



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**“DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR
ELECTROFORESIS CAPILAR PARA LA
DETERMINACIÓN DE BROMHEXINA Y AMPICILINA
EN CÁPSULAS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICA FARMACÉUTICA
BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

MAYRA ESTHER ROJAS CALVO

ASESORA:

DRA. ALMA LUISA REVILLA VÁZQUEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN



SECRETARÍA

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
P R E S E N T E

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

"Desarrollo de un método analítico por Electroforesis Capilar para la determinación de Bromhexina y Ampicilina en cápsulas".

que presenta la pasante: Mauro Esther Rojas Calvo
con número de cuenta: 9855398-1 para obtener el título de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de Septiembre de 2008.

PRESIDENTE MFC. Ma. Eugenia R. Posada Galarza

VOCAL G. Sonia Rincón Arce

SECRETARIO Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez

PRIMER SUPLENTE CFR. Enrique Ramos López

SEGUNDO SUPLENTE M.C. Elvia Adriana Morales Hipólito

DEDICATORIA

*A ti mamita por haber llenado mi vida de
amor y ternura, porque siempre estuviste
conmigo cuando te necesite,
enseñándome a ser mujer, hija y madre,
ya que no hubiera podido lograr esta meta
sin tu apoyo y comprensión.*

*Por darme la más grande lección de
fortaleza y confianza en Dios
Y por todas y cada una de las cosas que te
hicieron ser tan especial*

A ti que ahora eres un ángel en el cielo.

Con todo mi amor



AGRADECIMIENTOS

- ☞ *A la Universidad Nacional Autónoma de México por el privilegio de formar parte de su comunidad estudiantil, brindándome la oportunidad de una formación profesional de alta calidad.*

- ☞ *A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por ofrecerme el espacio físico e intelectual para la adquisición de conocimientos.*

- ☞ *A los docentes por todos los conocimientos que a través de ustedes puede obtener ya que son pieza clave en la formación de todo profesionista.*

- ☞ *A la Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez por haberme dado la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo y conocerla mejor, por su gran apoyo no solo como docente sino como ser humano, gracias por sus enseñanzas, paciencia y consejos.*

- ☞ *A todos los miembros del jurado; MFC. M^a Eugenia R. Posada Galarza, Q. Sonia Rincón Arce, Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez, Q.F.B Enrique Ramos López y M.C Elvia Adriana Morales Hipólito, por su atención y colaboración en este trabajo a través de sus observaciones y aportaciones.*

- ☞ *A los laboratorios Grimann por facilitarme los estándares primarios y excipientes relacionados con la formulación farmacéutica trabajada.*

- ☞ *Al CONACYT por el proyecto 52723, a la UNAM DGAPA por el proyecto PAPIIME PE203405.*

- ☞ *A mis verdaderas amigas Alma Esther y María Esther por su apoyo y consejos.*

- ☞ *A Rogelio y Lucy por su ayuda y apoyo.*

☪ *A mi Papi:*

Te agradezco con todo mi corazón tu amor, consejos, enseñanzas y apoyo incondicional, gracias por ser digno ejemplo de trabajo y constancia, por impulsarme a salir adelante y porque siempre me das la mano cuando estoy a punto de caer...

Porque sabes que nunca estarás sólo... siempre nos tendrás contigo...

Te amo

☪ *A mis preciosos hijos Jony y Josh:*

Por ser el centro de mi vida, porque le dan sentido a mis días, por enseñarme a sonreír y disfrutar de los momentos especiales que hemos pasado juntos, porque todo lo que hago es para ustedes... con todo mi amor pedacitos de mi ser.

☪ *A mi hermana Sandra:*

Por ser mi compañera y amiga de toda la vida, por cada momento que hemos compartido y porque a pesar de nuestras diferencias siempre hemos estado y estaremos unidas, te amo.

❧ *A Victor:*

Por tus consejos, por haberme acompañado por tanto tiempo, por todo lo que vivimos juntos y por los dos grandes motivos por los que siempre serás importante.

❧ *A mi tía Manue por todo su apoyo y comprensión, pues nunca podré hacer lo suficiente para agradecer todo lo recibido.*

❧ *A mis primas Eri y Lili por su apoyo, compañía y consejos.*

❧ *A mi tía Aurora por su cariño y apoyo en los momentos buenos y en los más difíciles.*

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
3. MARCO TEÓRICO	4
3.1 Características de los analitos	4
3.1.1 Características generales de la Bromhexina	4
3.1.2 Características generales de la Ampicilina	6
3.2 Métodos de Cuantificación reportados.	8
3.2.1 Bromhexina	8
3.2.2 Ampicilina	9
3.2.3 Mezcla Bromhexina – ampicilina	11
3.3 Generalidades de Electroforesis Capilar	11
3.3.1 Electroforesis	11
3.3.2 Electroforesis Capilar	12
3.3.3 Componentes básicos de un sistema de EC	13
3.3.4 Separación electroforética	14
3.3.5 Movilidad electroforética –electromigración.	15
3.3.6 Movilidad electroosmótica- electroósmosis (FEO)	15
3.3.7 Factores que afectan la velocidad de migración	18
3.3.8 Consideraciones acerca de los instrumentos	19
3.3.8.1 Tipo y Configuración del capilar	19
3.3.8.2 Introducción de la muestra	19
3.3.8.3 Fuente de alimentación	20
3.3.8.4 Modalidades de detectores	20
3.3.9 Consideraciones analíticas	21
3.3.9.1 Dimensiones de los capilares	21
3.3.9.2 Efectos del voltaje	21
3.3.9.3 Efectos de la fuerza iónica	22
3.3.9.4 Efectos del pH	22
3.3.10 Comparación de la Electroforesis Capilar con la CLAR	22
3.3.11 Ventajas de la Electroforesis Capilar.	23

4. PARTE EXPERIMENTAL	24
4.1 Material	24
4.2 Equipos	24
4.3 Reactivos y estándares	24
4.4 Disoluciones empleadas	25
4.5 Plan de trabajo	25
4.6 Desarrollo del Método	25
4.7 Tratamiento de la muestra y evaluación de parámetros estadísticos	27
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS	28
5.1. Estudio de solubilidad	28
5.1.1 Estudio de solubilidad para Bromhexina	29
5.1.2 Estudio de solubilidad para Ampicilina	29
5.1.3 Estudio de solubilidad para la mezcla bromhexina- ampicilina	30
5.2 Selección de la longitud de onda	31
5.3 Selección del pH para la separación	32
5.4 Selección de la concentración del búfer	36
5.5 Selección de la naturaleza del búfer	39
5.6 Introducción de la muestra	50
5.7 Tiempo de lavado del capilar	52
5.8 Selección de la longitud y diámetro interno del capilar	52
5.9 Efecto del voltaje	54
5.10 Condiciones electroforéticas óptimas de separación.	55
5.11 Tratamiento de la muestra real	56
5.12 Evaluación de parámetros estadísticos	61
5.12.1 Adecuabilidad del sistema	61
5.12.2 Precisión del sistema	62
5.12.1 Linealidad del sistema	63
6. CONCLUSIONES	66
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. INTRODUCCIÓN

La economía global demanda a la industria el mejoramiento continuo de sus procesos de producción y de su control interno de la calidad, dadas las tendencias mundiales, que exigen un óptimo manejo de los recursos tecnológicos y económicos de cada empresa.

La industria farmacéutica es muy rigurosa en cuanto a su control de calidad, ya que la producción de un fármaco demanda métodos de análisis que aseguren en un pronto tiempo que el producto final cumple con especificaciones planteadas en las políticas de calidad de la empresa y en las normas oficiales. [1]

Con el fin de garantizar el cumplimiento de estos requisitos, los laboratorios desarrollan y aplican métodos analíticos en diversas etapas dentro de los procesos de producción de un medicamento.

Considerando al método como el recurso más eficiente en el laboratorio para el análisis tanto en materias primas como en productos finales de la industria farmacéutica actual. [1]

Las metodologías diseñadas brindan resultados confiables, sin embargo, al surgir nuevas técnicas de análisis e instrumentos de medición, es imprescindible adaptar los métodos existentes a estas nuevas tendencias, tal es el caso de la electroforesis capilar, que se ha impuesto como una importante alternativa en el análisis de ciertas muestras ó analitos que sólo eran realizados mediante técnicas muy complejas, tardadas y costosas como la cromatografía de líquidos y gases.

El surgimiento de la electroforesis capilar (EC) como una prometedora, efectiva y económica propuesta para la separación de una gran variedad de sustancias, así como la creciente disponibilidad de instrumentos de EC automatizados ha promovido la búsqueda de un creciente número de métodos por EC para el análisis rutinario.[2]

Los recientes estudios publicados empleando la electroforesis en todas sus modalidades demuestran que los resultados obtenidos son sumamente eficientes y sobre todo de un bajo costo para los laboratorios analíticos. Incluso ya existe un

apartado sobre electroforesis capilar en la farmacopea 2007 de los Estados Unidos de América (USP 30), lo cual da evidencia del auge que esta tomando esta técnica analítica, pues también ha sido incluida en otras farmacopeas como la Europea y la Japonesa.[3]

Este trabajo forma parte un proyecto enfocado a desarrollar métodos aplicando la electroforesis capilar, proyectándola como una técnica de grandes capacidades al ser rápida, segura y sobre todo de bajo costo en reactivos y muestras, contribuyendo así a que pueda ser la primera opción de análisis a nivel industrial.

En él se describe el desarrollo de un método analítico para la determinación simultánea de ampicilina y bromhexina en cápsulas, el cual puede ser considerado como un método innovador, ya que hasta ahora no se cuenta con ningún otro con el cual se pueda realizar esta determinación.

Según los datos bibliográficos, actualmente, a nivel industrial, la determinación se efectúa a cada analito por separado, esto marca la importancia de conseguir una metodología que pueda determinar de forma simultánea a dos analitos cuyas características y solubilidades son totalmente distintas.

Buscando así, que este pueda ser una alternativa aplicable en el control de calidad a nivel industrial, ya que la asociación bromhexina- ampicilina es manejada por varios laboratorios en cápsulas y otras formas farmacéuticas.

Así mismo, el presente trabajo sirve como antecedente a trabajos aplicativos posteriores para su futura validación así como para el desarrollo de métodos específicos para la suspensión oral y la solución inyectable de esta misma asociación.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- ✦ Desarrollar un método analítico por electroforesis capilar como una opción innovadora de análisis para la determinación simultánea de bromhexina y ampicilina en cápsulas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ✦ Determinar las condiciones adecuadas para el tratamiento de la muestra, que garantice la disolución total de bromhexina y ampicilina, además de que asegure la selectividad del método analítico al ser aplicado.
- ✦ Determinar las condiciones electroforéticas óptimas a través de una secuencia experimental para lograr la separación de bromhexina y ampicilina.
- ✦ Determinar y cuantificar bromhexina y ampicilina en placebos cargados preparados con la formulación de una muestra comercial, por medio de electroforesis capilar para verificar que la metodología propuesta cumpla con los propósitos prácticos de medición para los cuales ha sido optimizada

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Características de los analitos

3.1.1 Características generales de la bromhexina

La bromhexina se comporta como un mucolítico y expectorante por activación de las glándulas seromucosas. En la secreción procedente de las células glandulares serosas se comprueba abundantes lisosomas, cuyas enzimas fisiológicas fragmentan las fibras de mucopolisacáridos ácidos, lo que determina una disminución de la viscosidad de la secreción bronquial y la activación de la expectoración. Recientes estudios han demostrado que la bromhexina aumenta el volumen de la secreción lagrimal y su contenido en lisozima. [4]

Su acción farmacológica como mucolítico expectorante se indica en: bronquitis y traqueobronquitis agudas y crónicas; bronquitis enfisematosa y bronquiectasias; neumoconiosis y neumopatías crónicas inflamatorias; asma bronquial; profilaxis pre y postoperatoria de las complicaciones broncopulmonares. [4]

La bromhexina tras ser administrada por vía oral, se absorbe a través del tracto gastrointestinal y la concentración máxima en plasma se alcanza al cabo de una hora. Experimenta una cinética de primer paso de 75%-80% y la biodisponibilidad absoluta de las formas orales es de 20-25%. Se une en alto grado a las proteínas plasmáticas (95-99%) y presenta un alto volumen de distribución, principalmente a nivel pulmonar. Se metaboliza en el hígado; en el plasma se han detectado por lo menos 10 diferentes metabolitos entre los que se incluye al ambroxol, que es farmacológicamente activo. [5]

La bromhexina y su principal metabolito activo, el ambroxol son administrados en forma de clorhidrato en dosis diarias de 30-120mg usando vías

oral, rectal, intravenosa, incluso por inhalación, produciendo buenos resultados en el tratamiento de bronquitis crónica y proteinosis alveolar. [6]

Los clorhidratos de bromhexina y de ambroxol han sido formulados solos y en combinación con otros fármacos y se encuentran disponibles comercialmente en jarabes, tabletas, gránulos e inyecciones. [6]

En la figura 1 se muestra su fórmula estructural mientras que en la tabla 1 se han reunido las principales propiedades fisicoquímicas de la bromhexina.

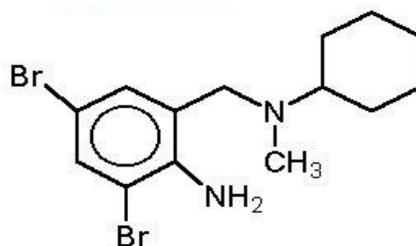


Figura 1. Fórmula estructural de la Bromhexina

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la bromhexina [7- 9]

Nombre Común	Bromhexina
Nombre IUPAC	2-Amino-3,5-dibromo-N-ciclohexil-N-metil-benzenmetanamina
Fórmula Condensada	$C_{14}H_{20}Br_2N_2$
Peso Molecular	376.13 g/mol
Detección UV	254 nm (Soluciones acidas) 262nm (Soluciones alcalinas)
pKa	4.85
Apariencia Física	Polvo cristalino blanco, inodoro y sensible a la luz
Punto de Fusión	237-238°
Solubilidad	Insoluble en cloroformo y acetona. Muy poco soluble en agua, alcohol y cloruro de metileno. 1g se disuelve en 25ml de etanol.

3.1.2 Características generales de la Ampicilina

Los antibióticos β -lactámicos han sido los fármacos antimicrobianos más ampliamente utilizados por más de 80 años y aún constituyen el más importante grupo de antibióticos. [10]

La ampicilina es un antibiótico penicilínico semisintético, derivado del núcleo básico de la penicilina, el ácido 6-aminopenicilánico y clasificado dentro de los β -lactámicos, de amplio espectro y activo por vía oral. Aunque es más activo que las penicilinas naturales no es estable frente a las beta-lactamasas producidas por bacterias gram-positivas o gram-negativas. La ampicilina se utiliza para el tratamiento de infecciones debidas a organismos susceptibles como la otitis media, la sinusitis y las cistitis. Debido al aumento de resistencias ya no se recomienda la ampicilina para el tratamiento de la gonorrea. [2]

La ampicilina es bactericida, actúa inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana uniéndose a unas proteínas específicas localizadas en la pared celular. Al impedir que la pared celular se construya correctamente, la ampicilina ocasiona, en último término, la lisis de la bacteria y su muerte. La ampicilina, junto con la amoxicilina, es el fármaco preferido para el tratamiento de infecciones urinarias producidas por enterococos sensibles. [11]

La ampicilina se puede administrar por vía oral y parenteral. Es estable en presencia del ácido gástrico y se absorbe bien en el tracto gastrointestinal. Se difunde rápidamente en la mayoría de los líquidos y tejidos. Aproximadamente el 30-55% de la dosis se absorbe, una cantidad mucho menor que la de la amoxicilina. Las concentraciones máximas se obtienen a las 1-2 horas después de una dosis intramuscular. La ampicilina se une a las proteínas del plasma en un 14-20%. Se distribuye ampliamente, es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, pero no cruza la barrera placentaria. Se excreta en grandes cantidades por la orina sin cambios. [5]

La figura 2 muestra la fórmula estructural de la ampicilina mientras que la tabla 2 describe las principales características fisicoquímicas de la ampicilina.

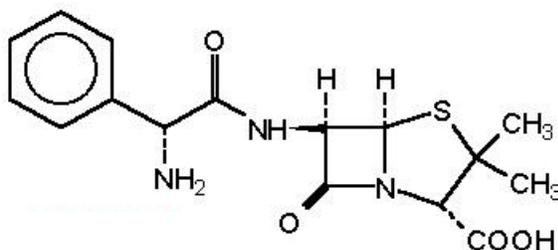


Figura 2. Fórmula estructural de la Ampicilina

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de la ampicilina [7-9]

Nombre Común	Ampicilina
Nombre IUPAC	Acido-6-(2-amino-2-fenilacetamido)penicilánico
Fórmula Condensada	$C_{16}H_{19}N_3O_4S$
Peso Molecular	349.4 g/mol
Detección UV	Soluciones acuosas 257, 262 y 268 nm
pKa's	2.52 y 7.24
Apariencia Física	Polvo cristalino blanco con aroma característico de las penicilinas.
Punto de Fusión	200°
Solubilidad	Prácticamente insoluble en etanol, acetona, cloroformo y éter. Soluble en agua (1 en 170).

Actualmente, existen formulaciones que aprovechan las características farmacológicas de ambas sustancias, proporcionando así, en una sola dosis, el efecto antibiótico de la ampicilina aunado al expectorante y mucolítico de la bromhexina, logrando un tratamiento óptimo de las infecciones crónicas y agudas de las vías respiratorias como bronquitis y bronconeumonía ocasionadas por

bacterias grampositivas y gramnegativas y en infecciones de conductos oculares por gérmenes susceptibles a la ampicilina.

Actualmente en el mercado se dispone de varias presentaciones de dicha asociación, las más comunes se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Presentaciones comerciales de la asociación ampicilina - bromhexina [12]

Nombre Comercial	Laboratorio Fabricante	Forma Farmacéutica (Amp/Bro)
Pentrexyl Expec	BRISTOL-MYERS SQUIBB	Cápsulas (500/8mg) Suspensión (500/8mg)
Pentrexyl Expec Infantil	BRISTOL-MYERS SQUIBB	Suspensión (250/4mg)
Brupen Compuesto	BRULUAGSA	Cápsulas (500/8mg) Suspensión (250/4mg)
Penbritin Ex.	HORMONA	Cápsulas (500/8mg) Suspensión (500/8mg)
Penbritin Ex. Infantil	HORMONA	Suspensión (250/4mg)
Bisolvon A	BOEHRINGER	Cápsulas (500/8mg) Suspensión (500/8mg)
Pentibrom	MAVER	Suspensión (125/4mg)

3.2 Métodos de Cuantificación reportados.

3.2.1 Bromhexina

a) Farmacopea Mexicana [13]: No reportado

b) Farmacopea de los Estados Unidos (USP) [14]: No reportado

c) Farmacopea Británica. [15]: Disolver 0.300g (o su equivalente) en 70ml de alcohol absoluto, adicionar 1ml de ácido clorhídrico 0.1M. Valorar potenciométricamente utilizando hidróxido de sodio 0.1M. Leer el volumen adicionado entre los dos puntos de inflexión. 1ml de hidróxido de sodio 0.1M equivale a 41.26mg de clorhidrato de bromhexina.

d) Otros [16]:

Técnica: Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

Fase móvil: Metanol (compuesto con perclorato de amonio 10mM y 1ml/L de hidróxido de sodio 100mM en Metanol, pH 6.7.)

Preparación de la muestra: Preparar una solución de 10 microgramos/mililitro en metanol.

Condiciones del equipo: Detector: Potenciométrico, electrodo de carbón vitreo (Le Carbone, V25) + 1.2 V. Columna (Spherisorb S5W) Sílica 125 x 4.9. Volumen de inyección: 20 microlitros.

Tiempo de retención: 1.2min

3.2.2 Ampicilina**a) Farmacopea Mexicana [13]:**

Técnica: Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

Fase móvil: Agua: acetonitrilo: fosfato monobásico de potasio 1.0M: ácido acético 1.0N (909: 80: 10: 1).

Diluyente: Agua: fosfato de potasio 1.0M: ácido acético 1.0N (980:10: 10)

Preparación de la muestra: Preparar una solución de 1 mg/ ml utilizando diluyente.

Condiciones del equipo: Cromatógrafo de líquidos equipado con un detector UV a 254nm. Precolumna L1 de 4.0mm de diámetro x 5.0cm. de longitud y columna L1 de 4.0mm de diámetro x 30 cm. de longitud. Velocidad de flujo de 2.0 ml/ min.

Tiempo de retención: 0.5 min.

b) Farmacopea de los Estados Unidos (USP) [14]:

Técnica: Valoración Yodométrica

Procedimiento: Preparar una muestra de 1.25mg/ml ampicilina sódica (o su equivalente) utilizando como diluyente solución amortiguadora de fosfato de potasio. (Sol. A) Agregar en un matraz 2.0 ml de sol. A y 2.0 ml de hidróxido

de sodio 1.0 N y dejar en reposo durante 15 minutos. Agregar 2.0ml de ácido clorhídrico 1.2N y 10.0 ml de yodo 0.01N. Tapar de inmediato y dejar en reposo durante 15 minutos. Valorar con tiosulfato de sodio 0.01N. Agregar 1 gota de pasta de almidón yoduro al acercarse al punto final y continuar la volumetría hasta que el color azul desaparezca. Se prepara y trata de igual forma un blanco y una muestra de solución estándar, y con ellos se calcula la concentración de ampicilina en la muestra.

c) Farmacopea Británica [15]:

Técnica: Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

Fase móvil: A: B (85: 15)

A: Agua: ácido acético 1.0N: fosfato de potasio dihidrogenado 0.2M: acetonitrilo: (899.5: 0.5: 50: 50).

B: Agua: ácido acético 1.0N: fosfato de potasio dihidrogenado 0.2M: acetonitrilo: (549.5: 0.5: 50: 400).

Preparación de la muestra: Disolver 27.0 mg de ampicilina o su equivalente en fase móvil A y aforar a 50ml con el mismo diluyente.

Condiciones del equipo: Cromatógrafo de líquidos equipado con un detector UV a 254nm. Columna de 25cm de longitud y 4.6 mm de diámetro empacada con sílica gel para cromatografía (5 micrómetros).

Velocidad de flujo de 1.0 ml/ min. Volumen de inyección: 50 microlitros.

Tiempo de retención: 2.0 a 2.5 min.

d) Otros [16]:

Técnica: Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

Fase móvil: MeCN: búfer de fosfatos 20mM (15:85), ajustando a pH 2.0 con ácido ortofosfórico.

Preparación de la muestra: Preparar una solución de 0.2 microgramos/ mililitro con agua.

Condiciones del equipo: Cromatógrafo de líquidos equipado con un detector UV a 230nm. Columna de 10 cm. de longitud x 2.0 mm de diámetro empacada

con Hypersil DS 3 micrómetros. Velocidad de flujo de 0.4 ml/ min. Volumen de inyección: 20 microlitros.

Tiempo de retención: 5.2 min.

3.2.3 Mezcla Bromhexina – ampicilina

Aunque comercialmente existen diversas formulaciones farmacéuticas de esta asociación, en la bibliografía consultada no existe algún método registrado que efectuó la determinación simultánea de estos principios activos.

3.3 Generalidades de Electroforesis Capilar

3.3.1 Electroforesis

La electroforesis se refiere a la migración de especies cargadas eléctricamente cuando se disuelven o suspenden en un electrolito a través del cual se hace pasar una corriente eléctrica.

Los cationes migran hacia el electrodo cargado negativamente (cátodo), mientras que los aniones son atraídos hacia el electrodo cargado positivamente (ánodo). Las partículas neutras no son atraídas hacia ninguno de los electrodos. [14]

En la técnica de electroforesis clásica, se utiliza un soporte plano de materia plástica recubierta de una sustancia porosa impregnada de un electrolito, sus extremos se sumergen en dos depósitos independientes que contienen electrolito y están unidos a los electrodos de un generador de corriente continua.

Las especies hidratadas presentes migran en un tiempo muy variable que oscila desde algunos segundos hasta más de una hora, desde uno de los extremos del soporte hacia el otro. [17]

La migración electroforética depende de las características de la partícula principalmente de su carga eléctrica, su tamaño o peso molecular y su forma, así como de las características y los parámetros operativos del sistema.

Entre estos últimos se incluyen el pH, la concentración iónica, la viscosidad y la temperatura del electrolito, la densidad y el gradiente de potencial utilizado. [14]

3.3.2 Electroforesis Capilar

La electroforesis capilar constituye una adaptación particular de la técnica de electroforesis, reemplazando el soporte plano de la técnica clásica por un tubo capilar abierto.

La electroforesis capilar (EC) se ha desarrollado gracias a los avances de la cromatografía líquida de alta resolución junto con los procedimientos más tradicionales de electroforesis.

Esta técnica permite separar biomoléculas, donde la cromatografía líquida se muestra menos eficaz, y compuestos de pequeña masa molecular, difíciles de estudiar por los procedimientos clásicos de electromigración en soporte. [17]

En la actualidad existen cinco modalidades principales de operación de EC:

- **Electroforesis Capilar de Zona (CZE):** Es el procedimiento de electroforesis más habitual, en el cual el capilar es llenado con el electrolito soporte, normalmente un sistema búfer, que puede ser ácido (fosfato o citrato) o básico (borato), o por un anfótero. El flujo electroosmótico crece con el pH del medio electroforético.
- **Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar (MEKC):** Es una variante del procedimiento anterior, se añade a la fase móvil un compuesto catiónico o aniónico tal como el dodecilsulfato sódico para formar micelas cargadas, mismas que retienen a los compuestos neutros de un modo más

o menos eficaz, por afinidad de tipo hidrófila-hidrófoba, y permiten su separación. [17]

- **Electroforesis Capilar en Gel (CGE):** Esta es la transposición de la electroforesis en gel de poliacrilamida o de agarosa. El capilar está relleno de un electrolito que contiene un gel. Se produce un efecto de filtración que disminuye la velocidad a las grandes moléculas y que minimiza los fenómenos de convección o de difusión. [17]
- **Electroforesis Capilar de Enfoque Isoeléctrico (CIEF):** Esta técnica, también conocida como electroforesis en soporte, consiste en crear un gradiente de pH lineal en un capilar neutro que contiene un anfótero. El capilar está sumergido en ácido fosfórico en el ánodo e hidróxido de sodio en el cátodo, generalmente sirve para separar proteínas en base a su punto isoeléctrico (p.I). [17]
- **Isotacoforesis Capilar (CITP):** Es una técnica de separación por desplazamiento, el capilar se debe llenar con un electrolito líder o guía en un extremo, éste debe tener alta movilidad, de hecho, mayor que la de todos los componentes a separar, además de un electrolito terminal.[18]

3.3.3 Componentes básicos de un sistema de EC

Un sistema de electroforesis capilar típico (Figura 3) contiene un capilar de sílice fundida con un diámetro interno de 50 a 150 micrómetros y una longitud de 20 a 100cm. Los extremos del capilar se colocan en depósitos separados con electrolito. La fuente de energía de corriente continua es capaz de suministrar voltajes altos que típicamente varían de 0 a 30kV. El sistema se complementa con un detector y un muestreador automático con algún dispositivo para el registro de datos. [14]

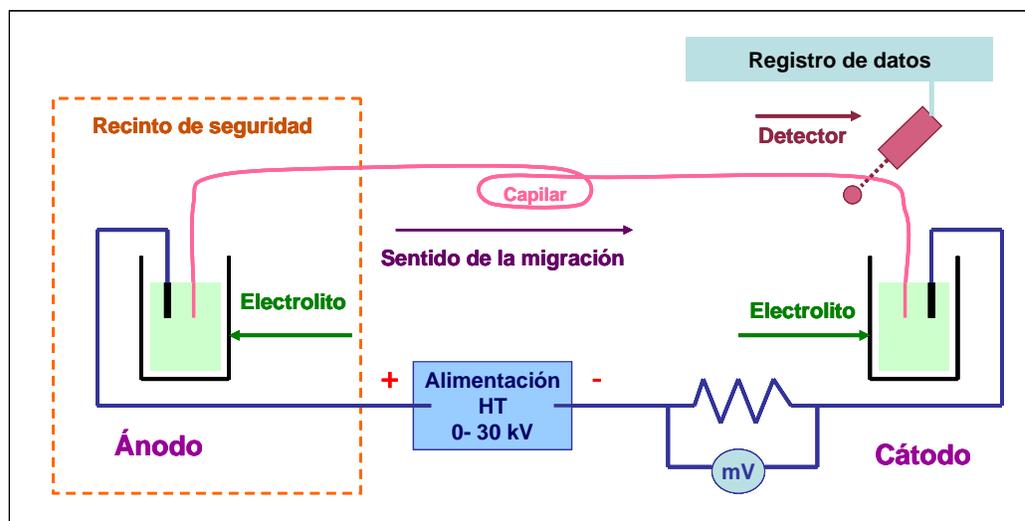


Figura 3. Configuración típica de un instrumento para electroforesis capilar [17]

La señal obtenida es la base de la obtención del Electroferograma, que muestra el registro de la composición de la muestra. Sólo se detectarán las especies que se dirigen hacia el cátodo. [17]

3.3.4 Separación electroforética

Las partículas en suspensión en un líquido, del mismo modo que las moléculas disueltas pueden llevar una carga eléctrica resultante, cuya intensidad y signo dependen, a la vez, de su tamaño, de su naturaleza y de la del electrolito, y en particular del pH.

Bajo el efecto de diversos fenómenos simultáneos como la temperatura, la viscosidad o diferencia de potencial, estas partículas van a tener mayores velocidades de migración entre más pequeñas sean y tengan cargas más grandes.

La separación depende, por lo tanto, de la relación volumen /carga del ión hidratado. Las especies neutras se separan mal entre ellas, salvo que se añada al electrolito un agente iónico capaz de asociarse con ellas y provocar su migración diferencial.

Las especies presentes en la muestra están sometidas a dos efectos principales, que se manifiestan sobre iones, moléculas o micelas. Se trata, por una

parte de su movilidad electroforética propia y por otra, la movilidad del flujo electroosmótico o movilidad electroosmótica

3.3.5 Movilidad electroforética – electromigración.

Todo compuesto portador de una carga eléctrica se desplaza en el electrolito con una velocidad (V_{EF}) que depende de las condiciones experimentales y de la verdadera movilidad electroforética (μ_{EF}). Este parámetro se define a partir de la velocidad de migración del compuesto y del campo eléctrico (E).

$$\mu_{EF} = \frac{V_{EF}}{E} = V_{EF} \frac{L}{V}$$

Donde L designa la longitud total del capilar y V la diferencia de potencial aplicada a sus extremos. La movilidad electroforética tendrá un signo (+ ó -) según la naturaleza, catódica o aniónica, de la especie; μ_{EF} ($\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) es nula para una especie globalmente neutra. [17]

Se puede obtener μ_{EF} a partir del Electroferograma calculando la V_{EF} en un campo E conocido teniendo en cuenta la velocidad del flujo electroosmótico. [17]

3.3.6 Movilidad electroosmótica- electroósmosis (FEO)

El segundo factor que controla la migración de los solutos en el flujo del electrolito soporte, también llamado flujo electroosmótico (FEO).

Este flujo se origina por la presencia del campo eléctrico en una solución iónica cuando entra en contacto con una superficie sólida cargada. Por ejemplo, en un capilar de sílice fundida, la interfase se pone en contacto con la solución que contiene el electrolito soporte, la superficie del sólido al tener una carga negativa

debido a la ionización del grupo silanol (a pH mayor de 4) y conjuntamente con sus contraiones forman una doble capa eléctrica

Los iones presentes en el sistema bajo la influencia del voltaje aplicado son desplazados hacia el cátodo o ánodo de acuerdo a su carga y arrastrando solvente con ellos dada su solvatación, originando así el denominado flujo electroosmótico [18]

El flujo electroosmótico, caracterizado por su movilidad electroosmótica μ_{FEO} , se define por la ecuación:

$$\mu_{\text{FEO}} = \frac{V_{\text{FEO}}}{E} = V_{\text{FEO}} \frac{L}{V}$$

Para calcular μ_{FEO} se debe determinar V_{FEO} . Esta se corresponde con la velocidad del flujo en el electrolito de las especies sin carga global. Su cálculo se lleva a cabo a partir de los tiempos de migración (t_m) que posee un marcador neutro, que se usa como trazador, tiempo que necesita para recorrer la distancia efectiva /del capilar.

$$V_{\text{FEO}} = \frac{l}{t_m}$$

El flujo electroosmótico (FEO) es el origen del desplazamiento de todas las especies presentes en la muestra y depende de la naturaleza de la pared interna del tubo capilar.

Esta pared de sílice, y el recubrimiento de grupos silanoles que se ionizan si el pH es superior a 3, forman una superficie con lugares aniónicos, fijos, que crean un potencial negativo (el potencial Z) enfrentando a una capa catiónica bañada de iones H_3O^+ . [17]

Un beneficio del FEO es provocar movimiento a todas las especies, prescindiendo de la carga, en la misma dirección. Bajo condiciones normales cuando la superficie del capilar está cargada negativamente, el flujo va del ánodo al cátodo.

Los cationes fluirán rápidamente hacia el cátodo dependiendo de la magnitud del flujo y pueden ser en un orden mayor a sus movilidades electroforéticas. Por otro lado, los aniones tratarán de migrar hacia el ánodo, pero si el FEO es mayor que su movilidad electroforética pueden ser arrastrados hacia el cátodo. (Figura 4).

Así, idealmente, los cationes y aniones, pueden ser separados en una sola corrida individual, ya que todos tendrán una migración neta en la misma dirección, aún los neutros. [18]

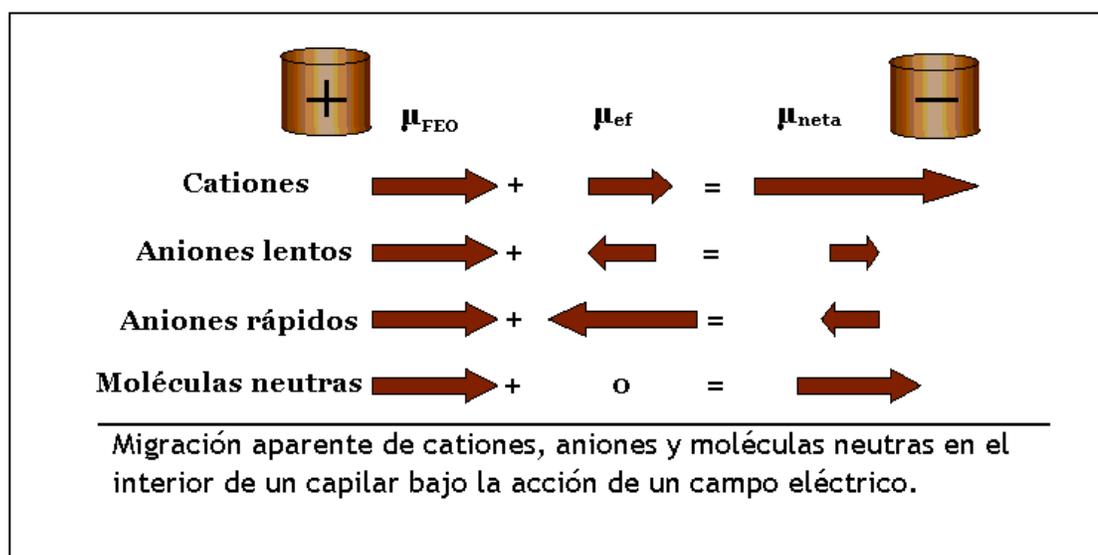


Figura 4. Ilustración del proceso que se lleva a cabo dentro del capilar en presencia de FEO [18]

En la práctica de la electroforesis capilar el control del flujo electroosmótico es esencial para obtener resultados reproducibles. El empleo de capilares de sílice fundida, parcialmente desactivados por un revestimiento interno, permite disminuir e incluso eliminar el FEO. [17]

3.3.7 Factores que afectan la velocidad de migración

La tabla 4 resume los principales factores operativos que afectan la velocidad de migración durante la separación electroforética, mismos que habrán de tomarse en cuenta durante la práctica de esta técnica.

Tabla 4. Factores que afectan la velocidad de migración. [18]

FACTOR	INFLUENCIA
LA MUESTRA	Carga: A mayor carga, mayor velocidad.
	Tamaño: Las moléculas más grandes migran lentamente.
	Forma: Da características particulares de migración.
MEDIO SOPORTE	Es el material del que se compone el capilar, por lo que debe ser inerte, los más utilizados son los de sílice.
ELECTRO-ÓSMOSIS	Fenómeno dado por las cargas del medio soporte y las moléculas del agua en el búfer. (Potencial Z)
ADSORCIÓN	Es la retención de moléculas por el medio soporte, que puede disminuir resolución y velocidad de migración.
ELECTROLITO SOPORTE (BÚFER)	Composición: Determina y estabiliza el pH del medio soporte, afectando la velocidad de migración.
	Concentración: Origina modificaciones en la fuerza iónica por tanto la intensidad de corriente. (Fuerza iónica 0.05-0.10 moles/litro).
	pH: En algunos compuestos tiene gran influencia en la magnitud de la ionización.
	Selección del búfer: Debe tener gran capacidad en los rangos de pH a trabajar, baja movilidad y baja absorbancia a la longitud de onda de detección.
CAMPO ELÉCTRICO	Intensidad de corriente: La velocidad de migración es proporcional a la intensidad de corriente.
	El voltaje: regula la corriente, por lo tanto la velocidad de migración.
	Resistencia: La velocidad de migración es inversa a la resistencia, la resistencia disminuye cuando la temperatura aumenta.

3.3.8 Consideraciones acerca de los instrumentos

Las consideraciones primordiales relativas a un instrumento incluyen el tipo y configuración del capilar, las modalidades de muestreo, la fuente de alimentación y las modalidades del detector.

3.3.8.1 Tipo y Configuración del capilar

Por lo general, los capilares que se emplean en electroforesis están hechos de sílice fundida y sin recubrimiento interno. En la mayoría de los instrumentos comerciales, el capilar se aloja dentro de un cartucho.

También existen capilares con una variedad de recubrimientos internos, diámetros y longitudes; por lo tanto, es importante tener en cuenta la capacidad del instrumento para alojar diferentes capilares.

Los recubrimientos internos de los capilares se pueden emplear para alterar la magnitud o la dirección del FEO o para reducir la absorción de la muestra. [14]

3.3.8.2 Introducción de la muestra

Para introducir volúmenes de nanolitros ó microlitros de muestra, que no debe sobrepasar el 1% de la longitud del capilar para no producir una disminución de la resolución, se utilizan dos procedimientos:

- **Inyección hidrodinámica:** consiste en sumergir el extremo del capilar en la muestra en disolución y provocar una aspiración en el otro extremo, este procedimiento introduce todos los componentes de la muestra dentro del capilar de manera homogénea y suele ser el modo de inyección más reproducible.

- **Inyección electrocinética:** se utiliza principalmente en electroforesis en gel y consiste en sumergir durante un cierto tiempo el extremo del capilar en la muestra sometida a un determinado potencial (50mV/cm), cuya polaridad es elegida con respecto al otro extremo. [17]

3.3.8.3 Fuente de alimentación

La mayoría de las unidades de electroforesis capilar comercialmente disponibles tienen fuentes de alimentación de corriente continua que son capaces de proporcionar energía con una modalidad de rampa ascendente o escalonada para alcanzar y mantener el voltaje operativo deseado sin problemas. Esto ayuda a asegurar una línea base relativamente estable. [14]

3.3.8.4 Modalidades de detectores

En general, los sistemas de CE ofrecen detectores de absorbancia en el UV/visible y detectores de fluorescencia inducida por rayo láser (LIF).

- **Detección UV/Visible:** se mide la intensidad de la luz que pasa a través del capilar en una pequeña zona en la que se ha eliminado el revestimiento opaco. El capilar intercepta el trayecto óptico procedente desde la fuente al fotomultiplicador. De esta manera se evita todo tipo de volumen muerto. [14]
- **Detección por fluorescencia:** ofrece una sensibilidad superior porque emplea una fuente láser muy intensa, asociada a un procedimiento de pre-o post- formación de derivados de los analitos portadores de un fluoróforo. Este tipo de detección resulta muy conveniente para muestras que sólo contienen cantidades muy pequeñas de analitos detectables al UV. [14]

3.3.9 Consideraciones analíticas

Se optimizan varios parámetros, a saber, las dimensiones de los capilares, el voltaje, la fuerza iónica y el pH, para obtener una resolución y separación adecuadas. Se deben evitar los cambios de temperatura que puedan afectar la viscosidad de la solución amortiguadora y, a su vez, influir tanto sobre el FEO como en las movilidades del soluto. [14]

3.3.9.1 Dimensiones de los capilares

Las variaciones en el diámetro y en la longitud del capilar pueden afectar la resolución electroforética. El aumento de la longitud del capilar da como resultado un tiempo de migración más prolongado, que suele aumentar la resolución y genera una corriente más baja. Por lo general, el aumento del diámetro del capilar aumenta la corriente y los gradientes de temperatura que disminuyen la resolución. Por el contrario, la reducción del diámetro del capilar dará como resultado menos calor y mejor resolución. [14]

3.3.9.2 Efectos del voltaje

Cuando se aplican altos voltajes, se calienta internamente la solución amortiguadora operativa debido a la corriente que fluye a su través. Este efecto de calentamiento conocido como calor de Joule, debe controlarse porque la resistencia, la constante dieléctrica y la viscosidad dependen de la temperatura y alteran la velocidad del FEO y las movilidades del soluto.

La máxima resolución se obtiene manteniendo el voltaje por debajo del nivel en que el calentamiento de Joule es considerable. [14]

3.3.9.3 Efectos de la fuerza iónica

El control y la modificación de la fuerza iónica permiten el ajuste de la resolución, la eficiencia y sensibilidad. En general, el aumento de la fuerza iónica mejora también la forma del pico. Sin embargo, debido a que la corriente generada es directamente proporcional a la concentración de la solución amortiguadora, se produce más calor cuando se aumenta la fuerza iónica de la solución. [14]

3.3.9.4 Efectos del pH

La resolución, la selectividad y la forma del pico pueden verse considerablemente alteradas por cambios en el pH, ya que este parámetro afecta el grado de ionización del soluto y el nivel del FEO.

El FEO es alto cuando el pH es alcalino y es bajo cuando el pH es ácido en capilares de sílice fundida sin recubrimiento. [14]

3.3.10 Comparación de la Electroforesis Capilar con CLAR

Los resultados de la electroforesis capilar son comparables a los de la cromatografía líquida de alta resolución, a la que complementa en su utilidad en las separaciones de biomoléculas.

La sensibilidad de la electroforesis capilar es muy grande, se conocen ejemplos de detección por fluorescencia de algunos millares de moléculas reales después de la formación de un derivado adecuado.

La cantidad requerida de muestra es muy pequeña y el consumo de reactivos o disolventes es insignificante. Sin embargo, la reproducibilidad de los análisis es más difícil de controlar.

Los parámetros de separación (eficacia, factor de capacidad, selectividad, resolución) se pueden establecer a partir de los electroferogramas utilizando tanto las fórmulas usadas en cromatografía como las fórmulas específicas de la CLAR. [19]

3.3.11 Ventajas de la Electroforesis Capilar.

- Buena disipación del calor, mejorando la reproducibilidad.
- Es posible utilizar voltajes muy altos, lo que reduce el tiempo de análisis.
- El material es barato y accesible.
- También se puede conectar a un detector y a una computadora para el procesamiento de datos.
- Es una técnica rápida.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiales

MATERIAL	CAPACIDAD	MARCA
Vasos de precipitados	5,10,25,50 y 100ml	Pyrex
Pipetas volumétricas	0.5-10ml	Pyrex Clase A
Pipetas graduadas	1-5ml	Pyrex
Matraces volumétricos	5, 10,20,50 y 100ml	Pyrex Clase A
Probetas	10 y 50ml	Pyrex
Matraz Kitazato	25ml	Kimax
Embudo Buchner	80/27	HCT Germany
Viales y tapones	2.5ml	Beckman Coulter
Barra magnética	-----	Dato no reportado
Espátulas	-----	Pattor A
Papel filtro	1.2 µm	Whatman
Mangueras para vacío	-----	Dato no registrado

4.2 Equipos

EQUIPO	CARACTERÍSTICAS
Equipo de electroforesis capilar	P/ACE MDQ, Beckman Coulter, equipado con un detector UV-VIS de arreglo de diodos acoplado a una computadora y manejado mediante el software 32 KARAT.
Desionizador de agua	MilliQ plus Millipore ®
pH-metro	HI 931401 Hanna Instruments
Balanza analítica	BOECO Germany con 0.0001g de precisión
Agitador magnético	Thermolyne, MIRAK TM
Bomba de vacío	Alltech, Benchtop Vaccum Station

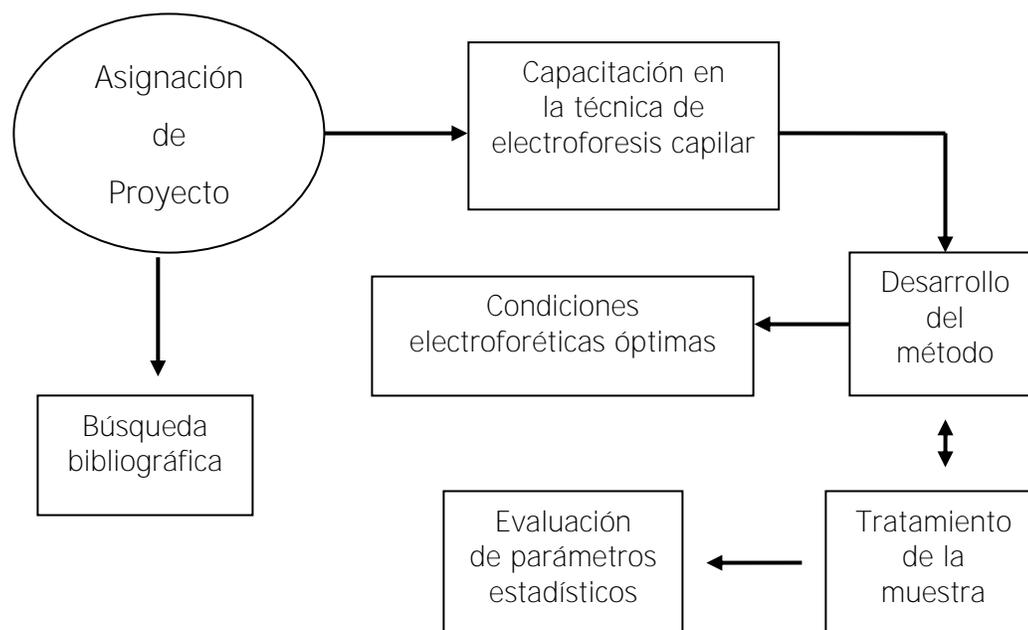
4.3 Reactivos y Estándares

REACTIVO	MARCA
Fosfato de sodio monobásico	J.T. Baker
Hidróxido de sodio	J.T. Baker
Metanol	High Putity
Ácido clorhídrico	J.T. Baker
Ácido cítrico	J.T. Baker
Acetonitrilo	High Putity
Estándar primario de Clorhidrato de Bromhexina	Lab. Grimann BRX-02706-C, pureza = 99.9%
Estándar secundario de Ampicilina Trihidratada	1600015-06 pureza = 98.7%
Agua Desionizada	MilliQ (USA)

4.4 Disoluciones empleadas

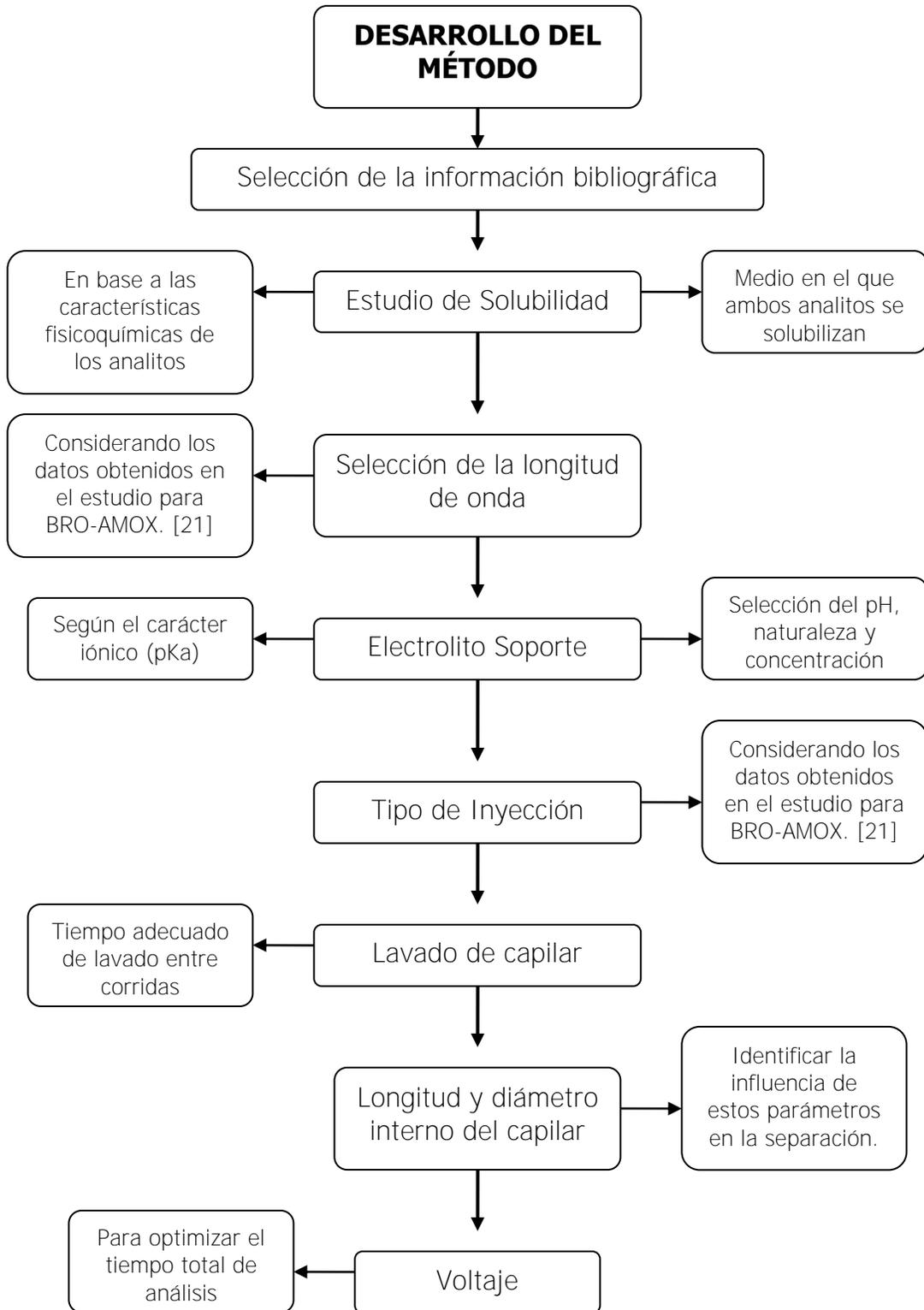
- ✦ Ácido Clorhídrico 0.1 Normal (HCl 0.1 N)
- ✦ Hidróxido de Sodio 1.0 Molar (NaOH 1.0M)
- ✦ Búfer de fosfatos 50mM ajustando a pH 5, 4, 3 y 2.5 con HCl 0.1N
- ✦ Búfer de fosfatos 50, 60, 70, 80, 90 y 100mM ajustando a $\text{pH} \cong 3.0$ con HCl 0.1N
- ✦ Búfer de citratos 50mM ajustando a pH 3 con NaOH 1.0M
- ✦ Búfer combinado Fosfatos- Citratos 50- 50mM ajustando a $\text{pH} \cong 3.0$ con HCl 0.1N e NaOH 1.0M respectivamente.
- ✦ Búfer combinado Fosfatos – Trietanolamina 50- 50mM ajustando a $\text{pH} \cong 3.0$ con trietanolamina.

4.5 Plan de Trabajo



4.6 Desarrollo del Método

A continuación se presenta el diagrama de flujo que describe las etapas del desarrollo del método, no obstante, en la sección de Resultados y Análisis se describe de manera detallada el fundamento e importancia de cada una.



4.7 Tratamiento de la muestra y evaluación de parámetros estadísticos.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la separación electroforética de los analitos, se evaluó el tratamiento de la muestra, realizándose pruebas de solubilidad para los excipientes presentes en la formulación farmacéutica modelo (cápsulas).

Así mismo se optimizaron los volúmenes de disolventes agregados a la muestra, para obtener porcentajes de recobro entre el 98 y 102%.

Se evaluaron parámetros estadísticos como la adecuabilidad, precisión y linealidad del sistema, los cuales fueron confrontados con los valores establecidos en la guía de validación [24].

Se considero como base a este documento ya que esta fundamentado en las diversas normas oficiales que rigen actualmente en la industria farmacéutica en nuestro país.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

El desarrollo práctico de un método analítico consta de etapas que implican operaciones como el tratamiento previo o preliminar que haga más sensible y específica la señal debida al analito, la medición y procesado de la señal procedente de la muestra, la adquisición de datos y el tratamiento de estos. [20]

En la mayoría de las metodologías analíticas el tratamiento previo corresponde a la disolución del analito de interés que permita su detección por la técnica a emplear.

En electroforesis capilar, además, se optimizan varios parámetros, a saber, las dimensiones de los capilares (longitud y diámetro interno), el voltaje, la fuerza iónica y el pH, para obtener una resolución y separación adecuadas. Se deben evitar los cambios de temperatura que puedan afectar la viscosidad de la solución amortiguadora y, a su vez, influir tanto sobre el FEO como sobre las movilidades de los analitos. [14] Como ya se mencionó antes, el presente trabajo forma parte de un conjunto de investigaciones cuyo fin es el desarrollo de métodos analíticos por electroforesis capilar, considerando lo anterior, algunos datos presentados más adelante fueron tomados del trabajo realizado para la mezcla bromhexina-amoxicilina. [21]

5.1. Estudio de solubilidad

A fin de cumplir el objetivo planteado para este trabajo, lo primero era contar con un medio de disolución en el cual ambos analitos pudieran encontrarse disueltos para así poder efectuar después la cuantificación mediante la técnica de electroforesis capilar.

5.1.1 Estudio de solubilidad para Bromhexina

Se consideraron, en primer lugar los datos de solubilidad para la bromhexina (tabla 1) y los resultados aportados por el trabajo bromhexina – amoxicilina [21], en la cual se obtiene al metanol como medio de disolución ideal para este analito.

Tabla 5. Estudio de solubilidad para bromhexina [21]

Medio de disolución	Resultado
Agua pH 1.0	Parcialmente soluble
Agua pH 5.0	Parcialmente soluble
Metanol puro	Soluble
Metanol: H ₂ O (1:60)	Insoluble
Metanol: H ₂ O (1:20)	Insoluble
Metanol: H ₂ O (1:10)	Ligeramente soluble
Etanol puro	Soluble

5.1.2 Estudio de solubilidad para Ampicilina

Considerando datos bibliográficos, se efectuó el estudio de solubilidad para ampicilina, empleándose los mismos medios de disolución que para bromhexina, como se muestra en la tabla 2, el agua pH 1.0 resultó ser el disolvente más adecuado para la ampicilina.

Tabla 6. Estudio de solubilidad para ampicilina.

Medio de disolución	Resultado
Agua pH 1.0	Soluble
Agua pH 5.0	Insoluble
Metanol puro	Insoluble
Metanol: H ₂ O (1:60)	Insoluble
Metanol: H ₂ O (1:20)	Insoluble
Metanol: H ₂ O (1:10)	Ligeramente soluble
Etanol puro	Insoluble

Así mismo, se encontró que no existía un medio en común que pudiera disolver en un paso a los dos analitos, por lo que se propuso llevar a cabo la disolución en dos pasos.

5.1.3 Estudio de solubilidad en la mezcla bromhexina- ampicilina.

Para el estudio de disolución en dos pasos se probaron los disolventes que resultaron apropiados para cada analito, primero por separado, probando adiciones de mililitro en mililitro hasta obtener 25 ml de cada disolvente y posteriormente en mezcla.

Las tablas 7 y 8 muestran que un volumen de 3ml de metanol y 22ml de agua pH 1.0 fueron adecuados para solubilizar 6mg de bromhexina y 300mg de ampicilina respectivamente, sin evidencia de precipitados.

Tabla 7. Solubilidad de bromhexina en metanol.

MeOH (ml)	Resultado
1	Parcialmente soluble
2	Parcialmente soluble
3	Completamente soluble
4	Completamente soluble
5	Completamente soluble

Tabla 8. Solubilidad de ampicilina en agua pH 1.0.

Agua pH 1.0 (ml)	Resultado
1-5	Insoluble
6-15	Poco soluble
16-21	Parcialmente soluble
22	Completamente soluble
23	Completamente soluble
24	Completamente soluble
25	Completamente soluble

Una vez definido el volumen necesario de cada disolvente, se utilizaron mezclas en proporciones de Bromhexina - Ampicilina (1:62), semejantes a una formulación farmacéutica modelo (cápsulas) para probar la adición de cada volumen de disolvente.

La tabla 9 muestra que al adicionar primero el metanol y posteriormente el agua acidulada se logra solubilizar efectivamente a los dos compuestos.

Tabla 9. Resultados por orden de adición de disolventes.

Adición 1	Adición 2	Resultado
3ml de MeOH	22 ml de agua pH 1.0	Mezcla completamente soluble
22 ml de agua pH 1.0	3ml de MeOH	Presencia de precipitado.

Con la información obtenida se llegó al siguiente procedimiento:

Pesando en forma aproximadamente exacta 5.6mg de bromhexina y 350mg de ampicilina, se agregan 3ml de metanol (con ligera agitación manual) y aforando a 25 ml con agua acidulada (pH 1.0), se consigue solubilizar completamente ambos analitos en mezcla.

Al obtenerse como resultado, una completa disolución de ambos analitos, se empleó este procedimiento para las siguientes etapas en el desarrollo del método.

5.2. Selección de la longitud de onda

Los sistemas de Electroforesis Capilar cuentan con detectores espectrofotométricos Ultravioleta-Visible (UV/VIS) como los detectores más comunes debido a que los capilares de sílice fundida permiten la detección por debajo de 200nm, o por arriba, cubriendo también el espectro visible (325-800nm).

El trabajo previo de bromhexina-amoxicilina [21], mostró que a una longitud de 214 nm ambos analitos son detectados y presentan una señal con gran sensibilidad y poco ruido, considerando la similitud estructural de la amoxicilina con la ampicilina, se tomó esta longitud como parámetro de inicio en este trabajo, con la posibilidad de ser optimizado durante el desarrollo experimental.

5.3 Selección del pH para la separación

La resolución, la selectividad y la forma del pico pueden verse considerablemente alteradas por cambios en el pH en el cual se efectúa la separación, ya que este parámetro afecta el grado de ionización del soluto y el nivel de FEO. [14]

Los sistemas efectivos de búfer tienen un rango de 2 unidades de pH aproximadamente centradas alrededor del valor de pKa. [18] Por lo que la búsqueda bibliográfica estuvo centrada en encontrar un búfer cuyo valor de pKa estuviera en dicho **rango de confianza, ya que el valor de pKa's para bromhexina** es de 4.85 y para ampicilina de 2.52 y 7.24 [7 - 9].

La información conseguida mostró que el búfer de fosfatos presenta 3 valores de pKa's (2.12, 7.21 y 12.32), por lo que se eligió como primer búfer de ensayo.

Con lo anterior y considerando algunas condiciones empleadas en artículos científicos consultados [2,10 y 22], se realizaron corridas para buscar la presencia de señales (picos) eficientes debidas solamente a los analitos y poder estimar el tiempo aproximado del análisis.

Se inicio con las siguientes condiciones: búfer de fosfatos de concentración 50mM a pH 4.0, capilar de sílice fundida, 30cm de longitud total y diámetro interno de 50µm, inyección hidrodinámica a 0.5psi por 5seg a 25° C, voltaje de 30Kv a 214nm.

Debido a la elevada proporción de la ampicilina en la formulación farmacéutica modelo (Bromhexina: Ampicilina 1:62), primero se utilizó una disolución de prueba a una concentración de 100ppm de cada analito para buscar las condiciones electroforéticas óptimas.

La figura 5 muestra los picos obtenidos para cada analito por separado (utilizando el procedimiento de disolución en cada uno), se puede observar que los picos son de buena calidad ya que son angostos y se tiene una buena resolución, ya que los tiempos de migración obtenidos fueron 1.79 minutos para la bromhexina y 4.35 para la ampicilina.

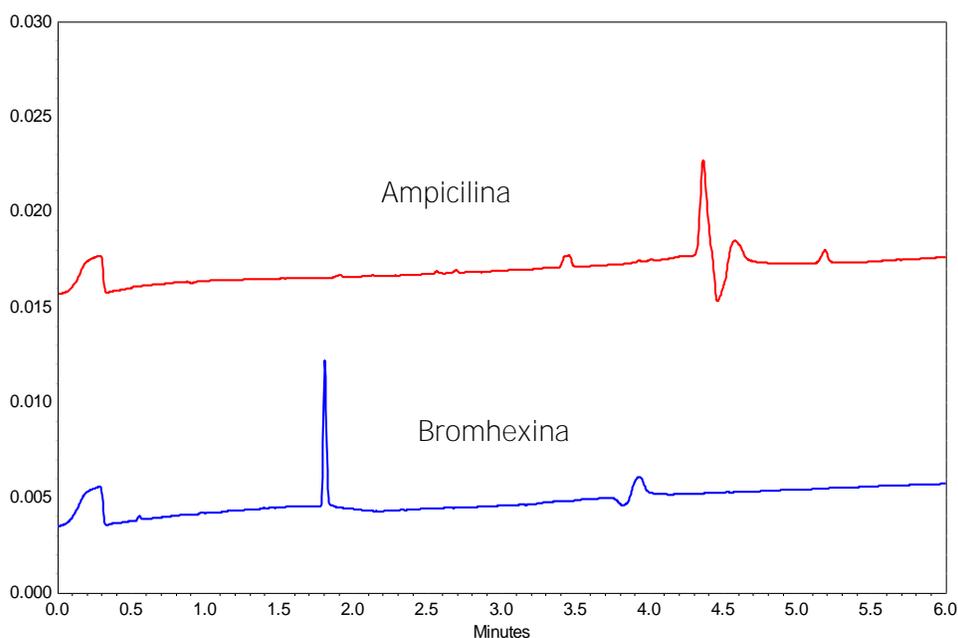


Figura 5. Señal para los analitos en búfer de fosfatos 50mM pH 4.0 capilar de sílice fundida, 30cm de longitud total y diámetro interno de 50 μ m, inyección hidrodinámica a 0.5psi por 5seg a 25 $^{\circ}$ C, voltaje de 30Kv a 214nm.

Por lo que el tiempo de análisis se estableció en 5 minutos por corrida aproximadamente.

Habiendo señales provenientes de la bromhexina y la ampicilina bajo las condiciones mencionadas, entonces, se estudio la separación en distintos valores de pH.

Para identificar el pH en el cual los analitos mostrarían una mejor separación se considero prioritariamente que la bromhexina tiende a precipitar bajo condiciones básicas o neutras ($\text{pH} > 6.0$), [22] por lo tanto se considero probar solamente en un rango de pH entre 2.5 y 5.0.

Se preparó búfer de fosfatos en concentración 50mM a cada valor de pH y se utilizó una mezcla con concentración de 100ppm de cada analito empleando el procedimiento de disolución antes descrito.

Es importante mencionar que se inició el estudio empleando un capilar nuevo y poco acondicionado, lo que condujo a tiempos de migración retardados, sin embargo se consideró que los resultados eran confiables, dado que eran reproducibles y permitían comparar la influencia del pH.

La figura 6 muestra que en todos los valores de pH trabajados se obtienen picos de buena calidad para la bromhexina, sin embargo sólo en pH 3.0 y 4.0 se obtienen picos gaussianos y eficientes para ambos analitos.

Aún cuando en pH 5.0 el tiempo de análisis podría acortarse de manera significativa, el pico de la ampicilina es de muy poca calidad ya que muestra mayor dispersión del analito y dada la proporción real, se buscó que fuera lo más angosto posible, ya que más adelante se trabajaría con las proporciones reales de la formulación farmacéutica modelo.

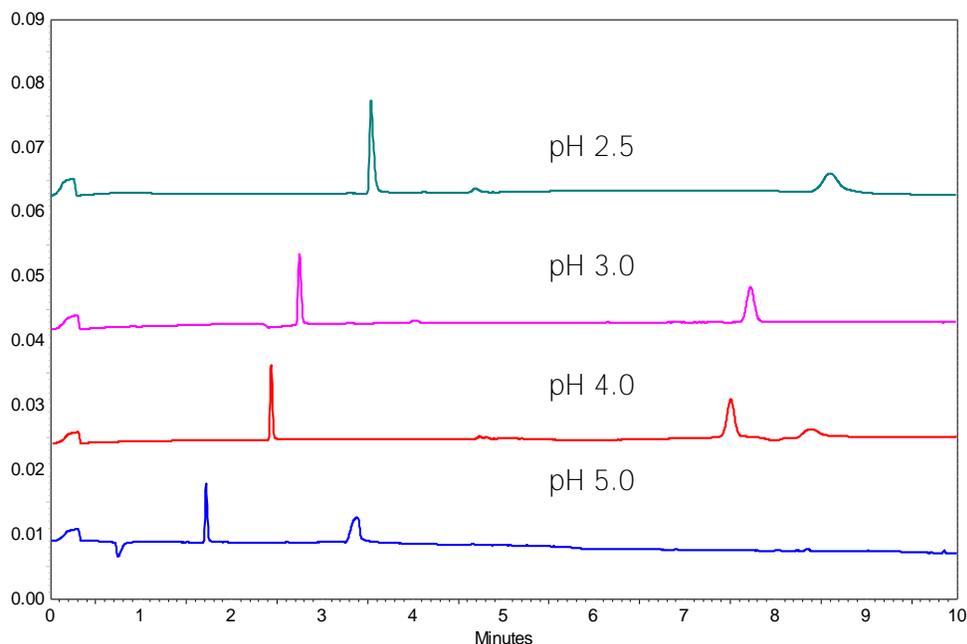


Figura 6. Influencia del pH en la separación de bromhexina y ampicilina, capilar de sílice fundida, 30cm de longitud total y diámetro interno de 50 μ m, inyección hidrodinámica a 0.5psi por 5seg a 25° C, voltaje de 30Kv a 214nm.

La eficiencia es un parámetro de calidad del pico que se describe a través del número de platos teóricos (N), cada plato representa un equilibrio teórico de distribución en el capilar. [23]

Entonces, el número de platos teóricos mide la capacidad del capilar para separar los componentes; la eficiencia o el número de platos se puede observar directamente a partir del electroferograma, observando la agudeza de los picos o a través de un cálculo matemático para saber su valor exacto. [23] Cuanto mayor sea el número de platos teórico (N) mayor será la eficiencia del pico y se logra más fácilmente la separación.

Al realizar una comparativa de este parámetro (N) se pudo definir el valor de pH más adecuado para la separación.

La tabla 10 muestra los valores de N obtenidos en cada valor de pH estudiado, estos datos indican que el pH 3.0 se brinda una mayor eficiencia, pues se obtiene el mayor número de platos teóricos para ambos analitos.

Tabla 10. Número de platos teóricos (N) en función del pH.

pH	Ancho BRO	N BRO	Ancho AMP	N AMP
2.5	0.35	1658.12	0.72	2296.01
3	0.15	5311.49	0.45	4700.47
4	0.2	2329.02	0.85	1240.03
5	0.23	874.1	0.41	1079.04

Con base en estos datos y al electroferograma obtenido se consideró al pH 3.0 como el más apropiado para la separación de los analitos, ya que a cualquier valor de pH, la resolución es mayor a 1.5.

5.4 Selección de la concentración del búfer

La elección de la concentración del búfer es muy importante dentro del desarrollo de un método, ya que al aumentar su concentración, la proporción de corriente conducida por éste crece y la participación de la muestra en dicha conducción disminuye, con lo que se reduce la velocidad de migración. [18]

Sin embargo, al aumentar la concentración del sistema se puede lograr un mejor amortiguamiento, por lo que la selección de la concentración debe ser cuidadosa para proveer un óptimo amortiguamiento sin sacrificar la movilidad de las especies cargadas.

Además una elevada fuerza iónica incrementa la intensidad global de corriente y, consecuentemente, la producción de calor.

Una vez acondicionado el capilar empleado, el búfer de fosfatos 50mM pH 3.0 brindo una corriente de **63.8 μ A**, lo que permitió incrementar la concentración sin riesgo a llegar al límite de corriente aceptable que es de 150 μ A, de esta forma se aumenta el amortiguamiento esperando mejorar la resolución y eficiencia de la separación pero sobre todo la reproducibilidad del método.

Se planeó trabajar con concentraciones del búfer de fosfatos de 50, 60, 70, 80 y 90mM a pH 3.0, continuando con muestras de bromhexina-ampicilina de concentración 100-100 ppm, bajo las condiciones mencionadas en la selección del pH.

En la figura 7 no se incluyo el electroferograma de la concentración 90mM, ya que su corriente resultó demasiado elevada (152 μ A), por lo que no se realizó la corrida.

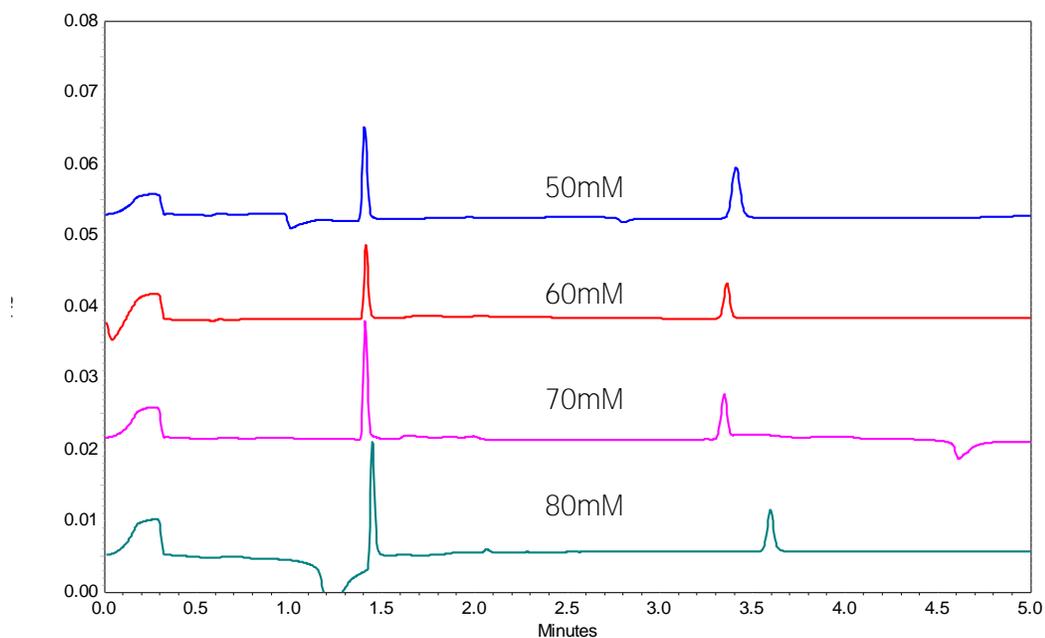


Figura 7. Efecto de la concentración del electrolito soporte en la separación.

La figura 7 muestra que el búfer empleado brinda picos de alta eficiencia en todas las concentraciones probadas, sin embargo en 50 y 60mM se obtienen los picos de mejor forma y tamaño.

No obstante, es preferible tomar en cuenta un parámetro electroforético que sirva como sustento en la elección de la concentración, nuevamente se tomo en cuenta el número de platos teóricos.

Como ya se mencionó, la proporción de ampicilina en la muestra real es 62 veces mayor, con respecto a la bromhexina, produciendo un pico demasiado ancho y alto, por lo cual, se procuró en cada etapa que los valores de resolución y eficiencia fueran prioritarios para este analito, ya que la bromhexina no presenta problemas en su señal.

Se observa en la tabla 11, que en 70 y 80mM el número de platos teóricos para la ampicilina fueron los más grandes, no obstante los valores para la bromhexina son demasiado bajos y dada la proporción real (Bromhexina: Ampicilina 1:62) no sería adecuada la separación en dichas concentraciones.

Por lo anterior, se consideró como la mejor concentración 50mM, ya que en esta se obtiene un número adecuado de platos teóricos para la bromhexina y en esta concentración también se tiene un valor numérico de alta eficiencia para la ampicilina.

Tabla 11. Número de platos en función de la concentración del búfer.

Concentración	Tm BRO	Ancho BRO	N BRO	Tm AMP	Ancho AMP	N AMP
50mM	1.396	0.09	3849.51	3.404	0.12	12874.68
60mM	1.404	0.08	4928.04	3.354	0.26	2662.56
70mM	1.367	0.36	230.7	3.337	0.11	14724.72
80Mm	1.429	0.49	136.07	3.486	0.09	24004.34

Estos datos aunados al electroferograma obtenido (Figura 6) demuestran que la concentración 50mM ofrece mejor eficiencia del sistema, una adecuada separación de ampicilina y bromhexina, y presenta una menor corriente siendo entonces la concentración más adecuada para el método.

5.5 Selección de la naturaleza del búfer

La naturaleza del búfer es una característica básica en la separación electroforética, ya que determina el movimiento de las especies eléctricamente cargadas, influenciando así su tiempo de migración, por tanto el tiempo de análisis.

La sensibilidad del flujo electroosmótico al pH de la separación requiere el uso de un búfer que pueda mantener un pH constante.

Según Castillo Rodríguez, et.al., un búfer para ser utilizado en Electroforesis Capilar debe poseer idealmente las siguientes características:

- Buena capacidad de amortiguación en el rango seleccionado.
- Baja movilidad, para minimizar la generación de corriente.
- Baja absorbancia a la longitud de onda de detección

A fin de mejorar la eficiencia de la separación, se probaron varios electrolitos soporte, cuyas características fuesen adecuadas en los valores de pH y concentración establecidos para la separación.

Se prepararon varios sistemas búfer a pH 3.0 y con una concentración 50mM, (en los sistemas de amortiguamiento combinados, la concentración total en el medio fue de 50mM para cada uno). Se utilizaron muestras de bromhexina-ampicilina de concentración 100ppm de cada analito, capilar de sílice fundida, 30cm de longitud total y diámetro interno de 50 μ m, inyección hidrodinámica a 0.5psi por 5seg a 25° C, voltaje de 30Kv a 214nm.

En la figura 8 se observa que en el búfer fosfatos- trietanolamina la línea base muestra múltiples variaciones y los tiempos de migración para la bromhexina y ampicilina se alargan a 1.8 y 7.3 minutos respectivamente.

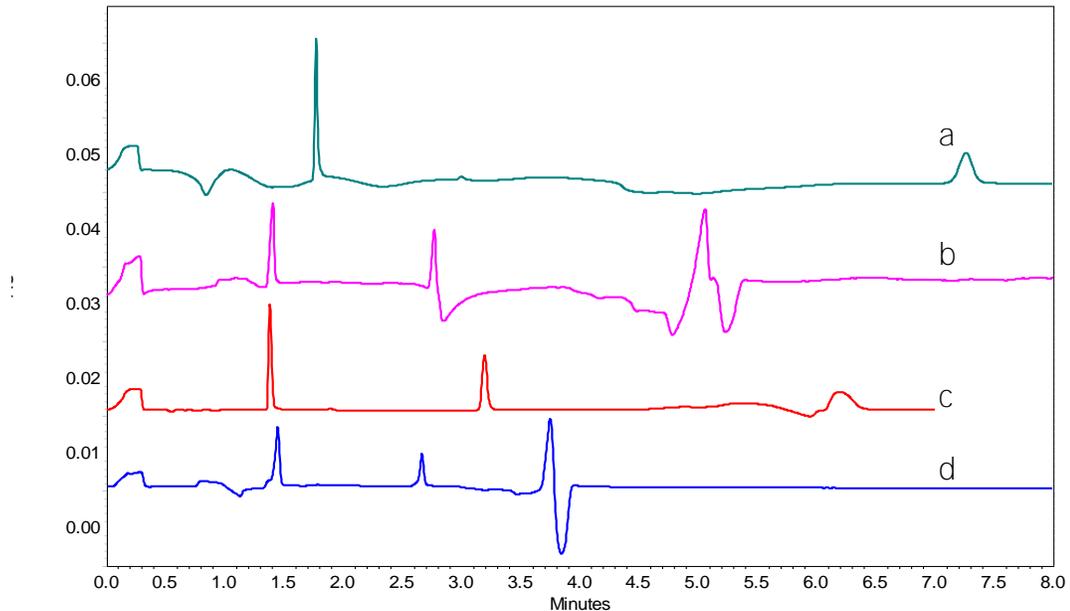


Figura 8. Efecto de la naturaleza del búfer en la separación.

a :Búfer fosfatos- trietanolamina (50-50mM), b: Búfer fosfatos-citratos (50-50mM)
c: Búfer fosfatos (50mM) y d: Búfer citratos (50mM).

Con el búfer fosfatos-citratos se acorta el tiempo de migración de la ampicilina a 2.7 minutos pero el pico de ampicilina no presenta un buen comportamiento, presenta coleo.

En el búfer de fosfatos se ve una menor señal del FEO, la línea base es de mejor calidad, debido a la menor absorción de dicho búfer en el rango del ultravioleta-visible en comparación con los otros sistemas búfer.

Usando el búfer de citratos se reduce el tiempo de migración de la ampicilina a 2.6 minutos, manteniéndose el de 1.4 para la bromhexina, sin embargo, el grado de dispersión del pico de ampicilina es más alto y podría generar problemas durante la integración del pico.

Por lo anterior, para hacer la selección de forma más confiable, se evaluó la eficiencia en cada sistema de amortiguamiento, obteniéndose los valores mostrados en la tabla 12.

Tabla 12. Eficiencia en función de la naturaleza del búfer

Búfer	Tm BRO	Ancho BRO	N BRO	Tm AMP	Ancho AMP	N AMP
Citratos	1.438	0.12	2297.6	2.658	0.27	1550.6
Fosfatos	1.383	0.27	419.79	3.196	0.23	3089.43
Fos- Cit	1.408	0.13	1876.89	2.771	0.07	25072.46
Fos - Trie	1.796	0.08	8064.04	7.287	0.95	941.39

Los resultados obtenidos indican que los valores más altos de platos teóricos (N) para la ampicilina se consiguen con el búfer combinado fosfatos-citratos (50-50mM) seguido por el de fosfatos 50mM, sin embargo, el electroferograma comparativo muestra que la mejor línea base se obtiene usando el búfer de fosfatos.

De cualquier manera, antes de tomar la decisión final, se decidió probar el medio combinado y evaluar su desempeño frente al búfer fosfatos, utilizando una muestra con las proporciones reales de la formulación modelo (cápsulas). Se usó una muestra que tenía una concentración 80ppm de bromhexina y 5000 ppm de ampicilina.

La figura 9 corresponde al electroferograma obtenido, los picos resultaron demasiado anchos, se observa que el tiempo de migración de la ampicilina se ve aumentado a 3.5 minutos, además aparece un pico adicional en el minuto 2.0.

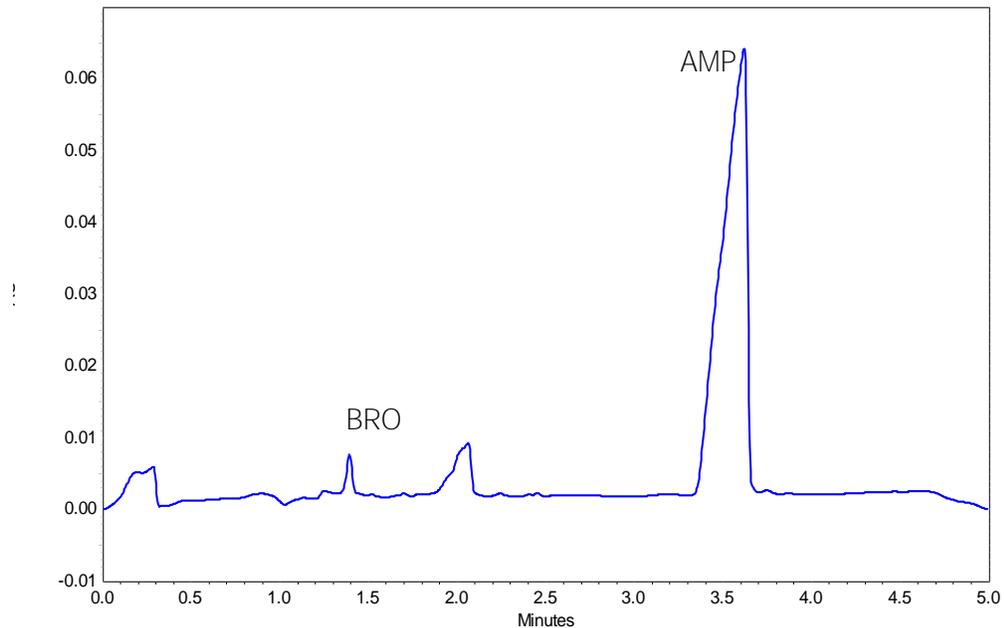


Figura 9. Mezcla bromhexina (80ppm) – ampicilina (5000ppm) en proporciones reales, en búfer combinado fosfatos –citratos (50- 50mM) pH 3.0

Al principio se sospecho que el pico fuese producido por un mal tratamiento de la muestra o algún contaminante, para descartar este hecho, se corrieron varias muestras, en las cuales apareció nuevamente, por lo tanto se decidió buscar el origen real de este pico para evitar problemas a futura en la aplicación del método.

Se consideró entonces, que podría tratarse de un compuesto de degradación, ya que la ampicilina, al igual que otros antibióticos β -lactámicos es inestable en medios alcohólicos. [10]

Entonces, se corrió una muestra de bromhexina estándar de 80ppm, (figura 10), al ser comparada con el perfil obtenido para la mezcla, no presenta el pico de degradación, por lo cual se confirma que la bromhexina no se degrada en el medio de disolución empleado, quedando como manifiesto que la ampicilina es quien esta generando el pico adicional.

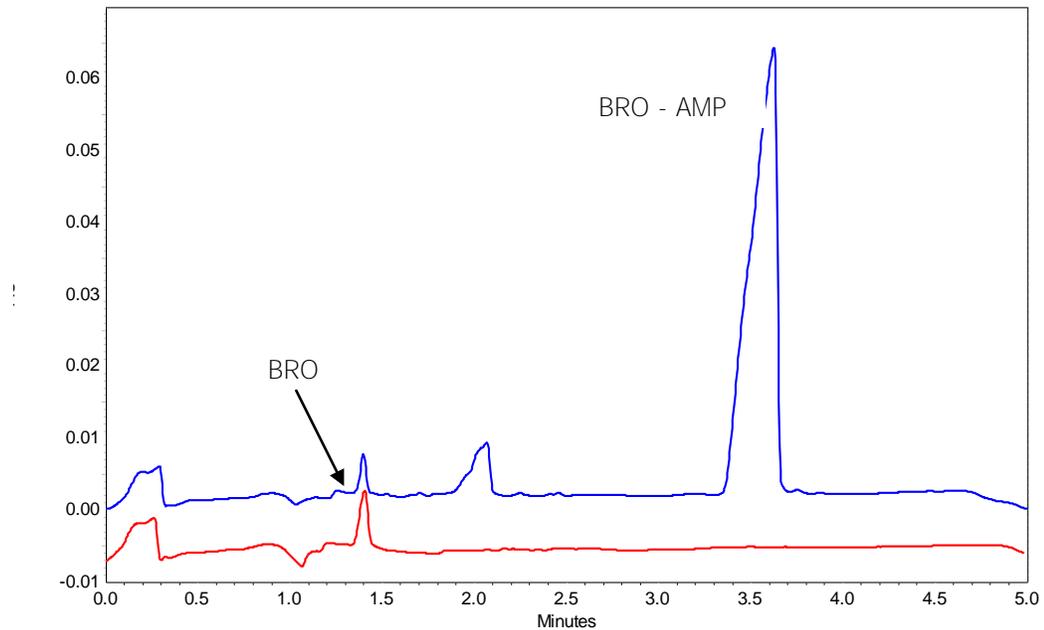


Figura 10. Comparación de bromhexina sola (80ppm) y mezcla bromhexina (80ppm) – ampicilina (5000ppm), empleando búfer combinado fosfatos –citratos (50-50mM) pH 3.0

Para establecer el grado de influencia de la concentración de ampicilina sobre la degradación, se disminuyó de 5000 a 2500ppm, conservando las 80ppm para la bromhexina.

De lo anterior, se obtuvo el electroferograma mostrado en la figura 11, donde se tiene que el pico de degradación (2.33 minutos) disminuyó proporcionalmente a la concentración de la ampicilina. La modificación en los tiempos se debe posiblemente a que se preparó un nuevo búfer, pues un cambio en la concentración real se refleja en la corriente del mismo (146.2 μA).

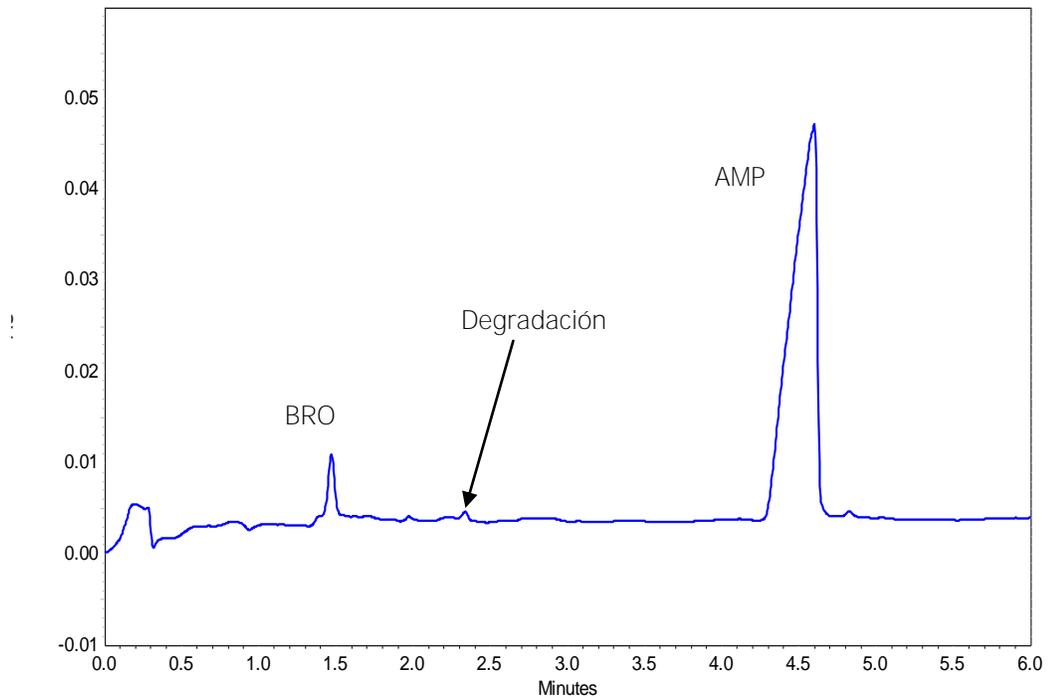


Figura 11. Influencia de la concentración de ampicilina en la degradación de la mezcla bromhexina – ampicilina. Empleando búfer combinado fosfatos –citratos (50-50mM) pH 3.0

Al obtener estos resultados, se corrieron muestras con el búfer de fosfatos 50mM pH 3.0, que también presenta una buena resolución y eficiencia de los picos, para poder discernir si con este electrolito soporte se podría mejorar el perfil de separación de la mezcla ó resultaba necesario modificar el medio de disolución en la muestra.

Se emplearon las concentraciones de 80 y 5000 ppm de bromhexina y ampicilina respectivamente.

La figura 12 muestra que se obtiene un pico de mejor calidad para la ampicilina, pero es evidente la presencia del pico de degradación (2.038 min.) además de un pico de bromhexina de buena calidad pero de poca altura, debido a la baja proporción en la que se encuentra en la muestra.

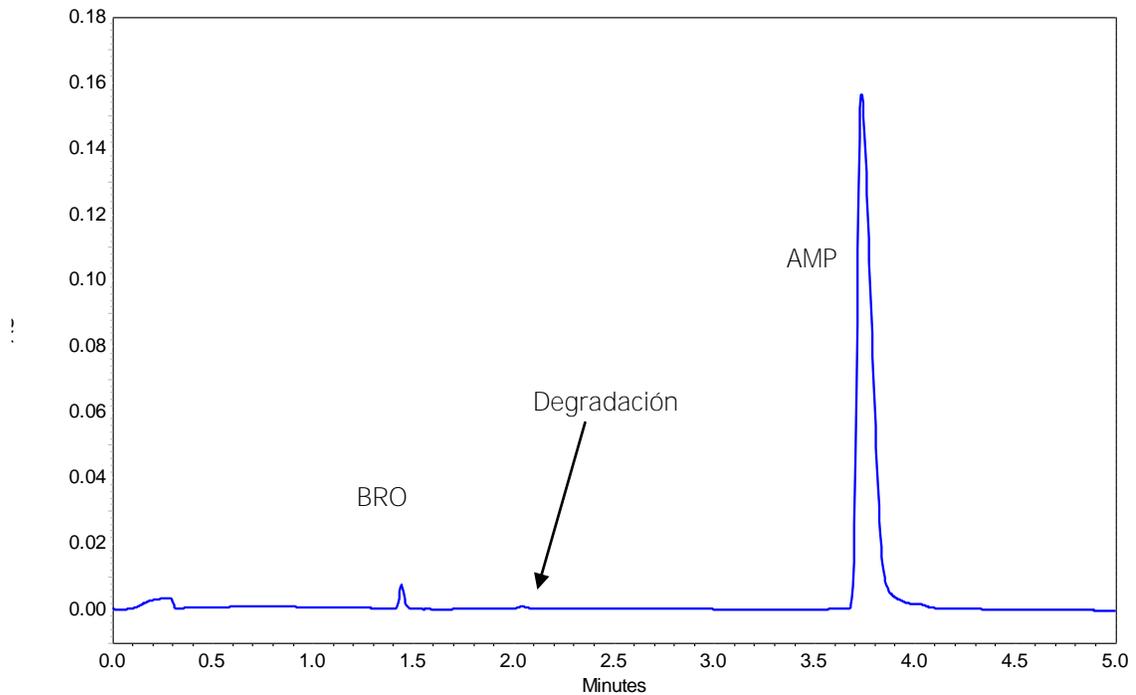


Figura 12. Mezcla bromhexina (80ppm) – ampicilina (5000ppm) en proporciones reales en búfer fosfatos 50mM pH 3.0

Antes de buscar otro medio de disolución, se probó que realmente el medio estaba provocando la descomposición del analito, por lo que se aumentó la cantidad de metanol, adicionando 10ml (antes 3ml.) y aforando a 25 ml con agua acidulada (pH 1.0), utilizando como electrolito soporte al búfer de fosfatos 50mM pH 3.0 para el análisis, cabe mencionar que se consideró este búfer, ya que los parámetros antes evaluados mostraron que también era una buena opción.

En la figura 13 se observa que el tamaño del pico de degradación aumentó, aún cuando las muestras se leyeron en un lapso no mayor a 20 minutos después de haber sido preparadas.

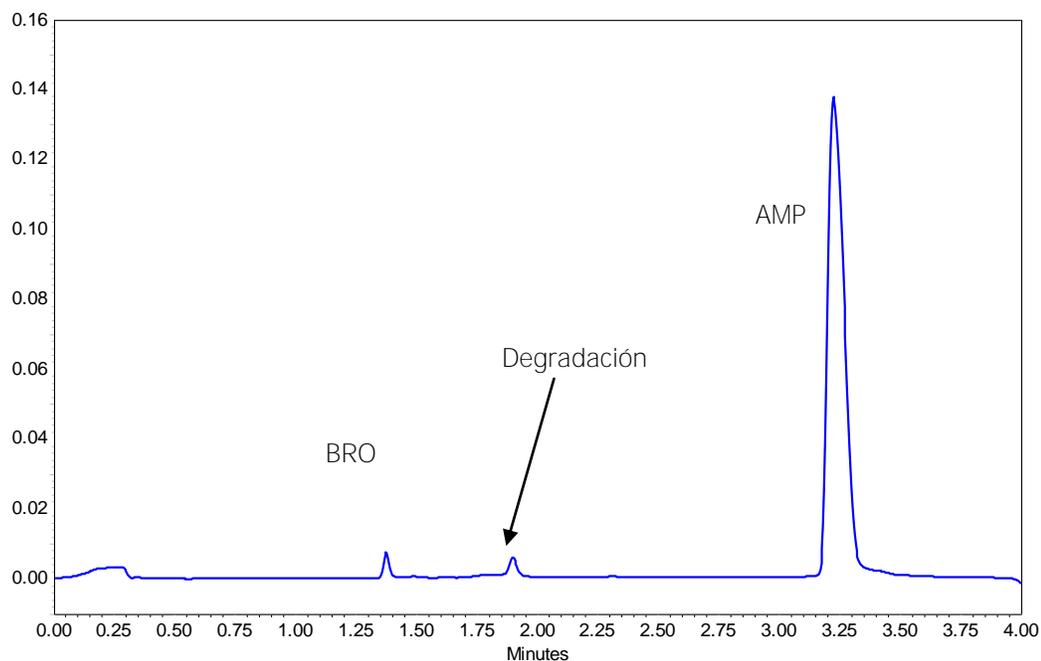


Figura 13. Influencia del volumen de metanol en la degradación de la ampicilina, búfer fosfatos 50mM pH 3.0

En la tabla 13 se registran los cambios en el tamaño del pico de degradación de la ampicilina en función del volumen agregado de metanol, lo cual hace evidente que la muestra no es estable en este medio.

Tabla 13. Modificación del pico de degradación en función del volumen de MeOH.

Vol. MeOH	Altura Pico de Degradación
3ml	633
10ml	4492

Por lo tanto, se decidió revisar nuevos datos bibliográficos de apoyo para encontrar otro medio de disolución.

En dicha revisión se encontró que al preparar muestras de los antibióticos β -láctamicos utilizando acetonitrilo como medio de disolución, estas se mantienen estables hasta una semana después. [10].

Se propuso usar acetonitrilo como medio de disolución, pero antes se realizó el estudio de solubilidad para verificar que no afectara el proceso de disolución de la bromhexina, empleándose 6mg de bromhexina y 300mg de ampicilina respectivamente.

En la tabla 14 se muestra que al emplear una mezcla acetonitrilo - agua acidulada (1:1) se logra solubilizar a los dos analitos.

Tabla 14. Estudio de solubilidad con acetonitrilo

Disolvente	Bromhexina	Ampicilina	Mezcla BRO-AMP
Acetonitrilo	Insoluble	Soluble	Presencia de precipitado
Mezcla acetonitrilo -H ₂ O desionizada (1:1)	Insoluble	Parcialmente soluble	Se forma una dispersión opaca.
Mezcla acetonitrilo -H ₂ O acidulada (1:1)	Soluble	Soluble	Completamente Soluble

Entonces, se pudo contar con dos tratamientos de solubilización:

- **Tratamiento 1:** 3ml de Metanol + 22ml de H₂O acidulada pH 1.0 (Aforo a 25ml)
- **Tratamiento 2:** 2ml de Mezcla Acetonitrilo – H₂O acidulada pH 1.0 (1:1) + 23ml de H₂O desionizada. (Aforo a 25ml)

Se probaron los dos tratamientos tanto en el búfer de fosfatos como en el medio combinado fosfatos-citratos (50-50mM), realizándose varias corridas, además se confrontaron los coeficientes de variación brindados por cada uno, para seleccionar el tratamiento más adecuado considerando también los valores estadísticos.

Para ello se planteo disminuir la proporción de ampicilina para mejorar el pico y posteriormente utilizar las proporciones reales.

La concentración de bromhexina y ampicilina en esta prueba fue de 80 y 250ppm respectivamente.

Los resultados con el búfer fosfatos - citratos (50-50mM) se muestran en la figura 14, donde se observa que se obtienen mejores picos cuando se utiliza el tratamiento con acetonitrilo (Tratamiento 2), además con este medio no se presenta el pico de degradación.

Lo inconveniente fue que el pico de la bromhexina resulto poco gaussiano y se retrasa el tiempo de migración de la ampicilina.

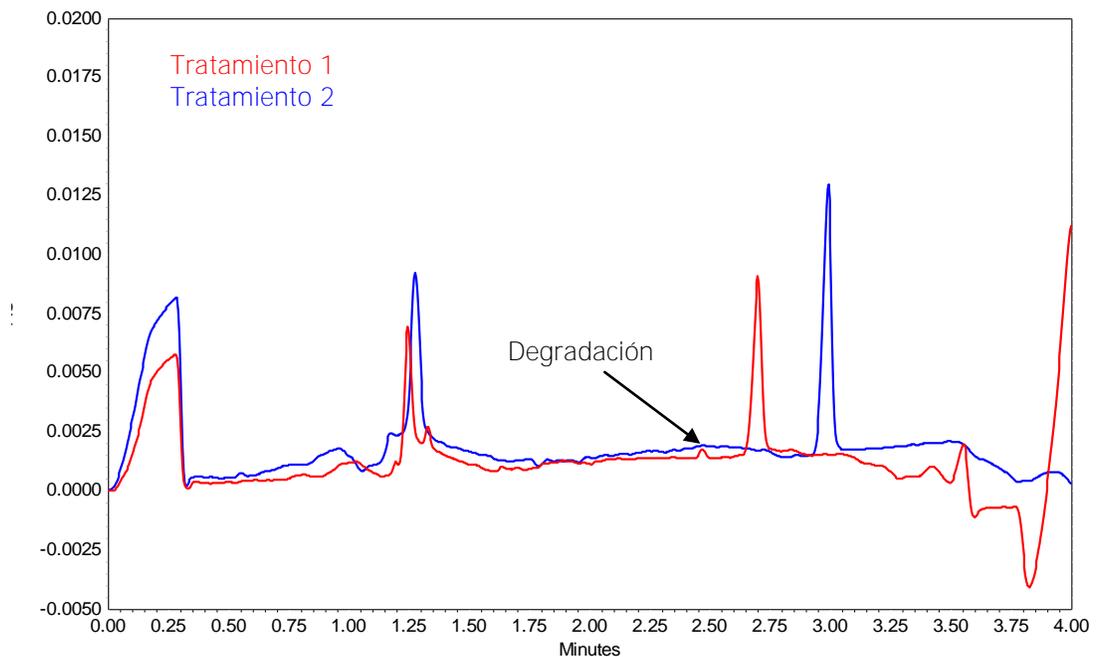


Figura 14. Efecto del tratamiento de los estándares en la separación usando búfer fosfatos-citratos (50-50mM) pH 3.0

En la figura 15 se muestra la comparativa de ambos tratamientos utilizando como medio de amortiguamiento al búfer de fosfatos, se observa que con el medio de acetonitrilo los picos son más gaussianos para ambos analitos.

Además, en estas condiciones se obtiene un pico más definido para la bromhexina, lo cual resulta de gran beneficio, ya que es muy conveniente que el analito en menor proporción tenga la mayor área posible.

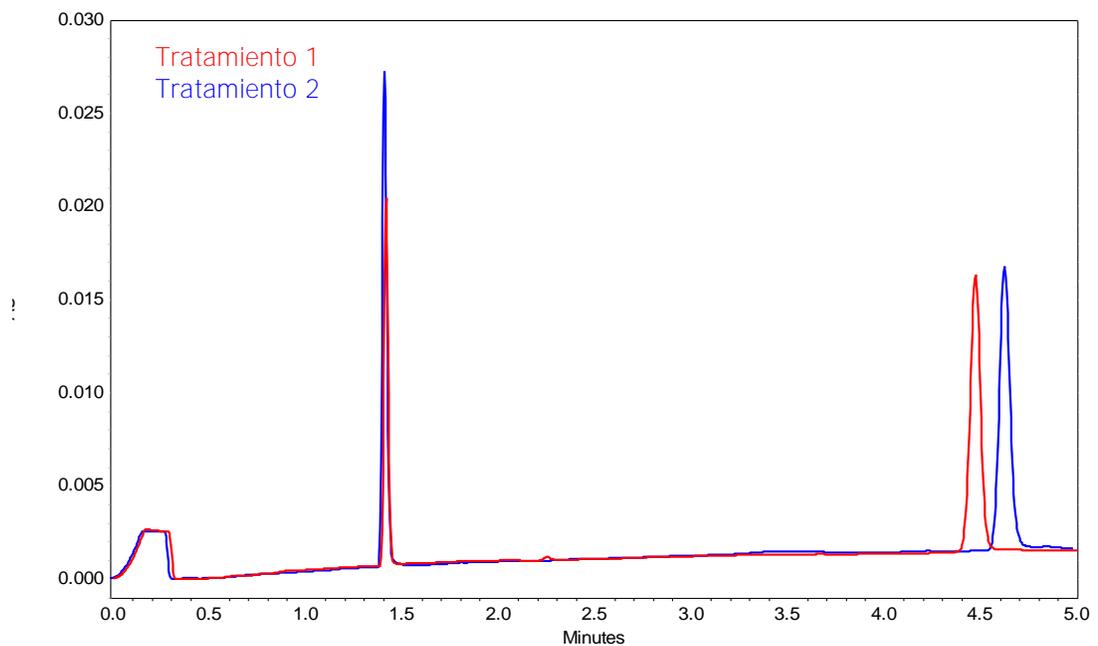


Figura 15. Efecto del tratamiento de los estándares en la separación usando búfer fosfatos 50mM pH 3.0

A fin de probar la reproducibilidad en cuanto los tiempos de migración, se realizaron varias corridas para verificar los parámetros estadísticos más significativos.

En las tablas 15 y 16 se muestran los coeficientes de variación en los tiempos de migración para cada analito, según el tratamiento y el búfer utilizado.

Estos datos reflejaron que el tratamiento con acetonitrilo (T2) en medio amortiguador de fosfatos mejoraba no sólo las señales obtenidas, sino también los coeficientes de variación en los tiempos de migración (T_m) para ambos analitos.

Tabla 15. Coeficientes de variación del T_m de la bromhexina.

PARÁMETRO	BUFFER FOSFATOS		BUFFER FOS-CIT	
	T1	T2	T1	T2
Promedio	1.4018	1.4413	1.4115	1.5150
Desviación Std.	0.0160	0.0106	0.0353	0.0168
C.V	1.142	0.736	2.499	1.111

Tabla 16. Coeficientes de variación del T_m de la ampicilina.

PARÁMETRO	BUFFER FOSFATOS		BUFFER FOS-CIT	
	T1	T2	T1	T2
Promedio	4.4024	3.8362	3.2289	3.5694
Desviación Std.	0.1126	0.0697	0.1588	0.1061
C.V	2.5566	1.8163	4.9171	2.9730

Entonces, a partir de los electroferogramas obtenidos, de su análisis, y de los datos anteriores, se decidió cambiar el medio de disolución, empleando entonces, 2ml de mezcla acetonitrilo-agua acidulada pH 1.0 (1:1), aforando a 25 ml con agua desionizada para solubilizar a los estándares y para el posterior tratamiento de la muestra.

También se pudo precisar que el búfer de fosfatos era el más eficiente para este método, en una concentración 50mM a pH 3.0.

5.6 Introducción de la muestra

La introducción de la muestra es un parámetro decisivo, su objetivo es lograr que la muestra entre al capilar de una manera adecuada y reproducible. Al elegir apropiadamente el tipo de introducción se garantiza que el volumen muestra

que entra al capilar es el correcto, ya que se debe considerar que los capilares empleados son de diámetros micrométricos y un exceso en el volumen inyectado afectaría tanto la separación como la eficiencia de los picos.

Para estudiar la influencia del modo de inyección en la separación bromhexina- ampicilina se realizó una comparativa entre la introducción electrocinética e introducción hidrodinámica, utilizando una muestra de 80 y 250ppm respectivamente.

La figura 16 muestra el electroferograma comparativo mediante el cual se decidió que la mejor opción era continuar con la inyección hidrodinámica, ya que los picos obtenidos son más definidos, principalmente el de bromhexina, ya que por la proporción real de la formulación farmacéutica, lo más conveniente es que sea de la mayor altura posible.

Además, la inyección hidrodinámica carga todos los componentes de la muestra dentro del capilar de manera homogénea y suele ser el modo de inyección más reproducible.

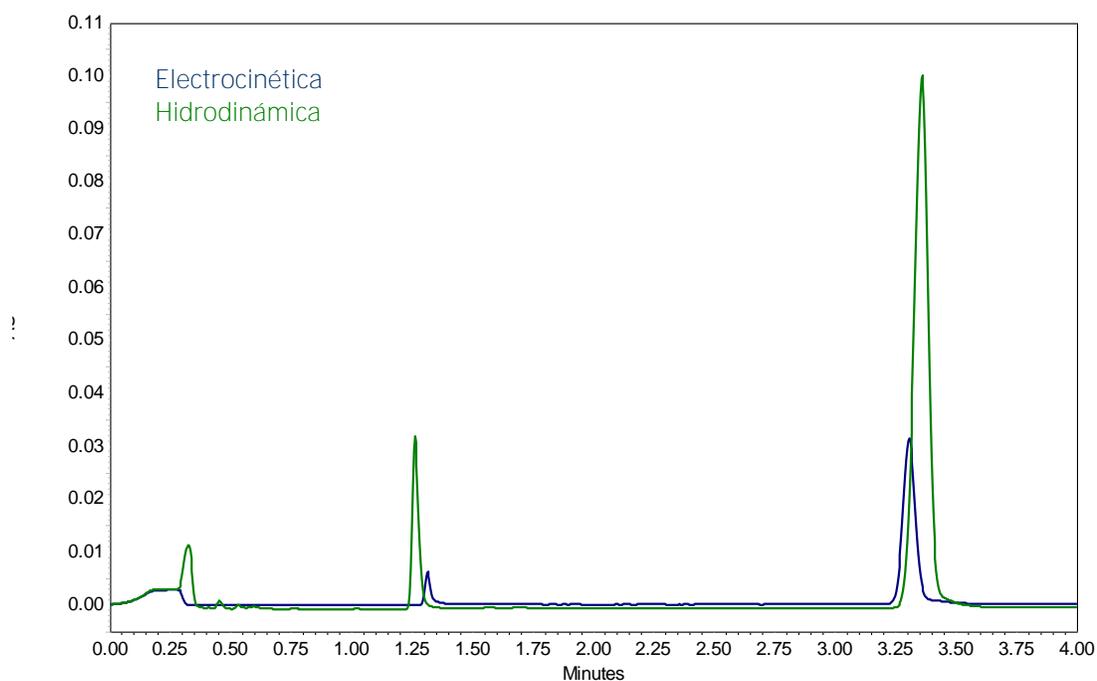


Figura 16. Efecto del tipo de inyección en la separación de la mezcla bromhexina – ampicilina.

5.7 Tiempo de lavado del capilar

Por lo general, se puede tener una mejor reproducibilidad en los tiempos de migración si se sigue un procedimiento de lavado definido.

Los procedimientos de acondicionamiento y lavado del capilar son muy específicos para cada analito, la matriz y el método. En consecuencia, estos procedimientos se desarrollan como parte del método. [14]

Para estimar el tiempo adecuado de lavado entre corridas se comparo la variación en los tiempos de migración y el área cuando se realizaba el lavado con búfer durante 2, 3 y 5 minutos entre cada corrida, cabe señalar que hasta ahora, el tiempo de lavado de capilar empleado era de 2 minutos entre cada corrida.

Tabla 17. Coeficientes de variación según el tiempo de lavado.

Tiempo de Lavado	CV Tm BRO	CV Área BRO	CV Tm AMP	CV Área AMP
2 minutos	0.414	7.178	3.186	8.179
3 minutos	0.402	3.838	2.149	7.448
5 minutos	1.026	11.846	3.618	12.227

La tabla 17 muestra los coeficientes de variación obtenidos, se observa que al lavar por 3 minutos entre corridas se obtienen menores variaciones en los tiempos de migración, así como en las áreas de pico de cada analito, por lo que se modifico el tiempo de lavado a 3 minutos.

5.8 Selección de la longitud y diámetro interno del capilar

Las variaciones en el diámetro y en la longitud del capilar pueden afectar la resolución electroforética. El aumento de la longitud del capilar da como resultado un tiempo de migración más prolongado, que suele aumentar la resolución y genera una corriente más baja.

Por lo general, el aumento del diámetro interno del capilar aumenta la corriente y los gradientes de temperatura asociados que disminuyen la resolución. Por el contrario, una reducción del diámetro del capilar dará como resultado menos calor y una mejor resolución. [14] Las longitudes totales más comúnmente empleadas en los capilares van de 30 a 70 cm., y los diámetros internos de 50 y 75 micrómetros.

Como hasta este punto se había empleado un capilar de 30 cm. de longitud total y diámetro interno de 50 μ m., se evaluó la separación de los analitos en un capilar de la misma longitud con un diámetro interno de 75 μ m. a fin de confrontar el perfil de separación en cada uno.

Se utilizó una muestra en proporciones reales de la mezcla Bromhexina-Ampicilina. (80-5000ppm).

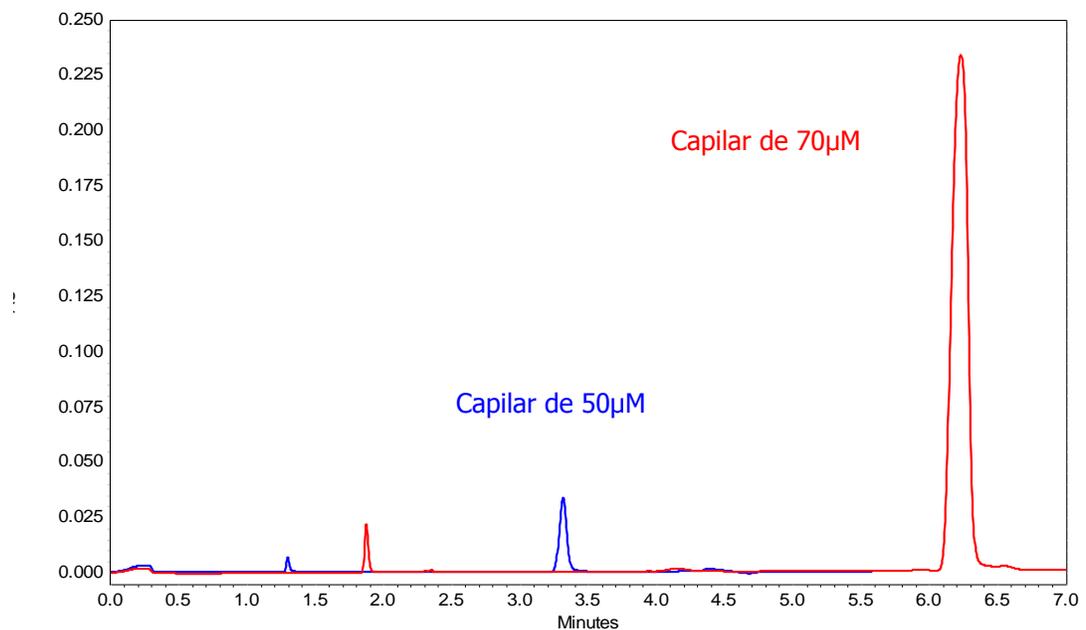


Figura 17. Efecto del diámetro interno del capilar en la separación de la mezcla bromhexina – ampicilina. Búfer de fosfatos 50mM pH 3.0, capilar de sílice fundida, 30cm de longitud total, inyección hidrodinámica a 0.5psi por 5seg a 25° C, voltaje de 30Kv a 214nm.

La figura 17 muestra el electroferograma comparativo, en el cual se observa que al utilizar un capilar de mayor diámetro interno se retrasan los tiempos de migración de ambos analitos, lo cual afectaría el tiempo total estimado para cada corrida.

Además, empleando el diámetro de 75 μ m se tuvieron corrientes más altas (148-150 μ A) con respecto al de menor diámetro, por lo tanto, se continuará empleando el capilar de 50 μ m.

5.9 Efecto del voltaje

Cuando se aplican altos voltajes, se calienta internamente la solución amortiguadora operativa debido a la corriente que fluye a través del capilar. Este efecto de calentamiento conocido como calentamiento de Joule, debe controlarse porque la resistencia, la constante dieléctrica y la viscosidad dependen de la temperatura y alteran la velocidad del FEO y las movilidades del soluto. [14]

A fin de mejorar la calidad de la separación, se evaluaron dos voltajes aplicados 25 y 30 Kv, para definir el más adecuado en este método. Se utilizó una muestra en proporciones reales de la mezcla Bromhexina- Ampicilina. (80-5000ppm).

Como se observa en la figura 18, al aplicar 30kV se reduce el tiempo de la separación y por tanto el tiempo total del análisis, por lo cual, se continuó trabajando con este voltaje.

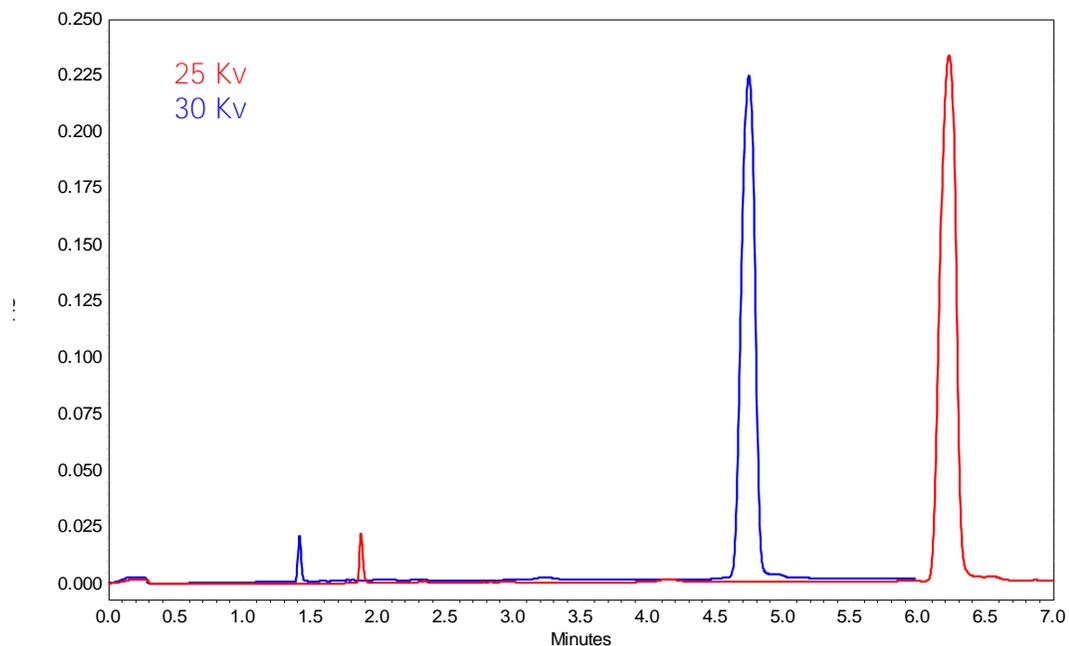


Figura 18. Efecto de voltaje en la separación de la mezcla bromhexina – ampicilina.

5.10 Condiciones electroforéticas óptimas de separación.

De acuerdo a los parámetros analizados y a los datos considerados [21], se estableció, que las condiciones apropiadas para la separación de la mezcla bromhexina – ampicilina son:

- Longitud de onda de detección a 214nm
- Búfer de fosfatos 50mM pH 3.0
- Inyección hidrodinámica 0.5psi, 5 segundos
- Capilar de sílice fundida de 30cm de longitud total y diámetro interno de 50 μ m
- Voltaje aplicado de 30Kv
- Tiempo de lavado entre corridas de 3 minutos.

La figura 19 muestra el perfil de separación de la mezcla bromhexina ampicilina empleando las condiciones electroforéticas óptimas de separación mencionadas, en las proporciones reales de la formulación farmacéutica, se obtiene un tiempo de migración de 1.292 y 3.313 minutos para la bromhexina y la ampicilina respectivamente.

Se estima que la corrida tendrá un tiempo total de 7 minutos aproximadamente, por los pasos de lavado entre corridas.

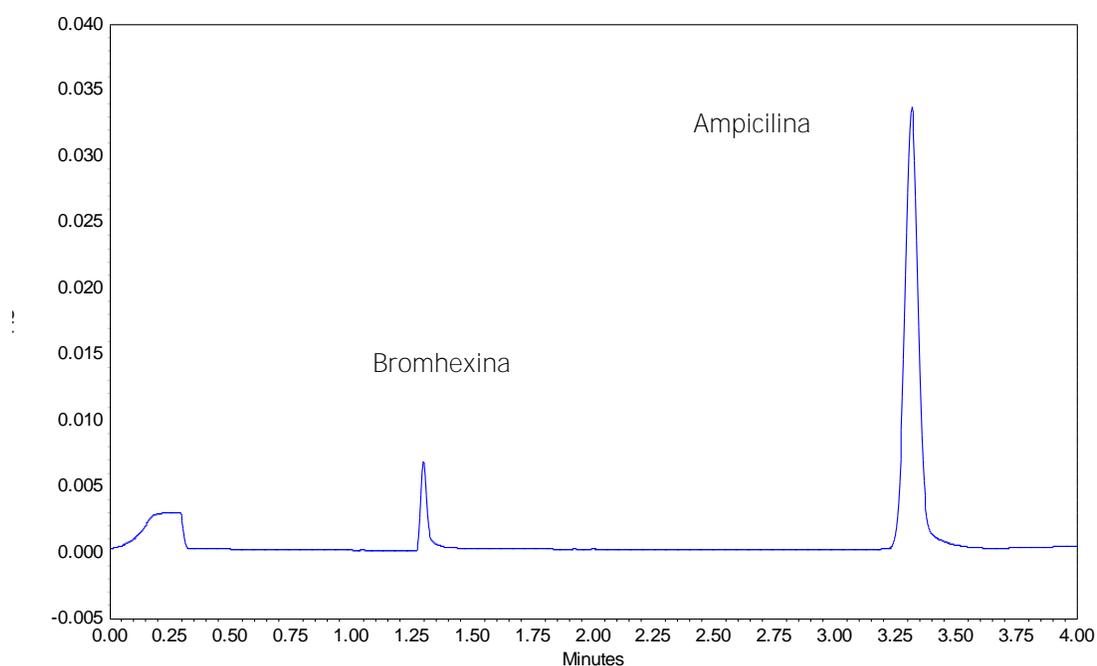


Figura 19. Perfil de separación electroforética de la mezcla bromhexina-ampicilina (80-5000ppm), búfer de fosfatos 50mM pH 3.0 , capilar de sílice fundida, 30cm de longitud total y diámetro interno de 50 μ m, inyección hidrodinámica a 0.5psi por 5seg a 25° C, voltaje de 30Kv a 214nm.

5.11 Tratamiento de la muestra real

Una vez establecidas las condiciones ideales del método, se realizó el tratamiento de la muestra real, considerando que los excipientes presentes en la forma farmacéutica modelo podrían ser solubles en el medio de disolución

empleado, pudiendo generar con ello alguna interferencia en la separación y/o en la señal hasta ahora obtenida.

La formulación indica que las cápsulas contienen estearato de magnesio como único excipiente, en una proporción de 11mg por cada 8mg de bromhexina y 500mg de ampicilina.

Primero se realizó un estudio de solubilidad del estearato de magnesio en el medio de disolución propuesto para el método.

Tabla 18. Estudio de solubilidad del estearato de magnesio.

Medio de disolución	Resultado
Mezcla acetonitrilo-agua acidulada (Ac: Aa) (1:1)	Insoluble
Agua desionizada	Insoluble
Mezcla Ac: Aa (1:1) + Agua desionizada	Insoluble
Búfer fosfatos 50mM pH 3	Insoluble

La tabla 18 muestra que el estearato de magnesio es insoluble en los medios de disolución empleados en el método, por lo cual fue necesario filtrar antes de aforar la solución.

El procedimiento empleado para el tratamiento de las cápsulas fue el siguiente:

- 1.** Preparar un placebo cargado al 100% según la formulación.
- 2.** Pesar del placebo el equivalente a 1.6mg de bromhexina y 100mg de ampicilina.
- 3.** Agregar 2ml de mezcla Ac: Aa (1:1) y dar agitación magnética por 2 min.
- 4.** Adicionar 5ml de agua desionizada y continuar la agitación por 3 min. más.
- 5.** Filtrar la solución y lavar con 3ml de agua desionizada.

6. Adicionar el filtrado a un matraz de 20ml y aforar con agua desionizada, la solución resultante tendrá una concentración de 80ppm de Bromhexina y 5000ppm de ampicilina.
7. Preparar un blanco pesando de manera aproximadamente exacta 11mg de estearato de magnesio y tratar con los pasos 3 a 6.
8. Preparar una solución de estándares con 1.6mg de bromhexina y 100mg de ampicilina siguiendo los pasos 3 a 6.
9. Analizar el blanco, la muestra estándar y la muestra del placebo bajos las condiciones establecidas para el método y obtener del electroferograma los tiempos de migración y área de cada analito.
10. Cuantificar la cantidad recuperada de cada analito.

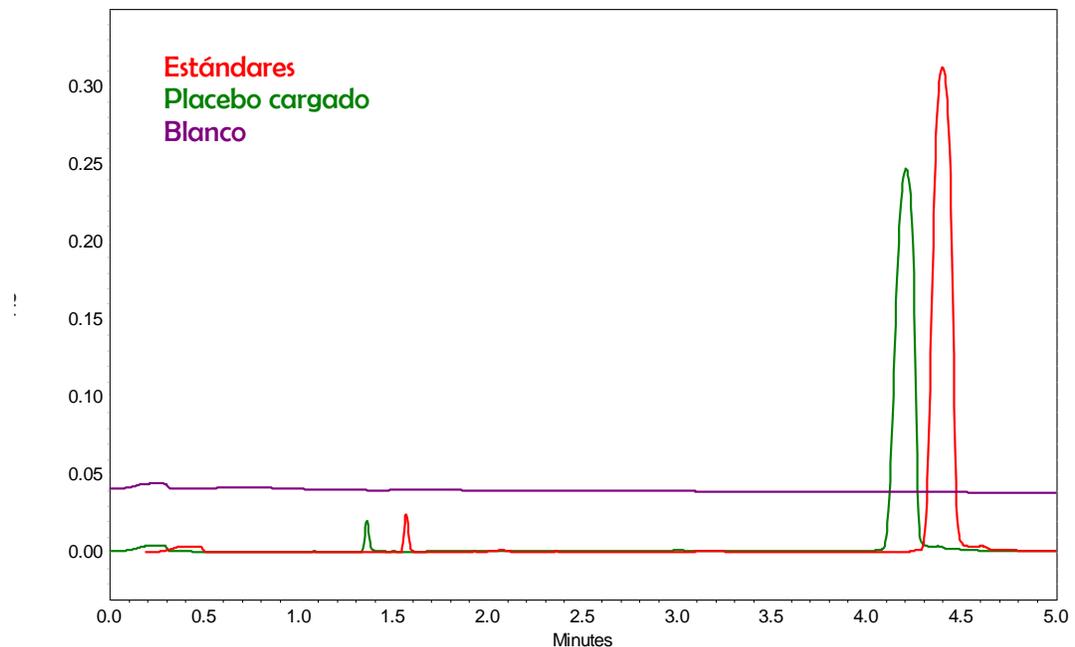


Figura 20*. Electroferograma comparativo de una muestra de estándares y un placebo cargado tratados con 2ml de mezcla Ac: Aa (1:1)

* Para evitar el traslape de las señales se movió a la izquierda el electroferograma de los estándares.

En la figura 20 se muestra el electroferograma comparativo obtenido empleando este procedimiento, al no aparecer un pico adicional en el perfil de separación, se observa que no existe interferencia del estearato de magnesio y

que el procedimiento de filtrado es adecuado, así mismo, las alturas de pico en el placebo hacen evidente un buen grado de recuperación de ambos analitos.

Sin embargo, es necesario emplear un parámetro cuantitativo para verificar la cantidad presente de los analitos en las muestras leídas, este parámetro es el recobro.

El recobro es la cantidad de analito determinada en el placebo adicionado o muestra adicionada, empleando el método analítico. [24]

Para calcularlo se emplea la siguiente relación:

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{Cantidad adicionada}}{\text{Cantidad recuperada}} \times 100$$

Como se muestra en la tabla 19, el % de recobro no estaba dentro del rango de aceptación manejado por la guía de validación (98-102%) [24], por lo que se evaluó la cantidad recuperada empleando un volumen mayor de la mezcla Ac: Aa (1:1) al inicio del tratamiento.

Tabla 19. Porcentajes de recobro en cápsulas empleando 2ml de mezcla Ac: Aa (1:1)

Analito	Tm *	Área *	% Recobro *
Bromhexina	1.37	35892	101.70%
Ampicilina	3.22	1644977	121.29%

* Los valores mostrados son un promedio de 5 muestras analizadas.

Se decidió, entonces, probar un volumen de 5ml de mezcla Ac: Aa (1:1) al inicio del tratamiento de la muestra, empleando el mismo tiempo y tipo de agitación para evaluar el recobro obtenido.

La figura 21 corresponde a un electroferograma comparativo, obtenido para estándares y placebo, en el cual se observa que al aumentar el volumen de disolventes en el tratamiento se mejora el recobro, ya que se ve aumentada la altura de cada pico.

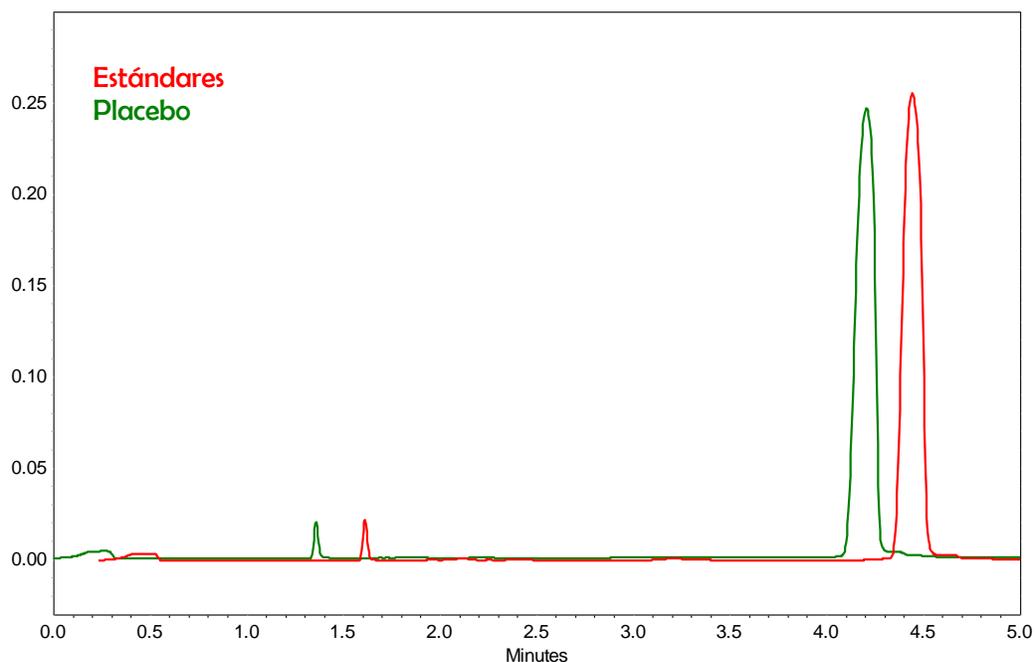


Figura 21. Electroferograma comparativo de una muestra de estándares y un placebo cargado tratados con 5ml de mezcla Ac: Aa (1:1)

De esta forma se asegura que se disolvería una mayor cantidad de los analitos al emplearse un volumen de 5ml de mezcla Ac: Aa (1:1) al inicio del tratamiento de una muestra real, en la tabla 20 se registraron los promedios de del % de recobro y de tiempos de migración de 5 muestras analizadas.

Tabla 20. Porcentajes de recobro en cápsulas empleando 5ml de mezcla Ac: Aa (1:1)

Analito	Tm	% Recobro*
Bromhexina	1.33	99.85%
Ampicilina	3.48	100.18%

La tabla anterior indica que los valores de recobro así obtenidos se encuentran dentro del rango de aceptación citado en la guía de validación [24].

Por lo tanto el tratamiento para las cápsulas es:

1. Preparar un placebo cargado al 100% según la formulación.
2. Pesar del placebo el equivalente a 1.6mg de bromhexina y 100mg de ampicilina.
3. Agregar 5ml de mezcla Ac: Aa (1:1) y dar agitación magnética por 2 min.
4. Adicionar 5ml de agua desionizada y continuar la agitación por 3 min. más.
5. Filtrar la solución y lavar con 3ml de agua desionizada.
6. Adicionar el filtrado a un matraz de 20ml y aforar con agua desionizada, la solución resultante tendrá una concentración de 80ppm de Bromhexina y 5000ppm de ampicilina.
7. Preparar una solución de estándares con 1.6mg de bromhexina y 100mg de ampicilina siguiendo los pasos 3 a 6.
8. Analizar la muestra estándar y la muestra del placebo bajo las condiciones establecidas para el método y obtener del electroferograma los tiempos de migración y área de cada analito.
9. Cuantificar la cantidad recuperada de cada analito.

5.12 Evaluación de parámetros estadísticos.

Se evaluaron algunos parámetros propios de la validación, mismos que sirvieron de sustento para afirmar que el método en cápsulas es confiable.

5.12.1 Adecuabilidad del sistema

La adecuabilidad permite verificar que el sistema de medición funciona apropiadamente, independientemente de las condiciones ambientales (Presión, temperatura y atmósfera) [24]

Para evaluar este parámetro del sistema, se inyectó por sextuplicado una muestra de estándares con una concentración de 80 y 5000ppm de Bromhexina y Ampicilina respectivamente, lo cual equivale al 100% en la muestra.

La tabla 22 muestra los valores obtenidos, así como el correspondiente coeficiente de variación (C.V).

Como se muestra en la tabla 21, los valores entran dentro del rango de aceptación establecido por la guía de validación del colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos [24] en la que se indica que el C.V debe ser menor o igual al 2%.

Tabla 21. Resultados de adecuabilidad del sistema

PARÁMETRO	BROMHEXINA		AMPICILINA	
	Tm	Área	Tm	Área
Inyección 1	1.642	33426	7.729	477643
Inyección 2	1.658	34873	7.717	470300
Inyección 3	1.65	35080	7.829	476429
Inyección 4	1.663	34541	7.97	483848
Inyección 5	1.658	34470	7.792	485458
Inyección 6	1.654	34541	8.025	464104
Promedio	1.6542	34457.83	7.84367	476297
Desviación Std.	0.007	572.952	0.127	8092.02
C.V (%)	0.45	1.66	1.62	1.70

Con este parámetro aceptado, se considera que el sistema electroforético funciona adecuadamente.

5.12.2 Precisión del sistema

La precisión del sistema indica el grado de dispersión entre una serie de mediciones bajo condiciones establecidas. [24]

Para evaluar este parámetro, se preparó por sextuplicado una muestra de estándares con una concentración de 80 y 5000ppm de Bromhexina y Ampicilina respectivamente, lo cual equivale al 100% en la muestra.

En la tabla 22 se muestran los valores obtenidos en cada sistema.

Tabla 22. Resultados para precisión del sistema.

PARÁMETRO	BROMHEXINA		AMPICILINA	
	Tm	Área	Tm	Área
Sistema 1	1.64	35051	7.72	580687
Sistema 2	1.64	34952	7.73	594657
Sistema 3	1.65	35100	7.98	582580
Sistema 4	1.67	34920	7.93	590651
Sistema 5	1.65	34486	7.82	600493
Sistema 6	1.63	35307	7.8	578804
Promedio	1.6466	34969.33	7.83	589437
Desviación Std.	0.014	273.535	0.105	8818.113
C.V (%)	0.83	0.78	1.35	1.50

De acuerdo con los criterios de aceptación se observa que el coeficiente de variación de los tiempos de migración y las áreas se encuentran por debajo del 1.5 %, por lo que se considera que el método es preciso.

5.12.3 Linealidad del sistema

Entendiendo a la linealidad como una habilidad del método analítico de obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra [24], se evalúa a este parámetro como un indicativo de la confiabilidad que ofrece el método.

Para evaluarla se preparo una serie de 8 sistemas con 8 niveles de concentración, por dilución a partir de soluciones stock de bromhexina de 400ppm y 1000ppm para la ampicilina, la tabla 23 muestra la preparación de los sistemas, los cuales fueron leídos por triplicado bajo las condiciones electroforéticas establecidas.

Tabla 23. Preparación de la curva de calibración

Sist.	Stock BROM (ml)	Stock AMP (ml)	Aforo (ml)	Conc. BROM (ppm) *	Conc. AMP (ppm) *
1	1	1	20	20	50
2	2	2	20	40	100
3	3	3	20	60	150
4	4	4	20	80	200
5	5	5	20	100	250
6	6	6	20	120	300
7	7	7	20	140	350
8	8	8	20	160	400

* Concentraciones teóricas

Una vez evaluados las áreas de los analitos en cada concentración, se graficaron a fin de obtener el coeficiente de correlación (r^2), el cual, según la guía de validación debe ser mayor al 0.98. [24]

Las figuras 22 y 23 muestran que en ambos analitos se obtienen valores de r^2 dentro del parámetro de referencia, comprobando así la linealidad del sistema y por tanto las cuantificaciones que han de realizarse a partir de estas serán confiables.

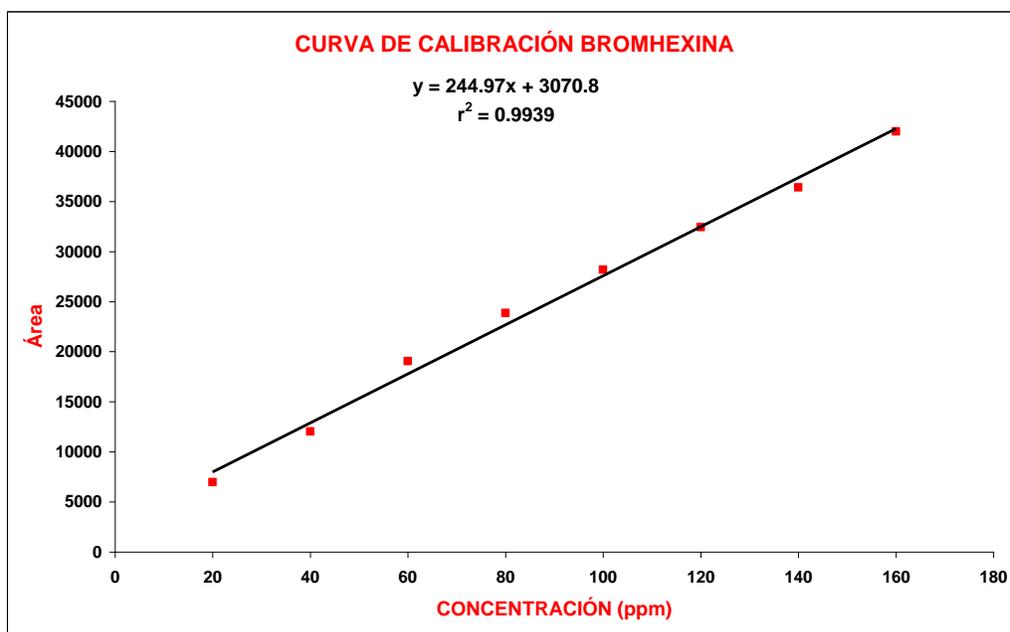


Figura 22. Curva de calibración de Bromhexina.

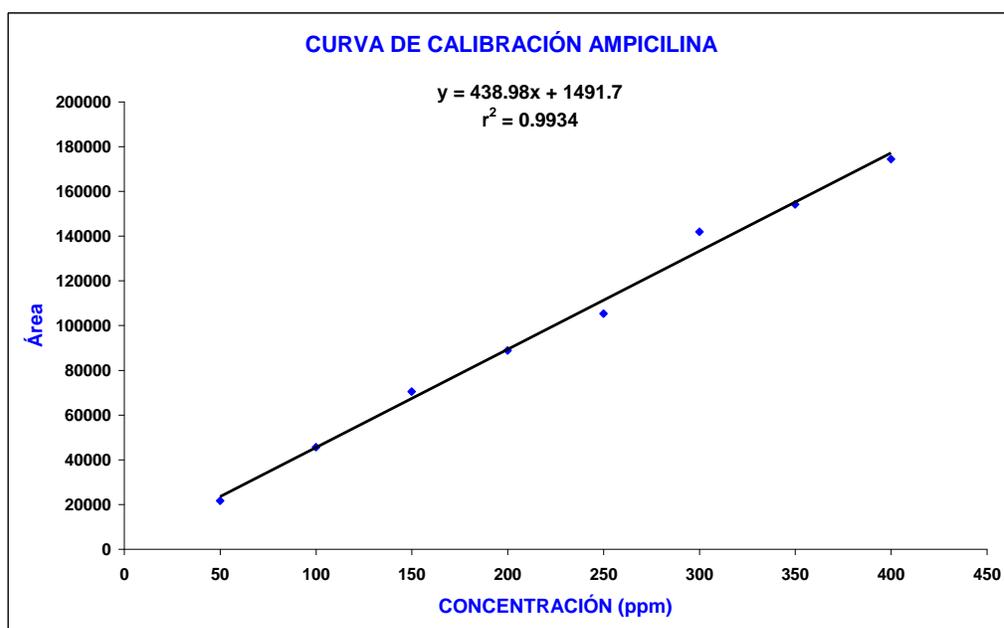


Figura 23. Curva de calibración de ampicilina

6. CONCLUSIONES

- Se desarrolló una metodología analítica innovadora que permite la determinación y cuantificación simultánea de bromhexina y ampicilina en cápsulas empleando como técnica de análisis la electroforesis capilar.
- Los estudios de solubilidad en conjunto con el desarrollo del método analítico permitieron determinar el medio de disolución en el cual ambos analitos pudieran ser solubilizados sin que la ampicilina presentará degradación a fin de asegurar la determinación simultánea de los analitos.
- Se establecieron las condiciones electroforéticas óptimas para la separación y cuantificación de bromhexina y ampicilina: búfer de fosfatos 50mM pH 3.0, capilar de sílice fundida de 30cm de longitud total y diámetro interno de 50 μ m, inyección hidrodinámica 0.5psi por 5 segundos, voltaje aplicado de 30Kv y longitud de onda de detección a 214nm, con un tiempo de lavado entre corridas de 3 minutos con búfer de corrida. El tiempo total de corrida es de 7 minutos.
- Se consiguieron recobros dentro de los parámetros establecidos por la guía de validación para ambos analitos en placebos cargados preparados según la formulación de las cápsulas.
- El método demostró ser adecuado, preciso y lineal, por lo que las determinaciones que se realicen a partir del mismo serán confiables.
- El método desarrollado sirve como antecedente a trabajos aplicativos posteriores para su validación y para el desarrollo de métodos específicos para la suspensión oral y la solución inyectable de esta misma asociación.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]** Medina Morales Sandra Rocío "Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de albendazol, en una presentación farmacéutica" Tesis Q.F.B. Facultad de Química UNAM México 2006
- [2]** Sergio M. Santos, Marília Henriques, et al. (2007) "Development and application of a capillary electrophoresis based method for the simultaneous screening of six antibiotics in spiked milk samples." Talanta Talanta 71 : 731-737.
- [3]** H.Fabre and K.D.Altria (2001) "Validating CE Method for Pharmaceutical Analysis" BECKMAN COULTER Europa.
- [4]** <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/b031.htm> (Sep 06)
- [5]** http://www.bms.com.mx/farmaceutica/pentrexyl_expec.html (Sep 06)
- [6]** 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
- [7]** A.C. Moffat, (2006) "Clarke's Isolation and identification of drugs". 2a ed. Edit. Staff. London.
- [8]** Chapman & Hall. (1997) "Dictionary of pharmacological agents" Vol. 1 London.
- [9]** "The Merck Index", (2001) 13a ed., Ed. Merck &CO, USA.

[10] E. Benito Peña, A.I Partal Rondera , et.al. (2006) Evaluation of mixed mode solid phase extraction cartridges for the preconcentration of beta-lactam antibiotics in wastewater using liquid chromatography UV-DAD detection. Analytica Chimica Acta 556: 415-422

[11] <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/a052.htm> (Sep 07)

[12] Krutzfeldt Willcock William. (2004) "Vademécum Farmacéutico" IPE Tomo I y II. 13ª Ed. Rezza Editores México.

[13] "Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos". (2004) Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 8va. Ed.; Secretaria de salud, México.

[14] "The United States Pharmacopeia", USP 30. Rockville Maryland: United States Pharmacopeial Convection. 2007.

[15] "British Pharmacopeia" (2002) Vol. 1 y 2 Londres.

[16] George Lunn (2004) "HPLC Methods for pharmaceutical análisis" Vol. 2 Ed. Wiley interscience USA

[17] Francis Rouessac, Annick Rouessac (2003) "Métodos y técnicas instrumentales modernas" Mc Graw Hill España

[18] Miriam A. Castillo Rodríguez, et.al. (2005) Fundamentos de Electroforesis Capilar. UNAM México.

[19] Skoog, A., Douglas, (2000). "Química Analítica". 7ª edición. Mc Graw – Hill. México.

[20] <http://www.uv.es/baeza/index.html>. (Marzo 2008)

[21] Cruz Oliva Denise, et.al (2007) "Desarrollo y validación de una metodología analítica por electroforesis capilar para la determinación simultánea de bromhexina y amoxicilina en formulaciones farmacéuticas" Tesis Q.F.B. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM. México

[22] T. Pérez- Ruíz, Martínez-Lozano., A. Sanz, E. Bravo (1996) Determination of bromhexine and ambroxol in pharmaceutical dosage forms, urine and blood serum. *Journal of chromatography*. 692: 199-205.

[23] <http://www.textoscientificos.com/quimica/cromatografia/parametros>. (Marzo 2008)

[24] Guía de validación de métodos analíticos. Colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos. Edición 2002.

