



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

“OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE AMOXICILINA Y BROMHEXINA EN FORMULACIONES FARMACEUTICAS POR ELECTROFORESIS CAPILAR”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**QUÍMICA FARMACEÚTICA
BIÓLOGA**

P R E S E N T A :

LUCIA RODRÍGUEZ CRUZ

ASESORA:

DRA. ALMA LUISA REVILLA VÁZQUEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



AGRADECIMIENTOS

- *A la Universidad Nacional Autónoma de México por la calidad en la formación académica que he recibido, por recibirme desde adolescentes hasta el día de hoy que me permite salir como profesionista de alto nivel.*
- *A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por ser mi segunda casa, por enseñarme los valores éticos, morales, profesionales, y la educación recibida que permitirá mi desempeño como profesionista contribuyendo a formar un país con un futuro más próspero y justo para las futuras generaciones.*
- *A la Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez por todo su apoyo, consejos y conocimientos brindados durante el desarrollo de este proyecto. Gracias por mostrarse siempre dispuesta a apoyarme y a enseñarme siempre. Gracias por su dedicación e interés en la realización de este proyecto y en la redacción de esta tesis y toda su paciencia para con migo.*
- *A Dios por que me ha permitido terminar esta faceta de mi vida y por que me ha acompañado siempre en el camino.*
- *A mis padres Julia y Joaquín por las enseñanzas, el apoyo incondicional, el cariño y la confianza que me han brindado siempre. Todos mis logros se los debo a ustedes, Gracias por todos sus consejos.*
- *A mis hermanos por permitirme compartir con ellos todos estos años en los malos y buenos momentos que pasamos siempre juntos y por todo el apoyo que he recibido de su parte. Se que sin ellos no habría logrado alcanzar esta meta. Gracias.*
- *A mis sobrinos por ser la luz y la alegría de la familia. Gracias por todo su cariño.*
- *A mis abuelitas por el cariño que me dieron en el tiempo que pasamos juntas, siempre recordare los buenos momentos que hemos compartido.*
- *A mis amigas Anabel, Carmen y Tamara, que han estado a mi lado durante la carrera, brindándome su apoyo, cariño y alegría. Gracias por haberse esforzado con migo durante todo este tiempo. Las quiero mucho.*
- *A mis compañeros de la carrera.*
- *A mis compañeros de Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos; Rogelio, Alma, Lety, Lluvia, Fabiola.*

- *A la familia Vargas Márquez en especial a Rogelio, por todo su amor, apoyo y alentarme para terminar este proyecto.*
- *A los sinodales por su atención y tiempo dedicado para el mejoramiento de este trabajo.*



AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

- *Quiero agradecer las facilidades y recursos de los Laboratorios Grimman*
- *A la UNAM DGAPA por el apoyo al proyecto PAPIIT208608 y al CONACYT por los recursos del proyecto 52723 (2007).*
- *Al Ing. Draucin Jiménez por el apoyo brindado.*

ÍNDICE.

RESUMEN	1
I. GENERALIDADES.	2
1. ELECTROFORESIS CAPILAR.	2
1.1 Proceso electroforético.	2
1.2. Fundamentos de la técnica de EC.	4
1.3 Principios de la separación electroforética.	5
1.3.1 Movilidad electroforética.	5
1.4. Factores que afectan la velocidad de migración del analito.	5
1.4.1 La muestra.	5
1.4.2 Electrolito soporte (Buffer o sistema amortiguador)	6
1.4.3 El campo eléctrico.	7
1.5 Técnicas de inyección	8
1.6 Factores que afectan la reproducibilidad del tiempo de migración.	9
1.7 Factores que afectan la eficiencia.	10
1.8 Principales ventajas de la electroforesis capilar.	12
1.9 Aplicaciones.	13
2. VALIDACION.	14
2.1 Validación según las guías del Comité Internacional de Harmonización (ICH).	15
2.2 Definición de los parámetros de validación.	16
2.3 Exactitud.	17
2.4 Precisión.	17
2.5 Especificidad / Selectividad.	18
2.6 Límite de detección (LD).	19
2.7 Límite de cuantificación (LC).	20
2.8 Linealidad.	21
2.9 Rango.	23
2.10 Robustez.	24

2.11 Metodología para electroforesis capilar (EC).	24
3. AMOXICILINA.	25
3.1 Características terapéuticas.	26
3.2 Propiedades fisicoquímicas.	27
3.3 Análisis químico.	27
3.4 Toxicología.	27
3.5 Farmacocinética.	27
3.6 Usos terapéuticos.	27
3.7 Formas farmacéuticas existentes	28
4. CLORHIDRATO DE BROMHEXINA.	28
4.1 Características terapéuticas.	28
4.2 Farmacocinética.	28
4.3 Indicaciones.	28
4.4 Propiedades fisicoquímicas.	29
4.5 Formas farmacéuticas existentes.	30
5. JUSTIFICACIÓN.	31
II. OBJETIVOS.	32
III. METODOLOGÍA.	33
1. Equipos y reactivos.	33
1. Metodología general	34
2. Optimización del método analítico	35
3. Validación del método analítico	36
3.1 Adecuabilidad del sistema.	37
3.2 Especificidad.	37
3.3 Precisión del sistema.	37
3.4 Linealidad del sistema.	38
3.5 Linealidad del método.	38
3.6 Exactitud y repetibilidad del método.	39
3.7 Precisión intermedia del método.	39

IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.	40
1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO	40
1.1 Medio de disolución	41
1.2 Tiempo de disolución	42
1.3 Selección del Buffer	42
1.4 Selección de longitud de onda	44
1.5 Temperatura del capilar	45
1.6 Condiciones de almacenamiento del capilar	46
1.7 Condiciones óptimas para validar el método	47
2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	49
2.1. Adecuabilidad del sistema.	51
2.2. Especificidad.	52
2.3. Precisión del sistema.	53
2.4. Linealidad del sistema.	54
2.5. Exactitud y Repetibilidad del método.	60
2.6. Linealidad del método.	63
2.7. Precisión del método (precisión intermedia)	70
V. CONCLUSIONES.	73
VI. BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS	74
ANEXO 1	78
ANEXO 2	80

ÍNDICE DE FIGURAS.

1. Ilustración del proceso electroforético convencional	3
2. Componentes del equipo de EC	4
3. Ilustración de una inyección hidrodinámica	9
4. Ilustración de una inyección electrocinética	9
5. Efecto de la naturaleza del buffer en la separación de los analitos	43
6. Comparación de la señal para amoxicilina y bromhexina 210 y 214 nm	44
7. Efecto de la temperatura del capilar: 25°C(—) y 20°C(----).	45
8. Comparación de resultados para un placebo, una mezcla estándar de amoxicilina bromhexina en un placebo cargado	53
9. Electroferograma que muestra los parámetros empleados para el cálculo de N y R	81

ÍNDICE DE TABLAS.

1. Factores que afectan la reproducibilidad del tiempo de migración	10
2. Factores que afectan la eficiencia de los picos en EC	11
3. Áreas de aplicación de la técnica de EC	14
4. Características de validación del ICH de acuerdo al tipo de procedimiento analítico	16
5. Propiedades fisicoquímicas de amoxicilina	26
6. Propiedades fisicoquímicas de bromhexina	29
7. Formas farmacéuticas existentes en el mercado para bromhexina	30
8. Preparación de la curva de calibración	38
9. Comparación de los CV de % de recuperación para amoxicilina y bromhexina con 10 y 20 min. de agitación	42
10. Comparación de los CV de los tiempos de migración con diferentes buffer	44
11. Comparación de las áreas de amoxicilina y bromhexina a 210 y 214 nm	45
12. Influencia de la temperatura del capilar en los CV de los tiempos de migración para la mezcla amoxicilina bromhexina	46

13. Parámetros de operación para el desarrollo del método analítico	48
14. Parámetros de desempeño a evaluar en función de la aplicación del método	50
15. Resultados del sistema de adecuabilidad de amoxicilina y bromhexina	51
16. Promedios de la resolución (R) y del número de platos teóricos (N), de amoxicilina y bromhexina para la prueba de adecuabilidad	52
17. Resultados de los tiempos de migración y áreas obtenidos	54
18. Resultados de las áreas en función de la concentración para amoxicilina	55
19. Análisis de varianza realizado para determinar la linealidad del sistema de amoxicilina considerando un nivel de significancia de $\alpha=0.05$	57
20. Resultados de las áreas en función de la concentración para bromhexina en un rango del 60 al 140 %	57
21.- Análisis de varianza realizado para determinar la linealidad del sistema de amoxicilina considerando un nivel de significancia de $\alpha=0.05$	58
22. Parámetros obtenidos del análisis de regresión de la linealidad del sistema de amoxicilina y bromhexina	59
23. Resultados del % de recobro de bromhexina a partir de placebos cargados	61
24. Resultados del % de recobro de amoxicilina a partir de placebos cargados	62
25. Resultados del % recuperado de amoxicilina a partir de placebos cargados(cápsulas)	63
26. Resultados del % recuperado de amoxicilina a partir de placebos cargados (suspensión)	64
27. Análisis de varianza para amoxicilina (cápsulas) considerando un $\alpha = 0.05$	66
28. Análisis de varianza para amoxicilina (suspensión) considerando un $\alpha = 0.05$	66
29. Resultados del % recuperado de bromhexina a partir de placebos cargados (cápsulas)	67
30. Resultados del % recuperado de bromhexina a partir de placebos cargados (suspensión)	67
31. Análisis de varianza para bromhexina considerando un $\alpha = 0.05$ (cápsulas)	69
32. Análisis de varianza para bromhexina considerando un $\alpha = 0.05$ (suspensión)	69
33. Parámetros estadísticos obtenidos de la regresión lineal para amoxicilina y bromhexina	69

34. Coeficientes de variación de los porcentajes de recobro de amoxicilina obtenidos en dos días y por dos analistas	71
35. Coeficientes de variación de los porcentajes de recobro de bromhexina obtenidos en dos días y por dos analistas	71
36. Resumen de los resultados de la validación del método para amoxicilina y bromhexina.	72
37. Comparación de la variación en los tiempos de migración para amoxicilina y bromhexina.	78
38. Comparación de los CV de los tiempos de migración para la mezcla de bromhexina y amoxicilina a 210 y 214nm.	78
39. Comparación de los CV de los tiempos de migración para la mezcla de amoxicilina bromhexina con diferente buffer	79
40. Comparación de la influencia de la temperatura en la variación de los tiempos de migración	79
41. Número de platos teóricos (N), ancho de pico y resolución (R), de amoxicilina y bromhexina, para la prueba de especificidad	80

ÍNDICE DE CUADROS.

1. Ecuaciones para el cálculo de la resolución y el número de platos teóricos.	80
--	----

ÍNDICE DE GRAFICAS.

1. Relación del área en función de la concentración para amoxicilina, en un intervalo de 60-140%	56
2. Relación del área en función de la concentración para Bromhexina, en un intervalo de 60-140%	58
3. Gráfica de la cantidad adicionada vs la cantidad recuperada de amoxicilina a partir de la preparación de placebos cargados (cápsulas), en un rango de 60 – 140 %	65
4. Gráfica de la cantidad adicionada vs la cantidad recuperada de amoxicilina a partir de la preparación de placebos cargados (suspensión), en un rango de 60 – 140 %	65
5. Gráfica de la cantidad adicionada vs la cantidad recuperada de bromhexina a partir de la preparación de placebos cargados (cápsulas), en un rango de 60 – 140 %	68
6. Gráfica de la cantidad adicionada vs la cantidad recuperada de bromhexina a partir de la preparación de placebos cargados (suspensión), en un rango de 60 – 140 %	68

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	SIGNIFICADO
amoxicilina	amoxicilina trihidrato
bromhexina	Clorhidrato de bromhexina
EC	Electroforesis capilar
T _m	Tiempo de migración
Nm	Nanómetros
G	Gramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
μg	Microgramos
kV	Kilovoltios
SD	Desviación estándar
CV	Coefficiente de variación
μA	Microamperes
λ	Longitud de onda
UV	Ultravioleta
min.	Minutos
conc	Concentración
N	Platos teóricos
R	Resolución
Cant ad	Cantidad adicionada
Cant rec	Cantidad recuperada
IC(β ₀)	Intervalo de confianza para la ordenada al origen
IC(β ₁)	Intervalo de confianza para la pendiente
IC(μ)	Intervalo de confianza para la media poblacional
T _{ini}	Tiempo inicial
T _{fin}	Tiempo final

RESUMEN

La frecuencia de enfermedades respiratorias causadas por bacterias ha incrementado el uso de medicamentos que contengan algún tipo de antibiótico y broncodiladores que contrarresten los efectos causados por la enfermedad tal es el caso de las formulaciones que se analizaron.

En este trabajo se muestra la optimización y validación de un método analítico por electroforesis capilar para cuantificar de manera rápida y simultánea un antibiótico beta lactámico (amoxicilina) y un broncodilatador de amplio uso (bromhexina) en una suspensión oral y cápsulas, para que este método pueda ser utilizado con toda confianza asegurando los límites establecidos de estos principios activos dentro de la formulación de medicamentos en los departamentos de control de calidad de una manera económica, eficiente, confiable y rápida.

El trabajo es de particular importancia, ya que actualmente no existe un método farmacopéico o algún artículo científico en el que se reporte la separación y cuantificación de esta mezcla solo existe uno para la amoxicilina y es por HPLC. Existía un método analítico desarrollado en el Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1¹¹, con la intención inicial de validarlo.

Sin embargo se determinó que el método no cumplía con todos los criterios de validación establecidos, lo cual, no asegura la confiabilidad del mismo para el análisis de formulaciones farmacéuticas que contengan los activos de estudio y se procedió a optimizar el método cambiando disolventes, modo de almacenamiento del capilar y buffer de corrida básicamente y una vez optimizado se procedió a validar dicho método.

I. GENERALIDADES

1. ELECTROFORESIS CAPILAR.

La electroforesis capilar (EC) se ha convertido en una de las técnicas analíticas más avanzadas de separación para el análisis farmacéutico. Esta constituye una técnica alternativa o complementaria a la cromatografía de líquidos en muchas áreas, incluyendo ensayos de muchos componentes, determinación de impurezas, confirmaciones de identidad y determinaciones estequiométricas. Otras áreas de interés en la industria farmacéutica son la determinación de residuos en la validación de la limpieza y en pruebas de disolución de tabletas ³¹.

La instrumentación es realmente simple, independientemente de que se requieren altos voltajes, sin embargo los parámetros involucrados en la optimización de la técnica para producir la separación son más complejos que los que se involucran en HPLC. La técnica es preferida al HPLC, en análisis donde se requiere una separación de alta selectividad ¹⁷. La alta eficiencia en la separación determina en EC que un pequeño grado de selectividad pueda a menudo proveer una resolución aceptable ²⁶.

A continuación se describe de manera general, el proceso electroforético y posteriormente se profundizara en la técnica de electroforesis capilar y sus ventajas.

1.1. Proceso electroforético

Es el fenómeno que se lleva a cabo cuando en un sistema dado, las especies cargadas (iones) se mueven y separan bajo la influencia de un campo eléctrico en función de su velocidad de migración. Las partes básicas del sistema son un par de electrodos, una fuente de poder y un medio conductor, (figura 1) ¹⁹.

El mecanismo de separación de la electroforesis capilar es el mismo que el de la electroforesis convencional. La migración diferencial dentro de zonas discretas es debido a diferencias en las movilidades electroforéticas, las cuales están a su vez vinculadas a la relación masa /carga y a la conformación de los analito ¹⁹.

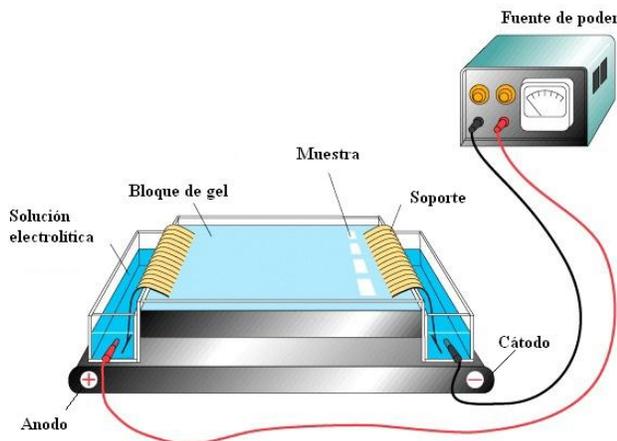


Figura 1. Ilustración de un equipo de electroforesis convencional ³¹

La electroforesis capilar es una técnica moderna poderosa para la separación de componentes en matrices complejas. Usando electroforesis capilar, las sustancias pueden separarse en una gran variedad de electrolitos soporte, incluyendo buffers acuosos, parcialmente acuosos, y completamente no acuosos, cuando se trabaja con sustancias insolubles ¹.

Esta técnica consiste en introducir en un capilar una muestra de especies (cargadas o neutras), que se separan en función de su carga y su movilidad iónica en el medio en el que se encuentran bajo la influencia de un campo eléctrico. Un sistema de EC se compone básicamente de los siguientes elementos (figura 2) ¹⁹:

- I. Electrodo (ánodo y cátodo)
- II. Deposito (viales) en donde se colocan los electrodos respectivamente.
- III. Capilar
- IV. Sistema de enfriamiento del capilar
- V. Sistema de inyección y
- VI. Detector

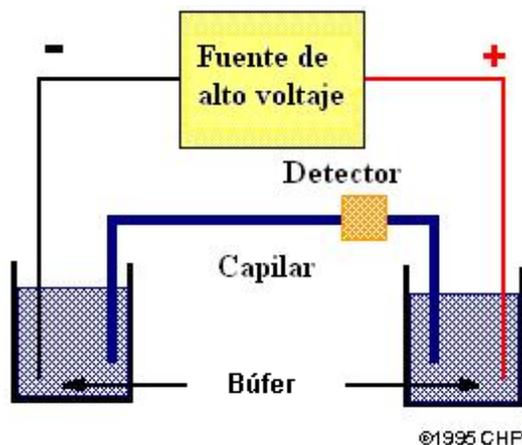


Figura 2. Componentes básicos de un equipo de EC⁴⁰

1.2. Fundamentos de la técnica de EC

Muchas moléculas importantes poseen grupos ionizables y pueden tenerse en solución en forma de especies con carga eléctrica, ya sea como cationes (+) o como aniones (-). Además, las moléculas que poseen cargas similares suelen tener distintas relaciones carga/masa. En conjunto, estas diferencias constituyen base suficiente para una migración diferencial, cuando los iones en disolución se someten a un campo eléctrico¹⁹.

Los cationes se trasladan hacia el cátodo (-) y los aniones hacia el ánodo (+) a velocidades que dependen del equilibrio entre la fuerza impulsora del campo eléctrico sobre los iones cargados de la muestra y las fuerzas de retardo entre las moléculas que migran y el medio circundante, que son principalmente fuerzas de fricción electrostáticas. La corriente se mantiene por todo el circuito ya que los electrodos, están sumergidos en viales que contienen buffer. Durante la separación en los electrodos se producen iones hidroxilo e hidrógeno en el cátodo, mientras que en el ánodo se forman iones oxígeno e hidrógeno. Las separaciones electroforéticas se originan por las diferentes movilidades de los analitos. La movilidad electroforética se ve afectada por la carga, la forma y tamaño del analito así como de la viscosidad del medio¹⁹.

1.3. Principios de la separación electroforética.

1.3.1. Movilidad electroforética.

La separación de los analitos por electroforesis convencional está determinada por las diferencias en sus velocidades dentro de un campo eléctrico ¹⁷. La velocidad está dada por la fórmula:

$$v = \mu_e E$$

Donde v es la velocidad del ión, μ_e es la movilidad electroforética y E es el campo eléctrico aplicado. El campo eléctrico esta dado en volts /cm y depende del largo del capilar usado y la fuerza del potencial aplicado a través de este. La movilidad electroforética depende de la especie iónica, tamaño, carga, temperatura, naturaleza y concentración del analito ¹⁷.

1.4. Factores que afectan la velocidad de migración del analito.

1.4.1. La muestra

La naturaleza de los compuestos con carga eléctrica afecta su velocidad de migración de varias formas, como se describe a continuación ¹⁹:

- I. Carga.- La velocidad de migración aumenta cuando hay un incremento de la carga del analito, generalmente, la magnitud de la carga depende del pH.
- II. Tamaño.- La velocidad de migración es menor en las moléculas grandes, debido al incremento de las fuerzas de fricción y electrostáticas ejercidas por el medio circundante.
- III. Forma.- Las moléculas de tamaño similar, pero con diferentes formas, tales como las proteínas fibrosas y las globulares, exhiben distintas características de migración o causa de los diferentes efectos de las fuerzas de fricción y electrostáticas ¹⁹.

1.4.2. Electrolito soporte (Buffer o sistema amortiguador)

El buffer determina y estabiliza el pH del medio de soporte, por lo que afecta la velocidad de migración de los compuestos en diversas formas ¹⁹.

Concentración: A medida que la fuerza iónica del buffer aumenta, la proporción de corriente conducida por éste crece y la participación de la muestra en dicha conducción de corriente disminuye, con lo que se reduce la velocidad de migración. Una elevada fuerza iónica del buffer incrementa la intensidad global de corriente y, consecuentemente, la producción de calor ¹⁹.

Con bajas fuerzas iónicas, la proporción de corriente conducida por el buffer se reducirá y la participación en la conducción de corriente por parte de la muestra crecerá, aumentando su velocidad de migración. Una fuerza iónica pequeña reduce la corriente global y se traduce en una menor producción de calor, pero la difusión y la pérdida de resolución resultante son menores. Por ello la selección de la fuerza iónica tiene que ser un compromiso, y generalmente se elige dentro de una gama de fuerzas iónicas comprendidas entre 0.05 – 0.1 moles / litro ¹⁹.

pH: Tiene poca influencia sobre los compuestos completamente ionizados tales como las sales inorgánicas, pero en los compuestos orgánicos el pH determina la magnitud de la ionización de los ácidos orgánicos, es decir aumenta con el pH, mientras que lo inverso ocurre con las bases orgánicas; por lo tanto, su velocidad de migración depende del pH ¹⁹.

La dirección, y también la magnitud de la migración de los anfolitos son por lo tanto, dependientes del pH, y se pueden emplear buffers que van desde un pH de 1 hasta un pH de 11 para producir las separaciones requeridas ¹⁹.

Selección del buffer: se requiere el uso de un buffer que pueda mantener un pH constante que mantiene la carga de los compuestos. Los sistemas efectivos de buffer tienen

un rango de dos unidades de pH aproximadamente centradas alrededor del valor de pKa¹⁹.

Un buffer para ser utilizado en EC debe poseer las siguientes características:

- I. Buena capacidad de amortiguación en el rango seleccionado.
- II. Baja movilidad, para minimizar la generación de corriente.
- III. Baja absorbancia a la longitud de onda de detección¹⁹.

1.4.3. El campo eléctrico.

La ley de Ohm establece la relación entre la intensidad de la corriente I (en amperios), el voltaje E (en voltios) y la resistencia R (en ohmios), de acuerdo a la ecuación¹⁹:

$$I = \frac{E}{R}$$

La separación de iones en un campo eléctrico esta, por lo tanto, influida por estos tres factores¹⁹.

Intensidad de corriente: Entre los electrodos la corriente en la disolución es conducida completamente por los iones del buffer y de la muestra; por lo que la velocidad de migración es proporcional a la intensidad de corriente. La distancia recorrida por los iones será proporcional al periodo de tiempo durante el cual se ha suministrado la corriente. Por tanto, para asegurar una buena reproducibilidad, la corriente debe mantenerse constante durante la electroforesis, es decir, debe utilizarse corriente continua¹⁹.

Voltaje: El voltaje regula la corriente y, por tanto, la velocidad de migración es proporcional a la diferencia de potencial existente en el medio de soporte. El gradiente de voltaje generalmente es expresado como $V\text{cm}^{-1}$ (voltaje aplicado dividido por la longitud del medio de soporte). Los voltajes altos se utilizan, principalmente para la separación de compuestos de bajo peso molecular.

Resistencia: La velocidad de migración es inversamente proporcional a la resistencia, la cual depende del tipo y tamaño del medio de soporte y de la fuerza iónica del

buffer. La resistencia aumenta con la longitud del medio de soporte y disminuye con la anchura de este y con el aumento de la fuerza iónica del buffer. Durante la electroforesis se produce calor en una cantidad igual a I^2R voltios, y la resistencia disminuye cuando la temperatura aumenta ¹⁹.

1.5. Técnicas de inyección

En general la cantidad de muestra inyectada debe ser menor del 1-2 % del total de la longitud del capilar. Esto corresponde a una longitud de inyección de pocos milímetros (1 – 50 nL) dependiendo de la longitud y del diámetro interno del capilar. Esto es una ventaja cuando el volumen de muestra es pequeño pues se pueden realizar numerosas inyecciones con una sola muestra, por otro lado, volúmenes pequeños aumentan las dificultades de sensibilidad para muestras diluidas. La sobrecarga de muestra puede tener dos efectos significativos, y los dos perjudican la resolución ¹⁹:

- I. Si la magnitud de la inyección es más grande que el ensanchamiento de pico, entonces este será proporcional al ancho de pico.
- II. Esto puede alterar la homogeneidad del campo y distorsionar la forma del pico provocando que la mala conductividad entre el electrolito soporte y la de la muestra.

La inyección cuantitativa de la muestra se puede lograr por diversos métodos: los dos más usados son el hidrodinámico y el electrocinético ¹⁹.

Inyección hidrodinámica: también llamada inyección neumática, se realiza mediante diferencia de presión, por bombeo o bien por vacío, es decir, forzando la introducción de la muestra al capilar (figura 3). Este es un sistema confiable y no selectivo. Con un control preciso de la presión y el tiempo de inyección se pueden obtener inyecciones altamente reproducibles ¹⁹.

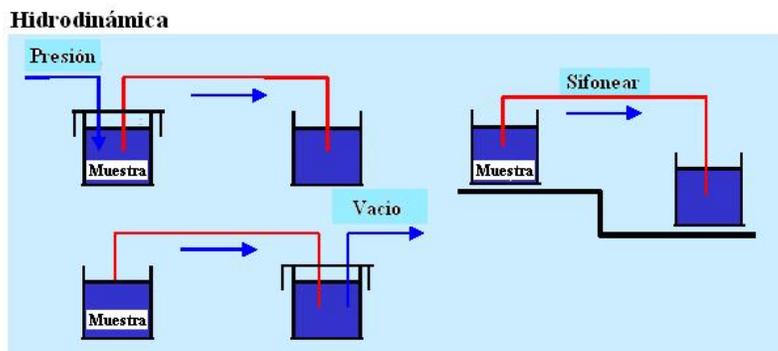


Figura 3. Ilustración de una inyección hidrodinámica ⁴¹.

Inyección electrocinética: se realiza mediante la electromigración de los iones presentes en la muestra al aplicarse un campo eléctrico que es un factor que afecta esta modalidad de inyección. La muestra es introducida aplicando un pequeño voltaje, normalmente de 5 kV por un tiempo determinado. El voltaje provoca que los iones de la muestra migren selectivamente al interior del capilar (figura 4). Generalmente este tipo de inyección no es tan reproducible como la hidrodinámica ¹⁹.

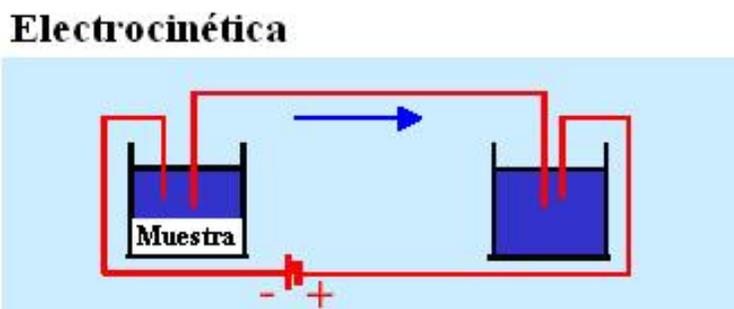


Figura 4. Ilustración de una inyección electrocinética ⁴¹.

1.6. Factores que afectan la reproducibilidad del tiempo de migración.

El cálculo de la movilidad y el uso de un estándar interno pueden mejorar la reproducibilidad del tiempo de migración. Las variaciones de la temperatura, la interacción del buffer con la superficie, pero generalmente no afectan la selectividad ³⁰.

Debido a que la movilidad es dependiente de la viscosidad del buffer, asumiendo que la concentración del buffer es constante y el pH es estable. Desde un punto de vista

instrumental, el campo eléctrico y la temperatura del capilar son los dos parámetros importantes para obtener tiempos de migración reproducibles³⁰.

Tabla 1. Factores que afectan la reproducibilidad del tiempo de migración³⁰.

Factor	Causa / Efecto	Solución
Cambio de temperatura	Cambios de viscosidad	Termostato del capilar
Adsorción en las paredes del capilar	Causado por buffer, aditivos o adsorción de la muestra.	Acondicionamiento del capilar y tiempo suficiente de equilibrio
Histéresis de la carga de la pared del capilar	Causada por acondicionamiento del capilar a alto o bajo pH y uso de buffers de corrida con pH extremo.	Evitar diferencias de pH Tiempo de equilibrado suficiente
Cambios en la composición del buffer	Cambios de pH debido a la electrolisis Evaporación del buffer Acarreamiento de NaOH de el vial de acondicionamiento al vial de buffer	Reemplazo del buffer Tapar los viales de buffer y enfriar el carrusel Usar reservorios separados para coleccionar soluciones de lavado Sumergir primero el capilar en buffer o en un vial con agua
Reservorios de buffer a desnivel	Flujo laminar no reproducible	Verificar el nivel de líquido en los viales
Variaciones en el voltaje aplicado	Cambios proporcionales en los tiempos de migración	Usar una buena fuente de poder

De la misma forma puede ser necesario el reemplazo frecuente del buffer con la finalidad de mantener reproducibles los tiempos de migración³⁰. En la tabla 1, se muestran los factores más comunes que causan variaciones en los tiempos de migración, así como las causas que los originan y como pueden solucionarse.

1.7. Factores que afectan la eficiencia.

La dispersión en EC puede tener muchas contribuciones adicionales al ensanchamiento de picos, siendo los más importantes el gradiente de temperatura inducido por el calor de

Joule, la longitud de la inyección y las interacciones del analito con la pared del capilar ¹⁹. En la tabla 2 se presenta un resumen de los factores que contribuyen al ensanchamiento de los picos:

Tabla 2. Factores que afectan la eficiencia de los picos en EC ¹⁹.

Origen	Comentarios
Difusión	<ul style="list-style-type: none"> • Define el límite fundamental de la eficiencia • Analitos con bajos coeficientes de difusión dan picos bien formados.
Calor de Joule	<ul style="list-style-type: none"> • Siguiendo gradiente de temperatura y flujo laminar
Longitud de la inyección	<ul style="list-style-type: none"> • Las dificultades del límite de detección hacen a menudo que sea necesario la inyección de mayor longitud.
Adsorción de la muestra	<ul style="list-style-type: none"> • La interacción pared – analito del capilar usualmente provoca coleo en el pico.
Electrodispersión (mala conductividad de la muestra y del buffer)	<ul style="list-style-type: none"> • Analitos con conductividad mayor al buffer originan picos con cabeceo. • Analitos con menor conductividad que el buffer resultan en picos con coleo.
Viales de buffer a desnivel	<ul style="list-style-type: none"> • Generan flujo laminar
Tamaño de celda	<ul style="list-style-type: none"> • Debe ser relativamente pequeña en relación al ancho del pico.

A continuación se presenta una breve descripción de los factores más importantes:

Difusión longitudinal: Esta es generalmente la causa más importante del ensanchamiento del pico en EC debido a la ausencia de la transferencia de masa. La difusión longitudinal depende de la longitud del tiempo que el analito pasa en el capilar y también del coeficiente de difusión del analito en la fase móvil. Analitos grandes como las proteínas y oligonucleótidos tienen bajos coeficientes de difusión y por tanto en un análisis por EC se tendrán separaciones eficientes de este tipo de analitos ¹⁷.

Longitud de la inyección: este término se refiere a la cantidad de muestra que se introduce en el capilar para realizar la separación electroforética. Durante la inyección es importante que la longitud de la muestra sea pequeña. Si la longitud es más grande que la dispersión provocada por la difusión, la eficiencia y la resolución se verán afectadas considerablemente¹⁹.

Calor de Joule: La fuerza del campo eléctrico que puede ser aplicada a través del capilar esta limitada por la conversión de la energía eléctrica en calor. El calor localizado, puede causar cambios en la viscosidad del buffer de corrida y un incremento localizado de la difusión del analito. La generación de calor puede ser minimizada por el uso de capilares angostos, donde la disipación del calor es rápida, y por la implementación de un control de la temperatura del capilar¹⁷.

Interacciones pared – analito: las interacciones entre el analito y la pared del capilar son perjudiciales para el análisis y de ello depende, el coqueo del pico o aun la adsorción total del analito. Las causas principales de adsorción en las paredes del capilar son las interacciones iónicas entre los analitos catiónicos y la pared cargada negativamente, así como las interacciones hidrófobas¹⁹.

Electrodispersión: las distorsiones en la forma de los picos son causadas por las diferencias en la conductividad. Cuando la zona del analito tiene mayor movilidad que la del buffer, se provoca la difusión acelerada del analito fuera de la zona del analito, dando como resultado una zona con cabeceo. Sin embargo, cuando la zona del analito tiene menor movilidad que la del buffer, el borde frontal será agudo y el borde final será difuso¹⁹.

1.8. Principales ventajas de la electroforesis capilar.

La implementación de la electroforesis en tubos capilares en los últimos años ha aumentado el interés de ésta técnica analítica. La EC tiene un número de ventajas como son^{1,17}:

- I. La disipación del calor en el tubo capilar es buena y, por tanto, los cambios de temperatura son muy pequeños y los resultados presentan mayor reproducibilidad.

- II. Dada la rápida disipación del calor, es posible utilizar voltajes muy altos (hasta 30 kV), lo cual disminuye los tiempos de análisis y aumenta la resolución entre los picos.
- III. El gasto en disolventes, aditivos y demás reactivos es mínimo, de ahí sus bajos costos y los casi nulos daños al medio ambiente.
- IV. La cantidad de muestra necesaria se reduce a unos cuantos microlitros.
- V. El valor de cada capilar es insignificante en comparación con el de una columna cromatográfica u otra columna en general.
- VI. Se pueden utilizar una gran variedad de detectores tanto en línea o fuera de línea o bien varios a la vez.
- VII. Se cuenta con equipos completamente automatizados que permiten analizar más de 100 muestras sin necesidad de atención en el equipo.
- VIII. Es posible acoplar los equipos de electroforesis capilar a otros equipos analíticos.
- IX. Rápido desarrollo y optimización del método.
- X. Rápido tiempo de análisis.
- XI. Reducción de la generación de desechos orgánicos tóxicos.

1.9. Aplicaciones

La versatilidad que presenta la técnica de electroforesis capilar hace que esta sea idónea para la separación de diversas sustancias químicas incluyendo iones, metabolitos de fármacos, péptidos, proteínas, oligonucleótidos y DNA. En los últimos años, el número de métodos por CE que son empleados exitosamente en laboratorios analíticos, biomédicos, farmacéuticos, ambientales, de alimentos, forenses y clínicos se ha incrementado notablemente ²⁸.

La identificación de enantiómeros y otros compuestos quirales ha tomado gran importancia en los últimos años y se han desarrollado varios métodos electroforéticos para este fin. La identificación y separación de compuestos quirales debe realizarse en las materias primas y en el producto terminado a fin de evitar la presencia de enantiómeros que puedan alterar la estabilidad del producto ¹⁹.

Una de las características más atractivas que presenta esta técnica es que permite la separación simultánea de una gran variedad de analitos, incluyendo analitos que forman complejos a través de interacciones moleculares ²⁸. Por lo que la electroforesis capilar

continúa creciendo rápidamente como una técnica analítica en un amplio rango de áreas de aplicación, como se muestra en la tabla 3 ¹⁹.

El área farmacéutica es uno de los campos de acción donde la electroforesis es muy empleada. Esta técnica se puede utilizar en cada uno de los pasos de producción de los medicamentos desde la recepción de la materia prima hasta el producto terminado ¹⁹.

Tabla 3. Áreas de aplicación de la técnica de EC ¹⁹.

Área	Aplicación
Industria farmacéutica	Control de la pureza de materias primas y medicamentos. Pruebas de disolución. Estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia.
Medicina	Determinación de principios activos (medicamentos) y sus metabolitos en fluidos biológicos.
Criminalística	Análisis de explosivos, drogas y sus metabolitos, metales pesados, etc; en muestras diversas.
Industria alimenticia	Análisis de colorantes alimenticios, vitaminas, identificación y cuantificación de iones metálicos, control de calidad de los productos alimenticios.
Investigaciones bioquímicas	Análisis de proteínas biológicamente activas, péptidos, aminoácidos y sus derivados.

2. VALIDACIÓN.

Un gran avance para la EC fue su reconocimiento por las autoridades regulatorias. Una monografía general en EC es ahora incluida en la USP, misma que ha sido publicada en las farmacopeas europea y japonesa ³¹. A partir de esto se ha incrementado su uso para análisis cuantitativos en pruebas de laboratorio, de alimentos y análisis ambientales. Con la madurez de la técnica, automatización instrumental y el incremento de la familiaridad del trabajador con su operación, un número cada vez más grande de reportes muestran que se puede alcanzar una precisión aceptable, y que se puede desarrollar y validar un método robusto ³⁰.

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación deseada, es decir, cumple con su propósito ³². El último objetivo de un método de validación es el producir los mejores resultados analíticos posibles. Para obtener estos resultados, todas las variables del método deben de ser consideradas, incluyendo el procedimiento de muestreo, los pasos para la preparación de la muestra, todas las condiciones electroforéticas, el tipo de detección, etc. El alcance de la validación va a depender del propósito del método ¹. Pruebas compendiales y procedimientos de ensayo, varían significativamente en el tipo de método analítico usado, y el tipo de información requerida para la validación de un método analítico dado va a depender de la naturaleza del método ¹⁸. Consecuentemente, las pruebas más comunes y los procedimientos de ensayo han sido divididos dependiendo del organismo, aunque existen pequeñas diferencias entre su clasificación.

2.1. Validación según las guías del Comité Internacional de Harmonización.

Las guías de ICH (Comité Internacional de Harmonización) Q2A (Texto en validación de procedimientos) y la Q2B (Validación de procedimientos analíticos: Metodología) fueron desarrolladas por el grupo experto de trabajo en la calidad de requerimientos para el registro de formas farmacéuticas de uso humano. Estos documentos presentan una discusión de las características a considerar durante la validación de un procedimiento analítico, incluido como parte de las aplicaciones para el registro, aceptado dentro de la Unión Europea, Japón y los Estados Unidos ¹⁸. La discusión de la validación de los procedimientos analíticos, los ha dividido en tres comunes categorías:

- I. Pruebas de identificación.
- II. Pruebas cuantitativas para contenido de impurezas y pruebas de límites para el control de las impurezas.
- III. Pruebas cuantitativas del activo en materiales de bulto de ingrediente farmacéuticos activos o productos de degradación u otro componente seleccionado en el producto farmacéutico.

El objetivo de un procedimiento analítico necesita estar bien claro para ver las características que requieren ser evaluadas. Las características típicas de validación, que pueden ser consideradas son: exactitud, precisión, repetibilidad, precisión intermedia, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango, robustez y adecuabilidad del sistema. Las variables analíticas que normalmente se requieren para la validación del método están resumidas en la tabla 4 ¹⁸.

Tabla 4. Características de validación del ICH de acuerdo al tipo de procedimiento analítico ¹⁸.

Tipo de procedimiento analítico	Prueba de impurezas			Ensayo
	Identificación	Cuantitativa	Pruebas de Límites	
Exactitud	-	+	-	+
Precisión	+	+	+	+
Repetibilidad	-	+	-	+
Precisión intermedia	-	+	-	+
Especificidad	+	+	+	+
Límite de detección (LD)	-	+	+	-
Límite de cuantificación (LC)	-	+	-	-
Linealidad	-	+	-	+
Rango	-	+	-	+

*si (+), no (-) se requiere su evaluación

2.2. Definición de los parámetros de validación.

La consideración más importante como estrategia para la validación de un método es el trabajo del diseño experimental que permita la apropiada validación de cada una de las características a estudiar, pudiendo hacerse de forma simultánea y minimizando así el número de experimentos necesarios para hacerlo. Es por eso importante también escribir

una forma de protocolo que ayude a planear el proceso. Ejecutar un trabajo experimental sin la previa planeación puede causar un desastre para la validación ²¹.

2.3. Exactitud.

La *exactitud* es la medida que nos indica que tan cerca es el valor experimental del valor verdadero. La ICH define la *exactitud* de un procedimiento analítico, como la cercanía acordada entre los valores que son aceptados como valores verdaderos convencionales o un valor aceptado de referencia y el valor encontrado. La ICH recomienda evaluar un mínimo de 9 determinaciones dentro de un mínimo de tres niveles de concentraciones, cubriendo el rango especificado ²¹. La FDA recomienda que el recobro sea llevado a acabo al 80, 100, 120% y que sea por lo menos por triplicado en cada nivel ¹⁸.

2.4. Precisión.

La *precisión* es la medida que nos indica que tan cerca están los valores de los datos entre sí para un número de mediciones, bajo las mismas condiciones analíticas. La precisión es usualmente expresada como el porcentaje de la desviación estándar relativa (%RSD) para un número significativo de muestras ¹⁸. La precisión es generalmente investigada en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad ²¹.

- **Repetibilidad (Precisión):** Es una medida de la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo de tiempo corto. Esta es referida algunas veces como precisión intraensayos ²¹. Hay dos opciones permitidas por la ICH para esta prueba:

- I. Un mínimo de 9 determinaciones cubriendo el rango específico para el procedimiento (por ejemplo, 3 concentraciones/ 3 replicas).
- II. Un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración de la prueba.

- **Precisión intermedia.** Es definida como la variación dentro del mismo laboratorio. En buena medida la precisión intermedia va a depender de las circunstancias bajo las cuales el procedimiento es previsto a ser usado. Algunos parámetros que son investigados incluyen la variación de día a día, de analista a

analista y la variación del equipo. La ICH recomienda reportar la desviación estándar, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza de los datos ²¹. La precisión intermedia también es llamada reproducibilidad en el laboratorio ¹⁶.

- **Reproducibilidad:** Mide la precisión entre laboratorios como en estudios de colaboración. Este parámetro debería ser considerado en la estandarización de un procedimiento analítico (por ejemplo, en la inclusión de procedimientos en farmacopeas y transferencia de métodos entre laboratorios) ²¹.

2.5. Especificidad / Selectividad.

Los términos especificidad y selectividad son frecuentemente intercambiables. La *especificidad* es generalmente usada para expresar que la respuesta de un método se debe a un sólo analito, mientras que el término *selectividad* de un método es una medida del límite al cual el método puede determinar un componente en particular en las matrices analizadas sin la interferencia de otros componentes en la matriz. Sin embargo, tanto la USP como el ICH actualmente usan el término de especificidad ¹⁸.

El ICH define a la *especificidad* como la habilidad de evaluar inequívocamente al analito en presencia de los componentes que se pueden esperar estén presentes ²¹. Estos componentes pueden incluir otros ingredientes activos, excipientes, impurezas y productos de degradación. De acuerdo con el ICH, el procedimiento de validación debe ser capaz de demostrar la habilidad del método para asegurar la inequívoca presencia del analito en presencia de impurezas, componentes de la matriz y productos de degradación ¹⁸. La especificidad ha sido dividida en dos categorías separadas:

- **Identificación.** La especificidad es demostrada por la habilidad para discriminar entre compuestos de estructuras relacionadas íntimamente, las cuales parecen estar presentes. La otra propuesta es por comparación de resultados con un material de referencia conocido ¹⁸.

- **Ensayo y Prueba de límites.** Para el ensayo y prueba de límites, la especificidad puede ser demostrada por la resolución de los componentes, para los métodos cromatográficos por ejemplo, en los cromatogramas obtenidos deben de estar apropiadamente etiquetados los componentes individuales de la muestra ¹⁸. (Para técnicas de separación, esto significa que hay una resolución > 1.5 entre el analito de interés y los interferentes) ¹.

La especificidad en un método es determinada por la comparación de los resultados de la prueba de análisis de muestras conteniendo: impurezas, productos de degradación, o ingredientes de un placebo, con aquellos obtenidos del análisis de muestras sin impurezas, productos de degradación o placebo. Para el propósito de un método indicador de estabilidad, los picos de la degradación necesitan estar resueltos de los excipientes. Sin embargo, estos no necesitan estar resueltos uno de otro ²¹.

2.6. Límite de detección (LD).

El ICH define el *límite de detección (LD)* de un procedimiento analítico individual como la menor cantidad de analito en una muestra que puede ser detectado pero no necesariamente cuantificado como un valor exacto ²¹. En la USP actual, la determinación del límite de detección es descrita por métodos instrumentales y no instrumentales. Para métodos instrumentales, se determina el ratio de señal a ruido (es decir, la relación entre la señal del analito y el ruido) por la comparación de los resultados de muestras con concentración conocida de analito con muestras blanco y estableciendo la menor concentración a la cual el analito puede detectarse confiadamente. Una ratio de señal a ruido requerido es de 2:1 o 3:1. Otra propuesta es calcular la desviación estándar para el análisis de un número de muestras del blanco. La desviación estándar multiplicada por un factor, usualmente 2 o 3, da una estimación del límite de detección ¹⁸.

Para métodos no instrumentales, el LD es determinado por el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito. La concentración mínima a la cual el analito puede ser detectado con confianza es el límite de detección. El ICH ha reconocido el convenio del ratio de señal a ruido, pero también lista algunas otras propuestas para determinar el LD

dependiendo si el procedimiento es instrumental o no instrumental. Las propuestas son las siguientes ¹⁸:

- **Basadas en una evaluación visual.** Esta puede ser usada para métodos instrumentales y no instrumentales. Esta requiere del análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito y estableciendo el mínimo nivel al cual el analito puede ser detectado con fiabilidad. Los métodos no instrumentales pueden incluir la determinación del LD por técnicas como la titulación ¹⁸.
- **Basadas en la desviación estándar de la respuesta y de la pendiente.** El límite de detección puede ser calculado basado en la desviación estándar (SD) de la respuesta y la pendiente (S) de la curva de calibración (una curva específica debe generarse usando muestras que contengan el analito en el rango del límite de detección), de acuerdo con la fórmula ¹⁸:

$$\text{Límite de Detección (LD)} = 3.3 \times \frac{S}{SD}$$

El SD de la respuesta puede ser determinada del SD del blanco, el residual SD de la línea de regresión o el SD de la ordenada al origen de la regresión de la línea. El límite de detección, y el método utilizado para determinar este debe ser documentado y soportado, y un adecuado número de muestras deben ser analizadas en el límite para validarlo. La FDA es de la opinión que la expresión del límite de detección en términos del radio de señal a ruido de 2 o 3 no es muy práctica. La razón de esto es atribuida a las diferencias en el nivel del ruido de un detector durante la fase del desarrollo del método y cuando las muestras son analizadas en diferentes detectores. La sensibilidad del detector puede variar con el número del modelo o fabricante ¹⁸.

2.7. Límite de cuantificación (LC).

El ICH define el *límite de cuantificación (LC)* de un procedimiento analítico individual como la menor cantidad de analito en una muestra que puede ser determinado cuantitativamente con precisión y exactitud adecuadas ²¹. Este es un parámetro de los

ensayos cuantitativos para concentraciones pequeñas de compuestos en matrices de muestra como son las impurezas en los excipientes y productos de degradación en productos terminados¹⁸.

En la actual USP, el LC, el cual es muy similar al límite de detección es expresado como la concentración de analito en una muestra, donde la precisión y exactitud de las mediciones son también reportadas. El LC es dependiente del tipo de procedimiento, por ejemplo, instrumental o no instrumental. Para métodos instrumentales, algunas veces el ratio señal a ruido es 10:1 y es usado para determinar el LC. Sin embargo, es señalado que la determinación del LC basado en el criterio del ratio señal a ruido es un compromiso entre la concentración y la precisión y exactitud requerida¹⁸.

El ICH, al igual que con el límite de detección, también reconoce el uso del ratio señal a ruido de 10:1 para la cuantificación. Sin embargo, esta propuesta puede ser solamente aplicada a procedimientos analíticos que exhiben una línea base para el ruido. El ICH lista las dos mismas opciones que se pueden utilizar para determinar el LC. Estas son la evaluación visual para métodos instrumentales y no instrumentales; el otro método puede estar basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente¹⁸. La fórmula anterior cambia a:

$$\text{Límite de Cuantificación (LC)} = 10 \times \frac{S}{SD}$$

Adicionalmente la guía de la FDA recomienda que debe ser generado el dato para el análisis de repetibilidad de inyección en el límite de cuantificación. La guía recomienda aun más, el uso adicional de un estándar de referencia en el límite de cuantificación como parte de la prueba para el método¹⁸.

2.8. Linealidad.

El ICH define a la *linealidad* de un procedimiento analítico como la habilidad (dentro de un rango determinado) para obtener resultados de la prueba con un dato variable (por ejemplo, absorbancia y área bajo la curva) las cuales son directamente proporcionales a la

concentración (cantidad de analito) en la muestra. Los datos variables que pueden ser usados para la cuantificación del analito son áreas del pico, alturas de pico o el radio de las áreas del pico (altura) de un analito a un pico estándar. La cuantificación del analito depende de si este obedece la ley de Beer y si es lineal en un rango de concentraciones. Por tanto, la concentración de la muestra a trabajar y las pruebas para exactitud deben estar en el rango lineal ²¹. La diferencia entre la linealidad del método y del sistema, se basa en que en la del sistema se utilizan soluciones estándar, mientras que la del método se determina empleando placebos cargados. Requerimientos generales:

- **Rango:** De acuerdo con la guía de la FDA, el rango de linealidad depende del uso que pretende el método. Para el ensayo de contenido, la linealidad debe ser llevada a cabo entre el 80% y el 120% de la concentración principal. El rango para la combinación del método de ensayo/ impurezas basado en el porcentaje de área (para impurezas) debe ser mayor al 20% de la concentración principal más baja del límite de cuantificación del excipiente o de la impureza ¹⁸.
- **Requerimientos experimentales:** La linealidad es usualmente demostrada directamente por la dilución de una solución stock, realizada con el (los) estándar (es). Es recomendado que la linealidad se lleve a cabo por una serie de diluciones de una solución stock común. Al menos se deben usar cinco niveles de concentraciones, cada nivel con tres replicas ^{32, 21}.
- **Criterio de aceptación:** Una inspección visual es el método más sensible para detectar la no linealidad. Por tanto, la gráfica de la señal en función de la concentración del analito, tiene que ser lineal en una inspección visual. Subsecuentemente, los datos variables son generalmente usados para calcular una regresión a través del método de mínimos cuadrados. De acuerdo con las guías del ICH, se debe reportar: la pendiente, el coeficiente de correlación (r^2), la ordenada al origen, y el residual de la suma de cuadrados ²¹.

2.9. Rango.

El ICH define el *rango* de un método analítico como el intervalo entre los niveles de concentración superior e inferior (cantidades) del analito en la muestra (incluyendo estas concentraciones) para las cuales se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad ²¹. El rango es usualmente expresado en las mismas unidades que los resultados obtenidos por el método analítico. De acuerdo con la USP, el rango del método es validado verificando tener una precisión aceptable y exactitud obtenidas a través del método analítico cuando el análisis actual de las muestras que contienen al analito son llevadas a cabo en los intervalos del rango. El ICH recomienda una propuesta similar a la USP para la validación del rango ¹⁸. Esta recomienda rangos específicos basados en el propósito de uso del método como sigue:

- I. Para ensayo de un principio activo o fármaco, el mínimo especificado de rango es del 80% al 120% de la concentración principal.
- II. Para la prueba de uniformidad de contenido, el rango mínimo es de 70% al 130%.
- III. Para la determinación de impurezas, el rango mínimo es el nivel reportado de la impureza hasta el 120% de ésta en la especificación.
- IV. Para una combinación del procedimiento de ensayo para el activo y la impureza, donde el 100% de estándar es usado, la linealidad debe cubrir el rango del que está reportado el nivel al 120% de especificación del ensayo.
- V. Para la prueba de disolución, el rango recomendado es $\pm 20\%$ sobre el rango especificado en la prueba. Esto es en el caso de una prueba de disolución de un fármaco de liberación controlada con un valor de Q de 20% después de 1 hora, a un 90% en 24 horas, el rango para la validación va a ser de 0 a 110% del nivel mantenido.
- VI. Para impurezas tóxicas o más potentes, el rango debe ser equivalente con el nivel controlado.

2.10. Robustez.

La *robustez* de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad de permanecer inafectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del procedimiento analítico. La robustez del procedimiento analítico provee un indicador de su confiabilidad durante su uso normal.

La evaluación de la robustez debe ser considerada durante el desarrollo de un procedimiento analítico. Si las mediciones son susceptibles a variaciones en las condiciones analíticas, las condiciones analíticas deben ser adecuadamente controladas o cuidadosamente establecidas e incluidas en el procedimiento.

Por ejemplo, si la resolución de un par crítico de picos son muy sensibles al porcentaje de composición orgánica de la fase móvil, esta observación debió ser observada durante el desarrollo del método y debe ser remarcada en el procedimiento. Variaciones comunes que son investigadas para robustez incluyen el efecto del filtro, la estabilidad de las soluciones analíticas, tiempo de extracción durante la preparación de la muestra, variaciones de pH en la composición de la fase móvil, columnas y velocidad de flujo, efecto de la temperatura, etc.²¹.

2.11. Metodología para electroforesis capilar.

Como mínimo, los parámetros que se encuentran enlistados en la parte de abajo, deben de ser especificados para un procedimiento analítico para electroforesis capilar. Parámetros adicionales pueden ser incluidos si son requeridos en el procedimiento. Si el desarrollo del método ha indicado que los capilares de una sola compañía son los adecuados, entonces esta información debe ir incluida como parte del procedimiento analítico. Si más de un capilar es adecuado, la lista de capilares encontrados como equivalentes debe ser incluida³³. Los parámetros son:

Capilar:

- I. Dimensiones del capilar: Longitud, longitud al detector, diámetro interno.
- II. Material del capilar.
- III. Recubrimiento interno del capilar (si aplica).

Parámetros de operación:

Procedimiento de preparación del capilar: Procedimiento a seguir antes del primer uso, antes de la primera corrida del día, antes de cada corrida (por ejemplo, un lavado con hidróxido de sodio 100 milimolar (mM), un lavado con buffer de corrida)³³.

- I. Buffer de corrida: Composición, incluyendo una preparación detallada con el orden de adición de los componentes.
- II. Inyección: Modo (por ejemplo, electrocinética, hidrodinámica), parámetros (por ejemplo, voltaje, presión, tiempo).
- III. Detector.
- IV. Tiempo de migración típico y tiempo total de corrida.
- V. Modelo de equipo de EC usado.
- VI. Voltaje (si es constante).
- VII. Corriente (si es constante).
- VIII. Polaridad (por ejemplo, la polaridad del electrodo por el detector)

Prueba de adecuabilidad del sistema.

Cada procedimiento analítico debe incluir las pruebas de adecuabilidad del sistema, definiendo las características críticas de dicho sistema. Otros parámetros pueden ser incluidos a la discreción del solicitante³³.

Si se usa un estándar interno, la resolución mínima aceptable entre el estándar interno y uno más de los ingredientes activos debe ser especificada. Si el procedimiento analítico utilizado es usado para control del nivel de impurezas, la resolución mínima entre el ingrediente activo y la impureza más cercana, o si los dos picos eluyen cercanos uno del otro, debe ser especificado³³.

3. Amoxicilina trihidrato (amoxicilina).

3.1. Características terapéuticas.

La amoxicilina es un antibiótico semisintético derivado de la penicilina. Se trata de una amino penicilina. Actúa contra un amplio espectro de microorganismos, tanto Gram positivos como Gram-negativos.

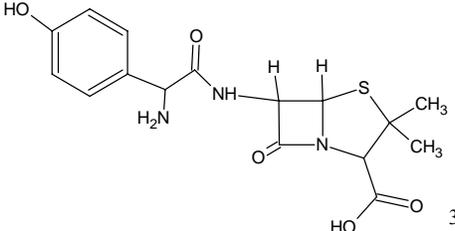
Por esto se emplea a menudo como primer remedio en infecciones de diferente gravedad, tanto en medicina humana como también en veterinaria. Se utiliza por vía oral o parenteral, aunque la forma parenteral (intramuscular o intravenosa) no está aprobada en todos los países.

A pesar de su amplio espectro, no es estable frente a beta lactamasas, por lo que no debe usarse frente a infecciones por gérmenes productores de las mismas. Sin embargo, hay preparados comerciales con la adición de ácido clavulánico o sulbactam, que aumentan su estabilidad y amplían su espectro en estos casos. Como todas las penicilinas puede provocar reacciones alérgicas severas o efectos secundarios como fiebre, náuseas, vómitos o diarrea.

3.2. Propiedades fisicoquímicas.

Las propiedades fisicoquímicas de la amoxicilina, se encuentran reportadas en la Tabla 5.

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de amoxicilina.

Apariencia.	Polvo blanco cristalino, muy higroscópico, sabor amargo e inodoro ² .
Formula empírica.	$C_{16} H_{19} N_3 O_5 S^2$.
Peso molecular.	365.41g/mol ² .
Formula estructural.	
Sinónimos.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Acido (2S,5R,6R)-6-[(R)-2-amino-2-(4-hidroxifenil)acetamido]-3,3-dimetil-7o⁹. 2. Acido 7-[2-amino-2-(4-hidroxifenil)-acetil]amino -3,3-Dimetil-6-oxo-2-tia-5-azabicyclo[3.2.0]heptano-4- metanóico 3. Amoxicilina
Constante de disociación	pKa = 2.8, 7.2, 9.6
Máximos de Absorción	230, 272 nm (en soluciones ácidas) 247,291nm (en soluciones alcalinas)
Solubilidad.	Solubilidad de la amoxicilina a 25°C. ¹⁰ (mg/ml) Agua 1:400, Metanol 1:200, Etanol 1:1000, Acetonitrilo 10:1 Eter insoluble.

3.3. Análisis químico.

Recientemente, la electroforesis capilar de zona (ECZ) ha emergido como un poderoso nuevo método para la rápida separación y detección de analitos cargados y esta ha sido otra técnica también utilizada para el análisis químico. En los años más recientes, la electroforesis capilar (EC) se ha convertido en una útil y poderosa técnica de separación que exhibe más frecuentemente mejor resolución y tiempos de análisis más cortos que la CLAR. Los aspectos más importantes que hacen a la EC una herramienta útil para la investigación básica y en laboratorios clínicos son: el bajo costo, volúmenes de muestra pequeños, automatización, alta selectividad y sensibilidad ¹⁹.

3.4. Toxicología.

Los efectos secundarios más frecuentes son los asociados a reacciones de hipersensibilidad y pueden ir desde rash sin importancia a serias reacciones anafilácticas. Se ha descrito eritema multiforme, dermatitis exfoliativa, rash maculopapular con eritema, necrosis epidérmica tóxica, síndrome de Stevens-Johnson, vasculitis y urticaria. En alguna rara ocasión se observado nefritis intersticial con necrosis tubular renal y síndrome nefrótico. Los efectos secundarios más comunes, asociados al tracto digestivo son similares a los de otros antibióticos y se deben a la reducción de la flora: Nausea/vómitos, anorexia, diarrea, gastritis, y dolor abdominal. En algún caso puede producirse colitis pseudomembranosa durante el tratamiento o después, si bien este efecto suele ser bastante raro.

3.5. Farmacocinética.

Es absorbida rápidamente en el intestino delgado (disponibilidad de aprox. el 80 %) tanto en ayunas como tras la ingesta de alimentos. Es eliminado con la orina sin ser metabolizado ⁵.

3.6. Usos terapéuticos.

Algunos de los usos más frecuentes de la amoxicilina son infecciones sistémicas o localizadas causadas por microorganismos gram-positivos y gram-negativos sensibles, en el

aparato respiratorio tracto gastrointestinal o genitourinario, de piel y tejidos blandos, neurológicas y odontoestomatológicas.

3.7. Formas farmacéuticas existentes.

La amoxicilina fue aprobada por primera vez en 1987. Desde entonces se comercializa entre otros por parte de GlaxoSmithKline con el nombre de Augmentine®, Amoxicilinail® o Clamoxil®. Hoy la patente ha caducado y se encuentra en el mercado también con otros nombres como Actimoxi®, Amoxibiotic®, Amoxicilina®, Amoxidal®, Pamoxicilinaicillin®, Lamoxy®, Polymox®, Trimox®, Tolodina® y Zimox® (Nota: las denominaciones comerciales pueden variar en diferentes países) ⁴¹.

4. Clorhidrato de bromhexina (bromhexina)

4.1. Características terapéuticas.

El clorhidrato de bromhexina es un fármaco que actúa como fluidificante de las secreciones bronquiales; posee actividad mucolítica debido a que fragmenta las fibras de muco polisacáridos de las secreciones viscosas y adherentes del tracto respiratorio, con lo cual se favorece la expulsión por medio de la expectoración ²⁹.

4.2. Farmacocinética

La absorción a través del tracto gastrointestinal es rápida, lo que proporciona niveles hemáticos óptimos a los 60 minutos de su administración. 75-80% de la dosis administrada sobrelleva metabolismo hepático de primer paso, por lo que la cantidad restante (20-25%) queda biodisponible.

La bromhexina se liga a proteínas en 95% y su distribución es principalmente a nivel pulmonar. La eliminación de la bromhexina fundamentalmente es por vía renal, un porcentaje mínimo (4%) se elimina por vía fecal.

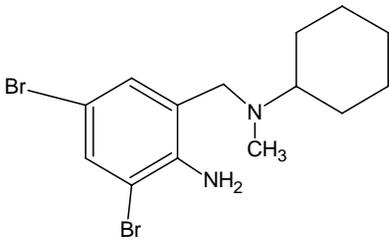
4.3. Indicaciones

Este medicamento es utilizado como terapia secretolítica en enfermedades bronco pulmonares crónicas y agudas asociadas a secreción mucosa anormal y trastornos del transporte mucoso.

4.4. Propiedades fisicoquímicas.

Las propiedades fisicoquímicas del bromhexina, se encuentran reportadas en la Tabla 6.

Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas de bromhexina.^{29,44}

Nombre químico.	2,4-dibromo-6-[(ciclohexil-metil- amino)metil]anilina
Formula empírica.	C ₁₄ H ₂₀ Br ₂ N ₂
Peso molecular.	376.1 g/mol
pKa	8.5
Formula estructural	
Máximos de absorción	254nm(en soluciones ácidas) 262nm (en soluciones alcalinas)
Solubilidad	Muy poco soluble en agua, alcohol y cloruro de metileno
Apariencia	polvo cristalino blanco o casi blanco inodoro, sensible a la luz con un punto de fusión de 235°C

4.5. Formas farmacéuticas existentes.

Tabla 7. Formas farmacéuticas existentes en el mercado para amoxicilina ⁴⁴.

Nombre comercial	Forma farmacéutica	Laboratorio
Acroxil-C	Suspensión	QUIM.SON'S
Ambrexin	Suspensión	IVAX
Amoxicilinaibrón	Suspensión y capsulas	GLAXO SMITHKLINE
Bromixen	Suspensión y capsulas	MAVER
Bromoxil	Suspensión y capsulas	VITAE
Bromel infantil y adulto	Suspensión	AMSA

Debido a que la bromhexina ayuda a descongestionar las vías respiratorias, la industria farmacéutica la asocia con algunos antibióticos las presentaciones farmacéuticas que existen en México que asocian la amoxicilina a la bromhexina se encuentran reportadas en la Tabla 7.

5. JUSTIFICACIÓN.

La frecuencia de enfermedades respiratorias causadas por bacterias ha incrementado el uso de medicamentos que contrarreste los efectos causados por la enfermedad tal es el caso de las formulaciones analizadas. Por lo tanto es preciso que la industria farmacéutica desarrolle nuevos métodos analíticos que resulten ser económicos y rápidos además de eficientes y confiables que aseguren la calidad del producto que colocan en el mercado.

En este trabajo se muestra la optimización y validación de un método analítico por electroforesis capilar para cuantificar de manera rápida y simultánea un antibiótico beta lactámico (amoxicilina) y un broncodilatador de amplio uso (bromhexina) en una suspensión oral y en cápsulas para que este método sea utilizado asegurando los límites establecidos con lo que ayudará a lograr asegurar la calidad de los productos de la industria farmacéutica y además, disminuirá costos de análisis a corto y largo plazo.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Optimizar y validar un método analítico por electroforesis capilar para la determinación de amoxicilina y clorhidrato de bromhexina, principios activos de una suspensión oral y cápsulas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Realizar una revisión bibliográfica de las características fisicoquímicas y farmacológicas, así como de las técnicas analíticas reportadas para la determinación de amoxicilina y clorhidrato de bromhexina.
- II. Determinar las condiciones electroforéticas óptimas para la separación y cuantificación de los principios activos.
- III. Evaluar los parámetros estadísticos relacionados con la validación: especificidad, adecuabilidad, precisión y linealidad del sistema y del método, exactitud y reproducibilidad.

III. METODOLOGÍA.

1. Equipos y reactivos.

Se utilizó un equipo de electroforesis capilar P/ACE MDQ, Beckman Coulter, equipado con un detector de arreglo de diodos (DAD), acoplado a una computadora y manejado mediante el software 32 KARAT (Beckman Coulter, USA).

El agua desionizada fue obtenida de un equipo desionizador de agua tipo 1 (MilliQ plus Millipore®)

pH-metro HI 931401, Hanna Instruments

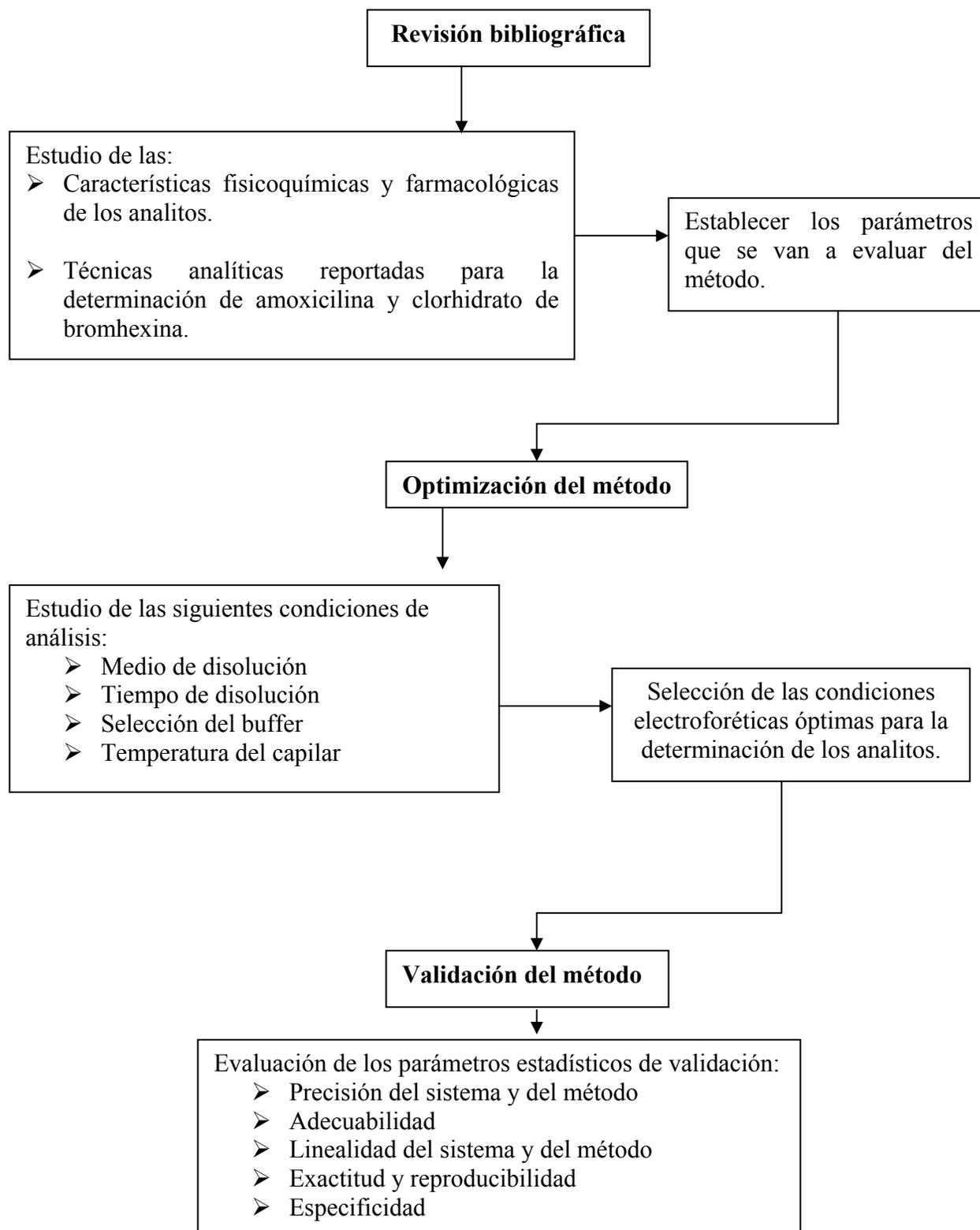
Agitador Magnético (Thermolyne, MIRAK™)

Balanza Analítica (BOECO Alemania, 0.0001g de precisión)

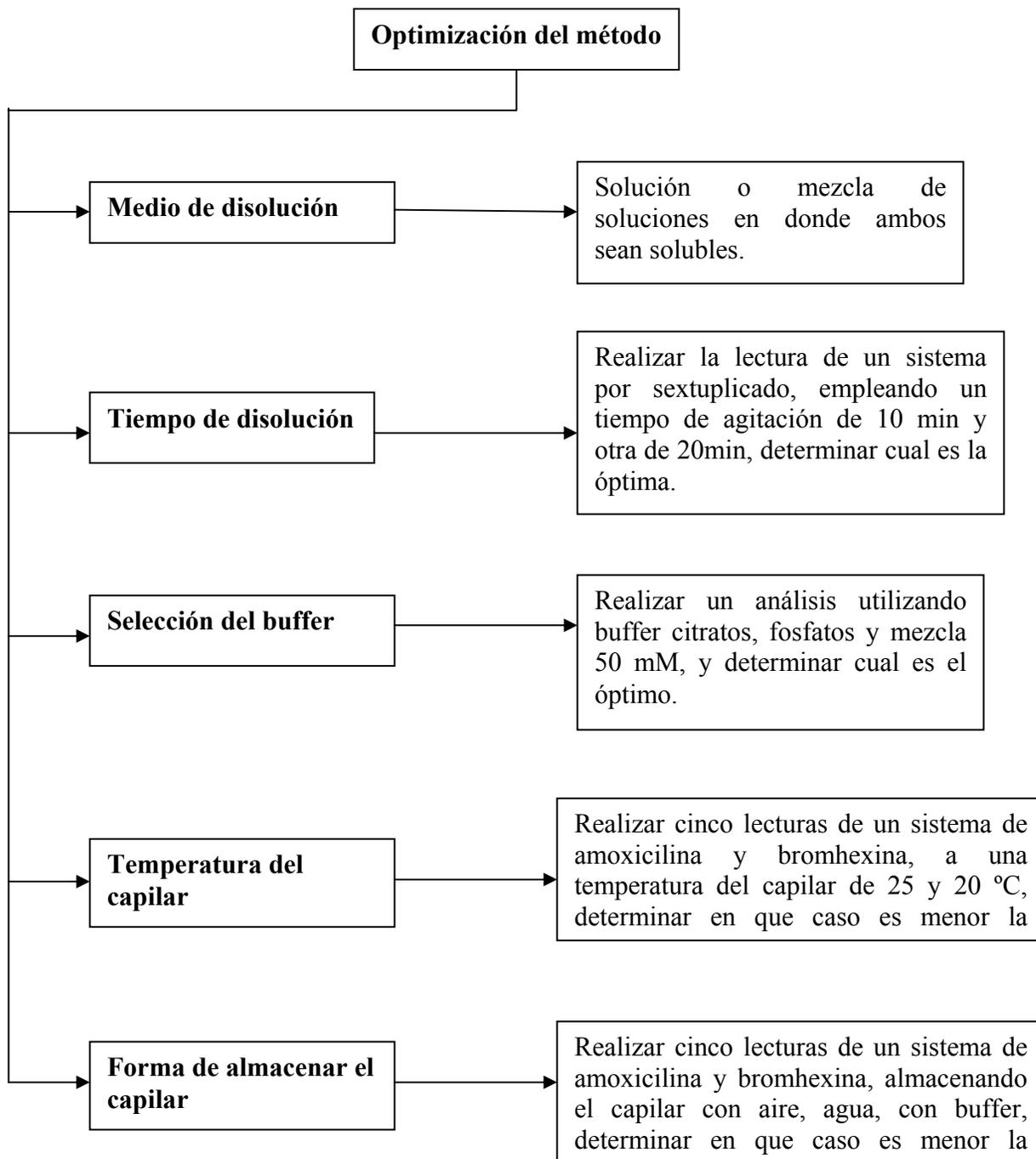
Los reactivos utilizados fueron:

- Ácido cítrico J.T. Baker (Xalostoc, Edo de Mex., México)
- Hidróxido de sodio, J. T. Baker (Xalostoc, Edo. De Mex., México)
- Fosfato de sodio monobásico, J. T. Baker (Xalostoc, Edo. De Mex., México)
- Metanol, J. T. Baker (Xalostoc, Edo. De Mex., México)
- Ácido clorhídrico, (Técnica Química, DF, México)
- Acetonitrilo High Purity R de México AS de CV 99.9%
- Agua desionizada
- Estándar primario de clorhidrato de bromhexina clave 18, Grimann, Lote BRX-02706-C pureza=99.9%
- Estándar secundario de trihidrato de amoxicilina clave 16, Grimann, Lote HPLCESAXT-006, pureza = 88.7%
- Estándar primario de amoxicilina SIGMAA8523-5G, lote 117K0754.

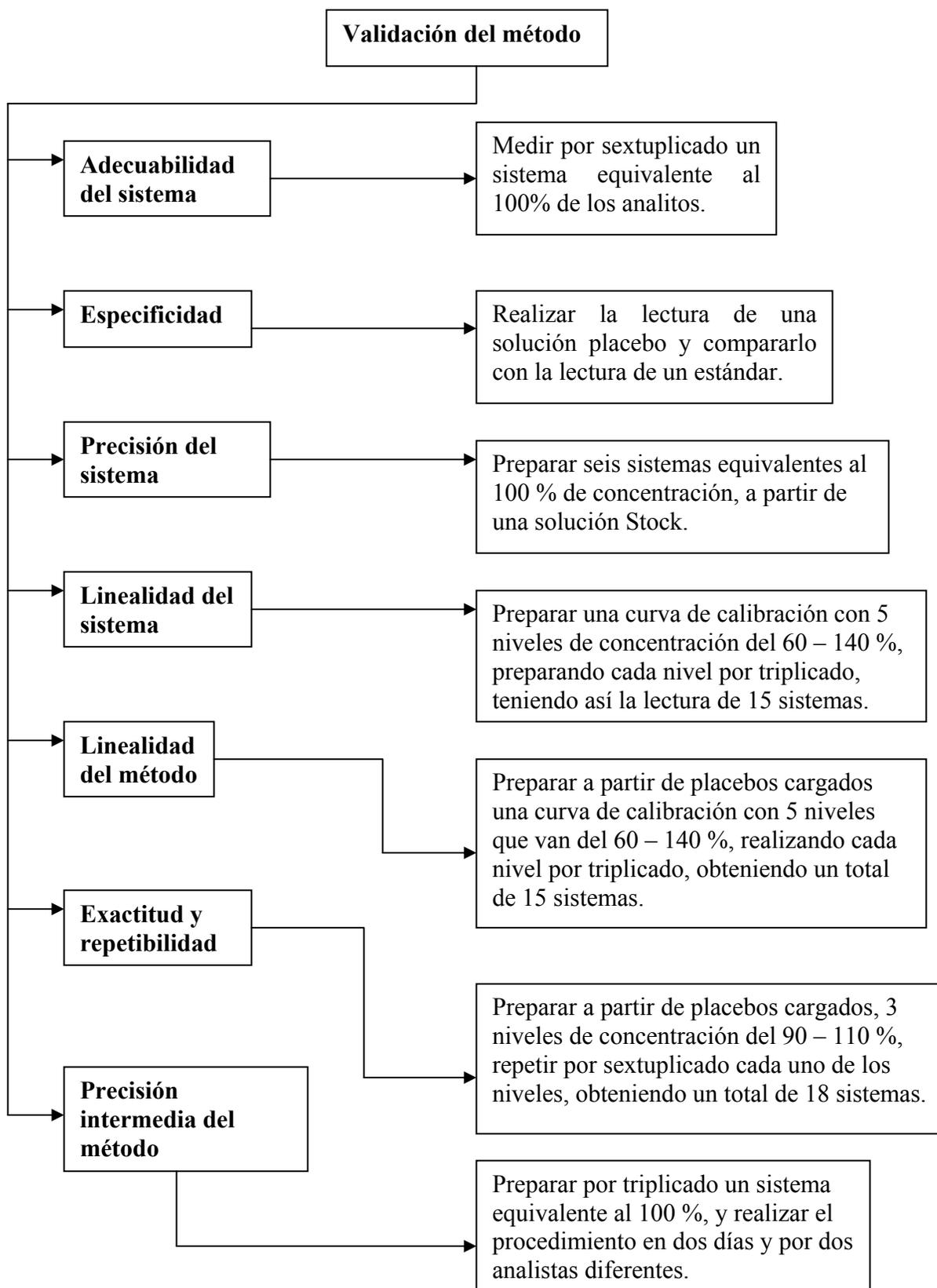
1.1. METODOLOGÍA GENERAL



1.2. Optimización del método analítico.



1.3. Validación del método analítico.



La detección se efectuó a 214 nm en un equipo PACE/MDQ utilizando un capilar de sílice fundida de 30cm de longitud total y 52µm de diámetro interno usando buffer de citratos 50mM a pH 3.0 como medio de soporte y como medio de disolución. Inyección hidrodinámica: 0.5 psi por 5 segundos. Voltaje de separación de 30 kV. Tiempo de corrida 3.0 minutos. Tiempo de lavado entre corridas de tres minutos con buffer.

1.3.1 Adecuabilidad del sistema.

1. Pesar lo más exactamente posible el equivalente a 0.2g de amoxicilina y 0.0064g de bromhexina.
2. Disolver en 90ml de una mezcla acetonitrilo [4] y HCl 0.1M (1:1)
3. Agitar con barra magnética a 350rpm 20min
4. Filtrar
5. Llevar al aforo de 100ml con buffer citratos 50mM. (solución stock)
6. Se toman 5ml del stock y se llevan al aforo de 10ml con buffer citratos 50mM (sistema al 100%)
7. Se mide el sistema por sextuplicado

1.3.2 Especificidad.

1. Preparar un (Placebo) que contenga los mismos componentes que en la formulación original y en la misma proporción, a excepción de los fármacos (amoxicilina y bromhexina).
2. Pesar 1.7936g del placebo (el equivalente 0.2g de amoxicilina y 0.0064g de bromhexina), y se siguen los pasos del 2 al 7 de adecuabilidad del sistema.

1.3.3 Precisión del sistema.

1. Tomar 5 ml de la solución Stock y colocarlos en un matraz volumétrico de 10ml, llevar a la marca de aforo con buffer citratos 50Mm. (Sistema 100%) [amoxicilina= 1000 µg/ml] y [bromhexina= 32 µg/ml]
2. Repetir por sextuplicado el paso anterior con el fin de obtener 6 sistemas de precisión.

1.3.4 Linealidad del sistema.

1. Se siguen los pasos del 1 al 5 de adecuabilidad del sistema.
2. Preparar una curva de calibración de 5 puntos, a cinco niveles de concentración siguiendo la tabla 8 Realizando la preparación independiente de cada sistema a partir de la solución stock.
3. Cada nivel debe realizarse por triplicado, para reportar la relación concentración vs área y calcular el valor de la pendiente (b1), la ordenada al origen (b0), el coeficiente de determinación (r2) y el intervalo de confianza para la pendiente (IC (β 1)).

Tabla 8. Preparación de la curva de calibración*.

Sistema	1	2	3	4	5
Stock(ml)	3	4	5	6	7
Conc (ppm) amoxicilina	600	800	1000	1200	1400
Conc (ppm) bromhexina	19.2	25.6	32	38.4	44.8
% Contenido	60	80	100	120	140

Nota: los sistemas se aforan a 10ml con buffer citratos 50mM

1.3.5 Linealidad del método.

1. Preparar un placebo analítico con el tipo de componentes que generalmente están presentes en la muestra.
2. Se siguen los pasos del 1 al 5 de adecuabilidad del sistema.
3. Preparar una curva de calibración de 5 puntos, a cinco niveles de concentración siguiendo la tabla 8 Realizando la preparación independiente de cada sistema a partir de la solución stock.
4. Determinar la cantidad recuperada de analito.
5. Repetir del paso 2 y 3, obteniendo así, un total de 15 sistemas para evaluar la linealidad del método.
6. Reportar la relación cantidad adicionada vs recuperada.

1.3.6 Exactitud y repetibilidad del método.

1. Preparar un placebo analítico con el tipo de componentes que generalmente están presentes en la muestra. A la cantidad de placebo adicionarle la cantidad de analito amoxicilina y bromhexinaequivalente al 100 % de este en la muestra. (placebo adicionado)
2. Preparar siguiendo los pasos del 1 al 5 de adecuabilidad del sistema, con el stock los sistemas 2,3, y 4 de la tabla 8.
3. Se debe realizar la preparación del ensayo de manera independiente por sextuplicado.
4. Los placebos adicionados deben ser analizados por un mismo analista bajo las mismas condiciones.
5. Determinar la cantidad recuperada del analito.
6. Calcular el porcentaje de recobro de cada placebo analítico o muestra adicionada, al obtener el cociente de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada expresada en porcentaje.
7. Calcular el promedio aritmético, la desviación estándar, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro (IC (μ)).

1.3.7 Precisión intermedia del método.

1. Repetir por triplicado del paso 1 al 6 de adecuabilidad del sistema con el fin de obtener 3 sistemas al 100%.
2. El procedimiento anterior, debe repetirse en dos días y por dos analistas diferentes.

IV. RESULTADOS Y ANALISIS.

1. OPTIMIZACION DEL MÉTODO ANALÍTICO.

Cuando se valida un método en EC para análisis de rutina en el laboratorio, los primeros tres parámetros que deben de ser evaluados son adecuabilidad, reproducibilidad, y sensibilidad ¹⁵.

El desarrollo analítico en una separación por EC requiere la definición de parámetros químicos e instrumentales. El principal parámetro químico que afecta es la composición del buffer (incluyendo el tipo de buffer, si se utiliza algún aditivo, el pH, etc.) ¹⁵.

La selección apropiada del tipo de capilar está íntimamente relacionada con la selección de la composición del buffer. Algunos parámetros (por ejemplo la temperatura) necesitan ser definidos experimentalmente, mientras que otros (por ejemplo el pH del buffer), pueden ser definidos conociendo las características de la muestra como solubilidad, pK_a, etc. ¹⁵.

En el caso de analitos ionizables, la manipulación del pH va a afectar la selectividad en gran magnitud. El conocimiento de los valores de pK_a para los solutos contenidos en la muestra es primordial para un rápido desarrollo del método. Se debe notar la importancia del control de la temperatura en el mantenimiento del pH durante la corrida de electrolitos, especialmente en el caso de los buffer que son sensibles a la temperatura o de los valores de pK_a de los analitos dependientes de la temperatura ¹.

Además de la optimización del medio de disolución, tiempo de disolución, buffer, parámetros como la forma de almacenar el capilar, el voltaje y la temperatura pueden ser la consecuencia de la separación ¹. Por todo lo anterior mencionado, para la optimización de este método se definieron experimentalmente las siguientes características:

- I. Medio de disolución
- II. Tiempo de disolución
- III. Selección de Buffer

IV. Temperatura del capilar.

V. Forma de almacenar el capilar.

Esto con el fin primordial de optimizar y validar un método que sea: sensible a si como reproducible para que pueda ser utilizado en el departamento de control de calidad desde recepción de materia prima hasta producto terminado.

Se habla de optimizar ya que el método se había desarrollado como tema de tesis¹¹ pero al comenzar a reproducir las condiciones que estaban establecidas no se lograba cumplir con los parámetros de aceptación de las guías de validación.

1.1 Medio de disolución

El primer problema fue que para poder hacer un análisis por EC, es necesario que los analitos de interés se encuentren en disolución, por lo que es muy importante tener solubles los analitos, estaba establecido disolver la muestra con 10ml de metanol, agitar la muestra mecánicamente por 15 minutos, adicionar 25ml de agua ajustada a pH 1, agitar mecánicamente por 15 minutos, filtrar la solución por vacío, llevar el filtrado aun volumen de 50ml con buffer citratos 50mM pH 3, y analizar.¹¹

Este procedimiento no era efectivo pues las muestras observaba un precipitado en forma de cristales que indicaba la no disolución de los analitos. La bibliografía indica que la bromhexina se precipita a pH mayor de 6 por lo tanto no era el pH del sistema pues este tenia un pH de 2.9 así se determino que el pH no era el que estaba afectando sino el medio de disolución, además se encontró que el acetonitrilo era un buen disolvente para ambos analitos²⁷.

En cuanto a la amoxicilina, esta muestra buena disolución con el agua ajustada a pH de 1, pero como todo el método tiene que ser reproducible para facilitar la validación, se usó HCl 0.1 M para estandarizarlo; con estos disolventes ya se tenía la completa disolución de los analitos.

1.2. Tiempo de disolución

En cuanto a la linealidad del método y reproducibilidad fue donde ya se empezaron a tener problemas con el porcentaje de recobro así que se hicieron pruebas, con los disolventes escogidos variando únicamente el tiempo de disolución de 10 a 20 min.

Tabla 9. Comparación del CV del % de recuperación para amoxicilina y bromhexina* con 10 y 20 min de agitación.

Tiempo (min)	Bromhexina		amoxicilina	
	10	20	10	20
Promedio % recuperación	97,26	100.11	96,30	99.99
Desvest	1,06	0.50	0,19	0.53
CV	1,48	0.50	1.36	0.53

*El resultado es el promedio de 6 lecturas del mismo sistema.

Con la tabla 9 se puede observar que es mucho mejor agitar 20 minutos ya que con este tiempo se obtiene un porcentaje de recuperación dentro de los parámetros de aceptación (98-102%). Aunque en cualquiera de los dos casos se mantiene un CV dentro de los parámetros de aceptación.

1.3 Selección del buffer

El pH de corrida del buffer es el parámetro más importante a manipular. Al elegir el pH del buffer se definen las cargas netas de los componentes de la muestra y por tanto la magnitud y dirección de sus moviidades en el capilar.

Dentro de la optimización del método analítico es importante asegurar que la variación en los tiempos de migración de cada una de las lecturas sea siempre la menor, comúnmente cuando la capacidad amortiguadora es aumentada la variación en los tiempos de migración se ve disminuida. Por lo que se realizó un estudio de comparación de los diferentes buffer.

El pH=3 es el óptimo para la separación de acuerdo ala tesis realizada²² y se encontró que el buffer mezcla de citratos-fosfatos, el buffer de fosfatos (pka 2.12, 7.12, 12.32) y el buffer citratos (3.06, 4.74, 5.4), eran los que incluían el rango de amortiguamiento, por lo que se realizó un estudio comparativo entre estos (figura 5).

Así que de acuerdo a la carga neta de los componentes y la composición del buffer es la movilidad de estos, figura 5 y con los datos de la tabla 10 en este valor de pH se presenta una buena separación entre los analitos, además el tiempo total de análisis máximo es de 5.69 min. con fosfatos, 2.79 min. citratos y finalmente el de la mezcla citratos- fosfatos 3.28 min. el buffer de fosfatos-citratos permite una separación más rápida que el buffer fosfatos, sin embargo al estudiar la variación en los tiempos de migración, estos son mejores con el buffer de citratos (tabla 10) con lo que se concluye que este es el buffer óptimo. Los resultados de cada corrida se encuentran reportados en el anexo 1.

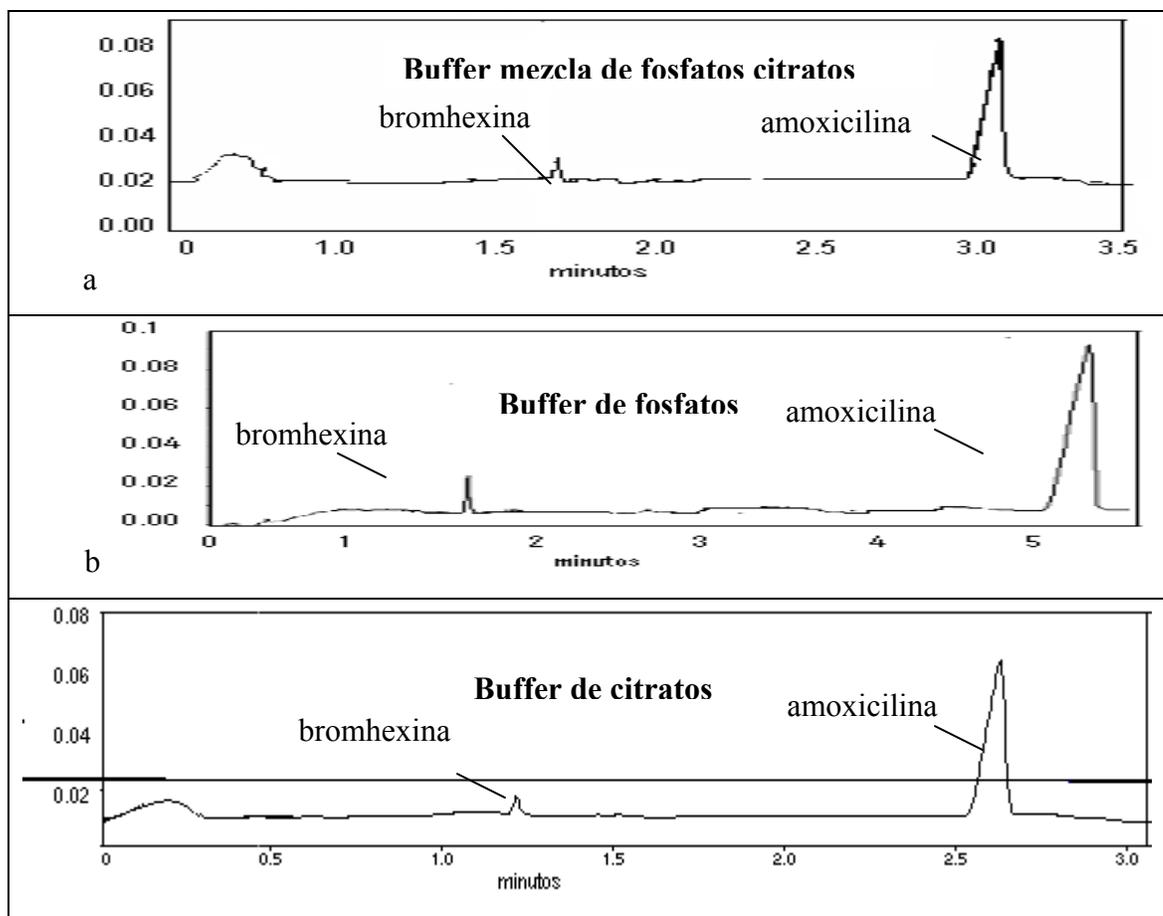


Figura 5. Efecto de la naturaleza del buffer en la separación de los analitos. Condiciones: Capilar de sílice fundida de 40.5 cm de longitud total, D.I. 50 μm , buffer 50mM pH 3.0; a) mezcla citratos-fosfatos, b) citratos, c) fosfatos, inyección hidrodinámica 5psi por 5 s, 30kV, polaridad normal del capilar, 25°C.

Tabla 10 Comparación de los coeficientes de variación de los tiempos de migración de amoxicilina y bromhexina con diferentes buffer y la corriente que presentan*

analito	Buffer mezcla de fosfatos - citratos 50 mM pH 3.0		Buffer Fosfatos 50 mM pH 3.0		Buffer Citratos 50mM pH	
	bromhexina	amoxicilina	bromhexina	amoxicilina	bromhexina	amoxicilina
Promedio	1.75	3.28	1.71	5.69	1.30	2.79
CV %	1.73	0.71	1.30	1.98	1.27	1.48
Corriente	150 μ A		70 μ A		50 μ A	

*El resultado es el promedio de 6 lecturas del mismo sistema.

De la misma forma, cuando se incrementa la fuerza iónica del buffer, se da un incremento del flujo de corriente eléctrica a través del capilar, lo cual puede causar calor ¹⁷, teniendo poca repetibilidad en los tiempos de migración obtenidos, como se indica en la tabla 10.

1.4. Selección de la longitud de onda.

Observando los electroferogramas (figura 6) de ambos analitos se puede apreciar que leyendo, amoxicilina y bromhexina a dos longitudes de onda 210 y 214 nm, ya que se tenía establecido leer a 210 por el método desarrollado ¹¹ se observo a 214 presentando mejores resultados así que fue necesario determinar en cual de estas dos longitudes de onda existe una mayor sensibilidad de detección del equipo.

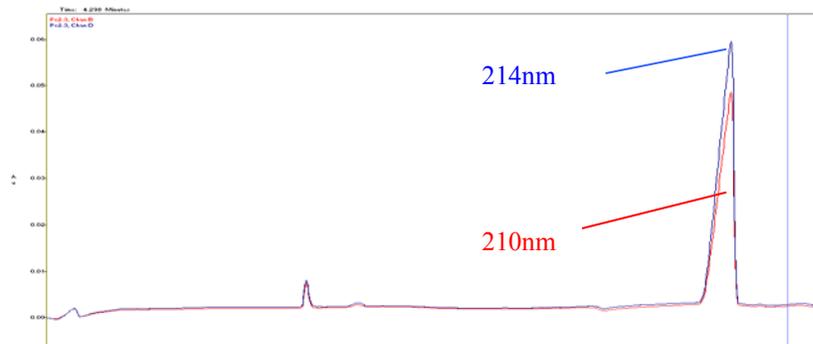


Figura 6. Comparación de la señal para amoxicilina y bromhexina a 210 y 214 nm.

Condiciones: Capilar de sílice fundida de 40.5 cm de longitud total, D.I. 50 μ m, buffer citratos 50mM pH 3.0, inyección hidrodinámica 0.5 psi por 5 s, 30kV, polaridad normal del capilar, 25°C.

Al realizar la comparación de los electroferogramas en ambas longitudes de onda (figura 6), se determino que a 210 nm se tiene una mayor sensibilidad, lo cual es favorable, ya que al

obtener áreas del pico mayores, se tendrá una menor dispersión de los datos. La diferencia de áreas en las dos longitudes se puede apreciar en la tabla 11 por lo tanto la mejor longitud de onda donde es mejor medir es 214nm. Los resultados completos se encuentran reportados en el anexo 1.

Tabla 11. Comparación de las áreas de amoxicilina y bromhexina 210 y 214 nm*.

	210 nm		214 nm	
	amoxicilina	bromhexina	amoxicilina	bromhexina
Promedio	298248	8842	325068	9277
CV %	0.79	0.67	1.00	0.91

*El resultado es el promedio de 6 lecturas del mismo sistema.

1.5. Temperatura del capilar.

La fuerza del campo eléctrico que puede ser aplicada a través del capilar esta limitada por la conversión de energía eléctrica en calor. El calentamiento puede causar cambios en la viscosidad del buffer de corrida y un incremento en la difusión del analito. La generación de calor se puede minimizar llevando un control de la temperatura del capilar ¹⁷. Para demostrar lo anterior, se emplearon dos temperaturas de estudio a 25 °C y llevando un control a 20 °C, obteniendo los siguientes resultados indicados en la figura 9.

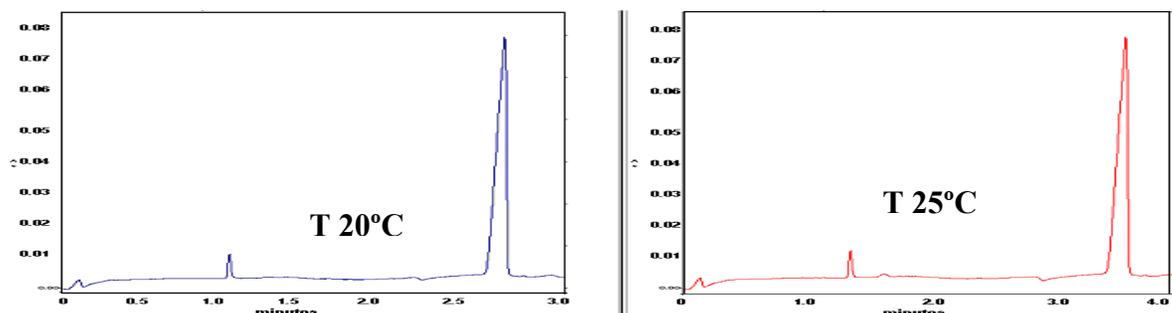


Figura 7. Efecto de la temperatura del capilar a 25°C y 20°C.

Condiciones: Capilar de sílice fundida, D.I. 50 µm, buffer citratos pH 3.0, inyección hidrodinámica 0.5 psi por 5 s, 30kV, polaridad normal del capilar, 214 nm. Las concentraciones empleadas de los analitos en cada temperatura son diferentes.

Al determinar la variación de las lecturas, se observa que a temperatura de 20 °C, la dispersión de los datos es mucho menor. Lo que permite una reproducibilidad entre lecturas. Esto se observa en la tabla 12. Los resultados de cada lectura se reportan en el anexo 1.

Tabla 12. Influencia de la temperatura del capilar en los coeficientes de variación de los tiempos de migración para la mezcla de amoxicilina y bromhexina. *

	T 25°C		T 20°C	
	amoxicilina	bromhexina	amoxicilina	bromhexina
Promedio	3,63	1,84	2,71	1,32
CV %	0,28	0,74	0,47	0,68

*El resultado es el promedio de 6 lecturas del mismo sistema.

1.6 Condiciones de almacenamiento del capilar

Antes de realizar cualquier tipo de ensayo, al inicio del día en general se debía acondicionar el capilar de sílice fundida, 5 min con agua, 5min HCl 0.1M, 7 min agua y 15 min con buffer de corrida ¹¹.

Sin embargo, este tratamiento del capilar no se presenta coeficientes de variación aceptables ya que el agua tiene un pH ligeramente ácido (aprox 6), después al ser lavado con ácido de pH=1, se tenía una gran desestabilización del pH interior del capilar, el cual debía después de trabajar a pH de 3.

Se probaron diferentes formas de almacenamiento y lavado del capilar. Primero se dejó en su estuche después de un lavado con agua al final del día de trabajo; al día siguiente el tiempo de migración no era estable comenzaba con un tiempo de 5.5 min para el pico de la amoxicilina y se iba disminuyendo el tiempo hasta 2.7min donde se estabilizaba, pero esto después de analizar muestras por más de 6 horas.

Tomando en cuenta esto, se analizó la situación, llegando a la conclusión, de que como se quedaba en agua toda la noche el pH de interior del capilar era el del agua y conforme se adecuaba al pH 3 del buffer era cuando se dejaba de recorrer el tiempo de migración de los analitos y se estabilizaba.

Se dejó entonces el capilar vacío, es decir antes de guardarlo se inyectaba aire a presión y se guardaba en el estuche, pero lamentablemente ocurría lo mismo que si se dejaba con agua, es decir, el capilar tarda varias horas en estabilizar los tiempos de migración de los analitos.

Finalmente, teniendo la teoría de que la estabilización de los tiempos de migración tiene que ver con la ionización de algunos grupos silanol, se probó dejar el capilar al final del día de trabajo lavado con buffer citratos 25mM a pH= 2.7, que era el pH de los sistemas. A fin de asegurar que no al evaporarse algo del buffer de las puntas se pudiera tapar el capilar, se pusieron viales en cada extremo del capilar con el mismo buffer y así se guardó el capilar en su estuche.

Con este procedimiento se logró que al volver a trabajar con el capilar, ya fuera al día siguiente o aún varios días después el tiempo de migración de los analitos estuviera estadísticamente constante y siguiendo con este procedimiento se hizo toda la validación.

1.7 Condiciones óptimas para validar el método

Una vez analizados todos estos parámetros del desarrollo analítico, se determinó que las condiciones óptimas con las que se debía llevar a cabo la validación son:

- I. Medio de disolución acetonitrilo HCl 0.1M
- II. Agitar 20 min.
- III. Buffer citratos 50mM.
- IV. longitud de onda de detección de 214 nm.
- V. temperatura del capilar de 20°C.
- VI. Dejar el capilar con buffer citratos 25mM pH= 2.7

Todas las condiciones electroforéticas bajo las cuales se trabajó durante la validación del método, se encuentran reportadas en la tabla 13.

Tabla 13. Parámetros de operación para el desarrollo del método analítico

Parámetro	Condición		
Aparato de EC	P/ACE MDQ, Beckman Coulter Software de análisis 32 KARAT Detector de arreglo de diodos (DAD)		
Capilar	Sílice fundida. 30.5 cm de largo total 20 cm de longitud efectiva 50 μm de diámetro interno		
Parámetros de operación			
Buffer de corrida	Buffer citratos 50 mM, pH 3.00.		
Modo de inyección	Hidrodinámico (1.5psi por 5 seg.).		
Voltaje	30 kV		
Tiempo de lavado entre corridas	3 min. con buffer citratos		
Detector	Arreglo de diodos (DAD)		
Tiempo típico de migración	Clorhidrato de Bromhexina: 1.3 min. Amoxicilina: 2.7 min. Tiempo de corrida total: 3.0 min		
Parámetros de integración			
	T_{ini}	T_{fin}	Valor
Valley to Valley	0	3.0	0
Width	0	3.0	0.05
Threshold	0	3.0	500

2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

El objetivo de un método es el producir los mejores resultados analíticos posibles y que sean confiables. Para obtener estos resultados, todas las variables del método deben de ser consideradas, incluyendo el procedimiento de muestreo, los pasos para la preparación de la muestra, todas las condiciones electroforéticas, el tipo de detección, etc. El alcance de la validación depende del propósito del método ¹.

La selección de las características del método va a depender del tipo y del uso para el cual se pretende emplear. Por ejemplo, un método de ensayo diseñado para disolución de producto terminado no debería ser utilizado para la determinación de los límites de cuantificación o detección de un principio activo. Sin embargo, si el método ha sido diseñado para monitorear la cantidad de trazas de un principio activo en un método de validación de muestras, el conocimiento de los límites de detección y cuantificación son apropiados y necesarios ¹⁸.

Por tanto, la selección de los parámetros de validación para cada ensayo o método de prueba deben de ser verificados caso por caso, para asegurar que los parámetros son apropiados para el uso que se pretende. Esto es aún más importante cuando se quieren validar métodos indicadores de estabilidad, porque estas validaciones son complejas, debido a que envuelven estudios de degradación forzada, hablando de muestras con productos de degradación conocidos ¹⁸.

En general las características analíticas para la validación del método son:

- I. Exactitud.
- II. Precisión.
- III. Especificidad.
- IV. Límite de detección (LD).
- V. Límite de cuantificación (LC).
- VI. Linealidad y rango.
- VII. Tolerancia.
- VIII. Robustez.

En función de la aplicación analítica del método serán los parámetros de desempeño a estudiar³²(tabla 14).

Tabla 14. Parámetros de desempeño a evaluar en función de la aplicación del método.

Parámetro de desempeño	Contenido/ Valoración /Potencia	Pruebas de impurezas		Identificación
		Contenido /Valoración	Límite	
Precisión / Adecuabilidad del sistema	+	+	+	*
Linealidad del sistema	+	+	-	-
Especificidad	+	+	+	+
Exactitud y repetibilidad	+	+	-	-
Linealidad del método	+	+	-	-
Precisión del método o precisión intermedia	+	+	-	-
Estabilidad analítica de la muestra	*	*	-	-
Límite de detección	-	-	+	-
Límite de cuantificación	-	+	-	-
Robustez	*	*	*	-
Tolerancia	*	*	*	-

+ si, - no, *puede, ser requerido dependiendo de la naturaleza del método³².

En el presente trabajo, el método desarrollado, tiene el propósito de cuantificar bromhexina y amoxicilina como contenido químico, por lo que los parámetros que a evaluar en la validación del método son:

- I. Adecuabilidad del sistema.
- II. Especificidad.
- III. Precisión y linealidad del sistema.
- IV. Exactitud y reproducibilidad.
- V. Precisión y linealidad del método.

2.1 Adecuabilidad del sistema

Esta prueba es la única reportada en la guía de validación de métodos analíticos del colegio nacional de QFB's, recomendada para todos los métodos analíticos, ya que permite verificar que el sistema de medición funciona apropiadamente, independientemente de las condiciones ambientales.

Por lo mencionado anteriormente, esta prueba es importante y fue evaluada primero. Para evaluar la adecuabilidad del sistema, se inyectó por sextuplicado una solución con una concentración de 1000 µg/ml de amoxicilina y 32 µg/ml de bromhexina. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Resultados del sistema de adecuabilidad de amoxicilina y bromhexina.

Iny.	bromhexina		amoxicilina	
	Tm	Área	Tm	Área
1	1.304	9241	2.746	313982
2	1.300	9262	2.746	318449
3	1.304	9245	2.783	315495
4	1.304	9228	2.775	314346
5	1.300	9205	2.787	310745
6	1.304	9278	2.742	311982
7	1.304	9236	2.746	313982
8	1.304	9274	2.758	316213
SD	0.002	24	0.018	2403
Prom	1.300	9246	2.76	314399
CV (%)	0.142	0.265	0.671	0.765

La resolución (R) entre los picos de amoxicilina y bromhexina de las lecturas reportadas de la tabla 15 y el número de platos teóricos (N) de cada uno de los mismos se encuentran reportados en la tabla 16. Los cálculos y resultados completos se reportan en el anexo 2.

Tabla 16. Promedios de la resolución (R) y del número de platos teóricos (N), de amoxicilina y bromhexina para la prueba de adecuabilidad.

	Promedio		Valores de referencia
	amoxicilina	bromhexina	
N	114300*	189100*	100 000 - 200 000 ³¹
R	14.14		>2.0 ¹¹

El resultado de esta muestra indica que el sistema electroforético funciona apropiadamente. Además se puede apreciar en los valores reportados en la tabla 16, que los picos muestran una buena resolución entre ellos, lo que indica que hay una buena separación de los componentes de la mezcla y el número de platos teóricos indica que hay una buena eficiencia en el proceso de separación, el valor de N obtenido se encuentra dentro del rango común obtenido con los voltajes que se aplica en EC, lo que mas importa para evaluar esto es la resolución.

Algunos autores indican que un valor de resolución (R) de 1.2 - 1.5 indica una separación completa ¹⁹. La resolución determinada indica que los componentes de la mezcla (amoxicilina y bromhexina) se encuentran completamente separados.

Algunos autores indican que la resolución aumenta con la cantidad de platos, por lo que es conveniente aplicar un voltaje elevado para lograr separaciones con alta resolución. En la electroforesis, al contrario que en la cromatografía la cantidad de platos no aumenta con la longitud de la columna y por lo tanto lo que se tomo en cuenta para aceptar adecuabilidad de este método es la resolución y el CV inferior al 2% ¹⁶.

2.2. Especificidad.

La determinación de la especificidad del método confirma que la medida de la señal es debida solamente al analito. Para determinar este parámetro, se analizó una solución estándar de 32 µg/ml de bromhexina y 1000 µg/ml amoxicilina, un placebo cargado al 100 % y una solución placebo, con la finalidad de realizar un estudio comparativo. Los resultados obtenidos se observan en la figura 8.

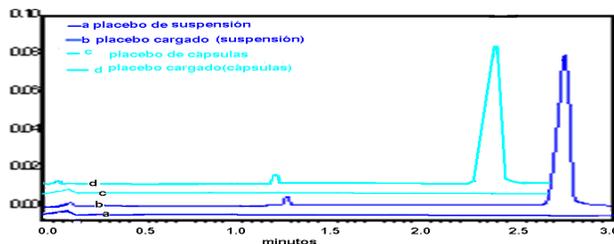


Figura 8. Comparación de resultados para un a) placebo (suspensión), c) placebo (capsulas) y un placebo cargado de amoxicilina y bromhexinab) suspensión, d) capsulas. Condiciones: Capilar de sílice fundida de 30.5 cm de longitud total, D.I 50 μ M, buffer citratos 50mM, inyección hidrodinámica 1.5psi por 5 s, 30kV, polaridad normal del capilar, 20°C.

En la guía de validación se indica, que para métodos de contenido / potencia / valoración, se deben analizar placebos del producto, como lo indica el método, muestras del producto, y cuando proceda: sustancias relacionadas, precursores, homólogos y una mezcla del producto con ellos o cualquiera de ellos.

En este caso, todos los parámetros del sistema se desarrollaron empleando estándares, dado que no se contaba con los productos de degradación de los analitos. A fin de realizar la prueba de especificidad se analizaron placebos blanco y cargados tanto de la suspensión que contaba con diez excipientes o ingredientes según su formulación que por confidencialidad no se mencionan, y en las cápsulas solo se tiene un excipiente, observándose que ninguno de los componentes de la formulación generan señal a esta longitud de onda con lo que se determina que no interfieren con la señal generada por los analitos (figura 8). Como muestra la figura 8, no aparecen otros picos serian atribuidos a los excipientes en el electroferograma, por lo que el método es específico para valorar el contenido de los analitos en las formas farmacéuticas mencionadas.

2.3 Precisión del sistema.

Para realizar la precisión del sistema se analizó la concentración establecido como el 100 % (32 μ g/ml de bromhexina y 1000 μ g/ml de amoxicilina) de una solución estándar, realizando el ensayo por sextuplicado, de acuerdo con lo establecido en la guía de validación para métodos analíticos según el colegio nacional de QFB's; los resultados se muestran a continuación en la tabla 17.

Tabla 17. Resultados de los tiempos de migración y áreas obtenidos.

Solució n	bromhexina		amoxicilina	
	Tm	Area	Tm	Area
1	1.304	9241	2.746	313982
2	1.301	9352	2.746	311449
3	1.304	9465	2.783	313495
4	1.300	9428	2.775	313446
5	1.302	9305	2.787	321735
6	1.304	9278	2.742	321982
SD	0.002	87.46	0.032	4461.15
Prom	1.300	9344	2.75	316348
CV (%)	0.153	0.936	1.163	1.410

Ya que la precisión del sistema indica el grado de dispersión entre una serie de mediciones bajo condiciones establecidas, y de acuerdo con los criterios de aceptación, en la tabla 17 se observa que el coeficiente de variación de las áreas se encuentra dentro de los límites de aceptación, por lo que se considera que el método es preciso.

2.4 Linealidad del sistema

La evaluación de la linealidad puede ser descrita como la caracterización de una curva de respuesta. Una gráfica de la respuesta en función de la concentración del analito, frecuentemente se espera que sea lineal en un rango específico de concentraciones, sin embargo, algunos ensayos generan curvas no lineales¹⁸.

En la tabla 18, se puede apreciar los valores de áreas con respecto a la concentración de amoxicilina presente en el sistema. Al graficar la respuesta (área) en función de la concentración del analito, se puede observar que presenta un comportamiento lineal (Gráfica 1).

La primera prueba que se puede realizar para verificar la linealidad de la respuesta consiste en calcular el coeficiente de variación del factor de respuesta de la recta de regresión. El factor de respuesta es la razón respuesta/concentración²². En la tabla 18 se puede observar

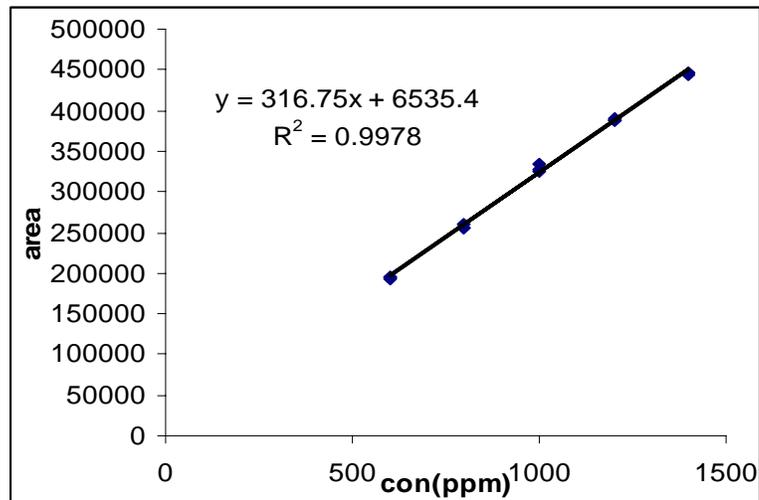
el resultado del cociente del área entre la concentración Si la relación concentración – respuesta en una zona determinada es una recta, el factor de respuesta será constante cualesquiera que sean los valores de los pares de concentración – respuesta (prueba F de la prueba de linealidad) ²².

Tabla 18. Resultados de las áreas en función de la concentración para amoxicilina.

amoxicilina			
Nivel (%)	Conc (ppm)	area	a/c
60	600	195423	325.70
	600	195908	326.51
	600	193355	322.26
80	800	259224	324.03
	800	256700	320.88
	800	256044	320.06
100	1000	334346	334.35
	1000	325495	325.50
	1000	328449	328.50
120	1200	388207	323.51
	1200	388902	324.09
	1200	389821	324.85
140	1400	446935	319.24
	1400	446395	318.85
	1400	444137	317.24
		Promedio	323.70
		SD	4.32
		CV (%)	1.33

A partir de los resultados de los factores de respuesta calculados, se determina la media y después el coeficiente de variación (CV expresado en porcentaje). Un valor bajo de este coeficiente permite afirmar casi con certeza que la representación concentración – respuesta es una recta ²². La Norma Oficial Mexicana 177 SSA, en el apartado para linealidad del sistema, marca como requisito que el error relativo (coeficiente de variación) de la regresión lineal debe ser menor al 2 %. Como se puede observar en la tabla 18, el valor de

este coeficiente es de 1.37, por lo que cumple con este requisito establecido en la norma. En este caso es importante resaltar que idealmente para realizar esta prueba se deben utilizar estándares.



Gráfica 1. Relación del área en función de la concentración para amoxicilina, en un intervalo de 60-140%.

En la gráfica 1, se puede observar que hay un comportamiento lineal entre la concentración de amoxicilina y el área (respuesta del analito), es decir que el área es proporcional a la concentración. Una forma adicional de demostrar que la respuesta es debida a la concentración del analito, es a través de un análisis de varianza (tabla 19).

Cuando se tiene una variable dependiente o respuesta y k variables independientes o de regresión, la relación entre estas variables se caracteriza por un modelo matemático conocido como ecuación de regresión. El modelo de regresión se ajusta a un conjunto de datos muestrales.

El análisis de varianza en un experimento diseñado ayuda a determinar que factores son importantes, usándose el de regresión para construir un modelo cuantitativo que relaciona los factores importantes con la respuesta.

Al realizar un análisis de regresión se desea determinar la relación entre una sola variable de regresión x y la respuesta y . Usualmente se supone que la variable de regresión x es

continua y controlable por el experimentador ¹². En este caso, la variable independiente es la concentración y la dependiente es el área de los picos.

Para establecer hipótesis relacionadas con la significación de la regresión, se debe proponer que:

H_0 : Los datos no se ajustan a un modelo lineal.

H_a : Los datos se ajustan a un modelo lineal

Tabla 19. Análisis de varianza realizado para determinar la linealidad del sistema de amoxicilina considerando un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

	<i>G.L.</i>	<i>S.C.</i>	<i>C.M.</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	1.20E+11	1.20E+11	5875.37	1.1822E-18
Residuos	13	266399280	20492252.3		
Total	14	1.21E+11			

El análisis de varianza (tabla 19), muestra que el valor de F crítica es menor que el valor de F calculada, por lo que se rechaza la hipótesis nula. Comprobando que la relación que existe entre la concentración y el área de pico es lineal para amoxicilina.

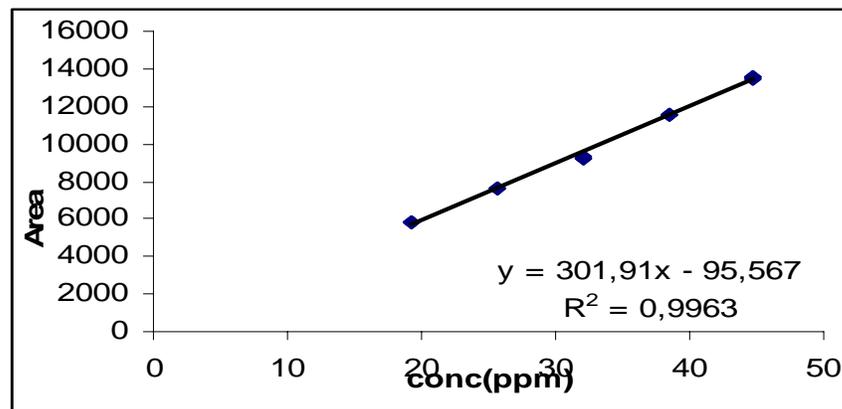
Tabla 20. Resultados de las áreas en función de la concentración para bromhexina en un rango del 60 al 140 %.

bromhexina			
Nivel (%)	conc (ppm)	área	A/C
60	19,2	5835	303,91
	19,2	5819	303,07
	19,2	5856	305,00
80	25,6	7626	297,89
	25,6	7673	299,73
	25,6	7649	298,79
100	32	9273	289,78
	32	9229	288,41
	32	9239	288,72
120	38,4	11562	301,09
	38,4	11509	299,71
	38,4	11564	301,15
140	44,8	13506	301,47
	44,8	13549	302,43
	44,8	13595	303,46
		Promedio	298,97
		SD	5,53
		CV(%)	1,85

Los resultados de la linealidad del sistema para bromhexina se pueden observar en la tabla 20, en la cual se muestra la relación entre el área y la concentración.

En esta misma tabla se pueden observar los valores correspondientes al cociente del área entre la concentración para bromhexina. Como ya se menciono anteriormente, en la NOM 177 SSA se menciona un valor de $CV \leq 2\%$, en este caso se observa un CV menor a este valor, por lo que cumple con este requisito solicitado por la norma.

Para poder observar el tipo de relación se graficó la respuesta en función de la concentración del analito, esta se muestra en la gráfica 2.



Gráfica 2. Relación del área en función de la concentración para bromhexina, en un intervalo de 60-140%.

En el Gráfica 2, se observa la relación entre área y la concentración es directamente proporcional, lo cual indica que en este rango de concentraciones para bromhexina, la respuesta es lineal y dependiente de la concentración, lo que permite interpolar una respuesta para conocer una concentración determinada de este analito en alguna muestra. Una forma de corroborar que la respuesta es debida a la concentración del analito es mediante un análisis de varianza, el cual se muestra en la tabla 21.

Tabla 21. Análisis de varianza realizado para determinar la linealidad del sistema de bromhexina considerando un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

	<i>G.L.</i>	<i>S.C.</i>	<i>C.M.</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	112005770	112005770	3475.27	3.5563E-17
Residuos	13	418981.967	32229.38		
Total	14	112424752			

El análisis de varianza (tabla 21), muestra que el valor de F calculado es mayor que el crítico, por lo que los datos se ajustan a un modelo lineal para bromhexina, a un nivel de significancia de 0.05.

Los parámetros estadísticos más importantes de la regresión de la prueba de linealidad, para amoxicilina y bromhexina, se resumen en la tabla 22.

Tabla 22. Parámetros obtenidos del análisis de regresión de la linealidad del sistema para amoxicilina y bromhexina.

Parámetros	amoxicilina	bromhexina
R	0,9988	0,9981
R²	0,9978	0,9963
Pendiente (m)	316.75	301.91
Intercepto (b)	6535.4	-95.56
IC(β_1)	307.83 – 325.68	289.97 – 313.85
IC(β_0)	-2742.38–15813.18	-463.50 – 272.37

El coeficiente de determinación se usa para juzgar la adecuación del modelo de regresión. A menudo se menciona a R^2 como la proporción de variabilidad de los datos explicada por el modelo de regresión ¹².

En la tabla 22 se puede observar que en ambas curvas, presentan un alto porcentaje de variación de la respuesta explicado por el modelo de regresión (R^2). Es importante mencionar que el coeficiente R^2 no permite por si solo verificar si la representación concentración – respuesta corresponde a una recta.

El cálculo de este coeficiente es importante para verificar la presencia de una relación entre dos variables y no define la linealidad de manera absoluta.

Los parámetros importantes usados para evaluar la variabilidad de la línea de regresión y de los datos son los intervalos de confianza y de predicción ²⁴. El rango lineal de

detectabilidad debe obedecer la ley de Beer y debe de ser dependiente del compuesto analizado y del detector usado³⁸.

El valor de la pendiente (diferente de cero) en la linealidad del sistema se encuentra determinado por las propiedades de absortividad de cada uno de los analitos, por lo que el valor de esta no es un parámetro determinante para esta prueba.

Para evaluar la ausencia de errores sistemáticos es un prerequisite que el intercepto sea insignificante, esto debe ser demostrado experimentalmente a través de un cálculo de regresión lineal que indique que el intercepto pasa a través del cero. Para poder ser demostrado estadísticamente se debe obtener el intervalo de confianza del intercepto, usualmente al 95 % de significancia. Si este incluye al cero, el intercepto puede ser asumido como cero, por lo tanto el intercepto es considerado estadísticamente insignificante.²⁴

El intervalo del intercepto (IC (β_0)) debe contener al cero, esto es muy importante, por que idealmente indica que a un valor de concentración de cero el valor de la respuesta es cero, es decir que cuando no está presente el analito, no hay respuesta significativa del equipo. Si este parámetro se cumple, evita la sobrestimación (cuantificar una mayor cantidad de lo que realmente hay en la muestra) o la subestimación (cuantificar menos de lo que realmente está en la muestra).

2.5 Exactitud y Repetibilidad del método.

Para evaluar la exactitud y repetibilidad del método se preparó un placebo analítico con los componentes incluidos en la formulación. A la cantidad de placebo analítico se le adicionó la cantidad de analito correspondiente al 80, 100 y 120%, teniendo concentraciones de 800 – 1200 $\mu\text{g/mL}$ para amoxicilina y 27–38 $\mu\text{g/mL}$ para bromhexina, por sextuplicado, en un día y el mismo analista, bajo las condiciones normales de operación. Los resultados obtenidos se indican en la tabla 23 y 24.

En la tabla 23 se observa que el promedio aritmético del porcentaje de recobro para bromhexina se encuentra dentro del intervalo establecido; así mismo el coeficiente de variación del porcentaje de recobro es menor al 2% y el intervalo de confianza del porcentaje incluye el 100%.

Tabla 23. Resultados del % de recobro de bromhexina partir de placebos cargados para la Evaluación de la exactitud y repetibilidad del método.

		bromhexina			
		cápsulas		suspensión	
Nivel %	Cant adic	Cant rec (ppm)	%recuperado	Cant rec (ppm)	%recuperado
80	27	27,03	99,89	26,95	100,2
	27	27,06	99,78	27,13	99,52
	27	26,91	100,32	27,06	99,78
	27	27,05	99,82	27,09	99,65
	27	26,88	100,46	27,01	99,95
	27	27,05	99,82	27,22	99,2
100	34	34,44	98,72	34,10	99,72
	34	33,96	100,11	33,79	100,61
	34	33,65	101,04	33,49	101,53
	34	33,88	100,36	34,04	99,88
	34	33,60	101,2	33,66	101,02
	34	33,77	100,67	33,68	100,95
120	38	37,59	101,09	38,65	98,33
	38	37,94	100,17	38,65	98,31
	38	38,11	99,72	38,76	98,04
	38	38,41	98,93	38,72	98,15
	38	38,16	99,59	37,75	100,66
	38	38,06	99,85	38,13	99,65
		promedio	100,09	promedio	99,73
		SD	1,67	SD	1,03
		CV	1,67	CV	1,03
		IC(μ)	98.42 - 101.76	IC(μ)	98.7 – 100.76

Tabla 24. Resultados del % de recobro de amoxicilina a partir de placebos cargados para la evaluación de la exactitud y repetibilidad del método.

		amoxicilina			
		cápsulas		suspensión	
Nivel%	Cant ad	Cant rec(ppm)	%recuperado	Cant rec (ppm)	%recuperado
80	600	591,95	101,36	606,86	98,87
	600	592,71	101,23	602,23	99,63
	600	598,62	100,23	607,47	98,77
	600	605,94	99,02	606,43	98,94
	600	600,12	99,98	603,68	99,39
	600	601,08	99,82	598,50	100,25
100	1000	1012,97	98,72	1000,40	99,96
	1000	998,90	100,11	1015,33	98,49
	1000	989,71	101,04	1013,38	98,68
	1000	996,41	100,36	1013,07	98,71
	1000	988,14	101,2	1003,21	99,68
	1000	993,34	100,67	1003,21	99,68
120	1200	1187,06	101,09	1208,82	99,27
	1200	1197,96	100,17	1199,04	100,08
	1200	1203,37	99,72	1220,50	98,32
	1200	1212,98	98,93	1205,30	99,56
	1200	1204,94	99,59	1202,16	99,82
	1200	1201,80	99,85	1207,61	99,37
		promedio	100,17	promedio	99,30
		SD	1,81	SD	1,58
		CV	1,81	CV	1,58
		IC(μ)	98.36 - 101.98	IC(μ)	97.72 - 100.88

En el caso de amoxicilina, en la tabla 24 se observa que de la misma forma que el promedio aritmético del porcentaje de recobro se encuentra dentro del intervalo establecido y el coeficiente de variación del porcentaje es menor al 2%. El intervalo de confianza del porcentaje de recobro incluye el 100%. Con los resultados obtenidos, se determinó que el método cumple con los criterios establecidos en la guía de validación por lo que es exacto.³²

2.6. Linealidad del método

Si un químico analítico desarrolla un método nuevo para la determinación de un analito concreto, el método debe ser validado (entre otras pruebas) aplicándolo a un número de muestras que contengan una concentración ya conocida. El interés principal al realizar una comparación entre la cantidad conocida y la recuperada por el método analítico será la identificación de errores sistemáticos, es decir, conocer si el método analítico proporciona resultados significativamente más altos o más bajos que la cantidad conocida.

Tabla 25. Resultados del % recuperado de amoxicilina a partir de placebos (cápsulas) cargados para la linealidad del método.

Nivel (%)	cápsulas					
	Tiempo	Área	Conc(ppm)	Cant ad (ppm)	Cant rec (ppm)	%
60	2.71	195474	600	626	618	98.82
	2.71	195488	600	626	619	98.89
	2.71	195386	600	626	622	99.44
80	2.73	254188	800	834	841	100.91
	2.76	253939	800	834	833	99.87
	2.75	254215	800	834	842	101.02
100	2.71	330545	1000	1042	1028	98.67
	2.71	324684	1000	1042	1033	99.14
	2.71	324707	1000	1042	1034	99.21
120	2.72	388673	1200	1250	1241	99.32
	2.72	386071	1200	1250	1255	100.43
	2.70	386173	1200	1250	1259	100.71
140	2.73	441348	1400	1459	1439	98.62
	2.75	441959	1400	1459	1460	100.08
	2.75	441959	1400	1459	1460	100.08
Promedio	2.73					99.68
SD	0.019					0.823
CV (%)	0.69					0.83

Queda claro que si cada resultado obtenido del método conduce a un resultado idéntico a la cantidad de analito conocida, la recta de regresión tendrá una ordenada en el origen 0, y una pendiente y un coeficiente de correlación de 1.

En la práctica, por supuesto, esto nunca ocurre, incluso estando completamente ausentes los errores sistemáticos, los errores aleatorios aseguran que los resultados del método analítico no darán resultados en exacta concordancia para todas las muestras ⁹.

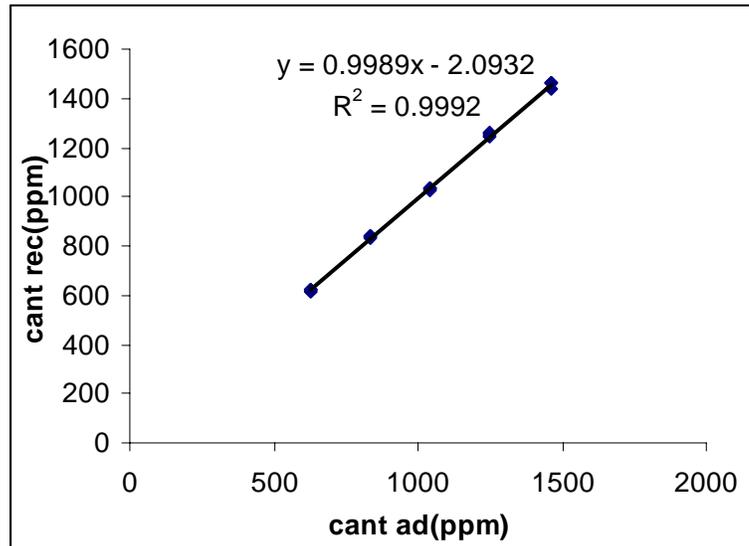
La linealidad del método se evaluó mediante la estimación de la concentración de placebos cargados en un rango de concentración de 19.2-44.8 $\mu\text{g/ml}$ para bromhexina y de 600 - 1400 $\mu\text{g/ml}$ para amoxicilina, preparados por triplicado, en un día y un analista. En la tabla 25 se indican los resultados obtenidos.

Tabla 26. Resultados del % recuperado de amoxicilina a partir de placebos (suspensión) cargados para la linealidad del método.

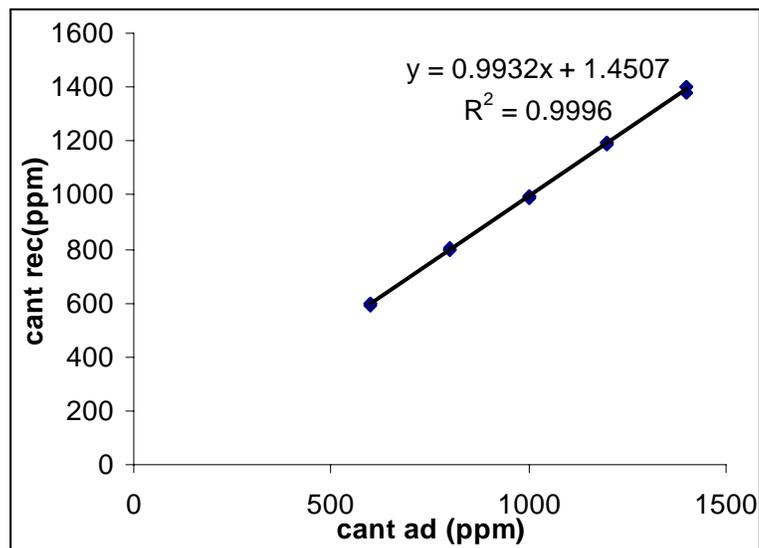
suspensión						
Nivel (%)	Tiempo	Área	Conc (ppm)	Cant ad (ppm)	Cant rec (ppm)	%
60	2.71	194464	600	600	599	99.82
	2.71	194468	600	600	593	98.89
	2.71	194366	600	600	597	99.44
80	2.75	253178	800	800	799	99.91
	2.75	253979	800	800	799	99.87
	2.75	253275	800	800	800	100.01
100	2.73	330505	1000	1000	997	99.67
	2.71	323654	1000	1000	991	99.14
	2.71	323757	1000	1000	992	99.21
120	2.72	385663	1200	1200	1192	99.32
	2.72	385061	1200	1200	1193	99.43
	2.73	385163	1200	1200	1185	98.71
140	2.73	440358	1400	1400	1381	98.62
	2.75	440969	1400	1400	1401	100.08
	2.75	440959	1400	1400	1401	100.08
Promedio	2.73					99.48
SD	0.02					0.49
CV	0.63					0.49

En las tablas 25 y 26 se observa que el coeficiente de variación del promedio aritmético del porcentaje de recobro dentro del rango del 60 al 140% es menor al 2%, por lo que inicialmente cumple con este parámetro.

Una vez calculada la cantidad recuperada se construyó un Gráfica, para determinar la linealidad de los datos, los resultados obtenidos se muestran en los Gráfica 3 y 4.



Gráfica 3. Gráfica de la cantidad adicionada vs la cantidad recuperada de amoxicilina a partir de la preparación de placebos (cápsulas) cargados, en un rango de 60 – 140 %.



Gráfica 4. Gráfica de la cantidad adicionada vs la cantidad recuperada de amoxicilina a partir de la preparación de placebos (suspensión) cargados, en un rango de 60 – 140 %.

Considerando la concentración medida como variable y , y la concentración adicionada como la variable x , se debe calcular la pendiente y el intercepto de la línea de regresión. En una situación ideal donde se obtienen exactamente los mismos resultados, la pendiente de la regresión debe ser de 1 y el intercepto debe ser 0. Sin embargo esto nunca ocurre en la práctica, aun si los errores sistemáticos están ausentes, la presencia de errores aleatorios

conduce a tener una dispersión de los puntos alrededor de la línea del cuadrado medio y pequeñas desviaciones de la estimación de la pendiente y el intercepto 1 y 0, respectivamente ⁷.

Una pendiente calculada que es significativamente diferente de 1 indica la presencia de un error sistemático proporcional. Un intercepto calculado que es significativamente diferente de 0 revela la presencia de un error sistemático constante ⁷.

En los Gráficas 3 y 4 se observa que el coeficiente de determinación es mayor a 0.98, y al determinar el valor de la ordenada al origen no es significativamente diferente de cero, de la misma forma el valor de la pendiente es muy cercano a uno.

Para determinar la linealidad de los datos, se realizó un análisis de varianza al 95 % de confianza en el cual se observa que el valor de F calculada es mayor que el valor crítico de F, por lo que los datos se ajustan a un modelo lineal, los resultados se muestran en la tabla 27 y 28.

Tabla 27. Análisis de varianza para amoxicilina (cápsulas), $\alpha = 0.05$.

	<i>G.L</i>	<i>S.C</i>	<i>C.M</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	1297491.65	1297491.65	16679.17	1.35E-21
Residuos	13	1011.28	77.79		
Total	14	1298502.93			

Tabla 28. Análisis de varianza para amoxicilina (suspensión), $\alpha = 0.05$.

	<i>G.L</i>	<i>S.C</i>	<i>C.M</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	1183751.38	1183751.38	34128.23	1.29E-23
Residuos	13	450.91	34.69		
Total	14	1184202.29			

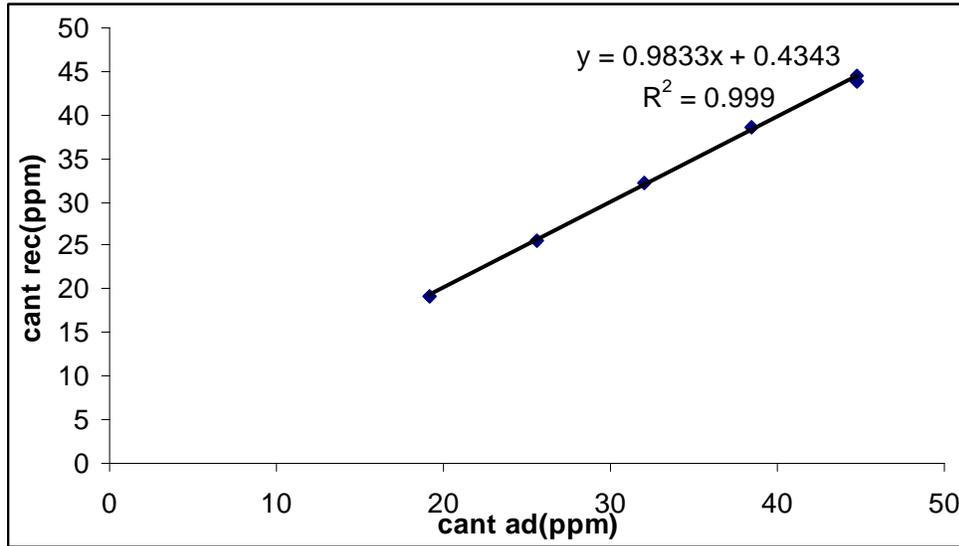
Tabla 29. Resultados del % recuperado de bromhexina a partir de placebos cargados (cápsulas) para la linealidad del método.

bromhexina(cápsulas)						
Nivel (%)	Tiempo	Área	Conc(ppm)	Cant ad (ppm)	Cant rec (ppm)	%
60	1.3	5884	19.2	19.2	19.15	99.74
	1.3	5823	19.2	19.2	19.14	99.69
	1.31	5933	19.2	19.2	19.16	99.79
80	1.35	7642	25.6	25.6	25.55	99.80
	1.3	7839	25.6	25.6	25.58	99.92
	1.3	7899	25.6	25.6	25.59	99.96
100	1.3	9288	32	32	32.1	100.31
	1.3	9391	32	32	32.1	100.31
	1.31	9304	32	32	32.12	100.38
120	1.32	11571	38.4	38.4	38.51	100.29
	1.32	11757	38.4	38.4	38.54	100.36
	1.3	11794	38.4	38.4	38.54	100.36
140	1.34	13443	44.8	44.8	43.93	98.06
	1.3	13536	44.8	44.8	43.94	98.08
	1.37	13536	44.8	44.8	44.54	99.42
Promedio	1.31					99.77
SD	0.02					0.75
CV (%)	1.67					0.75

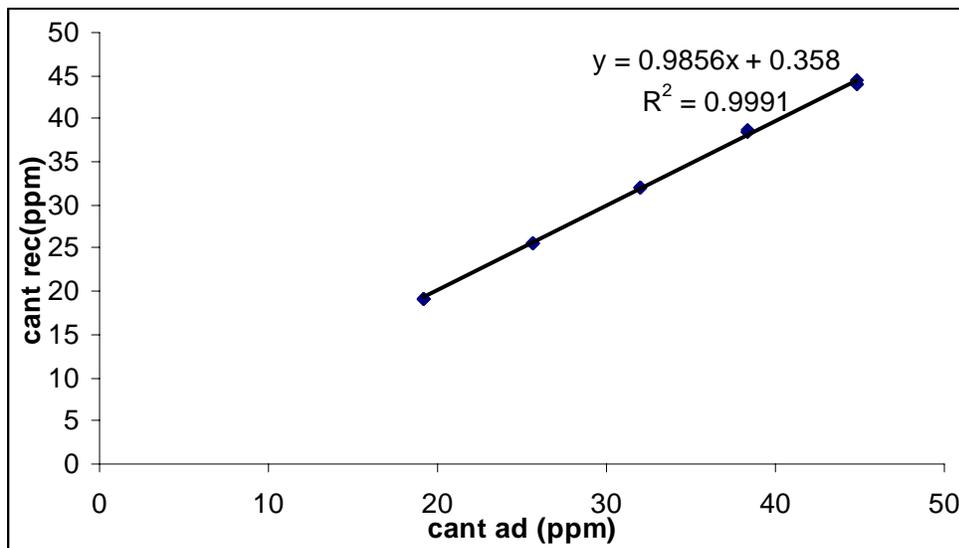
Tabla 30. Resultados del % recuperado de bromhexina a partir de placebos cargados (suspensión) para la linealidad del método.

bromhexina (suspensión)						
Nivel (%)	Tiempo	Área	Conc (ppm)	Cant ad (ppm)	Cant rec (ppm)	%
60	1.3	5884	19.2	19.2	19.1	99.48
	1.3	5823	19.2	19.2	19.19	99.95
	1.31	5933	19.2	19.2	19.15	99.74
80	1.35	7642	25.6	25.6	25.49	99.57
	1.3	7839	25.6	25.6	25.56	99.84
	1.3	7899	25.6	25.6	25.59	99.96
100	1.3	9288	32.0	32.0	32.10	100.31
	1.3	9391	32.0	32.0	32.13	100.41
	1.31	9304	32.0	32.0	31.98	99.94
120	1.32	11571	38.4	38.4	38.6	100.52
	1.32	11757	38.4	38.4	38.56	100.42
	1.3	11794	38.4	38.4	38.44	100.10
140	1.34	13443	44.8	44.8	43.96	98.13
	1.3	13536	44.8	44.8	44.06	98.35
	1.37	13536	44.8	44.8	44.56	99.46
Promedio	1.31					99.75
SD	0.02					0.70
CV	1.67					0.70

En las tablas 29 y 30 se determinó el coeficiente de variación del porcentaje recuperado para bromhexina en placebos cargados (cápsulas y suspensión), el cual es menor al 2 %, por lo que cumple con el criterio de aceptación establecido.



Gráfica 5. Gráfica de la cantidad adicionada vs la cantidad recuperada de bromhexina (cápsulas) a partir de la preparación de placebos cargados, en un rango de 60 – 140 %.



Gráfica 6. Gráfica de la cantidad adicionada vs la cantidad recuperada de bromhexina (suspensión) a partir de la preparación de placebos cargados, en un rango de 60 – 140 %.

En los Gráfica 5 y 6 se muestran las ecuaciones de cada recta, el valor de R^2 es mayor a 0.98, el valor de la pendiente es cercano a uno y el intercepto es prácticamente de cero.

Para evaluar si los datos se ajustan a un modelo lineal, se realizó un análisis de varianza, en los cuales se observa en las tablas 31 y 32, que el valor de F calculada es mucho mayor que el valor crítico de F; por lo cual se determinó que los datos se ajustan a un modelo lineal, a un 95% de confianza.

Tabla 31. Análisis de varianza para bromhexina (cápsulas), $\alpha = 0.05$.

	<i>G.L</i>	<i>S.C</i>	<i>C.M</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	1188.06	1188.06	13257.01	6.0087E-21
Residuos	13	1.16	0.0896		
Total	14	1189.22			

Tabla 32. Análisis de varianza para bromhexina (suspensión), $\alpha = 0.05$.

	<i>G.L</i>	<i>S.C</i>	<i>C.M</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	1193.73	1193.73	15188.54	2.484E-21
Residuos	13	1.02	0.08		
Total	14	1194.75			

Tabla 33. Parámetros estadísticos obtenidos de la regresión lineal

Parámetro	amoxicilina		bromhexina	
	Cápsulas	Suspensión	Cápsulas	Suspensión
R	0.9990	0.9996	0.9995	0.9996
R²	0.9982	0.9932	0.9990	0.9991
Pendiente (m)	0.9989	0.9932	0.9833	0.9856
Intercepto (b₀)	-2.04	1.45	0.43	0.36
CV_{y/x}	1.69	0.83	0.63	0.49
IC(B₁)	0.31 -1.69	0.98 -1.00	0.98 - 1.00	0.97- 1.01
IC(B₀)	-6.43 - 2.35	-10.62-13.52	-0.18 - 1.05	-0.22 - 0.93
CV	1.69	0.83	0.63	0.49
IC(μ)	100.16 - 101.59	98.85 - 100.5	100.16 - 101.59	100.16 - 101.59

En la tabla 33 se muestran los parámetros estadísticos obtenidos de la regresión lineal en donde se determinó el intervalo de confianza del porcentaje de recobro, el cual incluye en general el valor del 100% y para ambos analitos el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluye dentro del intervalo del 98 al 102% aceptado por las guías de validación.³²

El intervalo de confianza de la pendiente incluye la unidad, y el de la ordenada al origen incluye el cero tanto para amoxicilina como para bromhexina. Una vez analizados los datos, se determinó que el método cumple con los parámetros de linealidad establecidos en la guía de validación.³²

2.7 Precisión del método (precisión intermedia)

La estimación de este parámetro, permite investigar el efecto del analista y del día, así como estimar la variabilidad entre analistas (reproducibilidad interanalistas), la variabilidad entre días (reproducibilidad interdías) y la variabilidad del método analítico (repetibilidad). Este parámetro es de utilidad cuando se tiene interés en determinar el grado de tolerancia del método a estas fuentes de variación³².

La precisión intermedia del método se evaluó mediante la estimación por triplicado del porcentaje de recobro a partir de placebos cargados al 100% de amoxicilina y bromhexina en dos días diferentes y por dos analistas diferentes. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 34 y 35.

En la tabla 34 se observa que el día y el analista no son parámetros que interfieran con la reproducibilidad del método, ya que en ambos casos para el amoxicilina los coeficientes de variación del porcentaje de recobro obtenido tanto en diferentes días como por diferentes analistas son menores al 2 %. De la misma forma, en la tabla 35 se indican los porcentajes de recobro obtenidos para bromhexina en dos días y dos analistas, en donde se observa que los coeficientes de variación son menores al 2 % por lo que cumplen con el criterio de aceptación establecido para este parámetro.

Tabla 34. Coeficientes de variación de los porcentajes de recobro de amoxicilina obtenidos en dos días y por dos analistas.

amoxicilina	cápsulas			suspensión		
	% Recobro		CV	% Recobro		CV
	Analista 1	Analista 2		Analista 1	Analista 2	
Día 1	99.30	99.70	1.04	98.95	100.24	1,34
	97.51	100.04		99.13	99.98	
	100.19	98.23		99.28	100.89	
CV	0.31	1.05		1,23	1,78	
Día 2	100.01	100.00	1.24	99.72	98.49	1,26
	99.48	100.07		100.61	98.27	
	100.45	100.51		99.88	99.66	
CV (%)	0.55	0.67		1.55	1,78	
		CV global	1.34			1.25

Tabla 35. Coeficientes de variación de los porcentajes de recobro de bromhexina obtenidos en dos días y por dos analistas.

bromhexina	suspensión			cápsulas		
	% Recobro		CV	% Recobro		CV
	Analista 1	Analista 2		Analista 1	Analista 2	
Día 1	101.75	102.01	0.72	98.95	98.26	1,04
	101.21	99.98		101.23	98.71	
	101.76	101.55		99.28	99.48	
CV	0.31	1.05		1,23	1,78	
Día 2	99.98	97.98	1.11	98.04	98.95	1,27
	100.71	97.97		98.26	100.52	
	99.62	99.11		101.20	99.13	
CV (%)	0.55	0.67		1.55	1,78	
		CV global	1.43			1.14

En la tabla 36, se realizó un resumen de los criterios de aceptación para cada uno de los parámetros de validación del método, de acuerdo a lo establecido en la referencia. Además, se observa que todos los parámetros evaluados para la validación del método para la cuantificación de amoxicilina y bromhexina como contenido químico, cumplen con los criterios de aceptación establecidos, por lo que el método puede ser aplicado en el análisis de suspensión y cápsulas.

Tabla 36. Resumen de los resultados de la validación del método para amoxicilina y bromhexina.

Parámetro de desempeño	Criterio de aceptación	Resultado del método		Observación		
		amoxicilina	Bromhexina			
Adecuabilidad	$CV \leq 2\%$ para la respuesta analítica $R > 2$	CV = 0.27 R = 14.14	CV = 0.77 R = 14.14	Aceptado		
Precisión del sistema	$CV \leq 1.5\%$ para la respuesta analítica	CV = 1.41	CV = 0.94	Aceptado		
Linealidad del sistema	$R^2 \geq 0.98$ IC(β_1) no debe incluir el cero IC(β_0) debe incluir el cero $CV_{A/C} \leq 2\%$	$R^2 = 0.9978$ IC(β_1) = 307.83 – 325.68 IC(β_0) = -2742.38 – 15813.18 $CV_{A/C} = 1.33\%$	$R^2 = 0.9963$ IC(β_1) = 289.97 – 313.85 IC(β_0) = -463.0 – 272.37 $CV_{A/C} = 1.85\%$	Aceptado		
Especificidad	La respuesta debe ser debida al analito	No hay interferencia de los excipientes con el analito	No hay interferencia de los excipientes con el analito	Aceptado		
Exactitud y repetibilidad	IC(μ) debe incluirse en el intervalo de 98 – 102 % CV de recobro < 2%	cápsulas IC(μ) = 98.42 – 101.76 CV = 1.67	Suspensión IC(μ) = 98.7 – 100.76 CV = 1.03	Cápsulas IC(μ) = 98.36 – 101.98 CV = 1.81	Suspensión IC(μ) = 98.27 – 100.33 CV = 1.03	Aceptado
Linealidad del método	<i>Cantidad adicionada vs cantidad recuperada</i> $R^2 \geq 0.98$ IC(β_1) debe incluir la unidad IC(β_0) debe incluir el cero $CV_{y/x}$ del % de recobro < 2%	$R^2 = 0.9992$ IC(β_1) = 0.98 – 1.01 IC(β_0) = -0.02 – 0.01 $CV_{y/x} = 0.86\%$	$R^2 = 0.9996$ IC(β_1) = 1.00 – 1.02 IC(β_0) = -0.0042 – 0,00096 $CV_{y/x} = 0.63\%$	Aceptado		
	<i>Porcentaje de recobro</i> IC(μ) debe incluirse en el intervalo de 98 – 102 % CV de recobro < 2%	IC(μ) = 98.85 – 100.50 CV = 0.83	IC(μ) = 100.16 – 101.59 CV = 0.71	Aceptado		
Precisión intermedia	$CV \leq 2\%$	CV = 1.06	CV = 1.43	Aceptado		

V. CONCLUSIONES

Se optimizó una metodología analítica que permite la separación y cuantificación de amoxicilina y bromhexina por la técnica de electroforesis capilar tanto en una suspensión oral como en cápsulas. Las condiciones óptimas determinadas para el análisis son: buffer citratos 50mM pH 3.0, detección a 214 nm, longitud total de 30.5 cm y temperatura de 20°C del capilar y una inyección hidrodinámica (1.5 psi por 5 s).

Se realizó la validación del método para la determinación de contenido químico de amoxicilina y bromhexina, evaluándose los parámetros de adecuabilidad, precisión y linealidad del sistema y del método, especificidad, exactitud y repetibilidad, mismos que cumplen con los criterios especificados en la guía de validación de métodos analíticos del colegio nacional de QFB's, por lo que puede utilizarse para realizar el control de calidad de inyectables que contengan estos analitos de una forma rápida, económica y confiable.

VI. REFERENCIAS



LIBROS

- [1] ADAMOVICS, J. A. (1997). "Chromatographic analysis of pharmaceuticals. Chromatographic science series". Segunda Edición, Ed. Marcel Dekker, USA. Vol. 74.
- [2] FLOREY, K. (1990). "Analytical profiles of drug substances". Ed. Academic press, USA. Vol. 19.
- [3] MOFFAT, A. C. , Osselton, M. D., Widdop, B. (2004). "Clarke's Analysis of Drugs and Poisons". Tercera edición.
- [4] GENARO, F. (2006). "Remington. The science and practice of pharmacy". Vigésimo primera Edición. Ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- [5] LIVINGSTONE, C. (1991). "Therapeutic Drugs". Vol 1. Sir Coli y Dallery, Madrid.
- [6] LUNN, G. (2000). "Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis". Ed. Wiley-Interscience Publication, USA.
- [7] MASSART D.L, Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., et.al. (1997). "Handbook of chemometrics and qualimetrics". Part A. Ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- [8] MEDINA, C. (2004). "Compliance handbook for pharmaceuticals. Medical devices and biologics. Drugs and the pharmaceutical science". Ed. Marcel Dekker, USA.
- [9] MILLAR N. James; Millar C. Jane. (2002). "Estadística y Quimiometría para química analítica". Cuarta Edición. Prentice Hall, España.
- [10] MILNE, G. (2002). "Drugs: Synonyms and Properties". Segunda Edición. Ed. Ashgate, Sydney.
- [11] CRUZ O.,D.A., TORRES V.,K.G., Revilla V.,A.L., Lopez A., R., Desarrollo de una metodología analítica para la determinación de bromhexina y amoxicilina en formulaciones farmacéuticas por electroforesis capilar. Tesis de Licenciatura, UNAM FES-Cuautitlán, 2006.

-
- [12] MONTGOMERY, D.C. “Diseño y análisis de experimentos”. Grupo editorial Iberoamérica. México 1991.
- [13] OHANNESIAN, L.; Streeter, A.J. (2002). “Handbook of pharmaceutical analysis”. Ed. Marcel Dekker, USA. Vol. 117.
- [14] POTTER, M. C., Wiggert, D.C. (2002). “Mecánica de fluidos”. Tercera edición. Ed. Thompson learning Ibero. USA.
- [15] RODRÍGUEZ, D.R. (2005). “Analytical Techniques for biopharmaceutical development”. Editorial Marcel Dekker, USA.
- [16] SKOOG, A., Douglas, (2000). “Química Analítica”. 7ª edición. Mc Graw – Hill. México.
- [17] WATSON, D. G. (2005). “Pharmaceutical analysis. A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists”. Segunda Edición, Ed. Elsevier, China.
- [18] CARSTENSEN, J. T.; Rhodes, C. T. (2000). “Drug stability. Principles and practices”. Tercera Edición. Editorial Marcel Dekker, USA. Vol. 107.
- [19] CASTILLO, R.M.A., Revilla, V. A. L, López, A. R. (2002). Fundamentos sobre electroforesis capilar. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- [20] CHANNESIAN, L. (2002). “Handbook of pharmaceutical análisis. Drugs and the pharmaceutical science”. Ed. Marcel Dekker, USA. Vol. 117.
- [21] CHOW, C. C., Lee, Y. C., Lam, H. (2004). “Analytical method validation and instrument performance verification”. Ed. Wiley-Interscience, USA.
- [22] COHEN, Y. (1998). “Análisis químicos farmacéuticos de medicamentos”. Ed. Noriega editores, México.
- [23] Dictionary of pharmacological agents. (1997). Ed. Chapman & Hall, Gran Bretaña. Vol 2.
- [24] ERMER, J., Millar, J. H. (2005). “ Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A guide to best practice”. Ed. Wiley-VCH, Alemania.
-



ARTÍCULOS

- [25] AHRER, W., Scherwenk, E., Buchberger, W. (2001). Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 910: 69-78.
- [26] ALTRIA, K.D., Kelly, M.A., Clark, B.J. (1998). Current applications in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis. II. Elsevier science. *Trends in analytical chemistry*. 17 (4): 214-226.
- [27] Oraphan Anurukvorakun, Worapot Suntornsuk, Leena Suntornsuk, Factorial design applied to a non-aqueous capillary electrophoresis method for the separation of beta-agonists. *Journal of Chromatography A*, 1134 (2006) 326–332.
- [28] HEEGAARD, N.H.H., Nilsson, S., Guzman, N.A. (1998). Affinity capillary electrophoresis: important application areas and some recent developments. *Journal of Chromatography B*, 715: 29–54.
- [29] PINEROS. I. P, Ballesteros, J. L. Lastres. (2002). Extraction and LC determination of lisine cixinate salt in water / oil microemulsions. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 27:747 – 754.
- [30] ROSS, G. A. (1997). Instrumental validation in capillary electrophoresis and checkpoints for method validation. *General paper. Accred Qual Assur* 2: 275-284.



GUÍAS Y NORMAS

- [31] FABRE, H.; Altria, K. D. (2001). *Validating CE Methods for Pharmaceutical Analysis*. Beckman Coulter. LC-GC Europa.
- [32] *Guía de validación de métodos analíticos*. Colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos. Edición 2002.
- [33] *Guidance for industry. Analytical procedures and methods validation*. Chemistry, manufacturing, and controls documentation. FDA, USA, August, 2000.
- [34] *Guidance for industry. Q2B Validation of analytical procedures: Methodology*. ICH, November 1996.

-
- [35] Guideline for industry. Text on validation of analytical procedures. ICH- Q2A, March 1995.
- [36] Guideline on general principles of process validation. CDER, CBER, FDA. May 1987.
- [37] Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998.
- [38] Reviewer Guidance. Validation of Chromatographic Methods. Center for drug evaluation and research (CDER), November 1994.
- [39] Validation of analytical procedures: Methodology. VICH, October, 1998.



PAGINAS WEB

- [40] http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UPC/AVAILABLE/TDX-0130102-115958//04cap1.pdf (Enero, 2008)
- [41] http://www.chemsoc.org/ExemplarChem/entries/2003/leeds_chromatography/chromatography/ (Enero, 2008)
- [42] <http://www.rsc.org/pdf/books/capelectrosc.pdf> (Enero, 2008)
- [43] <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?wo=2007083985&IA=WO2007083985&DISPLAY=STATUS> (Marzo, 2008)
- [44] http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo.php?bib_vv=6 (Marzo, 2008)



OTRAS

- [45] Patente USP 3,973,027
- [46] Programa ACD/ChemSketch 1994-1998 Advanced chemistry development Inc. Toronto, Canada

ANEXO 1

Tabla 37. Comparación del CV en el % recuperación para amoxicilina y bromhexina con 10 y 20 min de agitación

Agitación T(min)	bromhexina(min)		amoxicilina(min)	
	10	20	10	20
1	90,54	98,74	52,35	99,74
2	92,95	99,67	53,71	98,87
3	90,89	99,00	53,97	99,97
4	90,89	98,99	53,50	98,98
5	94,36	98,30	53,01	99,79
6	90,86	99,30	53,78	98,78
promedio	91,75	99,00	53,39	99,36
SD	1,55	0,47	0,61	0,53
CV	1,69	0,47	1,13	0,54

Tabla 38. Comparación de las áreas de amoxicilina y bromhexina 210 y 214 nm. .

	210 nm		2.14 nm	
	amoxicilina	bromhexina	amoxicilina	bromhexina
	Área	Área	Área	Área
	299517	8875	325732	9275
	298717	8847	325370	9293
	297297	8934	324626	9253
	298810	8855	325240	9282
	298412	8862	325257	9219
	297752	8858	324765	9213
	297228	8862	324486	9203
Promedio	298248	8842	325068	9277
Desvest	852.8	320.3	451.5	136.7
C.V. %	0.79	0.67	1.00	0.91

Tabla 39. Comparación de los coeficientes de variación de los tiempos de migración para la mezcla de amoxicilina y bromhexina diferentes buffer.

	Buffer mezcla cit - fos		Buffer de fosfatos		Buffer citratos	
	bromhexina	amoxicilina	bromhexina	amoxicilina	bromhexina	amoxicilina
	Tm	Tm	Tm	Tm	Tm	Tm
	1,70	3,30	1,79	5,63	1,39	2,79
	1,74	3,30	1,54	5,67	1,36	2,74
	1,74	3,30	1,67	5,71	1,37	2,67
	1,79	3,28	1,75	5,72	1,34	2,75
	1,78	3,27	1,75	5,63	1,36	2,75
	1,77	3,26	1,62	5,84	1,34	2,79
	1,75	3,24	1,83	5,65	1,36	2,73
promedio	1,75	3,28	1,71	5,69	1,36	2,75
SD	0,03	0,02	0,10	0,07	0,02	0,04
CV	1,73	0,71	5,98	1,30	1,27	1,48

Tabla 40. Comparación de la influencia de la temperatura en la variación de los tiempos de migración.

	T 25°C		T 20°C	
	amoxicilina	bromhexina	amoxicilina	bromhexina
	Tm	Tm	Tm	Tm
	3,65	1,86	2,69	1,32
	3,64	1,84	2,70	1,33
	3,62	1,83	2,72	1,33
	3,63	1,84	2,71	1,32
	3,63	1,83	2,72	1,31
	3,63	1,86	2,72	1,31
promedio	3,63	1,84	2,71	1,32
SD	0,01	0,01	0,01	0,01
CV	0,28	0,74	0,47	0,68

ANEXO 2

Tabla 41. Número de platos teóricos (N) y resolución (R), de amoxicilina y bromhexina, para la prueba de especificidad.

Sistema	bromhexina		amoxicilina
	N	R	N
1	187800	14,60	111900
2	187800	13,90	111900
3	187800	13,90	111900
4	188000	14,60	111900
5	187500	13,90	119000
6	187800	13,90	119000
Promedio	189100	14,14	114300

El cálculo del número de platos teóricos y de resolución, fueron calculados a partir de las ecuaciones que se encuentran en el cuadro 1.

Resolución

La resolución entre dos picos A y B, está expresada en la siguiente ecuación:

$$R_S = \frac{2(t_{rB} - t_{rA})}{W_{bB} + W_{bA}}$$

Donde t_{rB} y t_{rA} son los tiempos de retención de los picos A y B y W_{bB} y W_{bA} , son los anchos de los picos A y B en la línea base 17.

Platos teóricos

Se ha demostrado que la cantidad de platos teóricos N en una columna de electroforesis capilar esta dada por:

$$N = 16(tr / Wb)^2$$

Cuadro 1. Ecuaciones para el cálculo de la resolución y el número de platos teóricos.

En la figura 9 se encuentra un electroferograma en el cual se representan los parámetros tomados para el cálculo del número de platos teóricos y la resolución de los picos.

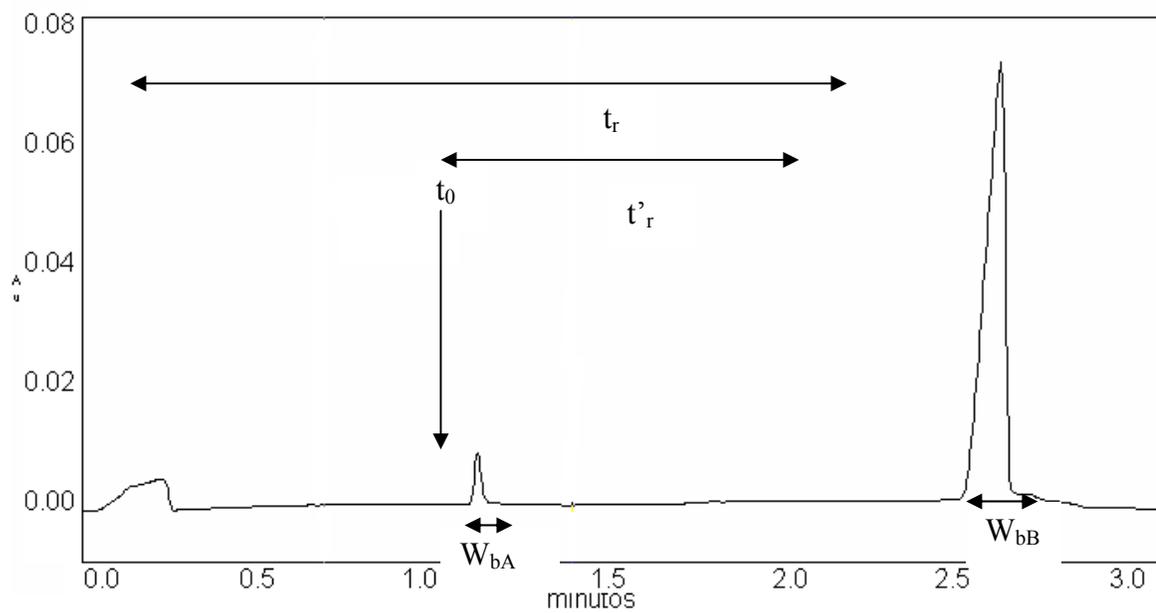


Figura 9. Electroferograma que muestra los parámetros empleados para el cálculo de N y R.