacto, lo cual permite una declaración exacta del contenido o potencia del analito en una muestra.³⁰

ANEXO

9. ANEXO

Formulario

Cálculo de límite de detección y cuantificación en base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión.

a) Pendiente (b_1)

$$b_1 = (n\sum xy - \sum x \sum y) / (n\sum x^2 - (\sum x)^2)$$

n = número de mediciones (concentración – respuesta analítica)

x = concentración

y = respuesta analítica

b) Coeficiente de determinación (r^2)

$$r^2 = \{((n\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2\} / \{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)\}$$

c) Intervalo de confianza para la pendiente (IC(β_1))

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1}$$

$$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\{(1) / \sum x^2 - ((\sum x)^2/n)\}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\{((\sum y^2 - b_1)(\sum xy - b_0 \sum y)) / n-2\}}$$

$$b_0 = (\sum y - b_1 \sum x) / n$$

$t_{0.975, n-2}$ = ver tabla de t de Student

d) Límite de detección (LD)

$$LD = (3.3 \times S_{y/x}) / b_1$$

e) Límite de cuantificación (LC)

$$LC = (10 \times S_{y/x}) / b_1$$