



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Optimización y validación de un método analítico para la cuantificación
de ampicilina y bromhexina en polvo para suspensión oral
por electroforesis capilar**

T E S I S

**Que para obtener el Título de:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

Presenta:

Diana Lucía Martínez Mendoza

Asesora: Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez



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.

*El mérito pertenece a aquellos que de hecho están en la arena,
que pelean valientemente; que conocen el gran entusiasmo,
las grandes devociones, y que se emplean a sí mismos en una causa noble;
quienes en el mejor de los casos, conocen el triunfo de un gran logro;
y quienes, en el peor de los casos, si fallan, lo hacen mientras se arriesgan
grandemente; de manera que su lugar nunca ha de estar con aquellas
almas frías y tímidas que no conocen ni la victoria ni la derrota.*

Theodore Roosevelt



Agradecimientos

A DIOS por la vida, por dejarme llegar hasta aquí acompañada de una familia y buenos amigos. Por no dejarme caer cuando tropezaba. Por permitirme hallar el camino que me conduciría a esta meta.

A MI FAMILIA porque siempre han confiado en mí y en que concluiría con esta etapa. Porque me han apoyado en todo momento. A mi mamá por sus preocupaciones, a mi papá por inspirarme a obtener conocimiento y a mi hermano por sus consejos y explicaciones. Gracias.

A la Dra. Alma Revilla por haberme dado la oportunidad de trabajar con ella, por su apoyo y confianza para la realización del proyecto, por sus consejos y su paciencia.

A mis amigos durante la carrera:

Diana Pimp: por brindarnos un "refugio" para trabajar, para divertirnos y relajarnos un rato; por enseñarme a hacer más divertida y amena mi estancia en la escuela. Por ser una salvación en la redacción de los reportes... ji ji. Y por ser una gran amiga, gracias por brindarme tu amistad.

Malva: por compartir conmigo la música, un concierto, algunas películas y discos. Por aceptarme como soy y confiar en mí. Por brindarme tu amistad y dejarme ser tu amiga. Y... por ser la más puntual del equipo... ji ji (espero algún día poder decir eso en serio)...

Jos: porque siempre estuviste ahí, muchas veces presionando para sacar adelante los trabajos, otras tantas sacándonos de apuros con la computadora, y cuando no estábamos trabajando...siempre con teléfono en mano... pero siempre con nosotras, como una gran amiga, gracias.

Mau: por ser un gran amigo, gracias por escuchar muchas veces mis aventuras, por ser como eres, por estar conmigo en momentos en que nadie más estaba.

Coti: porque desde que te conocí me presentaste al mundo de la ciencia y me hiciste ver que es mucho más emocionante de lo que pensaba; gracias por compartir tus conocimientos y por vivir conmigo buenos momentos (sé que no fueron muchos pero fueron buenos).

A ellos porque compartimos tantos días y noches durante la carrera, para llegar hasta donde ahora nos encontramos.

A mis compañeros de laboratorio: Lluvia por encaminarme; Angela y Uriel por ser en algún momento "mis pupilos", Gracias por su ayuda. A Elva, Rogelio, Claudia, Fabi, Carlos, por compartir las horas de trabajo y hacerlas más amenas.

A mis maestros del CECyTEM porque confiaron en mí y en que lograría llegar hasta aquí, y porque desde allá comienza gran parte de mi formación como químico.

A la UNAM por haberme dado la oportunidad de aprender en sus aulas de grandes profesores.

A los sinodales: QFB Elia Granados, QFB José Antonio Garduño, QFB Guadalupe Rebollar y Dra. Adriana Ganem, por sus observaciones para enriquecer este trabajo.

Al Ingeniero Draucin Jiménez por el apoyo brindado a este trabajo.

A la UNAM DGAPA por el apoyo brindado a los proyectos: PAPIIT IN208608 y PAPIME207606.

Índice

Abreviaturas

1. Introducción	1
2. Objetivos	2
3. Marco teórico	
3.1. Ampicilina	3
3.1.1. Propiedades fisicoquímicas	3
3.1.2. Propiedades terapéuticas	3
3.1.3. Farmacocinética y Farmacodinamia	4
3.2. Bromhexina	5
3.2.1. Propiedades fisicoquímicas	5
3.2.2. Propiedades terapéuticas	5
3.2.3. Farmacocinética y Farmacodinamia	5
3.3. Formas farmacéuticas existentes para la asociación	
Ampicilina-Bromhexina	6
3.4. Electroforesis capilar	7
3.4.1. Instrumentación	7
3.4.2. Fundamento de la técnica	9
3.4.3. Flujo electroosmótico	10
3.4.4. Separación electroforética	11
3.4.5. Ventajas de la electroforesis capilar	13
3.5. Validación de métodos analíticos	13
3.5.1. Definición de Validación	13
3.5.2. Tipos de Validación	14
3.5.3. Pruebas para la validación de métodos analíticos	14
3.5.3.1. Especificidad	15
3.5.3.2. Adecuabilidad del sistema	15
3.5.3.3. Precisión del sistema y del método	16
3.5.3.4. Linealidad del sistema y del método	17
3.5.3.5. Exactitud	17
3.5.3.6. Estabilidad de la muestra analítica	18
3.5.3.7. Robustez	18

4. Desarrollo Experimental	
4.1. Materiales y reactivos	
4.1.1. Equipos	19
4.1.2. Reactivos	19
4.2. Diagrama General de actividades	19
4.3. Procedimientos de ensayo	21
4.3.1. Preparación de la solución amortiguadora	21
4.3.2. Preparación de la solución de electrolito soporte	21
4.3.3. Preparación de la solución estándar	21
4.3.4. Preparación de la muestra	22
4.4. Obtención del resultado analítico	22
5. Resultados y Análisis de Resultados	
5.1. Antecedentes	23
5.2. Optimización del método analítico	24
5.2.1. Pruebas de solubilidad	25
5.2.2. Elección de la mezcla de disolución	26
5.2.3. Proporción de los disolventes en la mezcla	27
5.2.4. Disolución de la muestra	28
5.2.5. Electrolito soporte	29
5.2.6. Almacenamiento del capilar	34
5.2.7. Acondicionamiento del capilar	35
5.2.8. Condiciones óptimas de análisis	36
5.3. Validación del método analítico	
5.3.1. Especificidad	38
5.3.2. Adecuabilidad del sistema	39
5.3.3. Precisión del sistema	39
5.3.4. Linealidad del sistema	40
5.3.5. Exactitud y repetibilidad del método	46
5.3.6. Linealidad del método	49
5.3.7. Precisión Intermedia	57
5.3.8. Resumen	60
6. Perspectivas del método analítico	61
7. Conclusiones	62

8. Anexos	
8.1 Índice de Tablas	63
8.2 Índice de Figuras	66
8.3 Preparación de la muestra para Precisión del Sistema	67
8.4 Preparación de las soluciones para Linealidad del Sistema	67
8.5 Fórmula para la obtención del porcentaje de recuperación (%Rec)	68
8.6. Fórmula para la obtención de t en la prueba de hipótesis para exactitud del método	68
8.7. Fórmula para la obtención de t en la prueba de hipótesis para la pendiente y el intercepto en linealidad del método	68
8.8. Forma de obtención de $F_{critica}$ en la prueba de hipótesis para precisión intermedia	69
9. Referencias	70

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
A	Área de pico
α	Nivel de significancia
Amp	Ampicilina
β_0	Intercepto
β_1	Pendiente
Brom	Bromhexina
BPG	Solución de PG en búfer al 6%
C	Concentración
CV	Coeficiente de variación
F_{cal}	F calculada
$F_{crítica}$	F crítica (obtenida de tablas)
FEO	Flujo electroosmótico
H_a	Hipótesis alternativa
H_o	Hipótesis nula
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
$IC(\beta_0)$	Intervalo de Confianza para el intercepto
$IC(\beta_1)$	Intervalo de Confianza para la pendiente
$IC(\mu)$	Intervalo de Confianza para la media poblacional
kV	kiloVoltios
μ	Media poblacional
mM	miliMolar
PG	Propilenglicol
% Rec	Porcentaje de recuperación
rpm	Revoluciones por minuto
S	Desviación estándar
Sol.	Solución
STD	Estándar
t_m	Tiempo de migración
\bar{x}	Promedio

Introducción

Un método analítico es la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico, llamado analito, de una muestra. (Guía de Validación CNQFB's, 2002)

Existen métodos analíticos oficiales, los cuales son procedimientos analíticos estandarizados y validados que se encuentran descritos en farmacopeas o referencias oficiales. Los métodos analíticos no oficiales, son los que desarrolla el fabricante para asegurar la calidad de su producto.

La iniciativa para desarrollar métodos analíticos surge de la necesidad de determinar ciertos analitos para los cuales no existe un método de cuantificación en los textos oficiales; nacen entonces procedimientos innovadores y/o alternativos a los indicados en las referencias oficiales.

El proyecto en el cual se trabajó surgió de la necesidad de cuantificar simultáneamente dos analitos presentes en diversas formas farmacéuticas: bromhexina y ampicilina. La asociación de estos dos activos es manejada por varios laboratorios, por lo tanto se buscaba una alternativa para el control de calidad de estos productos que pudiera ser utilizada a nivel industrial.

El método para la determinación de estos activos fue desarrollado en el Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos, L-401, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM (Rojas Calvo, 2008) y posteriormente optimizado y validado para la cuantificación de los principios activos en cápsulas (Terán Alvirde, 2009).

El método propuesto para la determinación de estos activos en cápsulas aún podía ser explotado ya que la asociación bromhexina-ampicilina también se encuentra como presentación en polvo para suspensión, de modo que en este trabajo se describe la optimización del método analítico, desarrollado anteriormente, así como la validación del mismo, de manera que pueda ser utilizado para la cuantificación de estos principios activos en una suspensión oral de uso infantil, la cual cabe mencionar tiene 5 excipientes en su formulación, siendo una muestra más compleja que la cápsula la cual sólo presenta un excipiente.

Objetivo General

Establecer las condiciones óptimas experimentales para lograr la cuantificación de ampicilina y bromhexina en polvo para suspensión oral empleando la técnica de electroforesis capilar, con la finalidad de llevar a cabo la validación del método analítico planteado y comprobar su aplicabilidad con muestras complejas.

Objetivos particulares

Determinar la metodología para la preparación de la muestra analítica, mediante la realización de pruebas de solubilidad, para obtener una solución que pueda ser sometida a un análisis utilizando electroforesis capilar y garantizar la completa disolución de los principios activos.

Determinar las condiciones experimentales óptimas de trabajo para la determinación simultánea de ampicilina y bromhexina en polvo para suspensión oral mediante electroforesis capilar.

Realizar la validación del método analítico en base a las guías existentes para tal efecto, para asegurar que dicho método es confiable.

3. Marco teórico

3.1. Ampicilina (Ampicilina trihidrato)

3.1.1. Propiedades fisicoquímicas (The Merck Index, 1996; Sweetman, 2006; Moffat et. al., 2004; Gennaro, 2000)

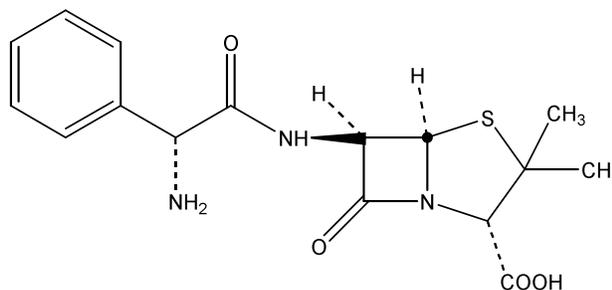


Figura 1. Estructura química de la Ampicilina.

Ácido [2S-[2 α ,5 α ,6 β (S*)]]-6-[(aminofenilacetil)amino]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo-[3.2.1]heptano-2-carboxílico, (Fig 1).

Fórmula condensada: C₁₆H₁₉N₃O₄S, 3H₂O

Peso molecular: 403.5

Descripción: Polvo cristalino blanco.

Solubilidad: Poco soluble en agua, insoluble en etanol, acetona, tetracloruro de carbono, cloroformo, éter y aceites grasos.

Constante de disociación (pK_a) (25°):

2.5 (-COOH)

7.3 (-NH₂)

3.1.2. Propiedades terapéuticas (Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, 2006; Litter, 1988)

La ampicilina es un antibiótico β -lactámico. Es bactericida y posee amplio espectro de actividad.

Es activa especialmente sobre bacterias grampositivas, cocos y bacilos, y cocos gramnegativos; también son sensibles algunos bacilos gramnegativos. Entre los microorganismos susceptibles se incluyen: *Streptococcus* del grupo B, *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus*

pneumoniae, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria* sp, *Branhamella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae*.

La ampicilina se indica en caso de infecciones en el tracto respiratorio, digestivo, urinario, genital, oculares; en odontología.

3.1.3. Farmacocinética y Farmacodinamia (Sweetman, 2006; Litter, 1988)

Todas las penicilinas poseen el mismo mecanismo de acción, la muerte de las bacterias se debe a una desintegración de la pared celular. Las penicilinas inhiben la síntesis de la mureína o peptidoglicano, mucopéptido que forma esencialmente a este organelo.

Al inhibir la síntesis de la pared celular, esta se hace defectuosa y desaparece la protección de la bacteria, que se hace osmóticamente muy sensible; dado que la presión osmótica en el interior de la célula bacteriana es enorme y puede penetrar líquido hasta que la célula estalla, se produce entonces la lisis celular.

En cuanto a su farmacocinética, es relativamente resistente a la inactivación por los ácidos gástricos y se absorbe moderadamente bien en el tubo digestivo después de la administración oral. Los alimentos pueden interferir en su absorción, por lo que debe administrarse al menos 30 min antes de las comidas.

La concentración plasmática máxima (3-6µg/ml) se alcanza aproximadamente entre 1 y 2 horas después de una dosis oral de 500mg. Se distribuye ampliamente en el organismo, atraviesa la barrera placentaria y se distribuye en pequeñas cantidades en la leche materna.

La semivida de eliminación oscila entre 1-1.5 horas. La ampicilina se biotransforma a ácido peniciloico, que se excreta por la orina. La depuración renal se lleva a cabo por filtración glomerular y secreción tubular. Entre el 20 y 40% se excreta inalterada por la orina en 6 horas. Sufre recirculación enterohepática y cierta cantidad se elimina por heces.

3.2. Bromhexina (Clorhidrato de bromhexina)

3.2.1. Propiedades fisicoquímicas (The Merck Index, 1996; Sweetman, 2006; Moffat et. al., 2004; Pospíšilová et.al., 2001)

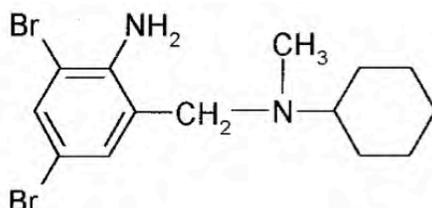


Figura 2. Estructura química de la Bromhexina. (Pospíšilová et.al., 2001)

2-Amino-3,5-dibromo-N-ciclohexil-N-metilbencenmetanamina (Fig. 2)

Fórmula condensada: $C_{14}H_{20}Br_2N_2 \cdot HCl$

Peso Molecular: 412.6

Descripción: Polvo cristalino blanco o casi blanco.

Presenta polimorfismo.

Solubilidad: Muy poco soluble en agua; poco soluble en etanol y en cloruro de metileno.

Constante de disociación (pK_a) (25°):

8.5 (-NH₂)

3.2.2. Propiedades terapéuticas (Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, 2006)

Es un agente mucolítico y expectorante empleado en el tratamiento de los trastornos respiratorios asociados con producción de tos. Está indicado como coadyuvante para la terapia secretolítica en enfermedades asociadas con una secreción mucosa anormal y deterioro de transporte mucoso.

3.2.3. Farmacocinética y Farmacodinamia

La bromhexina es un expectorante y mucolítico que actúa aumentando la ruptura de los mucopolisacáridos del moco (productores de la secreción viscosa) y estimulando la actividad

mucociliar. Incrementa el volumen de las secreciones bronquiales y reduce su viscosidad, facilitando así la expulsión del esputo mucopurulento. (Vademécum Farmacéutico, 1992; Litter, 1988)

El clorhidrato de bromhexina se absorbe rápidamente en el tubo digestivo y experimenta un extenso efecto del primer paso en el hígado, su biodisponibilidad oral se calcula del 20%. Se distribuye ampliamente en los tejidos corporales. Se une en un alto grado a las proteínas plasmáticas. Atraviesa la barrera hematoencefálica y en pequeñas cantidades la barrera placentaria.

Entre el 85 y 90% se excreta por la orina como metabolitos. Tiene una semivida de eliminación de aproximadamente 12 horas.

(Sweetman, 2006)

3.3. Formas farmacéuticas existentes para la asociación Ampicilina-Bromhexina (Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, 2006; Vademecum Farmacéutico, 1996)

I. PENTREXYL EXPEC

BRISTOL-MYERS SQUIBB

☞ Cápsulas (500mg/8mg)

☞ Polvo para suspensión (250mg/4mg/5ml)

II. PENBRITIN EX¹

HORMONA

☞ Cápsulas (500mg/8mg)

☞ Polvo para suspensión (Pediátrica: 250mg/4mg/5ml) (Infantil:
500mg/8mg/5ml)

III. PENTIBROM²

MAVER

☞ Cápsulas (500mg/8mg)

☞ Polvo para suspensión (250mg/8mg/10ml)

¹ http://www.facmed.unam.mx/bmnd/plm_2k8/src/prods/38721.htm. 05.06.09.

² <http://www.maver.com.mx/>. 12.06.09.

3.4. Electroforesis capilar

El término electroforesis es empleado para describir la migración de compuestos cargados bajo la influencia de un campo eléctrico.

El fenómeno electroforético es aquel que se lleva a cabo cuando en un sistema dado las especies cargadas (iones) se mueven y se separan bajo la influencia de un campo eléctrico en función de su distinta velocidad de migración.

En la electroforesis capilar, se lleva a cabo este fenómeno dentro de un capilar de sílice fundida de diámetro interno pequeño (50-100 μ m) el cual al disipar eficientemente el calor, permite aplicar hasta 30,000Volts, agilizando la separación de las especies cargadas.

3.4.1 Instrumentación

Un equipo de Electroforesis Capilar consiste en las siguientes partes básicas (Fig. 3):

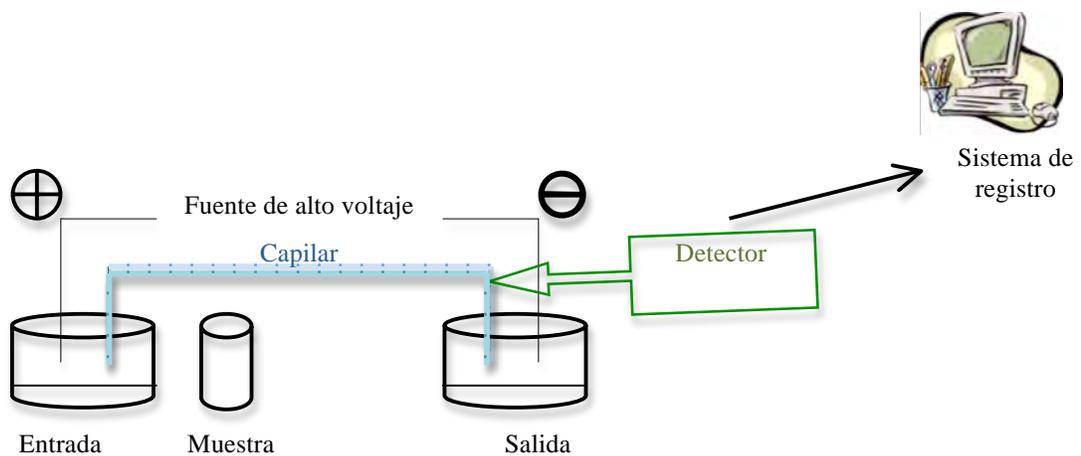


Figura 3. Esquema de las partes básicas de un equipo de electroforesis capilar.

- Fuente de poder. Es capaz de proporcionar hasta 30kV. Es una fuente de corriente continua conectada a dos electrodos de platino inmersos en un electrolito.
- Dos electrodos ánodo y cátodo. Son de platino y se encuentran inmersos en el electrolito soporte.

-
- Depósitos o viales en los que se colocan los electrodos y el electrolito soporte. Durante las separaciones, los extremos del capilar están colocados en dos viales que contienen al electrolito, la composición de éste define el método de análisis. Ambos viales contienen el mismo electrolito a un mismo nivel.
 - Capilar: es el compartimento donde se lleva a cabo la separación. Es de sílice fundida, su diámetro interno oscila entre 25-200 μm (25-100 Skoog), se encuentran cubiertas con poliamida para darle flexibilidad y disminuir su fragilidad; este recubrimiento no es transparente a la luz ultravioleta, por lo que se tienen que eliminar unos milímetros de la parte del capilar que actuará como celda de detección.
 - Sistema de enfriamiento del capilar. Necesario para disipar el exceso de calor producido en el capilar.
 - Sistema para introducir la muestra. Los métodos de inyección de la muestra evitan el posible ensanchamiento de pico, ya que hacen que la muestra entre al capilar de una manera adecuada y reproducible. Existen diferentes sistemas de inyección que se basan en aplicar un gradiente de voltaje (electrocinética) o un gradiente de presión (hidrodinámica o hidrostática) entre los dos extremos del capilar, el volumen de muestra introducido es del orden de nanolitros (nL).
 - Detector. Permite determinar y cuantificar los diferentes componentes de la muestra. En general la detección se realiza directamente sobre el capilar. El tipo de detector escogido dependerá de los analitos a determinar, tratando de escoger aquel que proporcione una sensibilidad elevada para los compuestos. El detector empleado en este trabajo fue el arreglo de diodos UV/Vis, por lo que a continuación se describe.
 - * DetECCIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA CON ARREGLO DE DIODOS (DIODE ARRAY DETECTION DAD). Consiste en un sistema con un lente acromático, un foco de luz en el capilar, donde el rayo de luz es dispersado por una rejilla de difracción, cada uno de los numerosos diodos que tiene el detector mide los picos estrechos del espectro. Un DAD puede monitorear una muestra a más de una longitud de onda. Es de gran utilidad cuando la longitud de

onda máxima de los analitos es diferente; permite que la absorción de picos no relevantes pueda minimizarse.

El número de caídas de la longitud de onda en un fotodiodo es llamado anchura de pico. La detección por DAD puede producir límites de detección, sensibilidad y un rango de detección lineal igual o mayor a los detectores individuales o múltiples. La proporción de ruido en la señal espectral es independiente al número de longitudes de onda adquiridas, la anchura de pico individual no está predeterminada y la línea base del espectro está disponible a todos los tiempos.

Ventajas del DAD:

- ✓ Produce espectros que ayudan a identificar picos
- ✓ Permite determinar también la pureza del pico
- ✓ La razón de absorbancia o espectro de absorción toma diferentes puntos a través del pico y descubre componentes ocultos.

Desventajas del DAD:

- ☒ Son más caros que el detector UV-Vis.
- Sistema de registro y procesamiento. Permite introducir instrucciones, variar los parámetros del sistema, interpretar las lecturas del detector, realizar cálculos y presentar los datos obtenidos en el análisis posterior a la separación.

3.4.2. Fundamento de la técnica

El capilar de separación se llena con electrolito soporte (búfer) colocando sus extremos en dos depósitos (viales) que contengan al búfer³; los electrodos se conectan a una fuente de poder y se sumergen en los depósitos por separado. La muestra se inyecta dentro del capilar sustituyendo un vial de búfer por el contenedor de la muestra. Un volumen de muestra definido es introducido en el tubo capilar, ya sea por presión o por la aplicación de un pequeño voltaje. Después se vuelve a reemplazar el vial de muestra por el de búfer y se aplica una diferencia de potencial para realizar la separación. Las especies iónicas en la muestra migran con dirección y velocidad determinadas por su carga y masa; eventualmente pasan por un detector, que puede estar situado cerca del extremo opuesto a

³ Solución de un ácido débil y su base conjugada, que tiene la propiedad de mantener relativamente estable el pH aún con la adición de otros ácidos o bases.

donde se hizo la inyección de la muestra (UV/Vis, infrarrojo) o en cualquier parte del capilar (detectores electroquímicos). La señal analítica obtenida es adquirida y evaluada por una computadora, los datos se procesan dando como resultado lo que se conoce como electroferograma.

3.4.3. Flujo electroosmótico (FEO)

Es el flujo de solvente (búfer) en dirección al cátodo.

Se origina por la presencia del campo eléctrico en una solución iónica cuando entra en contacto un electrolito con una superficie sólida cargada. En electroforesis capilar este sistema se conforma por un capilar de sílice fundida, estando la interfase en contacto con una solución que contiene el electrolito soporte.

La pared del capilar está constituida por grupos silanol (Si-OH) que cuentan con un pKa de alrededor de 4. Esto hace que al trabajar con soluciones con un pH por arriba de este valor, la pared se encuentre cargada negativamente debido a la ionización de los grupos silanol a grupos silanoato (Si-O⁻). Las cargas negativas de los grupos Si-O⁻ atraen las cargas positivas (a los cationes) presentes en la solución. Los iones presentes en el sistema, bajo la influencia del voltaje aplicado, son desplazados hacia el cátodo de acuerdo a su carga y arrastran disolvente con ellos debido a su solvatación, originando así el flujo electroosmótico (Fig. 4).

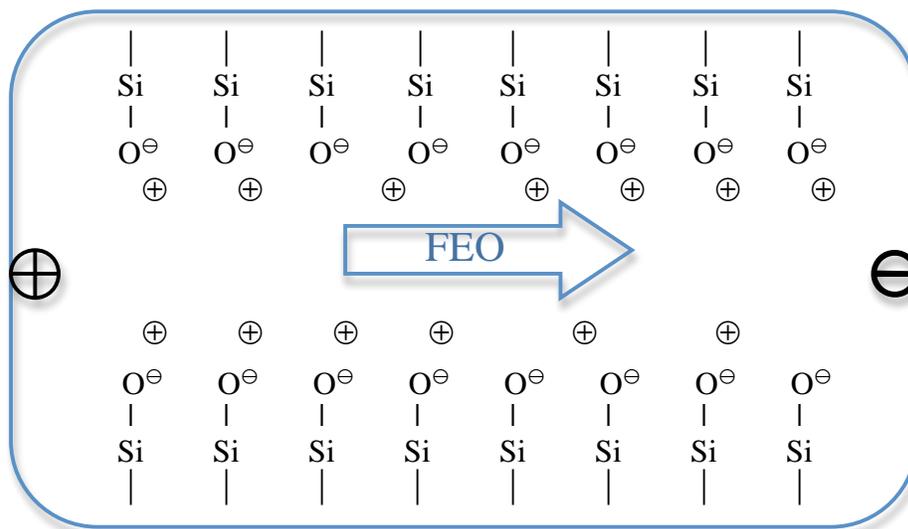


Figura 4. Representación del flujo electroosmótico.

El FEO puede ser alterado por:

- ★ La modificación química de la pared capilar, para limitar la adsorción del analito.
- ★ El ajuste del pH del búfer.
- ★ Viscosidad del búfer.
- ★ Concentración y fuerza iónica del búfer.
- ★ Adición de surfactantes, que pueden actuar como agente de solubilización para analitos hidrófobos, como modificador de pared o como reactivo apareador de iones.
- ★ La adición de disolventes orgánicos, que disminuyen la velocidad del flujo electroosmótico
- ★ La adición de selectores quirales

Es importante que el FEO permanezca constante, ya que si varía, los tiempos de migración⁴ de los solutos se verán afectados y cambiarán.

Una característica muy particular del FEO es que posee un perfil de flujo casi plano (Fig 5) a diferencia del parabólico que se presenta cuando se impulsa un líquido a través de un tubo mediante presión hidrostática, como en HPLC. Con esto la fuerza del flujo se distribuye uniformemente a lo largo del capilar, esto es benéfico porque no contribuye a la dispersión de zonas del analito y los resultados son más reproducibles.



Figura 5. Perfil del flujo electroosmótico (a) y el generado por presión hidrostática (b).

3.4.4. Separación electroforética

El mecanismo de separación se basa en la migración diferencial de los analitos en presencia de un campo eléctrico. La diferencia en las movilidades está vinculada a la relación masa/carga. La movilidad electroforética⁵ es proporcional a la carga del soluto e inversamente proporcional a las

⁴ Es el tiempo que le toma al soluto recorrer el capilar, desde su inicio hasta la ventana al detector.

⁵ Es la movilidad de los analitos en presencia de un campo eléctrico. La capacidad de los analitos para moverse en presencia de un campo eléctrico.

fuerzas de fricción que dependen de la forma y tamaño de la especie del analito, así como de la viscosidad del medio.

Al trabajar con polaridad positiva⁶ los cationes son atraídos hacia el cátodo y sus velocidades aumentan por el flujo electroosmótico. Los cationes se mueven rápidamente hacia el cátodo y los aniones se mueven más lento. El orden al que los analitos alcanzan el cátodo es: cationes, neutros y algunos aniones. Los cationes divalentes se moverán más rápido que los cationes monovalentes del mismo tamaño, y ambos se moverán más rápido que cationes monovalentes más grandes. Caso contrario para los aniones, ya que los pequeños divalentes escaparán más fácilmente al efecto del FEO, por lo que se moverán más lento hacia el cátodo, y los monovalentes grandes se resistirán menos a ser arrastrados hacia el cátodo por lo que llegarán antes que los anteriores. El orden de migración de los iones se muestra en la figura 6.

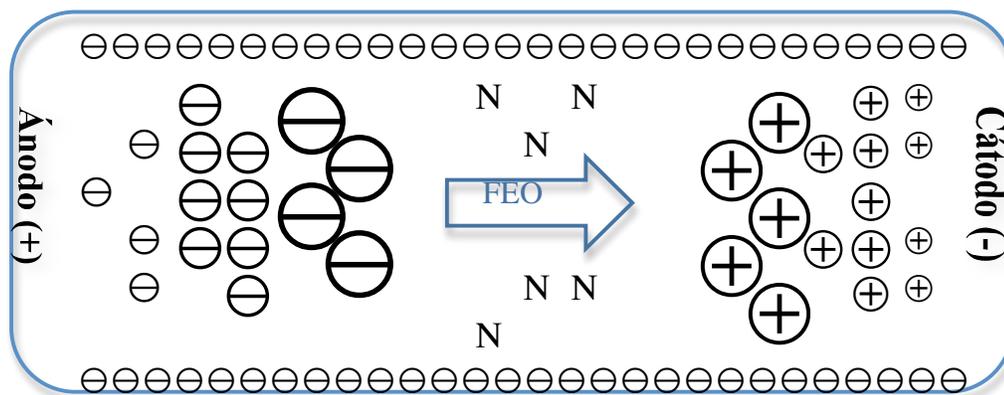


Figura 6. Representación de una separación electroforética.

Los compuestos neutros no pueden ser separados de esta manera, ya que no muestran movilidad electroforética. Se separan entonces por electroforesis en fase micelar, en esta técnica se prepara un sistema micelar en el búfer que transporte a los analitos, de forma que los compuestos neutros son separados según su interacción con las micelas.

⁶ El polo positivo o ánodo se encuentra en el extremo del capilar donde se realiza la inyección de la muestra, por lo tanto el flujo electroosmótico va del polo positivo al polo negativo, por lo que el búfer soporte se mueve del vial de entrada a través del capilar hacia el detector y el vial de salida.

3.4.5. Ventajas de la Electroforesis Capilar

- ✓ La disipación del calor en un tubo capilar es rápida, por lo que los cambios de temperatura generados por corrientes elevadas son muy pequeños.
- ✓ Ya que los cambios de temperatura son pequeños los resultados presentan mayor reproducibilidad.
- ✓ Corto tiempo de análisis y alta resolución. Debido a la rápida disipación del calor, es posible aumentar el voltaje aplicado (hasta de 30kV) disminuyendo así el tiempo de análisis y aumentando la resolución entre los picos.
- ✓ El gasto en reactivos es mínimo.
- ✓ Casi no hay generación de residuos tóxicos por lo que los daños al ambiente son casi nulos.
- ✓ La cantidad de muestra necesaria para el análisis se reduce a unos cuantos microlitros.
- ✓ Se pueden utilizar una gran variedad de detectores tanto “en línea” o “fuera de línea” o varios a la vez.
- ✓ Es posible acoplar los equipos de electroforesis capilar a otros equipos analíticos.

3.5. Validación de métodos analíticos

3.5.1. Definición de Validación

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se demuestra, mediante estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada. (Guía de Validación CNQFB's, 2002)

También se define como la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad de preestablecidos. (NOM-059; Guideline on General Principles of Process Validation, FDA)

A través de la validación se confirma que el método es consistente para la aplicación para la que fue desarrollado.

3.5.2. Tipos de Validación

Validación Prospectiva: Validación conducida antes de la distribución de un producto nuevo, o producto hecho bajo un proceso de fabricación revisado, donde las revisiones pueden afectar las características del producto. Es el proceso de validación en el cual la información no existe, se va a obtener, pero el procedimiento de ensayo ya se tiene.

Validación Retrospectiva: Validación de un proceso para un producto ya en distribución basada en datos acumulados de producción, de prueba y de control. Es el proceso documental para obtener la validación del método a partir de datos históricos.

Validación Concurrente: –Distribución comercial de producto concurrente con la aprobación de cada lote de validación. Validación del método mientras se está desarrollando.

3.5.3. Pruebas para la validación de métodos analíticos

Los *parámetros de desempeño* evaluados son diferentes dependiendo del tipo de método analítico. Para un método que se enfoca a la determinación del contenido químico se indican los siguientes parámetros de desempeño a estudiar, de acuerdo a algunos documentos regulatorios.

Tabla 1. Parámetros de desempeño evaluados de acuerdo a diversos documentos normativos.

PARÁMETRO DE DESEMPEÑO	Guía de Validación Colegio Nacional de QFB's	FDA	ICH Q2A	USP
PRECISIÓN/ ADECUABILIDAD DEL SISTEMA	+	+	+	+
LINEALIDAD DEL SISTEMA	+	+	+	+
ESPECIFICIDAD	+	+	+	+
EXACTITUD Y REPETIBILIDAD	+	+	+	+
LINEALIDAD DEL MÉTODO	+		+	+
PRECISIÓN DEL MÉTODO O PRECISIÓN INTERMEDIA ²	+	+	+	+
ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA	*	**	**	**
LIMITE DE DETECCION	-	-	-	-
LIMITE DE CUANTIFICACION	-	-	-	-
ROBUSTEZ	*	+	**	**
TOLERANCIA	*	**	**	**

(-) indica que el parámetro no es evaluado normalmente

(+) indica que el parámetro sí es evaluado normalmente

*Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método.

** No se indica si es requerido

3.5.3.1. *Especificidad*

Es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta analítica debida única y exclusivamente al analito de interés. (Guía de Validación CNQFB's, 2002)

Es la habilidad para determinar de manera inequívoca al analito en presencia de otros componentes (impurezas, productos de degradación, excipientes). (Q2A ICH, 1995) Con esta prueba se demuestra que no existe interferencia proveniente de los demás componentes. (FDA Guidance Validation of chromatographic methods, 1994)

Para demostrar la especificidad de un método analítico es necesario realizar la identificación del analito, en caso de ser un método cromatográfico deben utilizarse los cromatogramas representativos. (Q2B ICH, 1996) Se establecen las posibles sustancias interferentes y se adicionan cantidades conocidas de éstas, solas (placebo) o combinadas a la muestra (placebo cargado) y se evalúa su respuesta bajo las mismas condiciones de análisis. (Guía de Validación CNQFB's, 2002)

3.5.3.2. Adecuabilidad del sistema (Guía de Validación CNQFB's, 2002)

Se refiere a la verificación de que el sistema opera con base a criterios que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico. La evaluación de adecuabilidad del sistema permite verificar que el sistema de medición funcione adecuadamente, independiente de las condiciones ambientales.

Para evaluar la adecuabilidad del sistema se debe inyectar por quintuplicado la solución que contiene al analito, se reporta la respuesta y se calcula el coeficiente de variación, que no debe ser mayor del 2%.

3.5.3.3. Precisión del sistema y del método (Guía de Validación CNQFB's, 2002; Q2A ICH, 1995; FDA Guidance Validation of chromatographic methods, 1994)

Precisión es el grado de concordancia entre una serie de mediciones (resultados analíticos individuales), cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea bajo las mismas condiciones analíticas.

La precisión puede considerarse a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

La precisión de un método analítico es expresada como la desviación estándar o el coeficiente de variación de una serie de mediciones.

- *Repetibilidad:* Es la precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y métodos. Se prepara por lo menos un sextuplicado de soluciones a la concentración del analito que represente el 100% de la muestra procesada para su medición, o se realizan por lo menos 9 determinaciones (3 concentraciones/3 réplicas de cada una); preparadas por dilución o por pesadas independientes; se mide la respuesta analítica bajo las mismas condiciones. Debe reportarse la desviación estándar y el coeficiente de variación, este último debe ser menor o igual a 1.5%.
- *Precisión intermedia:* Es la precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo

laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días o con diferente equipo. El objetivo es asegurar que se obtengan los mismos resultados cuando muestras similares sean analizadas una vez desarrollado el método.

Para evaluar este parámetro se analiza por triplicado una muestra homogénea del producto que tenga un nivel cercano o igual al 100% en dos días diferentes y por dos analistas diferentes. Se reporta el contenido del analito de todas las muestras. Debe calcularse la media, desviación estándar y el coeficiente de variación, el cual debe ser menor o igual a 2%.

- *Reproducibilidad*: Es la precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios. Se refiere a utilizar el procedimiento analítico en diferentes laboratorios como un estudio colaborativo.

3.5.3.4. *Linealidad del sistema y del método* (Guía de Validación CNQFB's, 2002; Q2A ICH, 1995; Q2B ICH, 1996)

- *Linealidad* es la habilidad para asegurar que los resultados son proporcionales a la concentración (y a la cantidad) del analito en la muestra.

La linealidad del método se refiere a su capacidad para obtener resultados confiables, independientemente de la proporción en la que el analito se encuentre con respecto a los demás componentes de la muestra.

Para la evaluación de este parámetro se recomienda un mínimo de cinco niveles de concentración, con tres réplicas cada uno. Para el sistema se parte de la sustancia de referencia y para el método de placebos cargados.

Se determina el coeficiente de correlación, el intercepto y la pendiente a partir del análisis de regresión lineal. Debe incluirse un gráfico de la función lineal que representa el comportamiento del método.

Para evaluar la linealidad del método es conveniente trazar la gráfica de la cantidad adicionada (x) vs la cantidad recuperada (y), incluyendo en ella la ecuación, línea de ajuste y el coeficiente de determinación.

3.5.3.5. *Exactitud* (Guía de Validación CNQFB's, 2002; Q2A ICH, 1995; FDA Guidance Validation of chromatographic methods, 1994)

Es la concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia, el valor real.

Esta prueba se realiza mediante la adición de cantidades conocidas del analito al placebo. Se recomienda utilizar tres niveles de concentración (80, 100 y 120%), analizados por sextuplicado.

3.5.3.6. *Estabilidad de la muestra analítica* (Guía de Validación CNQFB's, 2002; FDA Guidance Validation of chromatographic methods, 1994)

Es la propiedad de una muestra preparada, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse por un tiempo y condiciones determinadas. Esta prueba se recomienda especialmente para analitos susceptibles de degradación por hidrólisis, fotólisis.

3.5.3.7. *Robustez* (Guía de Validación CNQFB's, 2002; Q2A ICH, 1995; Thompson et. al., 2002)

Es la medida de la capacidad del método para mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método.

Es la resistencia a cambiar, de los resultados obtenidos con el método analítico, en presencia variaciones menores debidas a las condiciones experimentales descritas en el protocolo. Ejemplos de factores que pueden ser evaluados en una prueba de robustez son: cambios en el instrumento, en los reactivos utilizados, cambio en el pH de una solución, temperatura de reacción, etc.

4. Desarrollo Experimental

4.1 Materiales y Reactivos

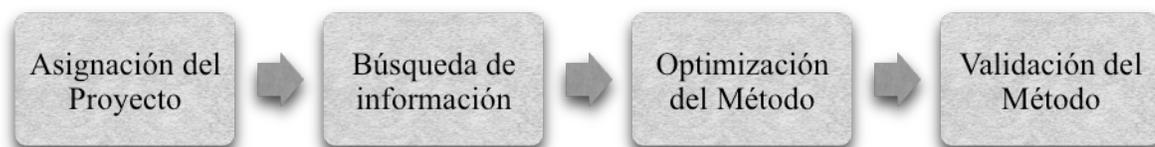
4.1.1. Equipos

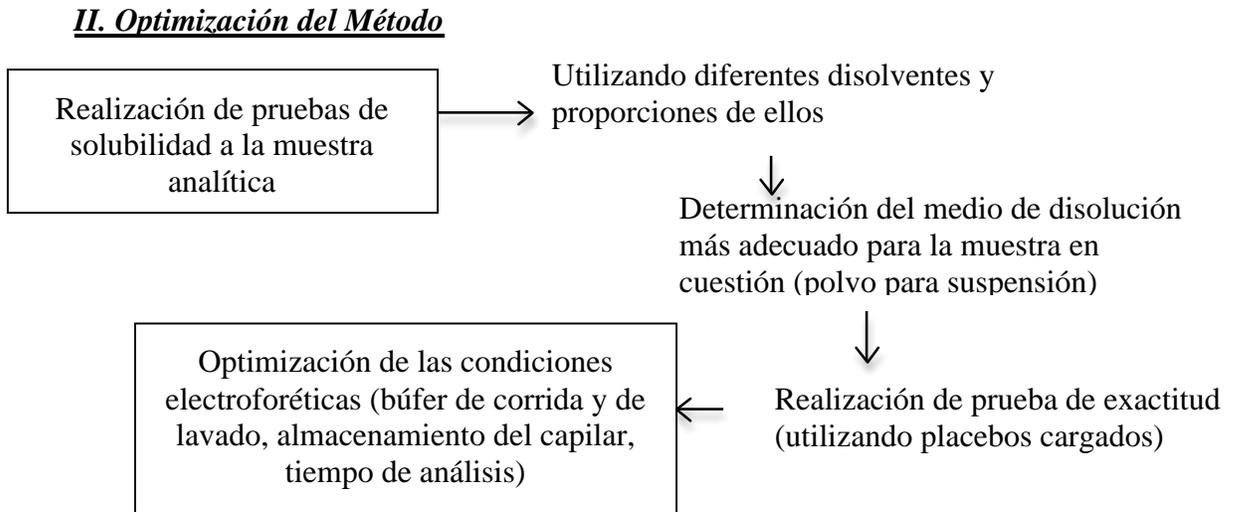
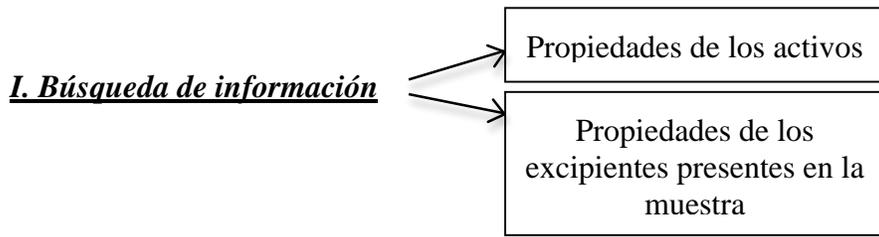
- ★ Equipo de Electroforesis Capilar P/ACE MDQ, Beckman Coulter, Detector de arreglo de diodos (DAD) UV/Vis, Software 32 Karat
- ★ Balanza Analítica, BOECO Germany con 0.0001g de precisión
- ★ PH meter, Hanna Instruments 931409
- ★ Agitador magnético, Thermolyne MIRAK™

4.1.2. Reactivos

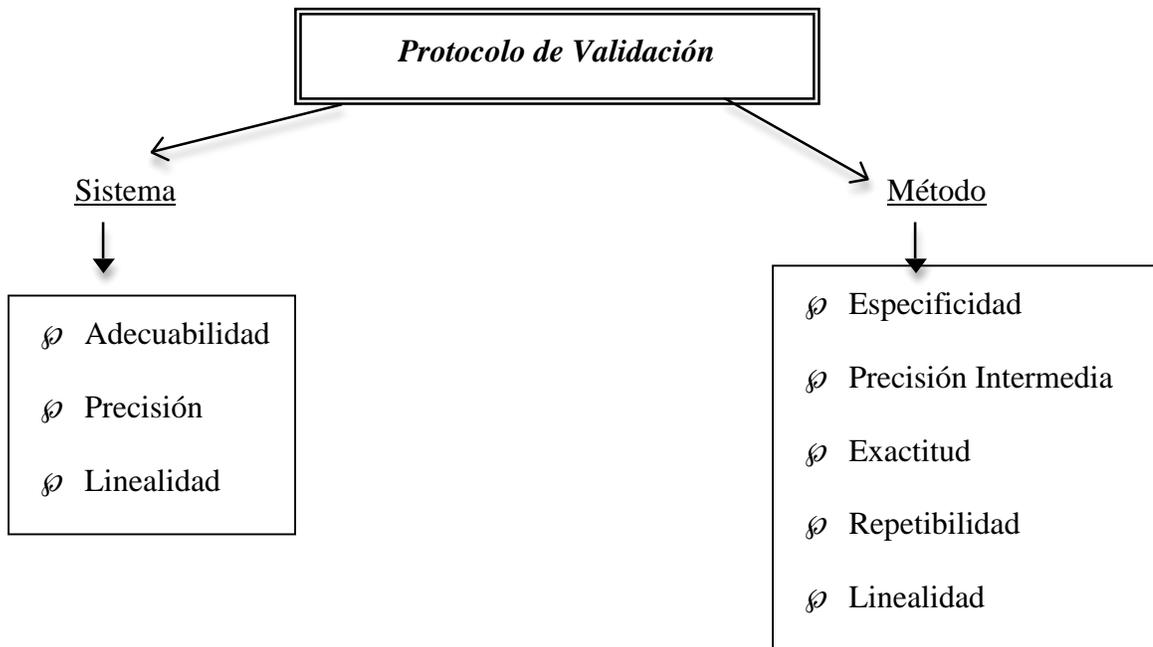
- ⌘ Agua desionizada obtenida de un equipo desionizador de agua Millipore Direct Q™ Progard® 2
 - ⌘ Acetonitrilo grado HPLC
 - ⌘ Propilenglicol
 - ⌘ Fosfato de sodio monobásico, monohidrato cristal, J. T. Baker
 - ⌘ Hidróxido de sodio, J. T. Baker
 - ⌘ Ácido clorhídrico, J. T. Baker
 - ⌘ Ampicilina materia prima
 - ⌘ Clorhidrato de bromhexina
 - ⌘ Estándar primario de Ampicilina, SIGMA
- ☞ Muestra: Penbritin EX polvo para suspensión

4.2 Diagrama General de Actividades





III. Validación del Método



4.3. Preparación de soluciones

4.3.1. Preparación de la solución amortiguadora: *Búfer Fosfatos 50 mM, pH = 2.5*

1. Pesar la cantidad necesaria de fosfato de sodio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) en un vaso de precipitados.
2. Agregar agua desionizada (aproximadamente una tercera parte del volumen total).
3. Agitar en un agitador magnético durante 5 minutos a 500 rpm.
4. Agregar agua desionizada (aproximadamente una tercera parte del volumen total).
5. Agitar en un agitador magnético durante 5 minutos a 500 rpm.
6. Ajustar pH a 2.5 utilizando HCl 0.1 M.
7. Transferir la solución al matraz volumétrico correspondiente, enjuagando el vaso de precipitados tres veces con agua desionizada.
8. Llevar al volumen de aforo con agua desionizada.
9. Medir pH y de ser necesario ajustar con HCl 0.1 M.

4.3.2. Preparación de la solución de electrolito soporte: *BPG*

1. Preparar una solución que contenga 6% de propilenglicol, llevando al aforo con búfer fosfatos 50mM pH=2.5.
2. Medir pH y de ser necesario ajustar a 2.5 con HCl 0.1 M.

4.3.3. Preparación de la solución estándar

1. Pesar lo más exacto posible, en un vaso de precipitados de 10ml, 12.5 mg de Ampicilina estándar y 10mg de Bromhexina estándar.
2. Agregar 5ml de mezcla acetonitrilo-agua pH=1.
3. Agitar manualmente hasta disolución total.
4. Transferir la solución a un matraz volumétrico de 50ml.
5. Realizar 3 enjuagues al vaso de precipitados con 2ml de búfer fosfatos 50 mM pH=2.5.
6. Llevar a volumen con búfer fosfatos. En esta solución la ampicilina se encuentra a 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$. (*Sol. STD Amp*)
7. Tomar una alícuota de 2 ml y depositarla en un matraz volumétrico de 10 ml.
8. Llevar a volumen con búfer fosfatos. En esta solución la bromhexina se encuentra a 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. (*Sol. STD Brom*)

4.3.4. Preparación de la muestra

1. Pesar aproximadamente exacto, en un vaso de precipitados de 30ml, 687.5mg del polvo para suspensión (muestra), que es equivalente a 125 mg de ampicilina y a 2 mg de bromhexina.
2. Agregar una mezcla que contenga 6 mL de propilenglicol, 6 mL de búfer fosfatos 50mM pH=2.5 y 12 mL de la mezcla acetonitrilo-agua pH=1 (1:1).
3. Agitar en un agitador magnético durante 20 minutos a 500rpm, con una barra mediana.
4. Transferir la solución a un matraz volumétrico de 50ml.
5. Realizar 5 enjuagues al vaso de precipitados, con 2ml de búfer cada uno.
6. Llevar a volumen con búfer fosfatos.
7. Filtrar con una membrana de 45 μ m. (*Sol. Brom*)
8. Tomar una alícuota de 1ml y colocarla en un matraz volumétrico de 10ml.
9. Llevar a volumen con búfer fosfatos.
10. Filtrar con una membrana de 45 μ m. (*Sol. Amp*)

4.4. Obtención del resultado analítico

Se expresa como mg de Bromhexina o Ampicilina por cada 5 ml de suspensión.

$$\text{mg Brom o Amp} / 5\text{ml} = \frac{A_{mta} * C_{STD} * FD * 2750}{A_{STD} * 1000 * W_{mta}}$$

Donde:

A_{mta} = Área de pico de la muestra

A_{STD} = Área de pico del estándar

C_{STD} = Concentración de la solución estándar en μ g/ml

W_{mta} = Peso de la muestra en mg

FD = Factor de dilución

5. Resultados y Análisis de Resultados

5.1. Antecedentes del método analítico utilizado

El método para la determinación de ampicilina y bromhexina fue desarrollado en el Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos por Rojas Calvo, 2008, y posteriormente optimizado y validado para la cuantificación de los mismos en cápsulas por Terán Alvirde, 2009.

El procedimiento del proyecto está basado en el trabajo de tesis realizado por Terán Alvirde, teniendo como *condiciones electroforéticas*:

Tabla 2. Condiciones electroforéticas para la determinación de ampicilina y bromhexina en cápsulas.

Capilar	Sílice fundida / longitud total: 30 cm / longitud al detector: 10 cm / diámetro interno: 50 μ m
Longitud de onda	210 nm
Detector	Arreglo de diodos
Temperatura	25 °C
Electrolito soporte	Búfer de fosfatos 50mM, pH = 2.5
Inyección de la muestra	Hidrodinámica, 0.5 psi, 5 seg.
Voltaje de separación	30 kV
Lavado	30 psi
Preacondicionamiento	Al inicio de la jornada de trabajo: Lavar 5 min / 20 psi / Búfer de fosfatos 50mM, pH = 2.5 Al final de la jornada de trabajo: Lavar 10 min / 20 psi / de fosfatos 50mM, pH = 2.5
Almacenamiento del capilar	En Búfer diluido (5:20)
Tiempo de migración	Bromhexina: 1.5 min Ampicilina : 3 min
Tiempo total de análisis	10.5 min

Metodología para la activación del capilar:

- ★ Lavar 10 min / 20 psi / agua desionizada / 25 °C
- ★ Lavar 10 min / 20 psi / NaOH 0.1 M / 25 °C
- ★ Lavar 20 min / 20 psi / NaOH 0.1 M / 40 °C
- ★ Lavar 10 min / 20 psi / agua desionizada / 25 °C
- ★ Lavar 10 min / 20 psi / búfer de corrida / 25 °C

Metodología para la disolución de los activos (solución estándar y preparación de la muestra):

- ★ Pesar lo más exacto posible la cantidad de muestra o de sustancia estándar en un vaso de precipitados.
- ★ Adicionar el volumen de una mezcla acetonitrilo – agua pH = 1 (1:1) correspondiente al 25% del volumen total de la disolución.
- ★ Solución estándar: agitar manualmente hasta disolución total.
Muestra: agitar en un agitador magnético 15 min a 500 rpm.
- ★ Llevar a volumen con búfer de fosfatos 50mM, pH = 2.5.

5.2. Optimización del método analítico

La optimización se llevó a cabo debido a que el método propuesto por Terán Alvirde fue diseñado para la determinación de ampicilina y bromhexina en cápsulas; en este proyecto se pretende ofrecer un procedimiento para la determinación de estos activos a partir de una presentación en polvo para suspensión oral.

El principal inconveniente de la metodología esta asociado a la disolución de los principios activos en presencia de 5 excipientes en la suspensión oral.

Al realizar el procedimiento indicado por Terán Alvirde no se obtenía una solución sino un coloide, en el cual quedaban atrapados los activos y no podían cuantificarse de manera satisfactoria.

Por lo anterior se decidió realizar pruebas de solubilidad para encontrar el mejor medio de disolución.

5.2.1. Pruebas de solubilidad

A partir de la búsqueda de información bibliográfica sobre las propiedades de los excipientes en cuestión, se realizaron pruebas de solubilización al placebo⁸ del polvo para suspensión para verificar si los disolventes reportados en la literatura podrían ser útiles en la aplicación del método. Las pruebas fueron cualitativas.

Tabla 3. Resultados de las pruebas de solubilidad iniciales.

Prueba	Disolvente	Resultado
1	Mezcla acetonitrilo-agua pH=1 (1.5ml)	Formación de pequeños grumos
2	Agua pH=1 (2ml)	Sólidos suspendidos, el medio es viscoso
3	Propilenglicol (2ml)	Líquido viscoso translúcido, no se presentan grumos
3.1	Propilenglicol (2ml) + Agua desionizada (2ml) + Búfer** (3ml)	Se presentan pequeñas partículas suspendidas
4	Acetonitrilo (2ml)	Algunos sólidos precipitan, sin formación de grumos

*se pesaron aproximadamente 50mg de placebo para cada prueba, agitando en cada caso manualmente.

**Búfer Fosfatos 50mM pH = 2.5

En base a estos resultados, la primera aseveración que podemos hacer es que el propilenglicol funciona como buen disolvente para el placebo. De acuerdo con esto se prosiguió con las pruebas de solubilidad ahora con los activos por separado.

⁸ Muestra que contiene todos los componentes de un producto a excepción del analito.

Tabla 4. Resultados de las pruebas de solubilidad en propilenglicol para los activos por separado.

Prueba	Activo	Disolvente	Resultado
3.a	Bromhexina (10mg)	Propilenglicol (1ml) + Búfer** (0.5ml)	Solubilización parcial, se observan pequeños sólidos suspendidos
3.b	Ampicilina (20mg)	Propilenglicol (2ml) + Búfer** (2ml)	No se disuelve
3.c	Ampicilina (10mg)	Búfer** (1ml) + Propilenglicol (1ml)	Solución traslúcida

* agitación manual en cada caso.

**Búfer Fosfatos 50mM pH = 2.5

Con estos resultados se puede decir que el orden en que se agregan los disolventes afecta la solubilización de los activos, entonces se propuso trabajar con mezclas de disolventes; para estas pruebas se utilizaron placebos cargados⁹ y se determinaron los porcentajes de recuperación aplicando el método ya desarrollado.

5.2.2. Elección de la mezcla de disolución

Ya que el propilenglicol es quien ayuda a disolver los excipientes, se propusieron dos mezclas que lo incluyen, y a partir de los porcentajes de recuperación obtenidos se determinó la más adecuada.

⁹ Muestra de un placebo al cual se le adiciona una cantidad conocida del analito. Tiene las mismas propiedades de la muestra real, siendo la única diferencia el conocimiento de la concentración del analito en ella.

Tabla 5. Resultados para la prueba de exactitud utilizando diferentes mezclas de disolventes.

Mezcla	Componentes	Bromhexina		Ampicilina	
		t_m	% Rec	t_m	% Rec
1	Búfer-PG	Se obtiene una suspensión que no puede ser analizada			
2	(acetoniitrilo-agua pH = 1)-PG	1.450	81.206	2.671	95.871

t_m = tiempo de migración

%Rec = porcentaje de recuperación

Ya que la mezcla Búfer-PG no constituye un buen medio para la disolución de la muestra, se decidió trabajar con la mezcla (acetoniitrilo-agua pH = 1)-PG. En esta composición la función de los disolventes es:

- ★ acetoniitrilo-agua pH = 1 (1:1): disuelve los activos, como determinó Rojas Calvo, 2008.
- ★ Propilenglicol (PG): disuelve lo que acompaña a los activos (placebo).

5.2.3. Proporción de los disolventes en la mezcla

Se obtuvieron los porcentajes de recobro de cuatro muestras (utilizando placebos cargados al 100%) en las que se varió la proporción de los disolventes en la mezcla de disolución. A partir de esto se determinó la mezcla con la que se obtendrían porcentajes de recuperación lo más cercanos al 100%. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 6. Resultados para la evaluación de la proporción de los disolventes en la mezcla de disolución.

Mezcla	Proporción (acet- agua pH=1)-PG	Bromhexina		Ampicilina	
		t_m	% Rec	t_m	% Rec
1	2:1	1.442	134.202	2.817	96.413
2	1:1	Se obtiene una mezcla muy viscosa, por lo que no puede ser analizada		2.767	91.730
3	1:2			2.737	90.977
4	2:0.5	1.438	181.063	2.492	82.719

t_m = tiempo de migración

%Rec = porcentaje de recuperación

PG = propilenglicol

A pesar de que los porcentajes de recuperación no son muy buenos puede determinarse que la mezcla que pudiera ser más adecuada es la número uno, ya que los resultados son los más cercanos al 100%. A partir de esta elección se realizaron algunos cambios para mejorar el rendimiento.

El procedimiento utilizado para realizar estas pruebas fue el siguiente:

1. Pesar aproximadamente exacto, en un vaso de precipitados de 30ml, 687.5mg del placebo cargado al 100%, que es equivalente a 125 mg de ampicilina y a 2 mg de bromhexina.
2. Agregar una mezcla que contenga 3 mL de propilenglicol y 6 mL de la mezcla acetoni-trilo-agua pH=1 (1:1).
3. Agitar en un agitador magnético durante 20 minutos a 500rpm, con una barra mediana.
4. Transferir la solución a un matraz volumétrico de 50ml.
5. Realizar 5 enjuagues al vaso de precipitados, con 2ml de búfer cada uno.
6. Llevar a volumen con búfer fosfatos. (*Sol. Brom*)
7. Tomar una alícuota de 1ml y colocarla en un matraz volumétrico de 10ml.
8. Llevar a volumen con búfer fosfatos. (*Sol. Amp*)

5.2.4. Disolución de la muestra

Para mejorar el porcentaje de recuperación de los analitos se aumentó el volumen de disolución para asegurar la distribución homogénea de los mismos. El procedimiento que se propuso fue el siguiente:

1. Pesar aproximadamente exacto, en un vaso de precipitados de 30ml, 687.5mg del placebo cargado al 100%, que es equivalente a 125 mg de ampicilina y a 2 mg de bromhexina.
2. Agregar una mezcla que contenga 6 mL de propilenglicol, 6 mL de búfer fosfatos 50mM $pH=2.5$ y 12 mL de la mezcla acetonitrilo-agua $pH=1$ (1:1).
3. Agitar en un agitador magnético durante 20 minutos a 500rpm, con una barra mediana.
4. Transferir la solución a un matraz volumétrico de 50ml.
5. Realizar 5 enjuagues al vaso de precipitados, con 2ml de búfer cada uno.
6. Llevar a volumen con búfer fosfatos.
7. Filtrar con una membrana de 45 μm . (*Sol. Brom*)
8. Tomar una alícuota de 1ml y colocarla en un matraz volumétrico de 10ml.
9. Llevar a volumen con búfer fosfatos.
10. Filtrar con una membrana de 45 μm . (*Sol. Amp*)

Este procedimiento de disolución fue puesto a prueba efectuando una prueba de exactitud; se realizaron seis inyecciones cada una de las muestras Sol. Brom y Sol. Amp., los resultados se presentan a continuación.

Tabla 7. Porcentajes de recuperación obtenidos utilizando el procedimiento de disolución propuesto.

	%Rec	
	Brom	Amp
	97.338	101.983
	99.008	100.769
	101.833	101.534
	103.643	102.192
	99.532	101.956
	99.714	101.114
Promedio	100.178	101.591
S	2.227	0.557
CV	2.224	0.549

Como se puede observar en los resultados mostrados en la tabla, el porcentaje de recuperación mejoró para los dos activos, en comparación con la anterior prueba de exactitud, ya que ahora ambos se encuentran cerca del 100%. Se puede determinar entonces que el medio de disolución propuesto es idóneo para la muestra, de manera que los activos pueden ser cuantificados de manera satisfactoria.

5.2.5. Electrolito Soporte

El pH impuesto en el medio es de 2.5, las especies existentes a estas condiciones para cada analito se muestran mediante las siguientes escalas de zonas de predominio:

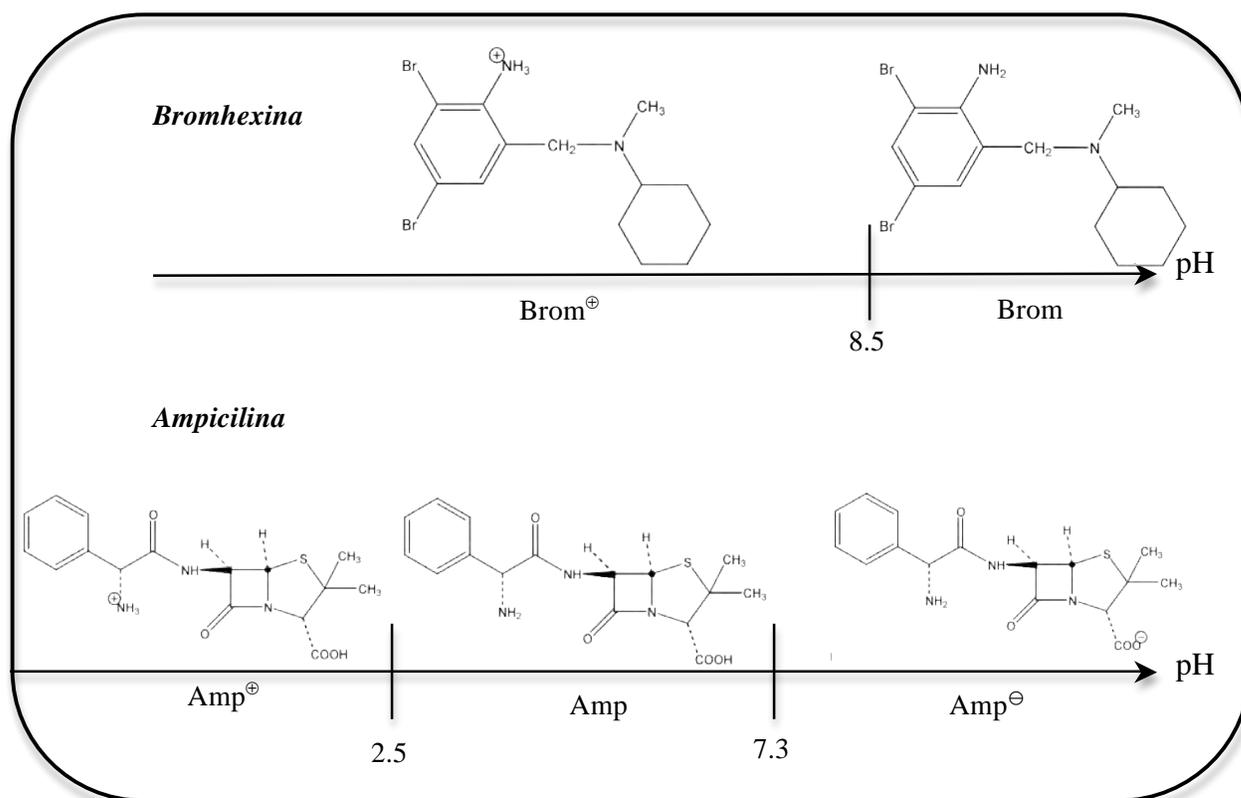


Figura 7. Escalas de Zonas de Predominio para los analitos.

A pH 2.5 la bromhexina se encuentra como catión monovalente, por lo que migrará libremente hacia el cátodo (donde se encuentra el detector). La ampicilina por otro lado se encuentra en su forma protonada y en su forma neutra en una proporción 50:50, ya que el pH del medio es uno de sus pK_a 's. La porción de ampicilina que se encuentra protonada tiende a migrar hacia el cátodo,

acarreado con ella a la porción que se encuentra en su forma neutra (que no tiene movilidad electroforética), a este pH no existe flujo electroosmótico que empuje a las especies sin carga hacia el cátodo, entonces, al tener que arrastrar a esta fracción hay un retraso en el tiempo de migración de la ampicilina ya que la porción con carga es frenada por la porción sin carga.

Entonces la bromhexina, al presentarse como catión monovalente, migrará más rápido que la ampicilina, que es retrasada porque la especie cargada debe arrastrar a la neutra (Figura 8).

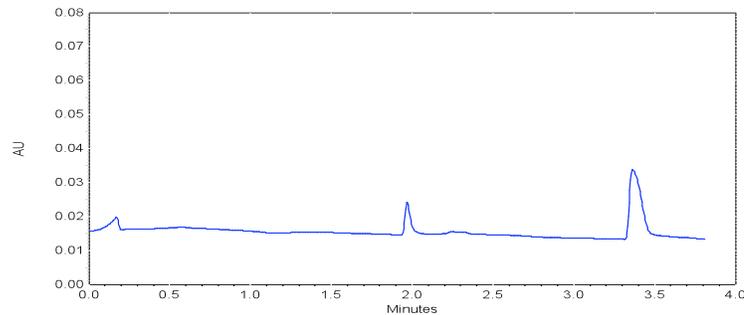


Figura 8. Electroferograma que muestra cómo se lleva a cabo la separación electroforética de bromhexina (primer pico) y ampicilina (segundo pico).

Al principio se trabajó con búfer de fosfatos 50mM pH = 2.5 como electrolito soporte, sin embargo los parámetros electroforéticos por día variaban mucho, esto se expresa con el coeficiente de variación de una serie de seis datos por día.

Tabla 8. Coeficientes de variación de los parámetros electroforéticos obtenidos utilizando búfer fosfatos 50mM pH = 2.5 como electrolito soporte.

Día	Bromhexina		Ampicilina	
	CV_{t_m}	CV_A	CV_{t_m}	CV_A
1	3.542	35.854	5.355	34.697
2	0.776	13.528	0.523	11.864
3	0.698	28.045	0.991	27.120
4	1.828	22.340	2.936	30.087
5	0.733	27.754	0.585	23.154
Promedio	1.515	25.504	2.078	25.385

Para disminuir estas variaciones, especialmente para el área, se propuso agregar propilenglicol (PG) al búfer, para mantener constante la composición del medio durante todo el análisis.

Para decidir la concentración a la que el propilenglicol estaría en la mezcla con búfer, se partió de la composición del medio de disolución de la muestra. Inicialmente se había propuesto disolverla con un volumen de PG equivalente al 6% del volumen total, y posteriormente se decidió que el mejor medio de disolución era el que contenía un volumen equivalente al 12% del volumen total; por lo tanto se hicieron pruebas con soluciones de PG en búfer que van del 6 al 12%.

A continuación se muestran los electroferogramas obtenidos:

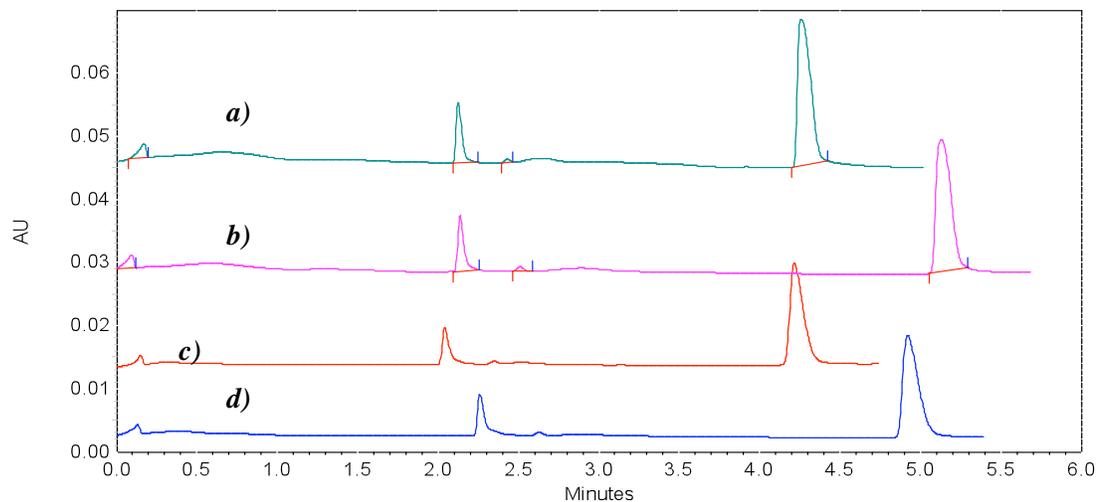


Figura 9. Electroferogramas obtenidos al utilizar como electrolito soporte soluciones de PG en búfer al: *a)* 6%, *b)* 8%, *c)* 10% y *d)* 12%.

Los tiempos de migración de la bromhexina (primer pico) no varían mucho entre cada mezcla, se mantienen entre el minuto 2 y el 2.5; los tiempos de migración de la ampicilina (segundo pico) se ven más afectados por la concentración de PG en el medio, variando del minuto 4 al 5.5. Se observa una tendencia al aumento en el tiempo de análisis, debido a que al aumentar la cantidad de PG en el medio, aumenta la viscosidad del mismo y disminuye la movilidad de los analitos.

Se analizaron también los picos de los analitos por separado para evaluar su forma:

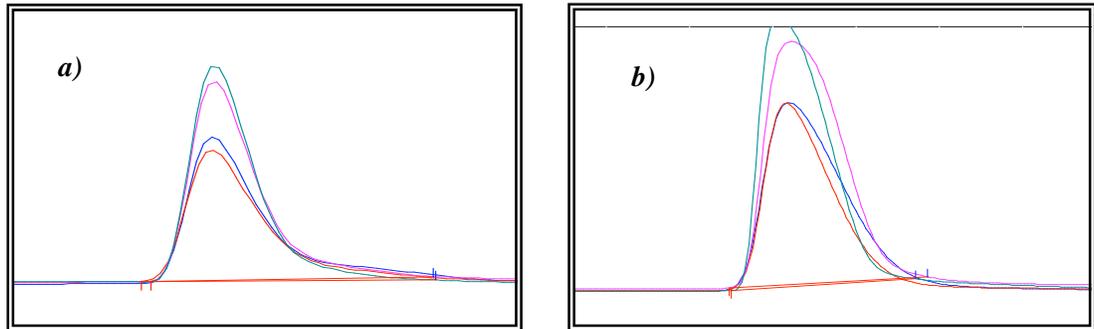


Figura 10. Picos de bromhexina (a) y ampicilina (b) obtenidos al utilizar como electrolito soporte soluciones de PG en búfer al: 6% (verde), 8% (rosa), 10% (rojo) y 12% (azul).

Los picos ampliados muestran que al aumentar la proporción de propilenglicol (PG) aumenta el coleo en ellos, y por lo tanto disminuye la tendencia a una forma gaussiana; también al aumentar la proporción de PG disminuye la altura, restando definición en la forma de pico. Una forma gaussiana (simétrica) es más fácil de integrar y su reproducibilidad es mejor. Por lo tanto los picos obtenidos con PG al 6% son mejores ya que están más definidos en comparación con los demás.

En base al análisis de los picos se determinó que la mejor mezcla es la del 6% ya que se obtiene una forma gaussiana, aunque un poco coleada, sin embargo la mejor en comparación con los demás resultados.

En base a lo anterior se utilizó como electrolito soporte una solución de PG en búfer al 6%, en adelante esta solución será llamada BPG.

Se evaluaron los parámetros electroforéticos por día, como se hizo anteriormente para el electrolito soporte inicial; al comparar los resultados de la tabla 8 con los de la tabla 9 se observa una disminución en los coeficientes de variación (obtenidos de una serie de seis datos por día), comprobando que efectivamente mejoran los resultados al añadir propilenglicol al medio, utilizando la proporción adecuada.

Tabla 9. Coeficientes de variación de los parámetros electroforéticos obtenidos utilizando BPG como electrolito soporte.

Día	Bromhexina		Ampicilina	
	CV_{t_m}	CV_A	CV_{t_m}	CV_A
1	0.490	3.880	1.135	3.373
2	0.517	3.128	0.750	3.373
3	1.286	1.676	1.267	1.306
4	0.404	8.420	0.868	3.443
5	0.629	3.789	0.941	3.768
Promedio	0.665	4.253	0.992	2.973

5.2.6. Almacenamiento del Capilar

En base al trabajo realizado por Terán Alvirde, se comenzó el proyecto almacenando el capilar en búfer fosfatos 50 mM pH=2.5 diluido en agua desionizada en una proporción 5 a 20. Sin embargo se observó que los tiempos de migración de los analitos variaban entre días como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 10. Tiempos de migración de los analitos almacenando el capilar en Búfer fosfatos 50 mM pH=2.5 diluido.

Día	t_m	
	Brom	Amp
1	1.639	3.075
2	1.715	3.425
3	1.760	4.374
4	1.724	4.073
5	2.001	6.195
Promedio	1.768	4.228
S	0.137	1.213
CV	7.775	28.698

Una vez que se cambió la composición del electrolito soporte se propuso cambiar de igual manera la composición de la solución de almacenamiento, de modo que ahora sería BPG diluido en agua desionizada en una proporción 5:20. Los tiempos de migración de los analitos ahora se mantienen al realizar el análisis en días diferentes.

Tabla 11. Tiempos de migración de los analitos almacenando el capilar en BPG diluido.

Día	t_m	
	Brom	Amp
1	1.962	3.599
2	1.772	3.648
3	1.799	3.612
4	1.875	4.193
5	1.833	3.806
6	1.878	3.846
Promedio	1.853	3.784
S	0.068	0.225
CV	3.647	5.956

5.2.7. Acondicionamiento del capilar

Al igual que para el almacenamiento del capilar, al inicio del proyecto se acondicionaba el mismo como lo había propuesto Terán Alvirde, pero utilizando la solución BPG como electrolito soporte y como solución de lavado:

Lavar al inicio de la jornada de trabajo 5 min / 20 psi / BPG

Lavar al final de la jornada de trabajo 5 min / 20 psi / BPG

Los resultados obtenidos con este acondicionamiento se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 12. Parámetros electroforéticos obtenidos con el acondicionamiento inicial.

	Brom		Amp	
	t_m	A	t_m	A
	1.967	24718	3.154	79028
	1.917	23384	3.125	79780
	1.913	22656	3.108	80092
	1.917	20854	3.117	77671
	1.900	26038	3.092	80712
	1.946	25260	3.133	87863
Promedio	1.927	23818.333	3.1215	80857.667
S	0.025	1904.818	0.0213	3587.368
CV	1.289	7.997	0.6831	4.437

Se propuso aumentar el tiempo de lavado al inicio y final de la jornada de trabajo, y utilizar solución diluida al final para eliminar todos los residuos que pudieran quedar en el capilar. También es importante mencionar que siempre deben utilizarse soluciones filtradas (electrolito soporte y soluciones de lavado) con una membrana de 45 μm para evitar la acumulación de cualquier partícula en el capilar.

El acondicionamiento propuesto fue el siguiente:

Lavar al inicio de la jornada de trabajo 10 min / 20 psi / BPG

Lavar al final de la jornada de trabajo 10 min / 20 psi / BPG diluido

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 13. Parámetros electroforéticos obtenidos con el acondicionamiento propuesto.

	Brom		Amp	
	t_m	A	t_m	A
	1.858	20179	3.163	19297
	1.846	20051	3.146	19370
	1.858	20261	3.217	19658
	1.863	20103	3.221	19615
	1.863	19432	3.242	19216
Promedio	1.858	20005.200	3.198	19431.200
S	0.007	330.099	0.041	195.759
CV	0.374	1.650	1.285	1.007

Se observa una disminución en el coeficiente de variación del área de pico de los analitos, por lo que este fue el acondicionamiento utilizado durante la validación del método analítico.

5.2.8. Condiciones óptimas

a) Condiciones electroforéticas

Tabla 14. Condiciones electroforéticas óptimas para la determinación de ampicilina y bromhexina en polvo para suspensión oral.

Capilar	Sílice fundida / longitud total: 30 cm / longitud al detector: 10 cm / diámetro interno: 50 μm
Longitud de onda	210 nm
Detector	Arreglo de diodos
Temperatura	25 °C
Electrolito soporte	BPG: Propilenglicol al 6% en Búfer de fosfatos 50mM, pH = 2.5
Inyección de la muestra	Hidrodinámica, 0.5 psi, 5 seg.
Voltaje de separación	30 kV
Lavado	30 psi
Preacondicionamiento	Al inicio de la jornada de trabajo: Lavar 10 min / 20 psi / BPG Al final de la jornada de trabajo: Lavar 10 min / 20 psi / BPG diluido (5:20)
Almacenamiento del capilar	En BPG diluido (5:20)
Tiempo de migración	Bromhexina: 2.0 Ampicilina: 3.5
Tiempo total de análisis	11.5 min

b) Disolución de muestra

1. Pesar en un vaso de precipitados de 30ml, una cantidad exactamente conocida, aproximadamente 687.5mg de la muestra, que es equivalente a 125 mg de ampicilina y a 2 mg de bromhexina.
2. Agregar una mezcla que contenga 6 mL de propilenglicol, 6 mL de búfer fosfatos 50mM pH=2.5 y 12 mL de la mezcla acetonitrilo-agua pH=1 (1:1).
3. Agitar en un agitador magnético durante 20 minutos a 500rpm, con una barra mediana.
4. Transferir la solución a un matraz volumétrico de 50ml.
5. Realizar 5 enjuagues al vaso de precipitados, con 2ml de búfer cada uno.
6. Llevar a volumen con búfer fosfatos.
7. Filtrar con una membrana de 45 μm . (**Sol. Brom**)
8. Tomar una alícuota de 1ml y colocarla en un matraz volumétrico de 10ml.
9. Llevar a volumen con búfer fosfatos.
10. Filtrar con una membrana de 45 μm . (**Sol. Amp**)

5.3. Validación del Método Analítico

5.3.1. Especificidad

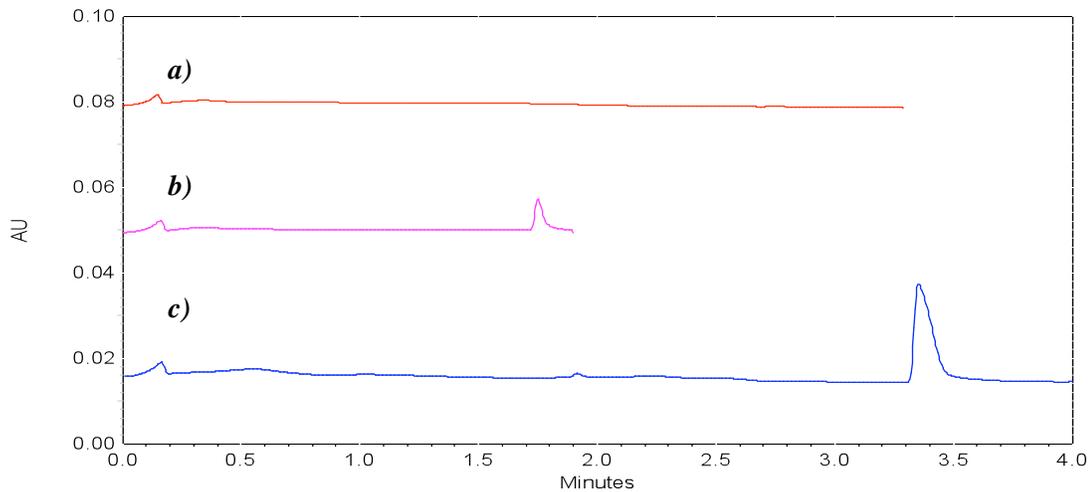


Figura 11. Electroferogramas obtenidos para la evaluación de la prueba de especificidad.

a) Placebo, *b)* Estándar de Bromhexina, *c)* Estándar de Ampicilina.

Para demostrar que los componentes del placebo no interfieren en la respuesta analítica de los analitos, se obtuvieron los electroferogramas correspondientes (Figura 11). Se muestra la identificación de los analitos mediante los estándares. El electroferograma del placebo no muestra presencia de alguna señal analítica y por lo tanto no existe interferencia. Entonces puede establecerse que el método es capaz de obtener una respuesta analítica debida única y exclusivamente a los analitos de interés; es decir, se demuestra que el método es específico para ampicilina y bromhexina.

5.3.2. Adecuabilidad del Sistema

Tabla 15. Resultados obtenidos para evaluar Adecuabilidad del Sistema.

Sistema	Bromhexina		Ampicilina	
	t_m	A	t_m	A
1	1.938	15698	3.304	65960
2	1.933	15841	3.362	67605
3	1.962	16113	3.383	67457
4	1.967	15817	3.396	67727
5	1.942	15852	3.329	65770
6	1.954	15398	3.396	66381
Promedio	1.949	15786.500	3.362	66816.667
S	0.014	233.905	0.038	880.840
CV	0.705	1.482	1.129	1.318

Los resultados de la tabla muestran que los coeficientes de variación para los tiempos de migración y área de pico de ambos analitos son menores al 2%, por lo que se cumple con el criterio de aceptación.

5.3.3. Precisión del Sistema

Tabla 16. Resultados obtenidos para evaluar Precisión del Sistema.

Sistema	Bromhexina		Ampicilina	
	t_m	A	t_m	A
1	1.783	18796	3.229	90369
2	1.783	18653	3.192	90841
3	1.775	19155	3.200	92001
4	1.775	18548	3.167	90558
5	1.788	19080	3.242	92475
6	1.796	19080	3.250	93872
Promedio	1.783	18885.333	3.213	91686.000
S	0.008	254.662	0.032	1358.031
CV	0.450	1.348	1.003	1.481

El valor establecido como criterio de aceptación para esta prueba es de 1.5%, los coeficientes de variación obtenidos son menores a este valor, entonces, se demuestra que el método es capaz de obtener resultados analíticos con una variabilidad aceptable.

5.3.4. Linealidad del Sistema

5.3.4.1. Bromhexina

Tabla 17. Resultados obtenidos para evaluar Linealidad del Sistema para Bromhexina.

Nivel			
	t_m	A	C ($\mu\text{g/ml}$)
1 (80%)	1.892	18031	32
	1.892	17265	32
	1.921	17681	32
2 (90%)	1.896	19362	36
	1.917	19624	36
	1.921	19798	36
3 (100%)	1.925	22001	40
	1.871	21962	40
	1.933	22038	40
4 (110%)	1.917	24846	44
	1.925	25218	44
	1.900	25146	44
5 (120%)	1.913	27142	48
	1.925	27136	48
	1.892	26753	48
Promedio	1.909		
S	0.018		
CV	0.922		

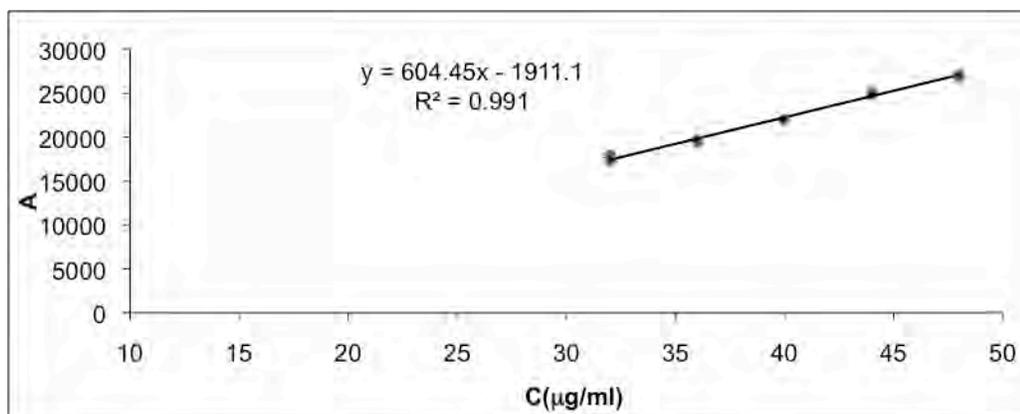


Figura 12. Gráfico del área de pico en función de la concentración de bromhexina.

Para demostrar que existe una relación lineal entre la concentración de bromhexina y el área de pico, se realizó un análisis estadístico, enunciándose las siguientes hipótesis:

Ho: No existe una relación lineal entre la concentración de bromhexina y el área de pico.

Ha: Existe una relación lineal entre la concentración de bromhexina y el área de pico.

Criterio de Aceptación

Si $F_{cal} < F_{crítica}$ ∴ No se rechaza Ho

Si $F_{cal} > F_{crítica}$ ∴ Se rechaza Ho

Tabla 18. Análisis de variancia para evaluar la linealidad del sistema para bromhexina.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	175372705.2	175372705.2	1421.073	1.15148E-14
Residuos	13	1604312.533	123408.656		
Total	14	176977017.7			

Nivel de significancia (α) = 0.05

El valor obtenido de F_{cal} es mucho mayor que el de $F_{crítica}$, por lo tanto se rechaza Ho y se establece que sí existe una relación lineal entre la concentración de bromhexina y el área de pico.

Se obtuvieron los parámetros estadísticos de la regresión, y se evaluaron en base a los criterios de aceptación establecidos por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, en la Guía de Validación de Métodos Analíticos.

Tabla 19. Parámetros estadísticos de la regresión para evaluar Linealidad del Sistema para Bromhexina.

Coefficiente de correlación múltiple	0.995
Coefficiente de determinación r^2	0.991
r^2 ajustado	0.990
Pendiente	604.45
IC(β_1)	569.816 - 639.084
Intercepto	-1911.133

Los criterios de aceptación indican que el coeficiente de determinación debe ser mayor o igual a 0.98, esto se cumple y se complementa con la prueba de hipótesis que indica que el sistema bromhexina es lineal. Además el intervalo de confianza para la pendiente no incluye al cero.

5.3.4.2. Ampicilina

Tabla 20. Resultados obtenidos para evaluar la Linealidad del Sistema para Ampicilina.

Nivel			
	t_m	A	C ($\mu\text{g/ml}$)
1	3.346	78948	200.32
	3.271	78232	200.32
	3.446	79892	200.32
2	3.233	90034	225.36
	3.304	89449	225.36
	3.358	90767	225.36
3	3.400	95054	250.4
	3.233	93012	250.4
	3.337	95606	250.4
4	3.404	103025	275.44
	3.396	103320	275.44
	3.375	102356	275.44
5	3.404	114060	300.48
	3.421	114231	300.48
	3.379	114177	300.48
Promedio	3.354		
S	0.066		
CV	1.983		

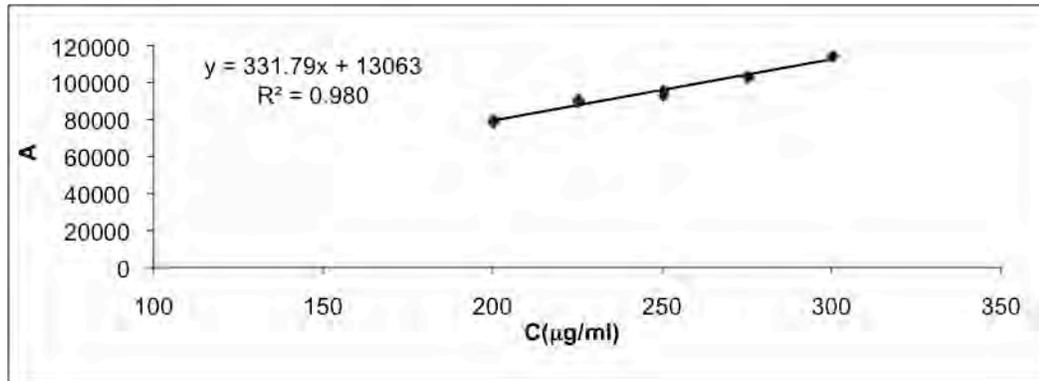


Figura 13. Gráfico del área de pico en función de la concentración de ampicilina.

Se realizó un análisis estadístico para demostrar que existe una relación lineal entre la concentración de ampicilina y el área de pico, las hipótesis son las siguientes:

Ho: No existe una relación lineal entre la concentración de ampicilina y el área de pico.

Ha: Existe una relación lineal entre la concentración de ampicilina y el área de pico.

Criterio de Aceptación

Si $F_{cal} < F_{crítica}$ ∴ No se rechaza Ho

Si $F_{cal} > F_{crítica}$ ∴ Se rechaza Ho

Tabla 21. Análisis de variancia para evaluar la linealidad del sistema para ampicilina.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	2070735768	2070735768	625.572	2.2253E-12
Residuos	13	43031912.1	3310147.085		
Total	14	2113767680			

Nivel de significancia (α) = 0.05

Ya que el valor obtenido de F_{cal} es mayor que el de $F_{crítica}$ se rechaza Ho y se concluye que sí existe una relación lineal entre la concentración de ampicilina y el área de pico.

Los parámetros estadísticos de la regresión se evaluaron en base a los criterios de aceptación.

Tabla 22. Parámetros estadísticos de la regresión para evaluar Linealidad del Sistema para Ampicilina.

Coefficiente de correlación múltiple	0.990
Coefficiente de determinación r^2	0.980
r^2 ajustado	0.980
Pendiente	331.79
IC(β_1)	303.139 - 360.447
Intercepto	13063

El coeficiente de determinación es igual a 0.98 y, a pesar de que se encuentra en el límite, cumple con la especificación, este resultado se complementa con la prueba de hipótesis que indica que el sistema ampicilina es lineal. Además de que el intervalo de confianza para la pendiente no incluye al cero.

5.3.5. Exactitud y Repetibilidad del Método

5.3.5.1. Bromhexina

Tabla 23. Resultados obtenidos para evaluar la exactitud y repetibilidad del método para Bromhexina.

Nivel	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	% Recuperación
80 %	1.620	1.657	102.311
	1.620	1.638	101.079
	1.620	1.591	98.200
	1.620	1.643	101.397
	1.620	1.630	100.567
	1.620	1.627	100.417
100 %	2.030	1.991	98.090
	2.030	2.066	101.771
	2.030	2.013	99.159
	2.030	2.074	102.168
	2.031	1.984	97.705
	2.030	2.021	99.525
120 %	2.440	2.431	99.649
	2.441	2.447	100.271
	2.440	2.386	97.787
	2.441	2.509	102.807
	2.441	2.489	101.944
	2.440	2.443	100.125
		Promedio	100.292
		S	1.634
		CV	1.630
		IC(μ)	99.465 - 101.088

5.3.5.2. Ampicilina

Tabla 24. Resultados obtenidos para evaluar la exactitud y repetibilidad del método para Ampicilina.

Nivel	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	% Recuperación
80 %	100.003	100.970	100.967
	100.003	101.297	101.295
	100.046	100.017	99.971
	100.003	95.768	95.765
	100.003	98.156	98.154
	100.003	98.829	98.827
100 %	125.031	122.754	98.179
	125.031	126.467	101.148
	125.031	122.003	97.578
	125.031	125.790	100.607
	125.031	126.926	101.516
	125.031	122.243	97.770
120 %	149.960	151.237	100.852
	149.960	153.462	102.335
	149.960	150.847	100.592
	149.960	149.827	99.911
	149.960	149.260	99.533
	149.960	148.468	99.005
		Promedio	99.667
		S	1.701
		CV	1.707
		IC(μ)	98.821 - 100.513

La repetibilidad del método se demuestra mediante los coeficientes de variación del porcentaje de recuperación (1.63% para bromhexina y 1.707% para ampicilina), que son menores al 2%.

Para evaluar la exactitud del método se realizó una prueba de t. Las hipótesis planteadas son las siguientes:

Ho: $\bar{x} = \mu = 100\%$ (el método es exacto)

Ha: $\bar{x} \neq \mu \neq 100\%$ (el método no es exacto)

Criterio de Aceptación

Si $t_0 < t_{\alpha/2, n-1} \therefore$ No se rechaza Ho

Si $t_0 > t_{\alpha/2, n-1} \therefore$ Se rechaza Ho

Tabla 25. Valores de t obtenidos para evaluar la exactitud del método.

t₀ para bromhexina	t₀ para ampicilina	t_{0.05/2, 18-1}
0.7582	0.8306	2.110

*La fórmula para el cálculo de t₀ se encuentra en el Anexo 9.6.

Los resultados indican que no se rechaza Ho y por lo tanto el método es exacto para ambos analitos, este resultado se complementa con los intervalos de confianza para la media poblacional (99.465 - 101.088 para bromhexina y 98.821 - 100.513 para ampicilina), ya que ambos incluyen el 100%.

Al cumplir con todos los criterios de aceptación para Exactitud y Repetibilidad del Método, se concluye que el método cuantifica confiablemente la cantidad de analito (ampicilina y bromhexina) que realmente contiene la muestra de manera repetible.

5.3.6. Linealidad del Método

5.3.6.1. Bromhexina

Tabla 26. Resultados obtenidos para evaluar la linealidad del método para Bromhexina.

Nivel	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	% Recuperación
80 %	1.620	1.605	99.029
	1.620	1.636	100.991
	1.621	1.579	97.443
90 %	1.851	1.872	101.149
	1.851	1.851	100.013
	1.851	1.892	102.236
100 %	2.031	2.031	100.015
	2.031	1.984	97.696
	2.031	1.986	97.803
110 %	2.221	2.209	99.437
	2.221	2.255	101.509
	2.222	2.270	102.174
120 %	2.441	2.430	99.563
	2.441	2.452	100.452
	2.441	2.419	99.061
		Promedio	99.905
		S	1.544
		CV	1.546

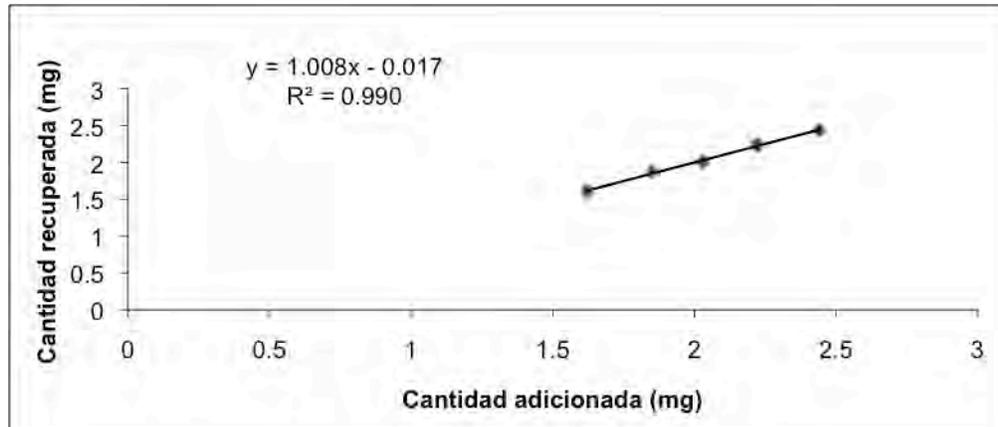


Figura 14. Gráfico de la cantidad recuperada en función de la cantidad adicionada para bromhexina.

Para demostrar que existe una relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada de bromhexina se realizó un análisis estadístico, enunciándose las siguientes hipótesis:

Ho: No existe una relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

Ha: Existe una relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

Criterio de Aceptación

Si $F_{cal} < F_{crítica}$ ∴ No se rechaza Ho

Si $F_{cal} > F_{crítica}$ ∴ Se rechaza Ho

Tabla 27. Análisis de variancia para evaluar la linealidad del método para bromhexina.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F_{cal}	Valor crítico de F
Regresión	1	1.288969522	1.288969522	1251.691	2.608E-14
Residuos	13	0.013387168	0.001029782		
Total	14	1.302356691			

Nivel de significancia (α) = 0.05

El valor obtenido de F_{cal} es mucho mayor que el de $F_{crítica}$, por lo tanto se rechaza Ho y se establece que sí existe una relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada para bromhexina.

Una vez demostrada la linealidad del método para bromhexina, se establecen los parámetros estadísticos de la regresión, para evaluarlos en base a los criterios de aceptación marcados por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, en la Guía de Validación de Métodos Analíticos.

Tabla 28. Parámetros estadísticos de la regresión para evaluar la Linealidad del método para Bromhexina.

Coefficiente de correlación múltiple	0.995
Coefficiente de determinación r^2	0.990
r^2 ajustado	0.989
Pendiente	1.008
IC(β_1)	0.9463 - 1.0694
Intercepto	-0.017
IC(β_0)	-0.1419 - 0.1071
IC(μ)	99.050 - 100.760

El coeficiente de determinación cumple con el criterio de aceptación, ya que es mayor a 0.98; aunando a esto la prueba de hipótesis, se demuestra que el método es lineal.

El promedio del porcentaje de recobro (99.905) se incluye dentro del 98 y el 102%, y el intervalo de confianza para la media poblacional incluye el 100%; con estos resultados se demuestra que el método es exacto. La precisión del método se ve reflejada en el coeficiente de variación del porcentaje de recobro (1.546%) que es menor al 2% especificado.

También puede demostrarse la exactitud del método mediante la pendiente y la ordenada al origen, cuyo valor debe ser 1 y 0 respectivamente, de ser diferente indicaría anomalías en la cuantificación, obteniéndose valores mayores o menores a los reales. Los criterios de aceptación establecidos para estos parámetros se indican como intervalos de confianza, que deben incluir la unidad para la pendiente y el cero para el intercepto.

En este caso los valores obtenidos son 1.008 para la pendiente y -0.017 para el intercepto, para demostrar que estos resultados cumplen con las especificaciones se realizó un análisis estadístico acerca de estos parámetros del modelo lineal. Las hipótesis planteadas son las siguientes:

Para la pendiente:

Ho: $\beta_1 = 1$ (El valor de la pendiente es igual a uno)

Ha: $\beta_1 \neq 1$ (El valor de la pendiente es diferente de uno)

Para el intercepto:

Ho: $\beta_0 = 0$ (El valor del intercepto es igual a cero)

Ha: $\beta_0 \neq 0$ (El valor del intercepto es diferente de cero)

Criterio de Aceptación

Si $|t_0| < t_{\alpha/2, n-2} \therefore$ No se rechaza Ho

Si $|t_0| > t_{\alpha/2, n-2} \therefore$ Se rechaza Ho

Tabla 29. Valores de t obtenidos para el análisis estadístico acerca de la pendiente y el intercepto para bromhexina.

$ t_0 $ para la pendiente	$ t_0 $ para el intercepto	$t_{0.05/2, 15-2}$
0.2747	0.3021	2.16

*Las fórmulas para el cálculo de t_0 se encuentran en el Anexo 9.7.

Con los resultados de la tabla 29 para la prueba de hipótesis y los intervalos de confianza mostrados en la tabla 28 se demuestra que la pendiente incluye la unidad y el intercepto el cero, por lo tanto sí se cumple con los criterios de aceptación.

5.3.6.2. Ampicilina

Tabla 30. Resultados obtenidos para evaluar la
Linealidad del método para Ampicilina.

Nivel	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	% Recuperación
80 %	100.046	100.017	99.971
	100.003	100.970	100.967
	100.061	102.723	102.661
90 %	112.541	115.740	102.842
	112.541	110.758	98.415
	112.557	114.202	101.461
100 %	125.085	125.361	100.220
	125.031	126.926	101.516
	125.104	127.073	101.574
110 %	137.614	134.766	97.931
	137.614	136.074	98.881
	137.634	135.798	98.666
120 %	149.960	151.237	100.852
	149.960	150.847	100.592
	150.047	149.100	99.368
		Promedio	100.394
		S	1.512
		CV	1.506

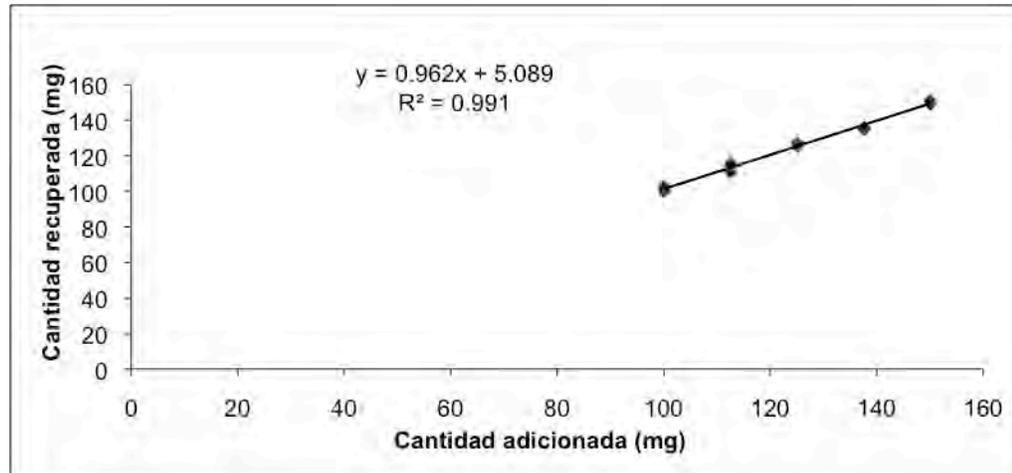


Figura 15. Gráfico de la cantidad recuperada en función de la cantidad adicionada para ampicilina.

Para demostrar que existe una relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada de ampicilina se realizó un análisis estadístico, se enunciaron las siguientes hipótesis:

Ho: No existe una relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

Ha: Existe una relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada.

Criterio de Aceptación

Si $F_{\text{cal}} < F_{\text{crítica}} \therefore$ No se rechaza Ho

Si $F_{\text{cal}} > F_{\text{crítica}} \therefore$ Se rechaza Ho

Tabla 31. Análisis de variancia para evaluar la linealidad del método para ampicilina.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	4340.1488	4340.1488	1410.8774	1.2062E-14
Residuos	13	39.9907	3.0762		
Total	14	4380.1395			

Nivel de significancia (α) = 0.05

El valor obtenido de F_{cal} es mayor que el de $F_{\text{crítica}}$, por lo tanto se rechaza Ho y se establece que sí existe una relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada para ampicilina.

Ya que se estableció la linealidad del método para ampicilina, se establecieron los parámetros estadísticos de la regresión, para evaluarlos en base a los criterios de aceptación.

Tabla 32. Parámetros estadísticos de la regresión para evaluar la Linealidad del Método para Ampicilina.

Coefficiente de correlación múltiple	0.995
Coefficiente de determinación r^2	0.991
r^2 ajustado	0.990
Pendiente	0.962
IC(β_1)	0.9070 – 1.0177
Intercepto	5.089
IC(β_0)	-1.8510 – 12.0296
IC(μ)	99.557 – 101.232

El coeficiente de determinación obtenido (0.99) cumple con el criterio de aceptación; y ya que la prueba de hipótesis también lo demuestra, se establece que el método es lineal.

El promedio del porcentaje de recobro es de 100.394, y se incluye dentro del 98 y el 102%; el intervalo de confianza para la media poblacional incluye el 100%; esto demuestra la exactitud del método. El coeficiente de variación del porcentaje de recobro (1.506%) refleja la precisión del método ya que es menor al 2%.

Como se mencionó anteriormente, la exactitud del método también puede demostrarse a través de la pendiente y la ordenada al origen; los valores obtenidos son 0.962 y 5.089 respectivamente, a simple vista estos resultados parecen muy desviados de los ideales, por lo que se realizó un análisis estadístico para verificar si cumplen con las especificaciones. Las hipótesis planteadas son las siguientes:

Para la pendiente:

Ho: $\beta_1 = 1$ (El valor de la pendiente es igual a uno)

Ha: $\beta_1 \neq 1$ (El valor de la pendiente es diferente de uno)

Para el intercepto:

Ho: $\beta_0 = 0$ (El valor del intercepto es igual a cero)

Ha: $\beta_0 \neq 0$ (El valor del intercepto es diferente de cero)

Criterio de Aceptación

Si $|t_0| < t_{\alpha/2, n-2} \therefore$ No se rechaza H_0

Si $|t_0| > t_{\alpha/2, n-2} \therefore$ Se rechaza H_0

Tabla 33. Valores de t obtenidos para el análisis estadístico acerca de la pendiente y el intercepto para ampicilina.

$ t_0 $ para la pendiente	$ t_0 $ para el intercepto	$t_{0.05/2, 15-2}$
1.4679	1.5839	2.16

*Las fórmulas para el cálculo de t_0 se encuentran en el Anexo 9.7.

Los valores de t_0 son menores al de t de tablas, por lo tanto no se rechaza H_0 y se concluye que la pendiente es igual a uno y el intercepto es igual a cero. La tabla 32 muestra que los intervalos de confianza para estos parámetros incluyen a la unidad para la pendiente, y al cero para el intercepto. Entonces, a pesar de que los resultados parecen no ser buenos, se demuestra estadísticamente que cumplen con los criterios de aceptación.

Ya que todos los resultados obtenidos para linealidad del método cumplen con los criterios de aceptación, se puede establecer que el método cuantifica de manera confiable, independientemente de la proporción en la que se encuentren los analitos (ampicilina y bromhexina) con respecto a los demás componentes de la muestra.

5.3.7. Precisión Intermedia

Tabla 34. Resultados obtenidos para evaluar precisión intermedia para Bromhexina

	Analista 1 %Recobro	Analista 2 %Recobro	CV_{%Rec}
Día 1	103.282	102.237	0.558
	102.413	103.487	
	103.500	103.426	
Día 2	103.193	102.195	0.544
	102.061	103.371	
	102.319	102.319	
CV_{%Rec}	0.584	0.629	CV global = 0.579

Tabla 35. Resultados obtenidos para evaluar precisión intermedia para Ampicilina

	Analista 1 %Recobro	Analista 2 %Recobro	CV_{%Rec}
Día 1	100.121	99.790	1.200
	100.146	98.979	
	102.557	100.659	
Día 2	99.135	99.977	0.928
	100.768	98.046	
	99.800	99.909	
CV_{%Rec}	1.169	0.919	CV global = 1.100

Los coeficientes de variación obtenidos son menores al 2%, criterio de aceptación establecido para esta prueba, con esto se demuestra que el método es preciso entre diferentes analistas y diferentes días. Para complementar estos resultados se realizó un análisis estadístico mediante el Modelo de diseños anidados. A partir de los resultados obtenidos (Tabla 36) se contrastaron los siguientes pares de hipótesis:

Para el factor A: *analista*

Ho: $A_1 = \dots = A_a = 0$ (el factor *analista* no influye en el porcentaje de recuperación obtenido)

Ha: algún $A_1 \neq 0$ (el factor *analista* influye en el porcentaje de recuperación obtenido)

Criterio de Aceptación

Si $F_{\text{calc}} < F_{\text{crítica}} \therefore$ No se rechaza Ho

Si $F_{\text{calc}} > F_{\text{crítica}} \therefore$ Se rechaza Ho

Para el factor B: *Día*

Ho: $B_{1(i)} = \dots = B_{b(i)} = 0$ (el factor *día* no influye en el porcentaje de recuperación obtenido)

Ha: algún $B_{j(i)} \neq 0$ (e factor *día* influye en el porcentaje de recuperación obtenido)

Criterio de Aceptación

Si $F_{\text{calc}} < F_{\text{crítica}} \therefore$ No se rechaza Ho

Si $F_{\text{calc}} > F_{\text{crítica}} \therefore$ Se rechaza Ho

Tabla 36. Análisis de variancia para evaluar la Precisión del método.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F_{calc}	Valor crítico de F^*	Valor p
Bromhexina						
Analista	0.0059	1	0.0059	0.02	3.46	0.9086
Día(Analista)	0.7052	2	0.3526	0.88	3.11	0.4502
Residual	3.1937	8	0.3992			
Total	3.9048	11				
Ampicilina						
Analista	0.0666	1	0.0666	0.05	3.46	0.8504
Día(Analista)	2.9087	2	1.4544	1.11	3.11	0.3742
Residual	10.4422	8	1.3052			
Total	13.4175	11				

Nivel de significancia (α) = 0.10.

*La forma de obtención de $F_{\text{crítica}}$ para esta prueba se explica en el anexo 9.8.

Los valores de F_{calc} obtenidos para el factor *analista* (0.02 para bromhexina y 0.88 para ampicilina) son menores al valor de $F_{\text{crítica}}$ (3.46), por lo tanto no se rechaza Ho y se puede decir que el analista no influye en el porcentaje de recuperación obtenido; es decir, se demuestra que el método es preciso entre analistas.

Para el factor *día* los valores de F_{calc} (0.05 para bromhexina y 1.11 para ampicilina) también son menores al valor de $F_{\text{crítica}}$ (3.11), entonces que el día no influye en el porcentaje de recuperación obtenido, y se demuestra que el método es preciso entre días.

Adicionalmente, los valores de p , que son mayores a 0.1, comprueban el no rechazo de las hipótesis nulas; demostrando que ni el analista ni el día influyen en el porcentaje de recuperación obtenido.

Los resultados obtenidos para precisión intermedia cumplen con los criterios de aceptación, por lo tanto se puede establecer que el método es capaz de obtener resultados analíticos con una variabilidad aceptable al realizarse determinaciones por diferentes analistas y en diferentes días.

5.3.8. Resumen

Tabla 37. Resultados de los parámetros de desempeño para la validación del método analítico utilizado para cuantificar ampicilina y bromhexina en polvo para suspensión oral mediante EC.

Parámetro de desempeño	Criterio de Aceptación	Resultados		Conclusión
		Bromhexina	Ampicilina	
<i>Especificidad</i>	La respuesta se debe únicamente al analito	La respuesta se debe únicamente al analito	La respuesta se debe únicamente al analito	Cumple
<i>Adecuabilidad del Sistema</i>	$CV \leq 2\%$	$CV_A = 1.482$	$CV_A = 1.318$	Cumple
<i>Precisión del Sistema</i>	$CV \leq 1.5\%$	$CV_A = 1.348$	$CV_A = 1.481$	Cumple
<i>Linealidad del Sistema</i>	$r^2 \geq 0.98$ $IC(\beta_1)$ no debe incluir el 0	$r^2 = 0.991$ $IC(\beta_1) =$ 569.816 - 639.084	$r^2 = 0.980$ $IC(\beta_1) =$ 303.139 - 360.447	Cumple
<i>Exactitud y Repetibilidad del Método</i>	$IC(\mu)$ debe incluir el 100% ó $\bar{X}\% \text{ Recobro } 98-102\%$ $CV_{\%Rec} \leq 2\%$	$IC(\mu) =$ 99.465 - 101.088 $\bar{X}\% \text{ Recobro } = 100.292$ $CV_{\%Rec} = 1.630$	$IC(\mu) =$ 98.821 - 100.513 $\bar{X}\% \text{ Recobro } = 99.667$ $CV_{\%Rec} = 1.707$	Cumple
<i>Linealidad del Método</i>	$r^2 \geq 0.98$ $IC(\beta_1)$ debe incluir la unidad $IC(\beta_0)$ debe incluir el cero $CV_{y/x} \leq 2\%$ $IC(\mu)$ debe incluir el 100% $\bar{X}\% \text{ Recobro } 98-102\%$ $CV_{\%Rec} \leq 2\%$	$r^2 = 0.990$ $IC(\beta_1) =$ 0.9463 - 1.0694 $IC(\beta_0) =$ -0.1419 - 0.1071 $CV_{y/x} = 1.547$ $IC(\mu) =$ 99.050 - 100.760 $\bar{X}\% \text{ Recobro } = 99.905$ $CV_{\%Rec} = 1.546$	$r^2 = 0.991$ $IC(\beta_1) =$ 0.9070 - 1.0177 $IC(\beta_0) =$ -1.8510 - 12.0296 $CV_{y/x} = 1.398$ $IC(\mu) =$ 99.557 - 101.232 $\bar{X}\% \text{ Recobro } = 100.394$ $CV_{\%Rec} = 1.506$	Cumple
<i>Precisión del Método</i>	$CV \leq 2\%$	$CV = 0.579$	$CV = 1.100$	Cumple

6. Perspectivas del Método Analítico

Se llevó a cabo un ensayo para una muestra de polvo para suspensión oral que contiene la mezcla amoxicilina y bromhexina, y se obtuvo el electroferograma que muestra la separación de estos dos analitos (Figura 16).

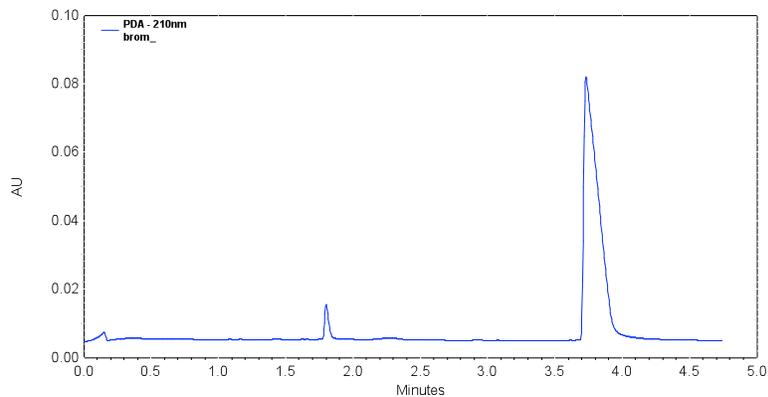


Figura 16. Electroferograma que muestra la separación de bromhexina (primer pico) y amoxicilina (segundo pico), al utilizar el método analítico.

Se demuestra que la separación de estos dos analitos es semejante a la de ampicilina y bromhexina; esto debido a que la amoxicilina y la ampicilina pertenecen al mismo grupo de antibióticos. En base a esto, el trabajo realizado puede servir como base para establecer un método analítico general para determinar ampicilina o amoxicilina en mezcla con bromhexina.

7. Conclusiones

Se optimizó el método analítico para la cuantificación de ampicilina y bromhexina en polvo para suspensión oral, determinando la metodología para la preparación de la muestra analítica que garantiza la completa disolución de los principios activos; y estableciendo las condiciones óptimas experimentales que garanticen la confiabilidad de la metodología propuesta, empleando la técnica de electroforesis capilar.

Se realizó la validación del método analítico una vez optimizado, demostrando con los resultados obtenidos que este es confiable para ser empleado para la determinación de los principios activos de interés, aún en presencia de 5 excipientes de diferente naturaleza química.

8. Anexos

8.1 Índice de Tablas

Tabla 1.	Parámetros de desempeño evaluados de acuerdo a diversos documentos normativos	15
Tabla 2.	Condiciones electroforéticas para la determinación de ampicilina y bromhexina en cápsulas	23
Tabla 3.	Resultados de las pruebas de solubilidad iniciales	25
Tabla 4.	Resultados de las pruebas de solubilidad en propilenglicol para los activos por separado	26
Tabla 5.	Resultados para la prueba de exactitud utilizando diferentes mezclas de disolventes	27
Tabla 6.	Resultados para la evaluación de la proporción de los disolventes en la mezcla de disolución	28
Tabla 7.	Porcentajes de recuperación obtenidos utilizando el procedimiento de disolución propuesto.....	29
Tabla 8.	Coefficientes de variación de los parámetros electroforéticos obtenidos utilizando búfer fosfatos 50mM pH = 2.5 como electrolito soporte.....	31
Tabla 9.	Coefficientes de variación de los parámetros electroforéticos obtenidos utilizando BPG como electrolito soporte.....	34
Tabla 10.	Tiempos de migración de los analitos almacenando el capilar en Búfer fosfatos 50 mM pH=2.5 diluido.....	34
Tabla 11.	Tiempos de migración de los analitos almacenando el capilar en BPG diluido.....	35
Tabla 12.	Parámetros electroforéticos obtenidos con el acondicionamiento inicial.....	35
Tabla 13.	Parámetros electroforéticos obtenidos con el acondicionamiento propuesto.....	36
Tabla 14.	Condiciones electroforéticas óptimas para la determinación de ampicilina y bromhexina en polvo para suspensión oral.....	37
Tabla 15.	Resultados obtenidos para evaluar Adecuabilidad del Sistema.....	39

Tabla 16.	Resultados obtenidos para evaluar Precisión del Sistema.....	39
Tabla 17.	Resultados obtenidos para evaluar Linealidad del Sistema para Bromhexina.....	40
Tabla 18.	Análisis de variancia para evaluar la linealidad del sistema para bromhexina.....	41
Tabla 19.	Parámetros estadísticos de la regresión para evaluar Linealidad del Sistema para Bromhexina.....	42
Tabla 20.	Resultados obtenidos para evaluar la Linealidad del Sistema para Ampicilina.....	43
Tabla 21.	Análisis de variancia para evaluar la linealidad del sistema para ampicilina.....	44
Tabla 22.	Parámetros estadísticos de la regresión para evaluar Linealidad del Sistema para Ampicilina.....	45
Tabla 23.	Resultados obtenidos para evaluar la exactitud y repetibilidad del método para Bromhexina.....	46
Tabla 24.	Resultados obtenidos para evaluar la exactitud y repetibilidad del método para Ampicilina.....	47
Tabla 25.	Valores de t obtenidos para evaluar la exactitud del método	48
Tabla 26.	Resultados obtenidos para evaluar la linealidad del método para Bromhexina.....	49
Tabla 27.	Análisis de variancia para evaluar la linealidad del método para bromhexina.....	50
Tabla 28.	Parámetros estadísticos de la regresión para evaluar la Linealidad del método para Bromhexin.....	51
Tabla 29.	Valores de t obtenidos para el análisis estadístico acerca de la pendiente y el intercepto para bromhexina.....	52
Tabla 30.	Resultados obtenidos para evaluar la Linealidad del método para Ampicilina.....	53
Tabla 31.	Análisis de variancia para evaluar la linealidad del método para ampicilina.....	54
Tabla 32.	Parámetros estadísticos de la regresión para evaluar la Linealidad del Método para Ampicilina.....	55

Tabla 33. Valores de t obtenidos para el análisis estadístico acerca de la pendiente y el intercepto para ampicilina.....	56
Tabla 34. Resultados obtenidos para evaluar precisión intermedia para Bromhexina.....	57
Tabla 35. Resultados obtenidos para evaluar precisión intermedia para Ampicilina.....	57
Tabla 36. Análisis de variancia para evaluar la Precisión del método.....	58
Tabla 37. Resultados de los parámetros de desempeño para la validación del método analítico utilizado para cuantificar ampicilina y bromhexina en polvo para suspensión oral mediante EC.....	60

8.2. Índice de Figuras

Figura 1.	Estructura química de la Ampicilina.....	3
Figura 2.	Estructura química de la Bromhexina	5
Figura 3.	Esquema de las partes básicas de un equipo de electroforesis capilar.....	7
Figura 4.	Representación del flujo electroosmótico.....	10
Figura 5.	Perfil del flujo electroosmótico y el generado por presión hidrostática	11
Figura 6.	Representación de una separación electroforética.....	12
Figura 7.	Escalas de Zonas de Predominio para los analitos.....	30
Figura 8.	Electroferograma que muestra cómo se lleva a cabo la separación electroforética de bromhexina y ampicilina	31
Figura 9.	Electroferogramas obtenidos al utilizar como electrolito soporte soluciones de PG en búfer al: 6%, 8%, 10% y 12%.....	32
Figura 10.	Picos de bromhexina y ampicilina obtenidos al utilizar como electrolito soporte soluciones de PG en búfer al: 6%, 8%, 10% y 12%	33
Figura 11.	Electroferogramas obtenidos para la evaluación de la prueba de especificidad.....	38
Figura 12.	Gráfico del área de pico en función de la concentración de bromhexina.....	41
Figura 13.	Gráfico del área de pico en función de la concentración de ampicilina.....	44
Figura 14.	Gráfico de la cantidad recuperada en función de la cantidad adicionada para bromhexina.....	50
Figura 15.	Gráfico de la cantidad recuperada en función de la cantidad adicionada para ampicilina.....	54
Figura 16.	Electroferograma que muestra la separación de bromhexina y amoxicilina, al utilizar el método analítico.....	61

8.3. Preparación de la muestra para Precisión del Sistema

1. Pesar en un vaso de precipitados de 20ml, lo más exacto posible 12.5 mg de Ampicilina estándar y 10mg de Bromhexina estándar.
2. Agregar 5ml de mezcla acetonitrilo-agua pH=1.
3. Agitar manualmente hasta disolución total.
4. Transferir la solución a un matraz volumétrico de 50ml.
5. Realizar 3 enjuagues al vaso de precipitados con 2ml de búfer fosfatos pH=2.5.
6. Llevar a volumen con búfer fosfatos. En esta solución la ampicilina se encuentra a 250µg/ml y la bromhexina a 200µg/ml.
7. Tomar una alícuota de 2ml y transferirla a un matraz volumétrico de 10ml.
8. Llevar a volumen con búfer fosfatos. En esta solución la bromhexina se encuentra a 40µg/ml.
9. Realizar una corrida en el equipo de acuerdo a las condiciones óptimas.
10. Realizar el procedimiento por sextuplicado.

8.4. Preparación de las soluciones para Linealidad del Sistema

Preparación de la solución Stock

1. Pesar en un vaso de precipitados de 30ml, 62.5mg de Ampicilina y 10mg de Bromhexina, sustancias de referencia.
2. Agregar 5ml de mezcla acetonitrilo-agua pH=1.
3. Agitar manualmente hasta disolución total.
4. Transferir la solución a un matraz volumétrico de 50ml.
5. Realizar 3 enjuagues al vaso de precipitados con 2ml de búfer fosfatos pH=2.5.
6. Llevar a volumen con búfer fosfatos. En esta solución la ampicilina se encuentra a 1250µg/ml y la bromhexina a 200µg/ml.
7. Tomar una alícuota de 20ml y verterla en un matraz volumétrico de 50ml.
8. Llevar a volumen de aforo con búfer.
Esta es la solución Stock, Amp: 500µg/ml y Brom: 80µg/ml

Preparación de los Sistemas

9. Tomar las alícuotas correspondientes (4, 4.5, 5, 5.5, 6 ml) y llevar al volumen de aforo (10ml) cada sistema.
10. Realizar una corrida en el equipo de acuerdo a las condiciones óptimas.
11. Realizar el procedimiento por triplicado.

8.5. Fórmula para la obtención del porcentaje de recuperación (%Rec)

$$\% \text{Rec} = \frac{\text{cantidad recuperada}}{\text{cantidad adicionada}} * 100$$

8.6. Fórmula para la obtención de t en la prueba de hipótesis para exactitud del método

(Montgomery, D. C., Runger, G. C. 2006)

$$t_0 = \frac{\bar{x} - \mu_0}{s / \sqrt{n}}$$

Donde :

\bar{x} = media muestral

μ_0 = media poblacional = 100%

s = desviación estándar

n = tamaño de muestra = número de datos

Para contrastar las hipótesis se utiliza el valor absoluto de t_0 , y si este es mayor a t de tablas ($t_{\alpha/2, n-1}$) se rechazará H_0 .

8.7. Fórmula para la obtención de t en la prueba de hipótesis para la pendiente y el intercepto en linealidad del método (Montgomery, D. C., Runger, G. C. 2006)

$$S_{xx} = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

$$S_{xy} = \sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n}$$

$$S_{EE} = \sum y^2 - n\bar{y}^2 - \beta_1 S_{xy}$$

$$\sigma^2 = \frac{S_{EE}}{n-2}$$

Donde:

x = variable independiente = cantidad adicionada

y = variable dependiente = cantidad recuperada

n = tamaño de la muestra = número de datos

Para la pendiente (β_1)

$$\beta_1 = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$$

$$t_0 = \frac{\beta_1 - \mu_1}{\sqrt{\frac{\sigma^2}{S_{xx}}}}$$

$$IC = t_{\alpha/2, n-2} \sqrt{\frac{\sigma^2}{S_{xx}}}$$

Donde:

μ_1 = media poblacional = 1

Para el intercepto (β_0)

$$\beta_0 = \bar{y} - \beta_1 \bar{x}$$

$$t_0 = \frac{\beta_0 - \mu_0}{\sqrt{\sigma^2 \left[\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{S_{xx}} \right]}}$$

$$IC = t_{\alpha/2, n-2} \sqrt{\sigma^2 \left[\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{S_{xx}} \right]}}$$

Donde:

μ_0 = media poblacional = 0

8.8. Forma de obtención de $F_{crítica}$ en la prueba de hipótesis para precisión intermedia

Para el factor A: analista

$$F_{crítica} = F_{(a-1), ab(n-1), \alpha} = \mathbf{F_{1,8,0.1}}$$

Donde:

a = niveles del factor A = 2

b = niveles del factor B = 2

n = número de réplicas = 3

Para el factor B: Día

$$F_{crítica} = F_{a(b-1), ab(n-1), \alpha} = \mathbf{F_{2,8,0.1}}$$

Los valores de F fueron obtenidos de una tabla de este estadístico de prueba (Montgomery, D. C. 2002, pp.: 643), en base a los grados de libertad y el nivel de significancia.

9. Referencias

1. Baker, D. R. 1995. Capillary Electrophoresis. John Wiley & Sons. USA. pp.: 2, 20-23.
2. Capella-Peiró, M.E., Bose E., Font Rubert, M., Esteve-Romero, J. 2006. Optimization of a capillary zone electrophoresis method by using a central composite factorial design for the determination of codeine and paracetamol in pharmaceuticals. *Journal of Chromatography B*. 839. pp.: 97.
3. Castillo Rodríguez, M. A., Revilla Vázquez, A. L., López Arellano, R., Rivera García, P. 2005. Fundamentos de Electroforesis Capilar. Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México.
4. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas-PLM. 2006, 52ª ed. Thomson PLM. México.
5. FDA Guidance. Validation of chromatographic methods. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 1994. pp. 7-18.
6. Fernández Gutiérrez, A., Segura Carretero, A. 2005. Electroforesis Capilar: Aproximación según la técnica de detección. Universidad de Granada. España. pp.: 12-15, 25-28, 32, 65.
7. Gennaro, A. R. 2000. Remington Farmacia Tomo 2. 20ª ed. Medica Panamericana. USA. pp. 1812.
8. Guía de Validación de Métodos Analíticos. 2002. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. México.
9. Guidance for industry. Q2A Text on validation of analytical procedures. International Conference on Harmonisation (ICH), 1995.
10. Guidance for industry. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. International Conference on Harmonisation (ICH), 1996.
11. Kibbe, A. H. 2000. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 3ª ed. American Pharmaceutical Association. USA. pp. 1-2, 691-693.
12. Litter, M. 1988. Compendio de Farmacología. 4ª ed. El Ateneo. Argentina. pp. 390, 698-705.
13. Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, B., Galichet, L. 2004. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. 3ª ed. Pharmaceutical Press. Gran Bretaña. pp. 635, 710.
14. Montgomery, D. C. y Runger, G. C. 2006. Probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería. 2ª ed. Limusa Wiley. México. pp. 434-459.

15. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.
16. Pospíšilová, M., Polásek, V. 2001. Determination of ambroxol or bromhexine in pharmaceuticals by capillary isotachopheresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 24. pp. 424.
17. Rojas Calvo, M. E. 2008. Desarrollo de un método analítico por electroforesis capilar para la determinación de bromhexina y ampicilina en cápsulas. Tesis Q.F.B. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM. México.
18. Skoog, D. A., Leary, J. J. 1994. *Análisis Instrumental*. 4ª ed. McGraw-Hill. España. pp.: 785-786.
19. Sweetman, S. C. 2006. *Martindale: Guía completa de consulta Farmacoterapéutica*. 2ª ed. Pharma editores, S. L. España. pp. 261-262, 784.
20. Terán Alvirde, L. 2009. Optimización y validación de un método analítico para la determinación de ampicilina y bromhexina en cápsulas por electroforesis capilar. Tesis Q.F.B. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM. México.
21. *The Merck Index an Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*. 1996. 12ª ed. Merck & Co., Inc. pp. 628, 1411.
22. Thompson, M., Ellison, S. L. R., Wood, R.. 2002. Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. *INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC)*. Vol. 74, No. 5. pp. 851.
23. *US Pharmacopeia XXIII*, 1999. US Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, pp. 2149-2152.
24. *Vademecum Farmacéutico*. 1992. 14ª ed. Información profesional Especializada. México.
25. Guideline on General Principles of Process Validation. FDA. <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm124720.htm>. 08.06.09.
26. http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UPC/AVAILABLE/TDX-0130102-115958//04_cap1.pdf. 12.05.09.