



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**"OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO
PARA LA DETERMINACIÓN DE AMPICILINA Y BROMHEXINA
EN CAPSULAS POR ELECTROFORESIS CAPILAR"**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

T E S I S:



QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

TÉRRAN ALVIRDE LLUVIA

ASESORA: DRA. ALMA LUISA REVILLA VAZQUEZ



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES
ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

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

Optimización y validación de un método analítico para la determinación
de ampicilina y bromhexina en cápsulas por electroforesis capilar.

que presenta la pasante: Lluvia Terán Alvirde
con número de cuenta: 40101730-6 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de Diciembre de 2008

PRESIDENTE	MFC. Ma. Eugenia R. Posada Galarza	
VOCAL	QFB. Delia Reyes Jaramillo	
SECRETARIO	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez	
PRIMER SUPLENTE	QFB. Elia Granados Enriquez	
SEGUNDO SUPLENTE	MI. Claudia Mariano Hernández	

DEDICATORIAS

A mis padres: Antonio Teran y Jovita Alvirde porque siempre me han dado su apoyo incondicional y porque gracias a su esfuerzo es que he terminado una etapa más en mi vida. Gracias por todo lo que me han brindado.

A mis hermanos: Arenita, Vianeth, a la pequeña Brisa y a mi Hermano Toño, que siempre me alentaron a seguir adelante.

A Ángel: Mi marido por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas. Gracias por el amor que me das. Te quiero mucho.

A mis amigos del Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos: Mac, Etzael, Rogelio, Mayra, Lucía, Claudia, Fabiola, Carlos, Dianita, Elva. Los estimo mucho.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme dado una familia en quien apoyarme, por haberme dado unos padres ejemplares y porque me permitió terminar mi carrera.

A mis papas porque siempre me han sabido guiar por el buen camino.

A mi asesora de tesis, la Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez, quien me dio la oportunidad de realizar este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, y a la FES-Cuautitlán por la preparación académica recibida. Por la oportunidad de formar parte de una institución de la cual me siento orgullosa, y gracias a la que crecí y logré llegar a ser la persona que soy ahora.

A mis sinodales: Elia Granados, María Eugenia Posada, Claudia Mariano y Delia Reyes por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y cuyos puntos de vista ayudaron a mejorar este trabajo.

A la DGAPA por el apoyo al proyecto PAPIIT208608 y al CONACYT por los recursos del proyecto 52723 (2007).

ÍNDICE GENERAL

INDICE GENERAL	1
INDICE DE FIGURAS	III
INDICE DE TABLAS	IV
1 Introducción	1
2 Objetivos	2
3 Generalidades	4
3.1 Formas farmacéuticas de interés	4
3.1.1 Medicamentos existentes con bromhexina /Ampicilina	6
3.2 Ampicilina	6
3.2.1 Propiedades fisicoquímicas	6
3.2.2 Indicaciones terapéuticas	7
3.2.3 Mecanismo de acción	7
3.2.4 Farmacocinética y farmacodinamia	9
3.3 Bromhexina	10
3.3.1 Propiedades fisicoquímicas	10
3.3.2 Indicaciones terapéuticas	11
3.3.3 Mecanismo de acción	11
3.3.4 Farmacocinética y farmacodinamia	12
3.4 Electroforesis capilar	13
3.4.1 Fundamento de la separación	14
3.4.2 Flujo electroósmotico	15
3.4.3 Consideraciones analíticas	18
3.4.4 Introducción de la muestra	19
3.4.4.1 Inyección hidrodinámica	20
3.4.4.2 Inyección electrocinética	20
3.4.5 Principales ventajas de la electroforesis capilar	21
3.4.6 Parámetros del electroferograma	23
3.4.7 Aplicaciones	26
3.5 Validación	27

3.5.1 Regulación	27
3.5.2 Tipos de procedimientos analíticos a ser validados	29
3.5.3 Parámetros de validación	30
4 Metodología	34
4.1 Reactivos material y equipo	34
4.2 Metodología general	35
4.3 Preparación de soluciones	36
4.4 Preparación de la muestra	37
4.5 Validación del método analítico	39
5 Optimización	47
5.1 Antecedentes	47
5.2 Desarrollo de la optimización	49
5.2.1 Cambio de buffer de corrida	52
5.2.2 Medio de dilución	53
5.2.3 Acondicionamiento del capilar	54
5.2.4 Almacenamiento del capilar	57
5.2.5 Concentración de la muestra	58
5.2.6 Selección del buffer y pH	63
5.2.7 Preparación de la muestra. Tiempo de agitación	66
5.2.8 Condiciones óptimas del método	67
6 Validación	68
6.1 Adecuabilidad del sistema	68
6.2 Especificidad	69
6.3 Precisión del sistema	69
6.4 Linealidad del sistema	70
6.5 Exactitud y Repetibilidad del método	74
6.6 Linealidad del método	76
6.7 Precisión intermedia (Reproducibilidad entre día y analista)	80
7 Conclusiones	85
8 Bibliografía	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.		Página
1	Estructura química de la ampicilina	6
2	Mecanismo de acción de la ampicilina	9
3	Estructura química de la bromhexina	10
4	Glándula mucosa bronquial	12
5	Diagrama del sistema de electroforesis capilar	13
6	Representación esquemática del flujo electroosmótico	15
7	Diagrama de separación de analitos cargados y neutros	16
8	Comparación del tipo de flujo producido en HPLC y electroforesis capilar de zonas	17
9	Inyección de muestra con modo hidrodinámico	20
10	Inyección de la muestra con modo electrocinético	20
11	Electroferograma ejemplo	23
12	Diagrama de flujo de preparación de muestra	38
13	Electroferograma de la muestra AMP-BROM a la proporción real (6.25-1 veces respectivamente) en buffer fosfatos	49
14	Variación de electroferogramas obtenidos el 17 de marzo	50
15	Electroferograma de AMP 1000µm/ml BROM 16µm/ml en buffer citratos 50mM pH=3.0	51
16	Electroferograma de AMP-BROM a concentración real, corrida con buffer fosfatos 50mM pH=3, 214nm	55
17	Electroferogramas a las diferentes longitudes de onda a las cuales absorbe menos la ampicilina, 245, 257, 268, 262 y 280nm	56
18	Electroferograma de AMP -BROM a la concentración real corrida con buffer fosfatos 50mM pH=3 a 214 y 210nm	56

19	Electroferograma de AMP 250µg/ml – BROM 80µg/ml, en buffer de fosfatos 50mM pH=3 -citratos 50mM pH=3(relación 40:60 respectivamente	63
20	Escala de zonas de predominio para ampicilina y bromhexina	64
21	Electroferograma de la muestra analítica, estándares y placebo	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.		Página
1	Parámetros de validación según la ICH	29
2	Parámetros de desempeño a evaluar en función de la aplicación del método. (Guía de validación QFB's)	39
3	Condiciones electroforéticas iniciales	47
4	Variación de resultados utilizando la muestra amp-brom (62.5-1)	50
5	Resultados utilizando la muestra amp-brom (62.5-1), después de lavar el capilar	50
6	Tiempos de migración de los analitos cambiando el buffer de corrida cada tres corridas	52
7	Tabla comparativa de los tiempos de migración de los analitos cambiando el buffer de corrida cada tres corridas y cada corrida	52
8	Tiempos de migración promedio aforando la muestra con agua desionizada y con buffer citratos	53
9	Tiempos de migración promedio de la muestra a la concentración real corrida con buffer citratos	53
10	Tiempos de migración obtenidos de ampicilina y bromhexina con el nuevo lavado de capilar	55
11	Tiempos promedio de migración de ampicilina y bromhexina (concentración 1000µm/ml-16µm/ml respectivamente) con buffer fosfatos	57

12	Tiempos de migración promedio con capilar remojado en buffer	58
13	Tiempos de migración para diferentes concentraciones de analito.	58
14	Tiempos de migración promedio de los analitos corridos 2 veces por día	59
15	Tiempos de migración (BROM 16 μ m/ml y AMP 1000 μ m/ml), aforando con buffer de fosfatos 50mM pH=3	60
16	Tiempos de migración con la muestra diluida, aforando con buffer de fosfatos	61
17	Tiempos de migración con la muestra diluida aforando con buffer de citratos	62
18	Tiempos de migración con la muestra diluida, aforando con buffer de fosfatos-citratos (relación 40:60 respectivamente)	62
19	Tiempos de migración promedio de varios días, con la muestra diluida aforando con buffer de fosfatos -citratos (relación 40:60 respectivamente)	63
20	Tiempos de migración promedio de varios días, con la muestra diluida (ampicilina 250 μ g/ml – bromhexina 80 μ g/ml), aforando con buffer de fosfatos 50mM pH=2.5	65
21	Porcentajes de recobro de los dos analitos empleando diferentes tiempos de agitación de la muestra	66
22	Condiciones electroforéticas durante la validación	67
23	Datos para evaluar adecuabilidad del sistema para Ampicilina y Bromhexina	68
24	Áreas para evaluar la precisión del sistema de ampicilina y bromhexina	69
25	Área en función de la concentración de bromhexina	70
26	Resultados de regresión para linealidad del sistema de bromhexina	71
27	ANADEVA para bromhexina	72
28	Área en función de la concentración de ampicilina	72
29	Resultados de regresión para linealidad del sistema de la ampicilina	73
30	ANADEVA para ampicilina	74

31	Resultados del porcentaje de recobro de bromhexina	74
32	Resultados del porcentaje de recobro de ampicilina	75
33	Resultados de la cantidad adicionada contra cantidad recuperada de bromhexina	76
34	Análisis de la regresión lineal para linealidad del método bromhexina	77
35	ANADEVA para la cantidad recuperada de bromhexina	77
36	Resultados de la cantidad adicionada contra cantidad recuperada de ampicilina	78
37	Análisis de la regresión lineal para linealidad del método de ampicilina	79
38	ANADEVA para la cantidad recuperada de ampicilina	80
39	Porcentaje de recobro de bromhexina por 2 analistas en dos días diferentes	80
40	ANADEVA para reproducibilidad del método para bromhexina	81
41	Porcentaje de recobro de ampicilina por 2 analistas en dos días diferentes	81
42	ANADEVA para reproducibilidad del método para ampicilina	82
43	Parámetros de validación del método analítico para la cuantificación de ampicilina	83
44	Parámetros de validación del método analítico para la cuantificación de ampicilina	84

ÍNDICE DE GRAFICOS

1.	Relación del área en función de la concentración para la bromhexina, en un intervalo de 60-140%	71
2.	Relación del área en función de la concentración para la ampicilina, en un intervalo de 60-140	73
3.	Gráfica de la cantidad adicionada vs la cantidad recuperada de bromhexina a partir de la preparación de placebos cargados, en un rango de 60 – 140%	77
4.	Gráfica de la cantidad adicionada vs la cantidad recuperada de ampicilina a partir de la preparación de placebos cargados, en un rango de 60 – 140 %	79

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Símbolos y Abreviaturas	Significado
AMP	Ampicilina
BROM	Bromhexina
ANOVA	Análisis de varianza
EC	Electroforesis capilar
tm	Tiempo de migración
nm	Nanómetros
g	Gramos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
µg	microgramos
kV	Kilovoltios
Desvest	Desviación estándar
CV	Coefficiente de variación
µA	Microampers
λ	Longitud de onda
min	minutos
conc	Concentración
Cant ad	Cantidad adicionada
Cant rec	Cantidad recuperada
IC(β ₀)	Intervalo de confianza para la ordenada al origen
IC(β ₁)	Intervalo de confianza para la pendiente
IC(µ)	Intervalo de confianza para la media poblacional
T _{ini}	Tiempo inicial
T _{fin}	Tiempo final
NaOH	Hidróxido de sodio
HCl	Ácido clorhídrico
Ac: Aa	Acetonitrilo: Agua

1 INTRODUCCION

En el presente trabajo se optimiza y se valida una metodología analítica que permite la cuantificación de ampicilina y bromhexina por electroforesis capilar. Hasta el momento no se encuentra reportado ningún método para separar y cuantificar ampicilina y bromhexina juntos, en la literatura solo se contemplan métodos cromatográficos para cuantificar ampicilina o bromhexina.

La primera parte consiste en la optimización de las condiciones establecidas en el trabajo de desarrollo del método, anteriormente realizado en el mismo laboratorio. Bajo esas condiciones los tiempo de migración no cumplían con el parámetro de reproducibilidad, ya que después de trabajar con el método varios días, los tiempos de migración de los dos activos se modifican considerablemente, es decir, con un coeficiente de variación mayor a 2%.

Una vez que se establecieron las condiciones óptimas de análisis que aseguran la reproducibilidad de los tiempos de migración, se procede a validarlo. La validación del método establece que sus características son adecuadas para el uso que se pretende. Esta se realizo en base a los criterios establecidos en la guía del colegio nacional de QFB's. y se determina que la metodología cumple con los criterios de validación establecidos, lo cual, asegura la confiabilidad del mismo para el análisis de cápsulas que contengan los activos de estudio.

2 OBJETIVOS:

Objetivo General:

- Optimizar las condiciones experimentales de separación para la determinación de Ampicilina y Bromhexina en cápsulas por electroforesis capilar y validar la metodología a fin de contar con un método que permita la determinación simultánea de los activos.

Objetivos Particulares:

- Optimizar las condiciones establecidas previamente para la separación de Ampicilina y Bromhexina por electroforesis capilar a fin de que se cumplan los requisitos necesarios para su posterior validación.
- Validar el método analítico con los parámetros estadísticos: especificidad, adecuabilidad, precisión, linealidad del sistema y del método, exactitud y reproducibilidad, especificados en la guía de validación de métodos analíticos editada por el colegio nacional de QFB's.

CAPÍTULO 1

MARCO TEORICO

3 GENERALIDADES

El medicamento modelo utilizado en este estudio está constituido por la asociación de ampicilina y bromhexina. La ampicilina es un antibiótico perteneciente al grupo de las penicilinas semisintéticas. La bromhexina es un expectorante y mucolítico que actúa produciendo el aumento en la ruptura de los enlaces mucopolisacáridos del moco viscoso y adherente, además estimula la actividad mucociliar bronquial. La bromhexina por su acción farmacológica incrementa el volumen de las secreciones bronquiales y reduce su viscosidad, facilitando la expulsión del esputo mucopurulento.⁴³

Indicaciones terapéuticas: está indicado en infecciones agudas y crónicas de las vías respiratorias como bronquitis, bronconeumonía y bronquiectasias, en general, en todos los procesos infecciosos que cursen con retención de secreciones ocasionadas por bacterias grampositivas y gramnegativas que no responden satisfactoriamente a otros antibióticos, especialmente a gérmenes de los grupos enterococos, Haemophilus, Proteus, Salmonella y E. coli.⁴³

3.1 Formas farmacéuticas de interés

Cápsulas

Ampicilina trihidratada, Clorhidrato de Bromhexina

DESCRIPCION:

PENBRITIN EX. Antibiótico betalactámico y mucolítico. Capsulas. HORMONA, S.A., DE C.V., LABORATORIOS

FORMA FARMACÉUTICA Y FORMULACIÓN

Cada CÁPSULA contiene:

Ampicilina trihidratada
equivalente a..... 500 mg
de ampicilina base

Clorhidrato de bromhexina..... 8 mg

Excipiente, c.b.p. 1 cápsula

Especificaciones Farmacopeicas:

Contienen ampicilina, anhidra o trihidratada, equivalente a no menos del 90% y no mas del 120% de la cantidad de $C_{16}H_{19}N_3O_4S$, indicada en el marbete. Para bromhexina no existen especificaciones farmacéuticas. ¹³

Polvo para suspensión

DESCRIPCION:

El polvo para suspensión oral, es una mezcla seca de ampicilina anhidra o trihidratada con reguladores, colorantes, diluyentes, saborizantes, conservadores y edulcorantes apropiados. ¹³

FORMA FARMACÉUTICA Y FORMULACIÓN

Cada 5 ml de SUSPENSIÓN Pediátrica contienen:

Ampicilina trihidratada
equivalente a..... 250 mg
de ampicilina base
Clorhidrato de bromhexina..... 4 mg
Excipiente, c.b.p. 5 ml.

Cada 5 ml de SUSPENSIÓN Infantil contienen:

Ampicilina trihidratada
equivalente a..... 500 mg
de ampicilina base
Clorhidrato de bromhexina..... 8 mg
Excipiente, c.b.p. 5 ml.

Especificaciones Farmacopeicas:

Contiene no menos del 90% y no más del 120% de la cantidad de $C_{16}H_{19}N_3O_4S$, indicada en el marbete, una vez preparada la suspensión. Para bromhexina no existen especificaciones farmacéuticas. ¹³

3.1.1 Medicamentos existentes con bromhexina/Ampicilina:

Nombre comercial	Forma farmacéutica	Laboratorio
Pentibrom	Capsulas /Suspensión	PRODUCTOS MAVER, S.A. DE C.V.
Bromaxin	Suspensión	GIRARCAMPS
Brupen compuesto	Suspensión/Capsulas	I.M. BRULUART, S.A. DE C.V
Penbritin Ex	Suspensión/Capsulas	LABORATORIOS HORMONA, S.A. DE C.V.
Pentrexyl Expec	Suspensión/Capsulas	Bristol-Myers Squibb de México, S. de R.L. de C.V.

3.2 AMPICILINA

La ampicilina es una D- α -aminobenzilpenicilina. Es un antibiótico de la familia de las penicilinas de amplio espectro. Es uno de los antibióticos mas prescritos en el mundo.⁵

3.2.1 Propiedades Fisicoquímicas

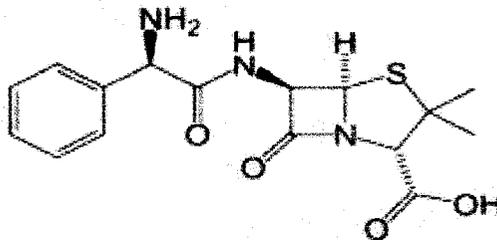


Figura 1. Estructura química de la ampicilina.²²

- *Nombre químico:* Ácido [2S-[2 α ,5 α ,6 β (S*)]]-6-[(aminofenilacetil)amino]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico.¹⁵
- *Propiedades fisicoquímicas:* Formula empírica; C₁₆H₁₉N₃O₄S, peso molecular; 349.4g/mol, el pH en 1% de solución acuosa es entre 5 y 8. La ampicilina muestra una aceptable estabilidad en un medio ácido.⁵

Ampicilina Trihidratada:

- *Formula condensada:* $C_{16}H_{19}N_3O_4S \cdot 3H_2O$
- *Numero de registro CAS:* 7177-48-2
- *Peso molecular:* 403.4 g/mol
- *Constante de disociación:* pKa 2.5(-COOH), 7.3(-NH₂), (25°)
- *Aspecto fisico:* Polvo cristalino blanco a blanquecino, estable a temperatura ambiente.
- *Solubilidad:* Un gramo se disuelve en 150ml de agua, prácticamente insoluble en etanol, acetona, cloroformo y éter.³⁶

Indicaciones Terapéuticas:

Está indicado en el tratamiento de las infecciones por cocos y bacilos susceptibles grampositivos y gramnegativos causantes de infecciones de diversa localización y severidad, agudas, crónicas y recidivantes, que incluyen a: Streptococcus del grupo B, Enterococcus faecalis y faecium, Haemophilus influenzae, Listeria monocytogenes, Proteus mirabilis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus sp, Neisseria sp, Branhamella catarrhalis, Klebsiella pneumoniae.⁴³

Mecanismo de acción:

Como todos los antibióticos betalactámicos, la ampicilina es capaz de penetrar bacterias gram positivas y algunas gram negativas y anaerobias. Inhibe la síntesis de la pared celular de la bacteria en sus últimas dos etapas, uniéndose a las proteínas fijadoras de penicilinas (o PBP, sigla en inglés), lo que lleva a la destrucción de la pared y lisis celular, como se muestra en la figura 2. Es uno de los antibióticos más comunes utilizados en el mercado y con un efecto muy bueno.²⁵

Los antibióticos Beta-lactámicos (dentro de los cuales se incluye la familia de las penicilinas) destruyen bacterias sensibles. Actúan sobre la pared de la bacteria. Dicha pared es esencial para

la proliferación y el desarrollo del microorganismo. Los peptidoglicanos son componentes heteropoliméricos de la pared, y le confieren estabilidad mecánica y rigidez, gracias a su entramado con innumerables entrecruzamientos (puentes intercatenarios). Las bacterias gram positivas tienen entre 50 y 100 capas de peptidoglicanos en su pared, en tanto que las gram negativas poseen una pared de tan sólo 2 peptidoglicanos de espesor. La síntesis de los peptidoglicanos puede dividirse en tres etapas:

- Formación de precursores de peptidoglicanos en el citoplasma bacteriano.
- Unión de grupos con Uridina Tri Fosfato (UDP), liberación de los nucleótidos de Uridina y formación de polímeros largos, por ensamblaje de los precursores entre sí.
- Finalización de los puentes intercatenarios.

En este último punto es que actúa la penicilina. Funciona como un inhibidor competitivo de la D-Alanil D-Alanina, uno de los últimos compuestos en sufrir transpeptidación en la síntesis de los peptidoglicanos. La penicilina se une a la enzima transpeptidasa y le provoca un cambio de conformación: la enzima pierde su forma cíclica y deja de ser funcional. De este modo la penicilina inhibe la formación de peptidoglicanos. Es por esto que la penicilina es más efectiva en momentos en que la bacteria está en crecimiento o en división.

Otro modo de acción depende de las proteínas ligadoras de penicilina (PBP) presentes en muchas bacterias. Estas proteínas poseen diferente afinidad por la penicilina, con la que terminan formando enlaces covalentes. Las PBP se encargan de la transpeptidación necesaria para la síntesis de peptidoglicanos, para conservar la forma bacilar y para formar tabiques en las fases de división bacteriana. La penicilina inhibe la actividad de estas proteínas y provoca lisis bacteriana, la cual puede sobrevenir con cierto retardo. La lisis bacteriana puede no ocurrir, en cuyo caso se producen formas filamentosas del microorganismo.²¹

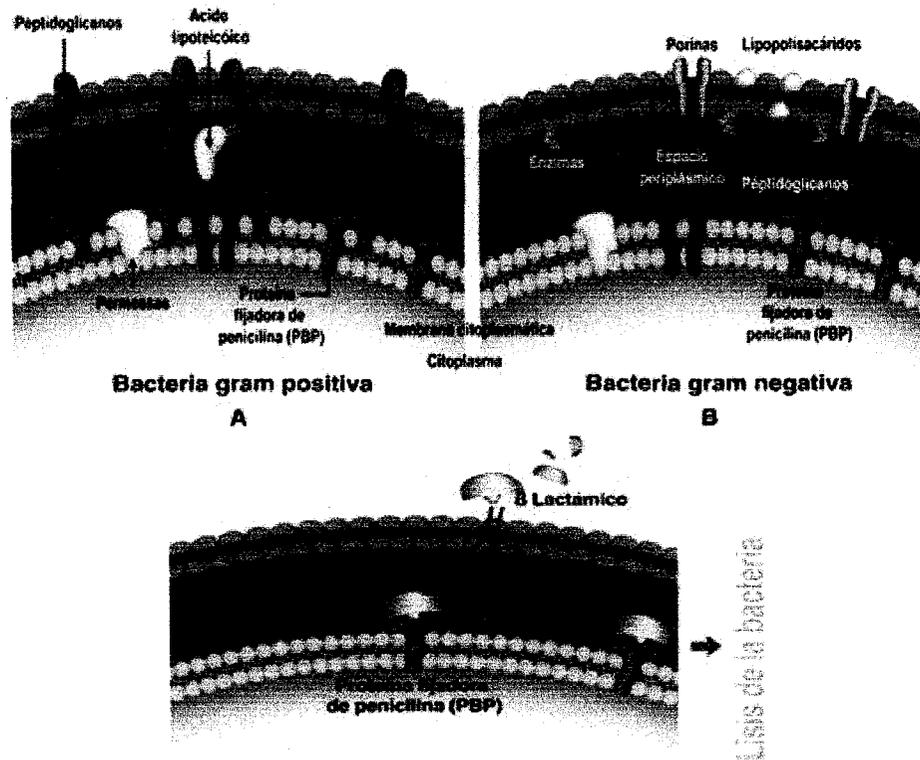


Figura 2. Mecanismo de acción de la ampicilina, (A) para una bacteria gram positiva y (B) para una bacteria gram negativa.²⁵

3.2.4 Farmacocinética y farmacodinamia:

La ampicilina es una penicilina semisintética con poder bactericida de amplio espectro, su actividad antibacteriana depende de sus efectos inhibitorios sobre la síntesis de la pared celular bacteriana, originando una estructura defectuosa y osmóticamente inestable. Es resistente a la inactivación por las secreciones gástricas y se absorbe rápidamente tras haber sido administrada por vía oral, dando lugar a concentraciones plasmáticas máximas a las 2 horas. El pico de la concentración plasmática después de una dosis oral de 500 mg, es de aproximadamente 7 µg/ml a las 2 horas y al cabo de 8 horas se encuentran concentraciones séricas detectables. Más de 20% de la dosis administrada se une a las proteínas plasmáticas. La ampicilina se difunde rápidamente en la mayoría de los líquidos y tejidos, atraviesa la barrera placentaria y pequeñas cantidades se excretan a través de la leche materna.

Penetra en el esputo mucoso o purulento, así como en la secreción del oído medio. Cerca de 40% de la dosis es metabolizado, por lo que se convierte en ácido peniciloico y bajo esta forma se elimina por la orina al igual que lo hace 60% restante, pero en forma inalterada.⁴³

3.3 BROMHEXINA

La bromhexina es un derivado de la vasicina, alcaloide de la nuez de Malabar (*Adhatoda vasica*), empleado en la medicina popular india como antiasmático. Es un agente mucolítico y expectorante.

3.3.1 Propiedades Físicoquímicas

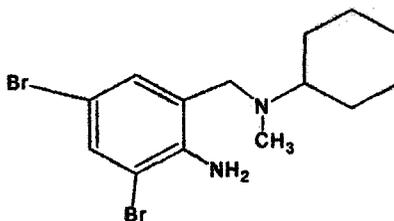


Figura 3. Estructura química de la Bromhexina.³⁶

- *Nombre químico:*

N-(2-Amino-3,5-dibromobenzil)-N-ciclohexilmetilamina.³⁶

Clorhidrato de Bromhexina:

- *Formula condensada:* $C_{14}H_{20}Br_2N_2 \cdot 3HCl$
- *Numero de registro CAS:* 611-75-6
- *Peso molecular:* 412.6 g/mol
- *Constante de disociación:* pKa 8.5(-NH₂)
- *Punto de fusión:* 235°
- *Aspecto físico:* Polvo cristalino blanco

- **Solubilidad:** Un gramo se disuelve en 150ml de agua, un gramo se disuelve en 100ml de etanol, un gramo se disuelve en 300ml de cloroformo y un gramo se disuelve en 50ml de metanol, prácticamente insoluble en acetona, soluble en ácido acético glacial.³⁶

3.3.2 Indicaciones terapéuticas:

Está indicado como coadyuvante para la terapia secretolítica en enfermedades broncopulmonares crónicas y agudas, asociadas con una secreción mucosa anormal y deterioro de transporte mucoso.⁴³

3.3.3 Mecanismo de acción:

El mucus está constituido por 95 % de agua y 5 % de glucoproteínas llamadas mucinas.

La mucina es una glicoproteína de elevado peso molecular que se caracteriza por poseer complejas cadenas de oligosacáridos unidos a la proteína por enlaces O- glicosídicos. Las propiedades reológicas del mucus, como viscosidad y elasticidad, están asociadas a las mucinas intactas. Sin embargo, bajo condiciones patológicas que afecten el tracto respiratorio superior, la respuesta inflamatoria producida, puede inducir diferencias en la composición química de las mucinas y al mismo tiempo en sus propiedades físico-químicas.

La acción y propiedades de los mucolíticos se encuentran en pleno análisis. Sumano y col.⁵⁰ discuten si los mucolíticos son capaces de incrementar los fluidos libres de sialoproteínas en las secreciones tráqueo-bronquiales. En cuanto al mecanismo de acción de los mucolíticos si bien se ha discutido sobre este punto, Takeda y col.⁵² determinaron que la bromhexina altera las propiedades histoquímicas de las glicoproteínas, así como que la acción mucolítica de este agente ocurre dentro de las células secretorias a través de la liberación de enzimas lisosomales, las cuales disuelven enzimáticamente las moléculas de glicoproteínas ácidas del mucus.³ En general la bromhexina ejerce cierta acción estimulante de la secreción de las glándulas mucosas bronquiales (Fig 4).

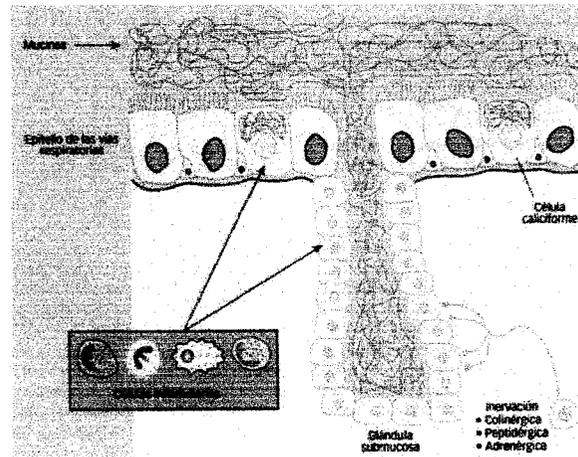


Figura 4. Glándula mucosa bronquial. 21

In vitro ejerce acción mucolítica por despolimerización (disminución del peso molecular) de las sialomucinas con reducción de la viscosidad. Fluidifica las secreciones por fragmentación de los mucopolisacáridos ácidos (disminuye la viscosidad de la secreción bronquial), con lo cual facilita la expectoración.

Complementa la eficacia de la ampicilina eliminando la obstrucción bronquial, mejorando la función respiratoria y facilitando la difusión del antibiótico en el esputo.²⁷

3.3.4 Farmacocinética y farmacodinamia

La bromhexina administrada por vía oral, se absorbe a través del tracto gastrointestinal, alcanzando su máximo nivel plasmático en una hora. Experimenta una cinética de primer paso de 75-80% y la biodisponibilidad absoluta de las formas orales es de 20-25%. La bromhexina presenta un alto grado de unión a proteínas plasmáticas (95-99%) y un alto volumen de distribución, principalmente a nivel pulmonar. La bromhexina se metaboliza en hígado y plasma.

Su principal metabolito, ambroxol, es farmacológicamente activo. Se elimina por vía renal principalmente en forma de metabolitos y del total, menos de 10% en forma inalterada. Aproximadamente 4% es excretado en heces. Por su acción mucolítica fragmenta las fibras de mucopolisacáridos ácidos de las secreciones viscosas, con lo que favorece la expectoración. Con la administración de la asociación de ampicilina/bromhexina, resuelve rápidamente el proceso

infeccioso, favorece la desaparición de los signos clínicos, disminuye la viscosidad del esputo, promueve la expectoración y al drenar las vías respiratorias inferiores mejora la ventilación pulmonar.⁴³

3-4 ELECTROFORESIS CAPILAR

La electroforesis capilar es una técnica alternativa de la electroforesis convencional (tradicional) y surge debido a que la velocidad de separación y resolución de los compuestos mejora al realizar las medidas en capilares, debido a la facilidad del aumento del campo eléctrico aplicado. Lo anterior se debe a que al realizar la separación en capilares el calor generado al aplicar el campo eléctrico, puede ser disipado más rápidamente con la consecuente facilidad de la utilización de voltajes mayores. Por esta razón la electroforesis se realiza en general en tubos capilares con un diámetro interno inferior a 0.1 mm y una longitud de 50 cm a 1 m.¹

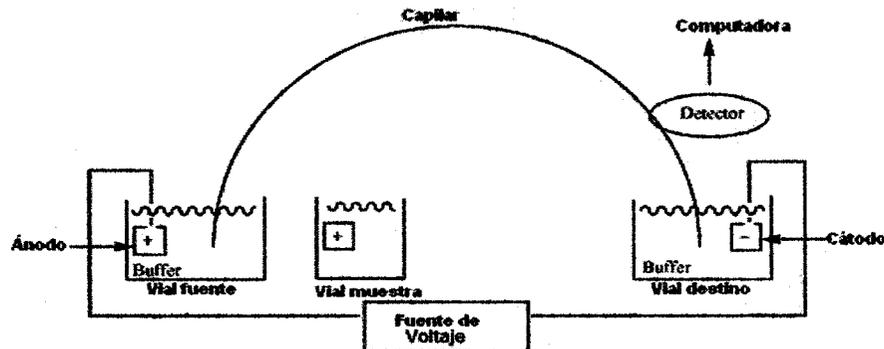
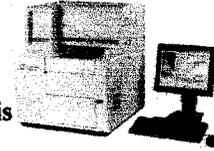


Figura 5. Diagrama del sistema de electroforesis capilar.²⁶

La figura 5 muestra un típico sistema de electroforesis capilar contiene un capilar de sílice fundida que tiene un diámetro interno de entre 50 a 100 μm y una longitud de 20 a 70 cm. Los extremos del capilar son colocados en viales o reservorios de electrolitos (buffers) separados. Una fuente de suministro de corriente directa es capaz de generar altos voltajes, típicamente del rango de 0 a 30 kV. Un detector y un automuestreador con un sistema de recolección de datos completan el sistema. Un sistema de reemplazo de buffer automático, una computadora de control y el sistema de adquisición de datos; se pueden encontrar comercialmente, en conjunto con sistemas de control de temperatura del capilar y el automuestreador.⁴⁸

3.4.1 *Fundamento de la separación*

Muchas moléculas, tales como aminoácidos, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos, poseen grupos ionizables y pueden tenerse en disolución en forma de especies con carga eléctrica, tanto como cationes (+) o como aniones (-). Además, las moléculas que tienen cargas similares poseen distintas relaciones carga/masa, debido a inherentes diferencias de peso molecular. En conjunto, estas diferencias constituyen base suficiente para una migración diferencial, cuando los iones en disolución se someten a un campo eléctrico.

El mecanismo de separación está basado en las relaciones carga/masa de los analitos, cuando se encuentran bajo un campo eléctrico generado en un medio conductor.

En general, toda separación vía electroforesis se realiza mediante la migración diferencial de solutos cargados sometidos a la acción de un campo eléctrico. En el caso de la técnica de EC, la separación se hace en capilares generalmente de sílice fundida, los cuales son llenados con solución buffer.

Los extremos de un capilar de sílice fundida son sumergidos en el buffer contenido en dos viales, y el interior del capilar es llenado con ese buffer. Cada vial contiene un electrodo de platino que sirve para establecer contacto eléctrico entre una fuente de poder de alto voltaje y la columna capilar. La introducción de la muestra se realiza reemplazando uno de los viales con buffer por un vial que contiene la muestra (disuelta en agua o en buffer) y luego aplicando por unos segundos una presión externa con ayuda de una bomba (inyección hidrodinámica), o bien de un campo eléctrico (inyección electrocinética). Hecho lo anterior, se aplica el campo eléctrico para llevar a cabo la separación. La detección se realiza en el otro extremo de la columna ya sea en línea (a través de la pared del capilar) con un detector UV-VIS, arreglo de diodos o fluorescencia, o fuera del capilar con detectores como índice de refracción, conductimetría, amperometría, e inclusive espectrometría de masas.⁸

3.4.2 Flujo Electroosmótico

El movimiento o flujo de disolvente dentro del capilar, el cual a su vez influye en la separación de las moléculas está determinada por la acción de un campo eléctrico que produce dentro del capilar un fenómeno llamado electroósmosis y está caracterizado por un término denominado Flujo Electrosmótico (FEO).

El flujo electroosmótico es el flujo que origina la presencia del campo eléctrico en una solución iónica cuando entra en contacto con una superficie sólida cargada. Por ejemplo, en un capilar de sílice fundida, la interfase se pone en contacto con la solución que contiene el electrolito soporte, la superficie del sólido está con carga negativa debido a la ionización del grupo silanol (a pH mayor de 4) y conjuntamente con sus contraiones forman una doble capa eléctrica. Los iones presentes en el sistema (incluyendo a los contraiones de los grupos silanol, H^+) bajo la influencia del voltaje aplicado son desplazados hacia el cátodo o ánodo de acuerdo a su carga y arrastrando disolvente con ellos dada su solvatación, originando así el denominado flujo electroosmótico.⁸

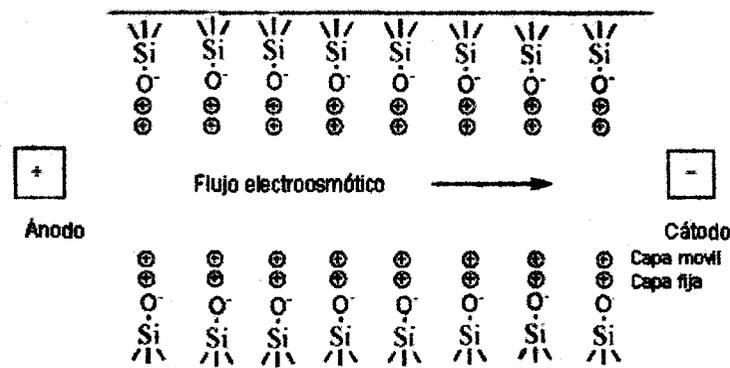


Figura 6. Representación esquemática del Flujo Electroosmótico. Pared interna: grupos silanol, cargada negativamente, atrae a los cationes y forma una doble capa. La capa interna es fija y la externa móvil (hacia el cátodo), arrastra el contenido hacia el cátodo y crea el flujo electroosmótico.²⁶

Debido a que las condiciones de corrida exigen que el capilar así como los viales en cada uno de sus extremos se llenen con un buffer, que sirve de medio conductor para el flujo de la corriente eléctrica, la diferencia de potencial impuesta entre los dos electrodos que generalmente son de platino permite la separación de los analitos cargados. La muestra que está formada por un conjunto de aniones y cationes es introducida dentro de este sistema, ocupando así una sola

franja o zona. Al someter este sistema a la acción de un campo eléctrico, las especies iónicas del electrolito y de la muestra migran hacia el electrodo correspondiente, es decir, se establece un movimiento de los iones que forman el sistema.

A causa de la alta concentración del electrolito comparada con la de la muestra, algunas propiedades físicas como la conductancia son influenciadas por el electrolito, pues la influencia de la muestra se hace despreciable. Cuando se aplica una diferencia de potencial entre los dos electrodos de platino separados por un medio conductor que es el buffer, el equilibrio de las velocidades electroforéticas de los iones de la muestra se alcanza en un periodo muy corto (10^{-6} s), con lo que se puede afirmar que las velocidades con las que se mueve cada molécula son constantes durante prácticamente todo el tiempo de análisis. Entonces la separación se da por las diferentes movilidades de los analitos, ya que cada ion tiene su propia constante de movilidad (μ_{efectiva}).⁵³

La naturaleza de los compuestos con carga eléctrica afecta su velocidad de migración de varias formas, como se describe a continuación:⁸

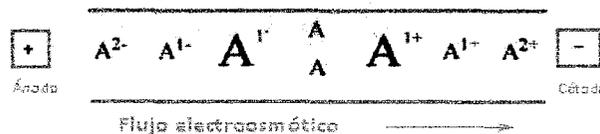


Figura 7. Diagrama de separación de analitos cargados y neutros.²⁶

- I. Carga.- La velocidad de migración aumenta cuando hay un incremento de la carga del analito, generalmente, la magnitud de la carga depende del pH.
- II. Tamaño.- La velocidad de migración es menor en las moléculas grandes, debido al incremento de las fuerzas de fricción y electrostáticas ejercidas por el medio circundante.
- III. Forma.- Las moléculas de tamaño similar, pero con diferentes formas, tales como las proteínas fibrosas y las globulares, exhiben distintas características de migración o causa de los diferentes efectos de las fuerzas de fricción y electrostáticas.⁸

Como se observa en la figura 7, los cationes se trasladan hacia el cátodo (-) y los aniones hacia el ánodo (+) dependiendo de su tamaño y carga es como van a migrar más rápido hacia el

cátodo. El orden usual de aparición de los solutos en un electroferograma son primero las especies catiónicas, los solutos neutros y las especies aniónicas.

El FEO puede modificar la migración de los compuestos, por lo tanto, si se mueven a la misma dirección que los analitos, la velocidad de éstos será mayor, si por otro lado, se mueven en contra del FEO su velocidad será disminuida. Las moléculas neutras se moverán a la misma velocidad que el FEO y este hecho permite determinar experimentalmente la velocidad del FEO, mediante la adición de un marcador neutro. Debido a que el FEO posee un perfil de flujo plano (Fig. 8), éste no contribuye de una forma significativa a la dispersión de las zonas de los componentes de la muestra. Ésta es una diferencia muy importante cuando se compara con el perfil de flujo parabólico causado por la introducción de líquido a la columna por una bomba, como se observa en HPLC. Por lo tanto, por EC siempre se obtendrán mayores eficiencias que por el método tradicional utilizado de HPLC.¹



Figura 8. Comparación del tipo de flujo producido en HPLC y Electroforesis capilar de zonas.

44

Existen varios factores que pueden afectar al flujo electroosmótico como son la adición de disolventes orgánicos, pero principalmente se verá afectado por el pH de trabajo y el campo eléctrico aplicado, también se ve afectado por la fuerza iónica del buffer, y es influenciado por la viscosidad y la temperatura, también afectan al FEO la adición de polímeros hidrofílicos al buffer, así como los surfactantes y la derivatización del capilar con moléculas adheridas covalentemente a su pared.⁸

3.4.3 Consideraciones Analíticas

Diversos parámetros a conocer como dimensiones capilares, voltaje, fuerza iónica y pH son optimizados con una adecuada resolución y separación. Se debe tener cuidado de evitar cambios de temperatura que puedan afectar la viscosidad en el buffer y cambiar la influencia en la movilidad del soluto y el EOF. En general, la influencia de los parámetros se describe en orden de importancia como sigue:

Efectos de pH.- La resolución, selectividad y forma del pico puede ser dramáticamente alterados por cambios en pH como un parámetro que afecta extensamente la ionización del soluto y el nivel de EOF. El EOF es alto a pH alto y bajo a pH bajo, en capilares de sílice sin recubrimiento.

Naturaleza del buffer.- El tipo de buffer es muy importante, ya que, de una buena selección depende el asegurar que el pH se mantenga constante. Esto es importante, pues la movilidad de los analitos cambia, si no existe un buen amortiguamiento del sistema y por lo tanto los tiempos de migración varían. La forma y simetría de los picos se ve influenciado por este factor.

Efectos de fuerza iónica.- El control de la fuerza iónica es una manipulación que permite ajustar la resolución, eficiencia y sensibilidad. Incrementando la fuerza iónica, generalmente mejora la resolución, la eficiencia y forma del pico. La sensibilidad puede ser mejorada, debido a que se logra una mejor convergencia. Aunque, la corriente generada es directamente proporcional a la concentración del buffer, se produce mayor calor cuando la fuerza del buffer es incrementada, limitando la fuerza iónica que puede ser utilizada.

Efectos de voltaje.- Cuando altos voltajes son aplicados, un calentamiento interno en la operación del buffer ocurre debido al flujo de corriente que atraviesa el buffer. Este efecto de calentamiento, conocido como calor de Joule, está controlado debido a la resistencia, la constante dieléctrica y la viscosidad; que son dependientes de la temperatura, alterando la velocidad del EOF y movilidad del soluto.

En general, un incremento en el voltaje tiene como resultado un incremento en la eficiencia y la resolución, debido al aumento en la movilidad de los analitos a separar.

El voltaje máximo a aplicarse, debe ser considerado cuando el calentamiento Joule no puede ser disipado adecuadamente. La resolución máxima es obtenida por el mantenimiento de un nivel alto de voltaje, al cual, el calentamiento Joule y la difusión empiezan a ser factores limitantes.

Dimensiones del capilar.- La variación en el diámetro y la longitud capilar, pueden afectar la resolución electroforética. Incrementar la longitud del capilar resulta en tiempos de migración largos; usualmente incrementa la resolución y genera una corriente baja también. Incrementando el diámetro del capilar usualmente se incrementa la corriente y asociado al gradiente de temperatura, la resolución disminuye; pero se observa un aumento en la señal de los analitos. Recíprocamente, una reducción en el diámetro del capilar puede resultar en un bajo calentamiento y una mejor resolución. Aunque, los capilares de gran diámetro tienen la ventaja de una mejor carga de masa y una mejora en la relación señal-ruido. ⁴⁴

3.4.4 Introducción de la Muestra

Los modos de introducción de la muestra en el capilar incluyen electromigración (modo electrocinético) y presiones de inyección positiva y negativa (modo hidrodinámico). ^{4,6,8,20}

En general la cantidad de muestra inyectada debe ser menor del 1-2 % del total de la longitud del capilar. Esto corresponde a una longitud de inyección de pocos milímetros (1 – 50 nl) dependiendo de la longitud y del diámetro interno del capilar. Esto es una ventaja cuando el volumen de muestra es pequeño pues se pueden realizar numerosas inyecciones con una sola muestra, por otro lado, volúmenes pequeños aumentan las dificultades de sensibilidad para muestras diluidas. La sobrecarga de muestra puede tener dos efectos significativos, y los dos perjudican la resolución: ⁸

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

La inyección cuantitativa de la muestra se puede lograr por diversos métodos: los dos más usados son el hidrodinámico y el electrocinético. ⁸

3.4.4.1 Inyección hidrodinámica: también llamada inyección neumática, se realiza mediante diferencia de presión, por bombeo o bien por vacío, es decir, forzando la introducción de la muestra al capilar (figura 5). Este es un sistema confiable y no selectivo. Con un control preciso de la presión y el tiempo de inyección se pueden obtener inyecciones altamente reproducibles.⁸

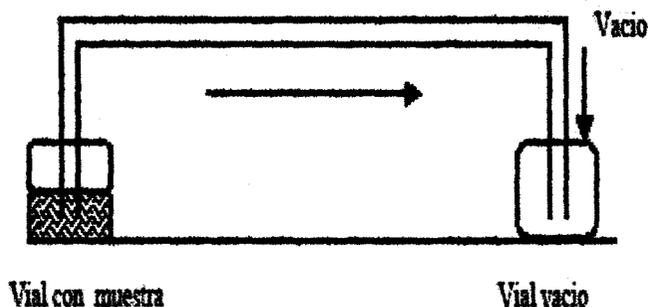


Figura 9. Inyección de muestra con modo hidrodinámico (presión).⁴⁴

3.4.4.2 Inyección electrocinética: se realiza mediante la electromigración de los iones presentes en la muestra al aplicarse un campo eléctrico, por lo que el flujo electroosmótico es un factor que afecta esta modalidad de inyección. La muestra es introducida aplicando un pequeño voltaje, normalmente de 5 kV por un tiempo determinado. El voltaje provoca que los iones de la muestra migren selectivamente al interior del capilar (figura 6). Generalmente este tipo de inyección no es tan reproducible como la hidrodinámica.⁸

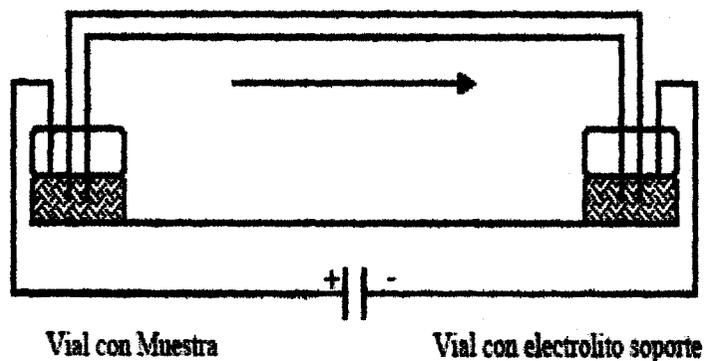


Figura 10. Inyección de la muestra con modo electrocinético (voltaje).⁴⁴

Cada método de inyección (introducción) ofrece ventajas y desventajas específicas, dependiendo de la composición de la muestra, el modo de separación, y la aplicación del método. Ninguno de los modos de inyección mencionados es tan reproducible como un inyector de HPLC, disponible comercialmente. En general, debido a que el error asociado en la introducción de la muestra, se vuelve más importante al inyectar volúmenes muy pequeños, del orden de nanolitros; puede ser necesario el uso de estándares internos, donde una alta precisión de introducción de la muestra es requerida.¹

3.4.5 Principales ventajas de la electroforesis capilar.

Entre las ventajas que ofrece la electroforesis capilar se puede apuntar que da lugar a separaciones con volúmenes de muestra extraordinariamente pequeños (de 0,1 a 10 nl), en contraste con la electroforesis convencional en la cual se emplean volúmenes de muestra en el orden de los microlitros, con una elevada resolución y rapidez. Ofrece además mayor facilidad y velocidad que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Esta técnica elimina el problema de los solventes de HPLC, la toxicidad de los mismos y su costo, pues emplea soluciones acuosas en su gran mayoría con muy baja concentración iónica, incorpora los principios de la automatización a través de un hardware creado especialmente con un software altamente optimizado.³⁵

La EC tiene un número de ventajas comparado con HPLC. La disipación del calor en el tubo capilar es buena y, por tanto, los cambios de temperatura son muy pequeños y los resultados presentan mayor reproducibilidad.^{2,53}

- ☞ Dada la rápida disipación del calor, es posible utilizar voltajes muy altos (hasta 30 kV), lo cual disminuye los tiempos de análisis y aumenta la resolución entre los picos.
- ☞ El gasto en disolventes, aditivos y demás reactivos es mínimo, de ahí sus bajos costos y los casi nulos daños al medio ambiente.
- ☞ La cantidad de muestra necesaria se reduce a unos cuantos microlitros.

- ☞ El valor de cada capilar es insignificante en comparación con el de una columna cromatográfica u otra columna en general.
- ☞ Se pueden utilizar una gran variedad de detectores tanto en línea o fuera de línea o bien varios a la vez.
- ☞ Se cuenta con equipos completamente automatizados que permiten analizar más de 100 muestras sin necesidad de atención en el equipo.
- ☞ Es posible acoplar los equipos de electroforesis capilar a otros equipos analíticos.
- ☞ Rápido desarrollo y optimización del método.
- ☞ Rápido tiempo de análisis.
- ☞ Reducción de la generación de desechos orgánicos tóxicos

3.4.6 Parámetros del electroferograma

En el caso de la EC la señal del detector como función del tiempo es la base de la obtención del "electroferograma" el cual muestra el registro de la composición de la muestra, mediante bandas o picos.⁴⁵

El electroferograma se define como una imagen que traduce visualmente en una pantalla la evolución, en función del tiempo, de un parámetro que depende de la concentración instantánea del soluto a la salida del capilar.⁴⁵

La línea base corresponde al trazado obtenido en ausencia del compuesto analizado. La separación se completa cuando el electroferograma presenta tantos picos que vuelven a la línea base como compuestos hay en la mezcla de análisis, como se observa en el electroferograma de la figura 13.

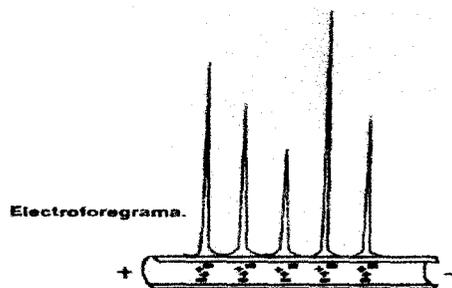


Figura 11. Electroferograma ejemplo¹¹

Un compuesto se caracteriza por su tiempo de migración t_m que representa el tiempo transcurrido entre el instante de introducción y el determinado cuando el pico correspondiente en el electroferograma alcanza su máximo.⁸

En el análisis cuantitativo hay que conformarse a menudo con separar de la mezcla el o los componentes a cuantificar. Si la señal enviada por el detector varía linealmente con la

concentración de un compuesto, lo mismo ocurrirá con el área del pico correspondiente en el electroferograma.

Los parámetros de aptitud del sistema puede determinarse utilizando mezclas de muestras estándar, y se pueden establecer a partir de los electroferogramas obtenidos, dichos parámetros son:⁴⁹

a) Forma del Pico: Idealmente, el pico debería ser simétrico, sin hombros y sin excesiva asimetría, es decir, el mismo aspecto que la función representativa de la ley de distribución normal (curva de Gauss), aunque en electroferogramas reales están lejos muchas veces de presentar picos con ésta forma tan perfecta, se deben tomar acciones correctivas antes de seguir con el desarrollo del método, aunque es aceptable utilizar picos muy asimétricos siempre y cuando sean reproducibles y no comprometan la selectividad de la separación.⁴⁸

b) Resolución: Constituye una medida cuantitativa de su capacidad para separar 2 analitos. Para definir numéricamente el que una separación entre 2 componentes sea más o menos buena, se emplea el factor Rs (o simplemente resolución), que se calcula a partir de los datos obtenidos del electroferograma:⁴⁷

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

Donde:

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

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

W_2 = Ancho del pico del analito 2

W_1 = Ancho del pico del analito 1

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

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

c) Factor de separación (o de selectividad) entre 2 solutos: Este factor, α , permite precisar las posiciones relativas de 2 picos adyacentes en un electroferograma; se define a través de la siguiente expresión: ⁴⁵

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

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

d) Eficiencia: Término general usado para expresar el pico producido por una separación, este parámetro es medido en número de platos teóricos a partir del electroferograma con la utilización de una simple regla de medir longitudes. ⁴⁵

Platos teóricos:

Se calculan a partir de un electroferograma utilizando la siguiente ecuación: ⁴⁸

$$N = 16 (t_m / W_a)^2$$

Donde:

N = el número de platos teóricos

t_m = tiempo de migración

W_a = ancho de pico del analito

La medida de la eficiencia reside en que mientras mayor sea el número de platos teóricos el proceso de separación es más eficiente. ⁴⁸

3.4.7 Aplicaciones

Una de las características más atractivas que presenta esta técnica es que permite la separación simultánea de una gran variedad de analitos, incluyendo analitos que forman complejos a través de interacciones moleculares.¹⁹ Por lo que la electroforesis capilar continúa creciendo rápidamente como una técnica analítica en un amplio rango de áreas de aplicación.⁸

El avance de la electroforesis capilar se ha extendido en el área biomédica, en el campo de las proteínas, péptidos, DNA, análisis de líquidos de perfusión, monitoreo de drogas, marcadores genéticos tumorales y neurobioquímicos, drogas xenobióticas, de abuso y pericias forenses.⁷

En el área biofarmacéutica para el control de calidad de los productos farmacéuticos y biotecnológicos.

En el área de alimentos, se le aplica al fraccionamiento y cuantificación de aminoácidos, hidratos de carbono, ácidos orgánicos, aditivos y contaminantes.

En el área de control ambiental, permite la identificación de contaminantes y sus metabolitos, pesticidas, metales pesados e hidrocarburos.

Como todo desarrollo de un área analítica nueva, la incorporación de técnicas analíticas acopladas como la espectroscopia de masa, fluorescencia inducida por laser y otras variantes permiten asegurar un promisorio futuro.⁷

3.5 *VALIDACION*

La validación de un método o procedimiento analítico surge de la necesidad de tener métodos analíticos que no presenten variaciones durante su uso cumpliendo con su propósito analítico para obtener datos exactos, precisos y sobre todo confiables.

Se llevan a cabo pruebas en el laboratorio que cumplan con parámetros y criterios de aceptación previamente establecidos.³⁸

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación deseada, es decir, cumple con su propósito.¹⁶

3.5.1 Regulación

Existen normas en nuestro país que determinan la obligación para validar métodos analíticos, cuando éstos no son farmacopeicos o presentan alguna desviación al método farmacopeico, cuando se quiere registrar algún medicamento o evaluar la bioequivalencia entre dos productos farmacéuticos. Pero es importante tener en mente que la validación de los métodos no se debe realizar sólo para cumplir con alguna regulación sino para que el método no cause problemas durante su uso y se obtengan resultados confiables. Para este propósito se evalúan los parámetros de validación. Una de las condiciones para validar métodos es contar y utilizar instrumentos y equipos calificados y con calibración vigente, esto nos dará seguridad de que los equipos nos estarán proporcionando mediciones confiables. Las sustancias de referencia pueden ser primarias o estar estandarizadas.³⁸

La Norma Oficial NOM-059-SSA1-1993 Buenas Prácticas de Fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos establece que se debe contar con métodos analíticos validados para productos a granel, producto terminado y materia prima en caso de no aparecer en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) o en alguna farmacopea internacional.⁴⁶

La Norma Oficial NOM-164-SSA1-1998 Buenas Prácticas de Fabricación para fármacos dice que se deben validar los métodos analíticos tanto farmacopéicos como no farmacopéicos que tengan desviaciones frente a la farmacopea de referencia.³⁷

La Norma Oficial NOM-177-SSA1-1998 Intercambiabilidad de medicamentos, establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable y los requisitos a los que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. Además, establece que el método analítico que se utilice para hacer el perfil de disolución debe estar validado.³⁶

Las guías como la Internacional Conference Harmonization ICH, Food and Drug Administration FDA y la Farmacopea de los Estados Unidos USP forman parte de la regulación internacional.²⁵

Los métodos analíticos están definidos como un sistema crítico en el aseguramiento de calidad de una empresa farmacéutica, ya que impacta de manera directa en la calidad del producto. Es por ello que la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993 (Buenas prácticas de fabricación) establece que todos los métodos analíticos deben de ser validados.⁴⁶

3.5.2 Tipos de procedimientos analíticos a ser validados

- ◆ Pruebas de identificación: Se llevan a cabo para asegurar la identidad del analito en la muestra. Se lleva a cabo la mayoría de las veces por comparación de una propiedad (espectro, reactividad química, comportamiento cromatográfico).
- ◆ Prueba para límite de impurezas
- ◆ Prueba para la cuantificación de impurezas: Esta prueba y la anterior intentan detectar la pureza de una muestra. Se requieren de diferentes pruebas para cada una de ellas.
- ◆ Ensayo de contenido de principio activo: Este procedimiento esta encaminado a la cuantificación de un principio activo en una muestra.

Los parámetros de desempeño que debe cumplir un método analítico, dependiendo del uso que se le pretenda dar se muestran en la tabla 1.²⁵

Tabla 1. Parámetros de validación según la ICH

Parámetro	Identificación	Prueba para impurezas		Ensayo
		Cuantitativa	Límite	
Exactitud	-	+	-	+
Precisión-Repetibilidad	-	+	-	+
Precisión intermedia	-	+	-	+
Especificidad	+	+	+	+
Límite de detección	-	-	+	-
Límite de cuantificación	-	+	-	-
Linealidad	-	+	-	+
Rango	-	+	-	+
Robustez	-	+	-	+

NOTA:

- Este parámetro no se evalúa normalmente
- + Este parámetro se evalúa normalmente

3.5.3 Parámetros de Validación:

La exactitud es la medida del grado de concordancia entre el valor de referencia del analito (también conocido como valor verdadero) y el valor obtenido del analito empleando el método. La exactitud es una medida de los errores sistemáticos que se cometen para obtener un valor. Como el valor verdadero raramente es conocido, la estimación de la exactitud representa un reto analítico. La exactitud se puede estimar de la siguiente forma:

- Adicionando cantidades conocidas de un analito de referencia que este perfectamente caracterizado a la muestra y expresar la exactitud como la cantidad recuperada con respecto a la cantidad adicionada (recobro) ⁹

Esta concordancia se expresa como porcentaje de recobro obtenido del análisis de las muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de sustancia.

Se reporta el % de recobro

$$\% \text{ recuperado} = \frac{\text{Cantidad adicionada}}{\text{Cantidad recuperada}} * 100$$

Precisión. Es la medida del grado de dispersión entre una serie de resultados que se obtienen al realizar varias veces el mismo procedimiento a una misma muestra bajo las mismas condiciones establecidas. La precisión se puede considerar en 3 niveles: Repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. Este parámetro se puede determinar usando la muestra o por medio de la elaboración de un placebo adicionado (muestra de un placebo al cual se le adiciona una cantidad conocida del analito) y por lo general se expresa como la varianza, desviación estándar o coeficiente de variación de la serie de medidas.⁹

La repetibilidad: Es la precisión de determinaciones independientes bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo: analista, aparatos, equipos. Se utilizan placebos cargados.

Precisión intermedia: expresa la concordancia entre las determinaciones realizadas en un mismo laboratorio, por ejemplo, diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos.

Reproducibilidad: expresa la precisión del método analítico al llevar a cabo determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios (estudios aplicados para la estandarización de metodologías) ICH, 1995. Expresa la precisión entre laboratorios.

El **límite de detección** se define como la concentración del analito mas pequeña en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones experimentales establecidas. En los sistemas analíticos donde el intervalo al que se lleva a cabo la validación no lo incluye o no se aproxima no es necesario que este parámetro forme parte de la validación.³¹

Límite de cuantificación es la concentración más pequeña del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con una exactitud aceptable bajo las condiciones experimentales establecidas. Es un parámetro del análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y se usa particularmente para impurezas y productos de degradación. Se expresa como concentración del analito.³¹

Linealidad y rango. La linealidad de un método analítico es la habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración de un analito dentro de un intervalo determinado. La linealidad se expresa comúnmente en términos del valor de la pendiente de la regresión que se calcula de acuerdo a relaciones matemáticas establecidas con los resultados obtenidos del análisis de las muestras al variar la concentración del analito. El rango de un método analítico es el intervalo entre la concentración más baja y la concentración más alta del analito dentro de los

cuales el método puede considerarse validado ya que se demuestra que estos niveles de concentración son determinados con precisión y exactitud usando el método establecido.⁵¹

Especificidad. Es la habilidad de medir con exactitud únicamente al analito de interés en presencia de otros componentes que están presentes en la muestra o matriz. Es una medida del grado de interferencia de muchas sustancias como otros principios activos, excipientes, impurezas, productos de degradación, asegurándose que la respuesta analítica solo se deba al analito de interés.⁹

La **robustez** de un método analítico es su capacidad de mantener su desempeño cuando se realizan desviaciones menores deliberadas en los parámetros normales de operación del método. La robustez se evalúa al variar algunos parámetros del método como la proporción de solventes orgánicos, pH, concentración de iones, temperatura, etc., y determinar el efecto que tienen sobre los resultados con respecto al método llevado a cabo en condiciones normales. Si las mediciones son susceptibles a las variaciones realizadas estos parámetros deben ser controlados adecuadamente y deberán de estar debidamente documentados.⁹

La **tolerancia** de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos en el análisis de una misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación como diferentes laboratorios, analistas, instrumentos, diferentes lotes de reactivo, diferentes lapsos de tiempo en el análisis, etc. La tolerancia normalmente se expresa como la falta de influencia de variables operacionales y ambientales en los resultados.⁵¹

Adecuabilidad del sistema. Este procedimiento es para verificar que la resolución y la reproducibilidad del sistema son las adecuadas antes de llevar a cabo un análisis o durante su ejecución.⁸

CAPÍTULO 2

PARTE EXPERIMENTAL

4 METODOLOGIA

4.1 REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPO

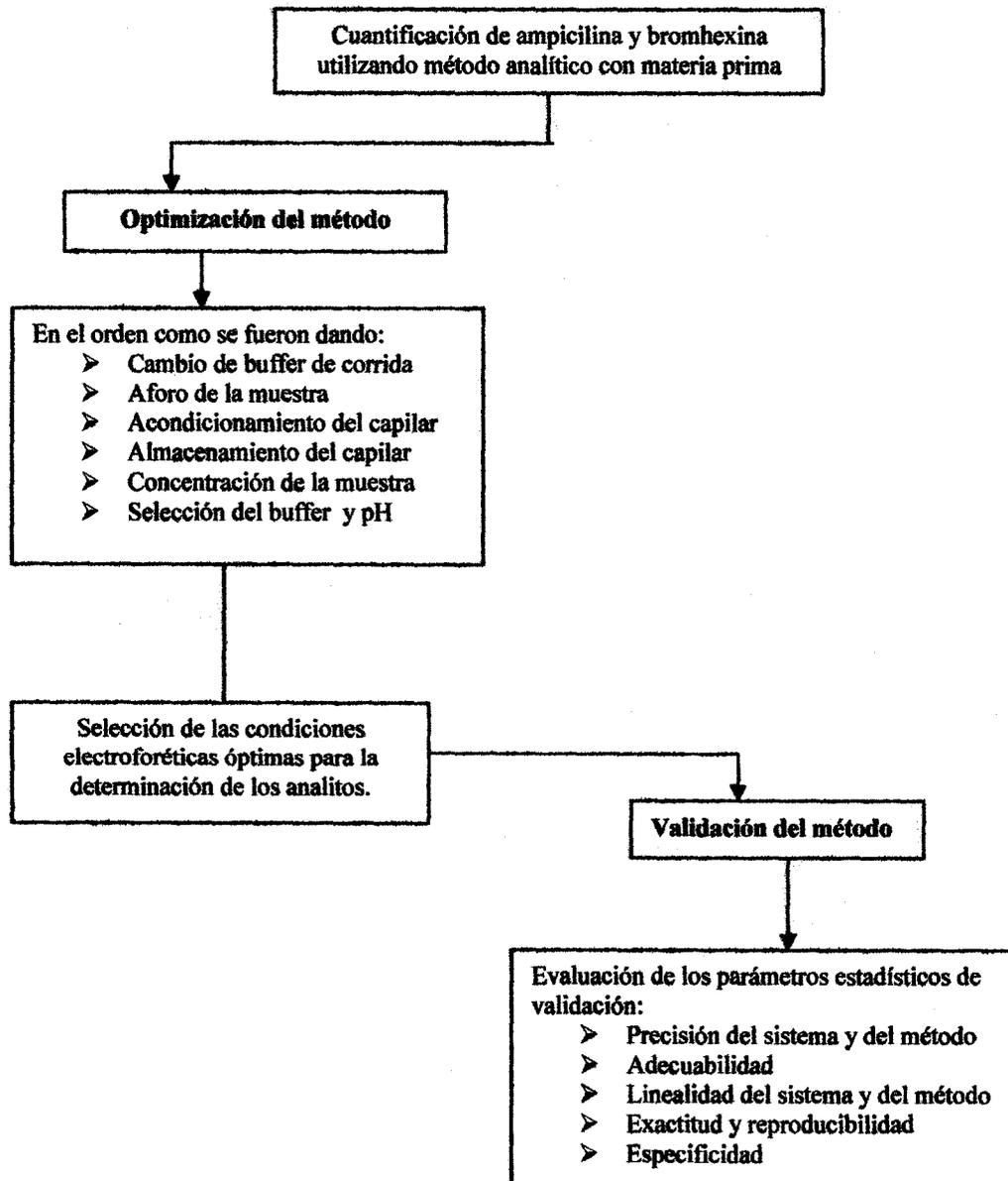
- ✓ Se utilizó un equipo de electroforesis capilar P/ACE MDQ2, Beckman Coulter, equipado con un detector de arreglo de diodos (DAD), acoplado a una computadora y manejado mediante el software 32 KARAT (Beckman Coulter, USA).
- ✓ El agua desionizada fue obtenida de un equipo desionizador de agua tipo 1 (MilliQ plus Millipore®)
- ✓ Balanza Analítica (BOECO Germany con 0.0001g de precisión)
- ✓ PH meter HI 931401 (Hanna Instruments)
- ✓ Agitador magnético (Thermolyne, MIRA^{KTM})
- ✓ Acetonitrilo grado HPLC
- ✓ Hidróxido de sodio, J. T. Baker (Xalostoc, Edo. De Mex., México)
- ✓ Acido Clorhídrico, J. T. Baker (Xalostoc, Edo. De Mex., México)
- ✓ Fosfato de sodio monobásico, monohidratado, cristal J. T. Baker (Xalostoc, Edo. De Mex., México)
- ✓ Materia prima: Ampicilina trihidratada (Lote: 1600001500) y Clorhidrato de Bromhexina (Lote: 1601025700) fueron proporcionados por HORMONA S.A de C.V. Laboratorios
- ✓ Estándar Primario: Ampicilina y Bromhexina

Muestra: Penbritin EX cápsulas.

Cada capsula contiene:

Ampicilina trihidratada equivalente a 500 mg de ampicilina base
Clorhidrato de bromhexina 8 mg
Excipiente, c.b.p. 1 cápsula

4.2 METODOLOGÍA GENERAL



4.3 Preparación de Soluciones:

Preparación del Buffer de Fosfatos 50mM pH = 2.5

Pesar con exactitud 13.99g de Fosfato de sodio monobásico, monohidratado, cristal en un vaso de precipitado de 2000ml, adicionar 1500ml de agua desionizada, agitar mecánicamente a 500rpm por 5min. Llevar a un volumen aproximado de 1800ml y ajustar el pH con HCl 1M a 2.5. Transvasar a un matraz aforado de 2000ml y enjuagar el vaso con agua desionizada por lo menos tres veces. Llevar al volumen de aforo y mezclar. Guardar en un frasco y etiquetar.

Preparación de la solución estándar de Bromhexina y Ampicilina

1) En una balanza analítica pesar con exactitud empleando un vaso de precipitado de 10 ml la cantidad de 80mg de estándar primario de Bromhexina, se adicionan 2.5 ml de mezcla acetonitrilo-agua pH=1(1:1) y agitar hasta que se disuelva el estándar, pasar la solución a un matraz volumétrico de 10ml, llevar al volumen de aforo con buffer de fosfatos 50mM pH=2.5 y mezclar. Esta es la solución 1.

2) En un vaso de precipitado de 10ml se pesa con exactitud 25 mg del estándar primario de Ampicilina, se adicionan 2.5 ml de mezcla acetonitrilo-agua pH=1(1:1) y agitar hasta que se disuelva el estándar, pasar la solución a un matraz volumétrico de 10ml, llevar al volumen de aforo con buffer de fosfatos 50mM pH=2.5 y mezclar. Esta es la solución 2.

3) Tomar 1 ml de la solución 1 y depositarlos en un matraz volumétrico de 10ml, tomar 1ml de la solución 2 y depositar en el mismo matraz volumétrico, llevar al volumen de aforo con buffer de fosfatos 50mM pH=2.5 y mezclar. (Solución estándar)

4.4 Preparación de la muestra:

- 1) Pesar el contenido de 20 capsulas y anotar el peso promedio. Pulverizar y mezclar el polvo.
- 2) Pesar aproximadamente 600mg (equivalente a 500mg de ampicilina y 8mg de Bromhexina) en un vaso de precipitado de 50ml, adicionar 20ml de mezcla acetonitrilo-agua pH=1(1:1) y agitar 15min a 500rpm. Pasar la solución a un matraz volumétrico de 100ml, llevar al volumen de aforo con buffer de fosfatos 50mM pH=2.5 y mezclar. Esta es la solución A (Bromhexina).
- 3) Pasar 1ml de la solución A, a un matraz volumétrico de 20ml. Llevar al volumen de aforo con buffer de fosfatos 50mM pH=2.5 y mezclar. Esta es la solución B (Ampicilina).
- 4) Filtrar las muestras con filtros de 0.45micras de diámetro y depositarlas en un vial para electroforesis. Leer las muestras utilizando como buffer de corrida y de lavado al buffer de fosfatos 50mM pH=2.5, haciendo la detección a una longitud de onda de 210nm. Al minuto 1.5 se corta la corrida para leer a la bromhexina (solución A), posteriormente se corre la Ampicilina por 3min (solución B).
- 5) Leer las muestras utilizando las condiciones electroforéticas especificadas en la optimización del método.

Análisis:

- ✓ La muestra se analiza con el equipo de electroforesis capilar P/ACE MDQ2, Beckman Coulter, equipado con un detector de arreglo de diodos (DAD), acoplado a una computadora y manejado mediante el software 32 KARAT (Beckman Coulter, USA).
- ✓ Antes de cada jornada de trabajo lavar 5min con buffer fosfatos 50mM pH2.5 a 20psi, 25°C
- ✓ Al término de la jornada de trabajo se deja remojando el capilar en dos viales que contienen buffer diluido (volumen 5:20) a pH 2.5
- ✓ Leer primero a la bromhexina y cortar al tiempo de salida del pico (1.5min de corrida) de este, posteriormente leer la ampicilina con 3 min de corrida.

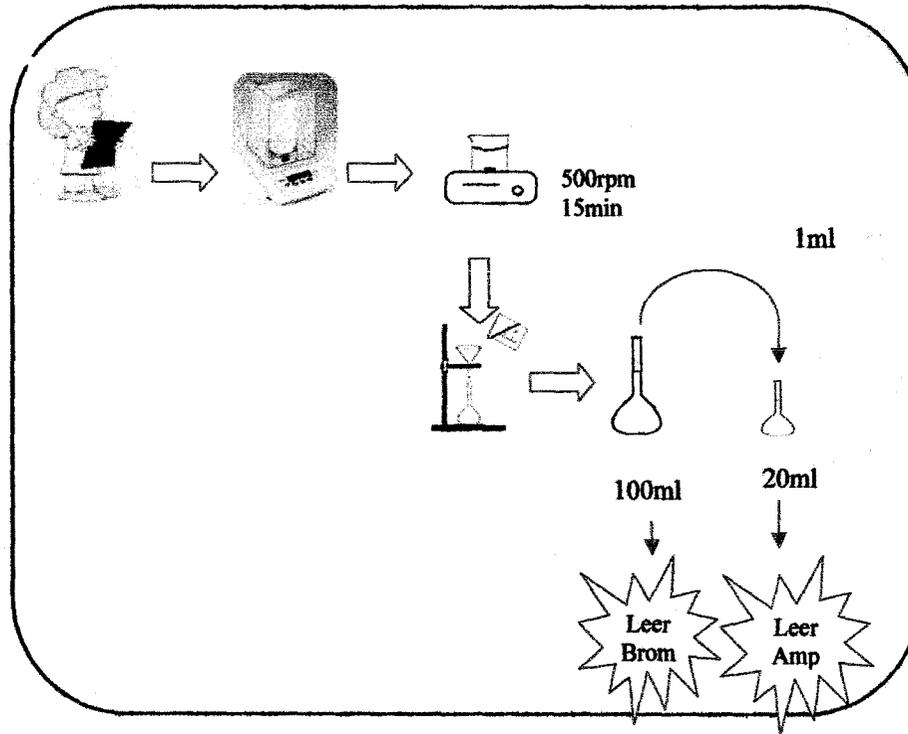


Figura 12. Diagrama de flujo de preparación de muestra

Cálculos:

Medir con exactitud la respuesta (área de los picos) del estándar y la muestra, calcular la cantidad de activo con la siguiente formula:

$$\text{mg de bromhexina o ampicilina /cap} = \frac{\text{Am} \times \text{Wstd} \times \text{FD} \times \text{W prom}}{\text{Astd} \times \text{Wm}}$$

Donde:

Am = Área del pico de la muestra

Astd = Área del pico del estándar

FD = Factor de dilución (aforos/alícuotas)

Wm = Peso de la muestra en mg

Wprom = Peso promedio de capsulas en mg /cap

Wstd = Peso del estándar en mg

4.5 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

El propósito de validar un método es obtener datos de calidad, si los datos y resultados de un análisis no son confiables esto repercutirá directamente en la calidad del producto ya que ésta será dudosa o simplemente se tomarán decisiones equivocadas en lo que se refiere a la liberación de productos ya sea evitando la liberación de lotes que cumplan especificaciones, o en el peor caso, liberando lotes cuyas características no cumplen los criterios de aceptación de calidad para los mismos, situaciones que a la larga afectarán económicamente a la empresa, o incluso puedan llevar a la pérdida de confianza en la misma y a un daño en su reputación. Es por esto por lo que es necesario dedicarle tiempo y recursos a la validación de métodos analíticos para que se pueda planear y organizar de manera correcta, se pueda ejecutar y revisar de manera apropiada, evitando así fallos o errores en la interpretación y aprobación de resultados consiguiendo a la larga no tener problemas después de concluida la validación.³⁸

Para validar este método analítico se tomó en cuenta el procedimiento y los criterios de aceptación para cada parámetro que se menciona en la Guía de Validación de Métodos Analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, edición 2002.

Tabla 2. Parámetros de desempeño a evaluar en función de la aplicación del método.
(Guía de validación QFB's).¹

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

- este parámetro no se evalúa; + este parámetro se evalúa; * puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método

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

- Adecuabilidad del sistema.
- Especificidad.
- Precisión y linealidad del sistema.
- Exactitud y reproducibilidad.
- Precisión y linealidad del método

Adecuabilidad del sistema:

Procedimiento:

Preparar a partir de una solución estándar de concentración conocida una solución que represente el 100% de Ampicilina (250mcg/ml) y Bromhexina (80mcg/ml) que se va a cuantificar. Depositar en un vial para electroforesis capilar y correr por sextuplicado, usando las condiciones electroforéticas descritas en la optimización.

Información de reporte y cálculos:

Reportar el área de Ampicilina y de Bromhexina y determinar el coeficiente de variación de la respuesta analítica de las 6 inyecciones.

Criterios de aceptación:

El coeficiente de variación entre las áreas de la Ampicilina y Bromhexina debe ser $\leq 2\%$.

Precisión del sistema:

Procedimiento:

A partir de una misma solución Stock de concentración conocida de Ampicilina y Bromhexina preparar por sextuplicado una solución con la misma concentración, representando así la concentración de la Ampicilina y Bromhexina a cuantificar (250mcg/ml y 80mcg/ml respectivamente). Depositar en un vial para electroforesis capilar y leer los sistemas usando las condiciones electroforéticas ya descritas.

Información de reporte y cálculos:

Reportar el área del pico de Ampicilina y Bromhexina de cada solución.
Determinar el coeficiente de variación de la respuesta analítica.

Criterios de aceptación:

El Coeficiente de Variación de las áreas de ampicilina y de bromhexina debe ser $\leq 1.5 \%$

Linealidad del sistema:

Procedimiento:

Este parámetro se determinó mediante la elaboración de una curva de calibración a partir de una misma solución stock de concentración conocida de Ampicilina y Bromhexina usando siete niveles de concentración. El intervalo de concentraciones incluye el 60, 80, 90, 100, 110, 120 y 140 % con respecto a la concentración que representa el 100 % de la muestra procesada para su medición.

Siguiendo la siguiente metodología:

- a) Se prepara una solución Stock de ampicilina y bromhexina (500 μ g/ml-160 μ g/ml respectivamente) conforme a la metodología descrita

- b) Tomar 3 ml de la solución stock y depositarlos en un matraz volumétrico de 10ml, llevar al volumen de aforo (Sistema 1) [AMP = 150 µg/ml] y [BROM = 48 µg/ml] (60%)
- c) Tomar 4 ml de la solución Stock y colocarlos en un matraz aforado de 10 ml, llevar al volumen de aforo con buffer de fosfatos 50mM pH=2.5 y mezclar. (Sistema 2). [AMP = 200 µg/ml] y [BROM = 64 µg/ml] (80%)
- d) Tomar 4.5 ml de la solución Stock y colocarlos en un matraz aforado de 10 ml, llevar al volumen de aforo con buffer de fosfatos 50mM pH=2.5 y mezclar. (Sistema 3). [AMP = 225 µg/ml] y [BROM = 72 µg/ml] (90%)
- e) Tomar 5 ml de la solución Stock y colocarlos en un matraz aforado de 10 ml, llevar al volumen de aforo con buffer de fosfatos 50mM pH=2.5 y mezclar. (Sistema 4). [AMP = 250 µg/ml] y [BROM = 80 µg/ml] (100%)
- f) Tomar 5.5 ml de la solución Stock y colocarlos en un matraz aforado de 10 ml, llevar al volumen de aforo con buffer de fosfatos 50mM pH=2.5 y mezclar. (Sistema 5). [AMP = 275 µg/ml] y [BROM = 88 µg/ml] (110%)
- g) Tomar 6 ml de la solución Stock y colocarlos en un matraz aforado de 10 ml, llevar al volumen de aforo con buffer de fosfatos 50mM pH=2.5 y mezclar. (Sistema 6). [AMP = 300 µg/ml] y [BROM = 96 µg/ml] (120%)
- h) Tomar 7 ml de la solución Stock y colocarlos en un matraz aforado de 10 ml, llevar al volumen de aforo con buffer de fosfatos 50mM pH=2.5 y mezclar. (Sistema 7). [AMP = 350 µg/ml] y [BROM = 112 µg/ml] (140%)
- i) Repetir por triplicado del paso b al paso h con el fin de obtener 15 sistemas para la linealidad del sistema.

Información de reporte y cálculos.

Trazar la gráfica concentración vs área de Ampicilina y la gráfica de concentración vs área para la Bromhexina. Calcular el valor de la pendiente, la ordenada al origen, el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente en ambos gráficos.

Criterios de aceptación:

$$r^2 \geq 0.98$$

El intervalo de confianza no debe de incluir el 0

Especificidad del método:

Procedimiento:

Para ello se prepara un placebo analítico, el cual contiene todos los componentes de la formulación excepto la ampicilina y a la bromhexina. A este placebo analítico se le realiza el procedimiento descrito para la muestra en la metodología.

Información de reporte:

Reportar los electroferogramas obtenidos

Criterios de aceptación:

No debe existir respuesta analítica a la longitud de onda de trabajo en el tiempo migración de Ampicilina y Bromhexina.

Exactitud y repetitividad del método

Procedimiento:

Para ello se preparó un placebo analítico con las cantidades especificadas en la formulación. A la cantidad de placebo analítico se le adicionó por sextuplicado, con pesadas independientes la cantidad de analitos correspondientes al 100%, teniendo concentraciones de 250 $\mu\text{g/ml}$ para ampicilina y 80 $\mu\text{g/ml}$ para bromhexina. Cada muestra se analiza conforme a la metodología descrita y también se prepara una solución estándar.

Haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación, en un día y por el mismo analista.

Información de reporte y cálculos:

Calcular la cantidad recuperada de Ampicilina y Bromhexina y considerando la cantidad adicionada, calcular el porcentaje de recobro de los 2 activos.

Calcular el promedio aritmético, la desviación estándar, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro de cada activo.

Criterios de aceptación:

El intervalo de confianza debe incluir el 100 % o el promedio aritmético del porcentaje de recobro este dentro del intervalo de 98 al 102 %.

El CV del porcentaje de recobro no debe ser mayor de 2 %.

Linealidad del método

Procedimiento:

Para ello se preparó un placebo analítico con las cantidades especificadas en la formulación. Se pesó en forma independiente los dos activos a los niveles de concentración de 60, 80, 90, 100, 110, 120, y 140% y se adicionó la cantidad de placebo ajustado a cada nivel por triplicado. Cada placebo cargado se analiza conforme a la metodología descrita y también se prepara una solución estándar.

Información de reporte y cálculos:

Calcular la cantidad recuperada de Ampicilina y Bromhexina y considerando la cantidad adicionada, calcular el porcentaje de recobro de los dos activos.

Graficar la cantidad adicionada vs cantidad recuperada de ampicilina y bromhexina por separado y calcular el valor de la pendiente, la ordenada al origen, el coeficiente de determinación, el intervalo de confianza para la pendiente, el intervalo de confianza para la ordenada al origen y el coeficiente de variación de regresión en cada gráfico.

Del porcentaje de recobro para los dos activos calcular el promedio aritmético, el coeficiente de variación y el intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro.

Criterios de aceptación:

Para la relación cantidad adicionada contra cantidad recuperada $r^2 \geq 0.98$, el intervalo de confianza de la pendiente debe de incluir la unidad, el intervalo de confianza para la ordenada al origen debe de incluir el 0 y el coeficiente de variación de regresión no debe ser mayor del 2 %.

Para el porcentaje de recobro, el intervalo de confianza para la media poblacional debe incluir el 100 % o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo de 98-102 % y el coeficiente de variación del porcentaje de recobro no sea mayor del 2 %.

Precisión intermedia (Reproducibilidad entre día y analista)

Procedimiento:

La muestra del producto se analizó por triplicado con dos analistas diferentes en 2 días diferentes. Cada muestra se analiza conforme a la metodología descrita y también se prepara una solución estándar.

Información de reporte y cálculos:

Calcular la media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación del contenido de ampicilina y bromhexina de la muestra.

Criterios de aceptación:

El coeficiente de variación del porcentaje de recobro no debe ser mayor del 2% para la Bromhexina y la Ampicilina.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSION

5. OPTIMIZACIÓN DEL METODO

5.1 Antecedentes

La siguiente metodología fue desarrollada en Química Analítica en el Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos L-401 en un trabajo de tesis previo.

En la tabla 3 se muestran las condiciones electroforéticas establecidas para la cuantificación de ampicilina y bromhexina:

Tabla 3. Condiciones electroforéticas iniciales

PARAMETROS	CONDICIONES
Longitud de onda	214nm
Electrolito soporte	Buffer de fosfatos 50mM, pH=3
Capilar	Sílice fundida de 52µm de diámetro interno y 31cm de largo
Tiempo de lavado entre corridas	3min con buffer
Cambio de buffer de corrida	Cada 3 corridas
Voltaje de separación	30kv, 6min
Inyección de la muestra	0.5psi, 5seg
Presión de lavado	30psi
Corrientes dadas c/muestra	131µA

Además, se utilizó la siguiente metodología:

1. Preparar un placebo cargado al 100% según la formulación.
2. Pesar del placebo el equivalente a 1.6mg de bromhexina y 100mg de ampicilina.
3. Agregar 5ml de mezcla Ac: Aa (1:1) y dar agitación magnética por 2 min.
4. Adicionar 5ml de agua desionizada y continuar la agitación por 3 min. más.
5. Filtrar la solución y lavar con 3ml de agua desionizada.
6. Adicionar el filtrado a un matraz de 20ml y aforar con agua desionizada, la solución resultante tendrá una concentración de 80ppm de Bromhexina y 5000ppm de ampicilina.
7. Preparar un blanco pesando de manera aproximadamente exacta 11mg de estearato de magnesio y tratar con los pasos 3 a 6.
8. Preparar una solución de estándares con 16mg de bromhexina y 100mg de ampicilina siguiendo los pasos 3 a 6.
9. Analizar el blanco, la muestra estándar y la muestra del placebo bajos las condiciones establecidas para el método y obtener del electroferograma los tiempos de migración y área de cada analito.
10. Cuantificar la cantidad recuperada de cada analito.

5.2 Desarrollo de la optimización

Inicialmente solo se pretendía validar el método analítico mencionado anteriormente, pero al trabajar varios días con el método se encontró que no era reproducible entre días, ya que variaban considerablemente los tiempos de migración de los analitos. Por tal motivo en el desarrollo de la optimización se citan los factores involucrados en la separación que se modificaron según el orden como se fueron dando.

Como iniciativa se pretendió encontrar una longitud de onda a la cual la ampicilina que se encuentra 62.5 veces mas concentrada en comparación con la bromhexina diera un pico más pequeño para poder cuantificarse.

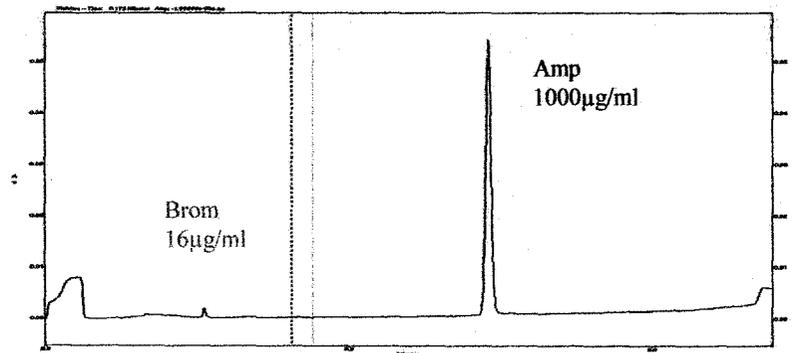


Figura 13. Electroferograma de AMP-BROM a la proporción real (6.25:1 respectivamente) en buffer fosfatos

Como se observa en la figura 13 el pico de bromhexina es muy pequeño, en comparación con el de la ampicilina, a la longitud de onda óptima para la bromhexina (214nm). Aun así se puede cuantificar bien a la bromhexina ya que el pico está bien definido.

Se realizó el método con una mezcla de AMP-BROM de concentración 1000µm/ml y 16µm/ml respectivamente (proporción en la que se encuentran en las muestras), utilizando todas las condiciones electroforéticas anteriormente mencionadas en los antecedentes obteniéndose los resultados presentados en la Tabla 4.

La metodología para la activación del capilar fue la siguiente:

- ✓ Lavar 10min 20psi con agua desionizada a 25°C
- ✓ Lavar 10min 20psi con Hidróxido de sodio 0.1M a 25°C
- ✓ Lavar 20min 20psi con Hidróxido de sodio 0.1M a 40°C
- ✓ Lavar 10min 20psi con agua desionizada a 25°C
- ✓ Lavar 10min 20psi con buffer fosfatos 50mM pH=3 a 25°C

Condiciones impuestas para el acondicionamiento del capilar de sílice fundida al inicio de la jornada de trabajo:

- ❖ Lavar 5min 20psi con agua desionizada a 25°C
- ❖ Lavar 5min 20psi con HCl 0.1M a 25°C
- ❖ Lavar 5min 20psi con agua desionizada a 25°C
- ❖ Lavar 10min 20psi con buffer fosfatos 50mM pH=3 a 25°C

Los datos reportados en el método dicen que a 2.5 min sale la bromhexina y que a 7.5 min sale la ampicilina. Por lo que son:

3min de lavado y 8 min de corrida

Dando un total de 11 min de tiempo de análisis por muestra

En el trabajo previo a este se encontró que una vez que se ha preparado la muestra debe analizarse antes de las 8 horas ya que a este tiempo la muestra aún es estable y no hay variación significativa en el porcentaje de recobro de ampicilina. En cuanto a la bromhexina es muy estable hasta por 3 días.

Tabla 4 .Variación de resultados utilizando la muestra amp-brom (62.5-1)

Día	tm promedio BROM	% CV	tm promedio AMP	% CV
1	1,921	3,18	4,795	6,0
2	1,279	5,01	3,8	
3	1,634	24,6	3,914	10,14
4	1,925	0,78	no salió	
5	2,072	5,8	no salió en 30min	

Como se observa en la tabla 4, al trabajar varios días con el método se encontró que no era reproducible entre días, ya que variaban considerablemente los tiempos de migración de los analitos. Por lo que se lavo el capilar con solo agua desionizada y HCl 0.1M, posteriormente se siguió con lo mismo.

Tabla 5. Resultados utilizando la muestra amp-brom (62.5-1), después de lavar el capilar

Día	tm promedio BROM	% CV	tm promedio AMP	% CV
1	1,921	3,18	4,795	6,0
2	1,279	5,01	3,8	
3	1,634	24,6	3,914	10,14
4	1,925	0,78	no salió	
5	2,072	5,8	no salió en 30min	

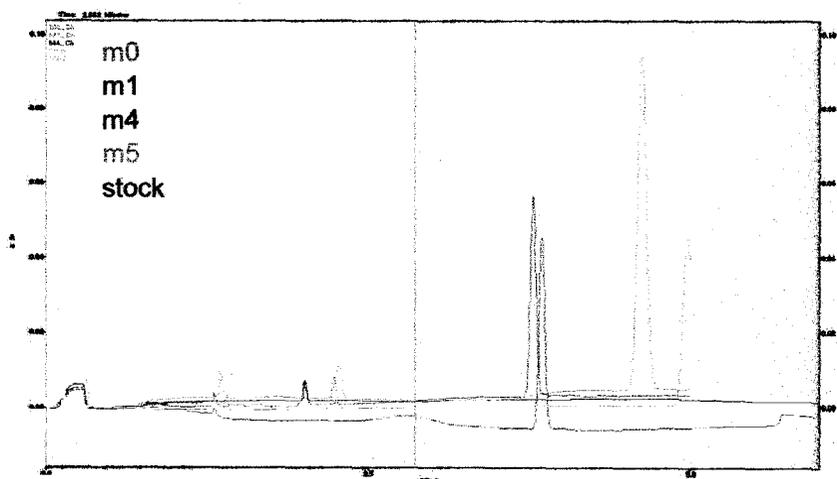


Figura 14. Variación de electroferogramas obtenidos el 17 de marzo

En la tabla 5 así como en la figura 14 se observa que el tiempo de migración de la Ampicilina así como de la Bromhexina varía considerablemente. Se atribuye este efecto al buffer que no estaba amortiguando.

Debido a que se movieron demasiado los tiempos de migración, se decidió entonces trabajar con buffer de citratos 50mM pH=3, utilizando las mismas condiciones de lavado, así como las electroforéticas dando tiempos de migración más reducidos; para la bromhexina de 1.337 y para la ampicilina de 3.204 min, obteniendo picos muy coleados (Fig. 15).

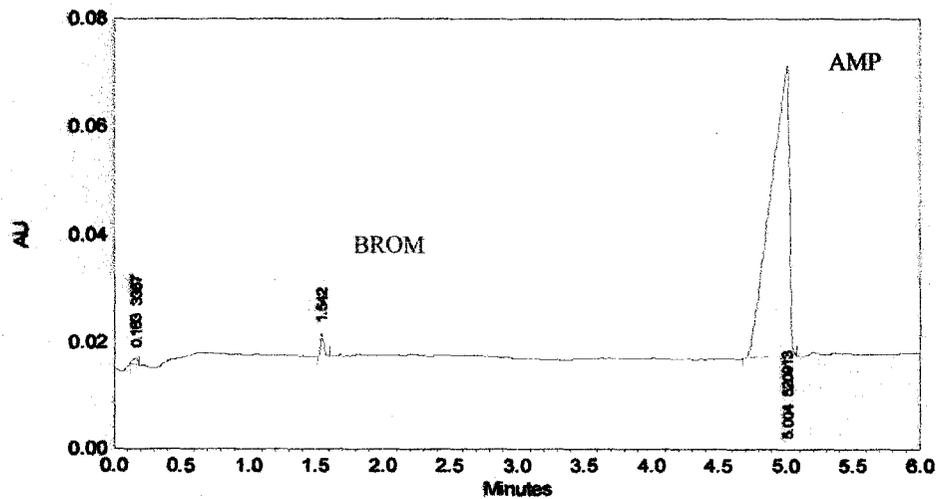


Figura 15. Electrofrograma de AMP 1000 μ m/ml BROM 16 μ m/ml en buffer citratos 50mM pH=3.0

5.2.1 Cambio del vial del buffer de corrida:

Al correr la muestra con el mismo buffer tres veces, disminuye el tiempo de migración en la segunda y tercera corrida con el mismo buffer como se observa en la tabla 6.

Tabla 6. Tiempos de migración de los analitos cambiando el buffer de corrida cada tres corridas

	Muestra	tm AMP	tm BROM
buffer 1	1	1,246	3,121
buffer 1	1	1,242	3,092
buffer 1	1	1,233	3,058
buffer 2	2	1,383	3,979
buffer 2	2	1,333	3,667
buffer 2	2	1,279	3,337
buffer 3	3	1,258	3,246
buffer 3	3	1,25	3,15
buffer 3	3	1,238	3,096
buffer 4	4	1,229	3,025
buffer 4	4	1,221	2,979
buffer 4	4	1,208	2,975
	media =	1,260	3,227
	Desvest =	0,050	0,304
	% CV =	3,99	9,43

Por lo que se decide cambiar buffer en cada corrida, obteniéndose los resultados de la tabla 7.

Tabla 7. Resultados comparativos de los tiempos de migración con cambio de buffer de corrida en tres o una corrida.

	Cambiando buffer cada 3 corridas		Cambiando buffer cada corrida	
	AMP	BROM	AMP	BROM
tm promedio	3,227	1,26	2,763	1,178
%CV	3,99	9,43	0,91	1,48

Como se observa en la tabla los C.V. calculados son menores del 2% cambiando buffer en cada corrida, entonces se decide seguir el análisis bajo estas condiciones.

5.2.2 Medio de dilución

La muestra inicialmente es aforada con agua desionizada. Es importante asegurar que la variación en los tiempos de migración de cada una de las lecturas sea siempre la menor, comúnmente cuando la capacidad amortiguadora es aumentada la variación en los tiempos de migración se ve disminuida.³⁵ En base a esto se decide aforar la muestra con buffer de citratos 50mM pH =3.

Tabla 8. Tiempos de migración promedio aforando la muestra con agua desionizada y con buffer citratos 50mM pH=3

	Muestra aforada con agua		Muestra aforada con buffer	
	AMP	BROM	AMP	BROM
tm promedio	2,71	1,09	2,26	1,04
%CV	8,21	5,15	5,86	3,46

En la tabla 7 se observa que se obtienen menores CV en los tm de los analitos, con la muestra aforada con buffer; esto debido a que al utilizar el buffer como medio de aforo se genera un mayor amortiguamiento del pH en la separación por que se aumenta la concentración del buffer en la muestra, lo cual no sucede al diluir con agua desionizada

De esta forma las condiciones de trabajo, son las siguientes:

Buffer de corrida: Buffer de citratos 50mM pH = 3

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

Cambio del vial del buffer de corrida: en cada corrida

Concentración de la muestra: mezcla AMP 1000µm/ml / BROM 16µm/ml

Tabla 9. Tiempos de migración promedio de la muestra a la concentración real corrida con buffer citratos 50mM pH =3

Día	tm promedio BROM	% CV	tm promedio AMP	% CV
1	1,241	0,9	2,643	1,83
2	1,229	0,66	2,627	1,53
3	1,316	1,19	3,108	2,22
4	1,346	4,37	3,338	9,48

Como se observa en la tabla 9 los tm así como los CV de los analitos van aumentando considerablemente de un día a otro, esto es el buffer no esta amortiguando. Por lo que se decide probar nuevamente con buffer fosfatos ya que se obtienen mejores picos, utilizando las modificaciones encontradas pero ahora acondicionando el capilar de diferente forma.

5.2.3 *Acondicionamiento del Capilar*

Se volvió a condicionar el capilar, pero ahora de la siguiente manera:

- ✓ Lavar 20min 20psi con agua desionizada a 35°C
- ✓ Lavar 10min 20psi con agua desionizada a 25°C
- ✓ Lavar 20min 20psi con HCl 0.1M a 25°C
- ✓ Lavar 10min 20psi con agua desionizada a 25°C
- ✓ Lavar 10min 20psi con buffer fosfatos 50mM pH=3 a 25°C

Cambiando las condiciones impuestas para el acondicionamiento del capilar al inicio de la jornada de trabajo:

- ❖ Lavar 5min 20psi con agua desionizada a 25°C
- ❖ Lavar 5min 20psi con buffer fosfatos 50mM pH=3 a 25°C

Esto se hizo con la finalidad de mantener el pH ácido en el capilar. Como se estaba trabajando a pH de 3 y se acondicionó con hidróxido de sodio 0.1M (pH = 11), el tiempo de acondicionamiento para volver a protonar todos los grupos silanol y tener realmente un pH de 3.0 dentro del capilar es excesivamente largo, entre 8-10 horas por lo que los tiempos de migración varían mientras el capilar no se acondiciona totalmente (Tabla 3 y 4).

Una vez cambiado el acondicionamiento del capilar, se volvió a realizar el análisis con buffer de fosfatos 50mM pH=3 (fig. 17) ya que se obtienen mejores picos en comparación con los obtenidos con citratos (fig. 16).

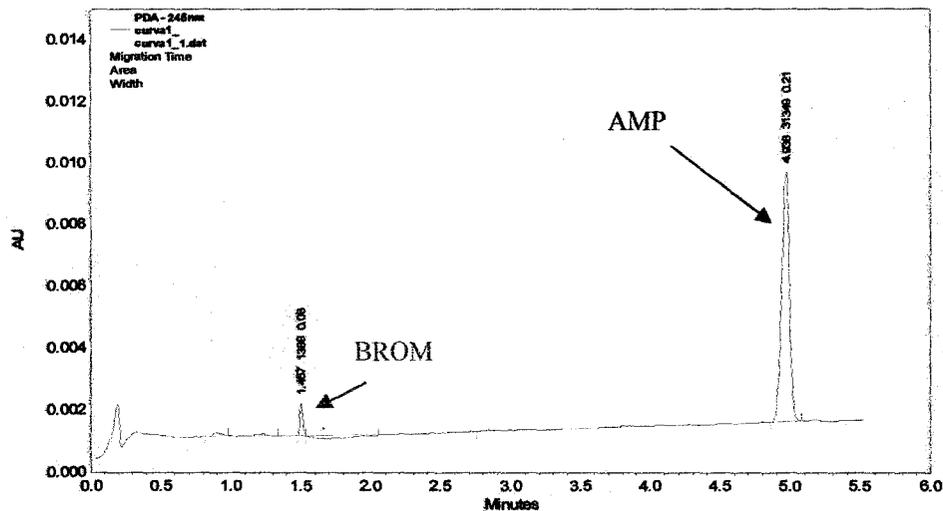


Figura 16. Electroferograma de AMP-BROM a concentración real, corrida con buffer fosfatos 50mM pH=3, 214nm

Como se observa en la Fig.16 los picos son más angostos y definidos empleando el buffer de fosfatos.

Se trabajo entonces con buffer de corrida con fosfatos 50mM pH=3 utilizando la muestra a la concentración real, así como todas las modificaciones encontradas con el buffer de citratos. Obteniendo los siguientes tiempos promedio de migración.

Tabla 10. Tiempos de migración obtenidos de ampicilina y bromhexina con el nuevo lavado de capilar

Día	tm promedio BROM	tm promedio AMP
1	1,504	5,758
2	1,488	4,721
3	1,467	4,938
4	1,475	5,313

Se observa en la tabla 10 que los tiempos de migración ya no varían significativamente de un día a otro por lo que se procedió a la determinación de la longitud de onda óptima para leer a la ampicilina realizando un barrido. Con el software Karat 32 del equipo se determinaron las diferentes longitudes de onda a las cuales absorbe menos la ampicilina.

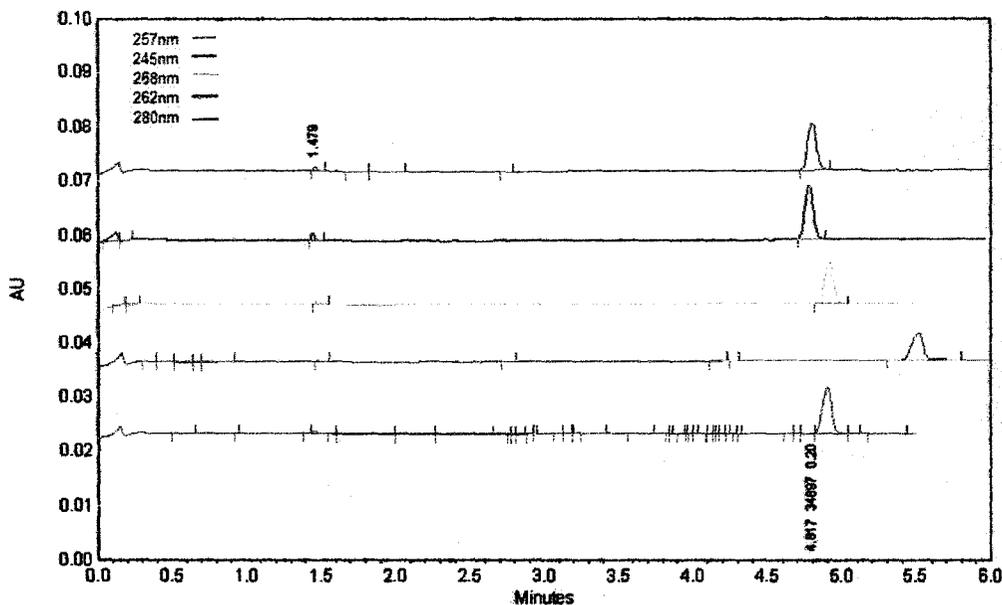


Figura 17. Electroferogramas a las diferentes longitudes de onda a las cuales absorbe menos la ampicilina, 245, 257, 268, 262 y 280nm

En la figura 17 se observa que a 245nm se obtiene un pico bien definido de forma gaussiana para la ampicilina. Para la bromhexina también se realizaron 2 comparaciones de la longitud de onda a 210 y a 214.

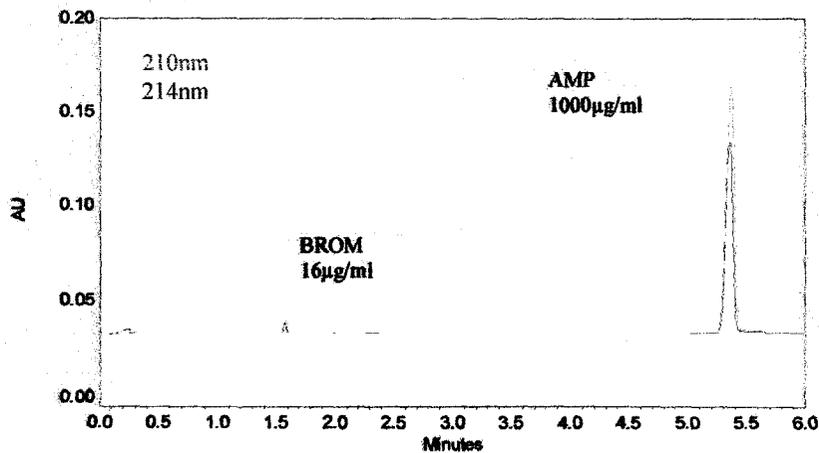


Figura 18. Electroferograma de AMP -BROM a la concentración real corrida con buffer fosfatos 50mM pH=3 a 214 y 210nm

Al realizar la comparación de los electroferogramas en ambas longitudes de onda (figura 18), se determinó que a 210nm se tiene una mayor sensibilidad, lo cual es favorable, ya que al obtener áreas del pico mayores, se tendrá una menor dispersión de los datos. Por lo tanto la mejor longitud de onda donde es mejor medir es a 210nm.

Entonces se procedió a leer a 2 longitudes de onda; a 210nm para ampicilina y 245 para bromhexina.

Tabla 11. Tiempos promedio de migración de ampicilina y bromhexina (concentración 1000 μ m/ml-16 μ m/ml respectivamente) con buffer fosfatos 50mM pH=3

Día	tm promedio BROM	tm promedio AMP
1	1,521	5,554
2	1,363	3,900
3	1,567	5,896

Los tiempos de migración varían de un día a otro y tardan en estabilizarse, atribuyendo este comportamiento a cambios en el pH del interior del capilar, por lo que se procedió a cambiar el almacenamiento del capilar.

5.2.4 Almacenamiento del capilar

Normalmente, el capilar se lava con agua y se deja con esta dentro del mismo. Sin embargo, dado que el pH del agua es cercano a 6.0, se decidió ahora dejarlo remojando en buffer de fosfatos pH 3.0 para que siempre se encuentre en pH ácido.

El lavado inicial del día se planteó solamente con buffer de fosfatos 50mM pH 3.0, la tabla 11 muestra los resultados obtenidos para reproducibilidad de los tiempos de migración.

Tabla 12. Tiempos de migración promedio con capilar remojado en buffer

Día	tm promedio BROM	tm promedio AMP
1	1,454	6,633
2	1,587	6,979
3	1,571	7,042
4	1,533	6,667
5	1,540	6,936
media =	1,537	6,851
Desvest =	0,051	0,188
% CV =	3,34	2,74

Como se observa en la tabla 12, los tiempos de migración ya presentan una variación mucho menor de un día a otro.

5.2.5 Concentración de la muestra

Se decide ahora hacer una comparación, el día 5, de concentraciones: muestra diluida (80µg/ml Bromhexina-250µg Ampicilina) y muestra a la concentración real (16µg/ml Bromhexina-1000µg Ampicilina).

Tabla 13. Tiempos de migración para diferentes concentraciones de analito.

	Muestra concentración real		Muestra diluida	
	AMP	BROM	AMP	BROM
tm promedio	6,9359	1,5397	6,7879	1,5534
%CV	3,5	0,59	1,09	0,25

Como se observa en la tabla 13 con la muestra diluida se obtienen menores coeficientes de variación de los tiempos de migración, esto se debe a que para la muestra diluida la forma del pico también mejora, sobre todo para la ampicilina.

A pesar de encontrar que con la muestra diluida se obtienen mejores tiempos de migración, se decide seguir probando con la muestra a la concentración real, ya que con esta última el tiempo de análisis de la muestra es menor y los CV no están muy alejados del 2%. Entonces se prepararon muestras con los analitos a la concentración de 16µm/ml para la bromhexina y 1000µm/ml para ampicilina (relación 1:62.5 respectivamente), aforando con buffer de fosfatos 50mM pH=3, utilizando las modificaciones mencionadas anteriormente.

Tabla 14. Tiempos de migración promedio de los analitos corridos 2 veces por día

Día	tm promedio BROM	tm promedio AMP
1	1,529	6,033
2	1,446	5,625
3	1,413	5,46
4	1,417	5,142
media =	1,451	5,565
Desvest =	0,054	0,370
% CV =	3,71	6,66

En el día 2 se tapa el capilar y se rompe, atribuyendo este efecto a que como se dejó remojando en buffer varios días, las sales del buffer al evaporarse algo de líquido se pueden precipitar, tapando el capilar, entonces, se decide dejar remojando el capilar con buffer pH=3 diluido en agua desionizada (5:20 respectivamente) después de cada jornada de trabajo.

En la tabla 15, se muestran los tiempos de migración, en los días posteriores, (5 al 8), aquí los tiempos ya son parecidos y los coeficientes de variación están muy cerca del 2%, sin embargo, aumentan ligeramente día con día así como el coeficiente de variación. En el día 8 se muestra el tiempo de migración promedio de las primeras corridas, ya que las últimas muestras corridas dan tiempos de migración para la ampicilina de 3.896 la última registrada por que después de esa ya no salió.

Tabla 15. Tiempos de migración (BROM 16µm/ml y AMP 1000µm/ml), aforando con buffer de fosfatos 50mM pH=3

Día	tm promedio BROM	tm promedio AMP
1	1,454	6,633
2	1,587	6,979
3	1,571	7,042
4	1,533	6,667
5	1,540	6,936
media =	1,537	6,851
Desvest =	0,051	0,188
% CV =	3,34	2,74

En el día 9 la bromhexina sale a los 3.95min y la ampicilina ya no salió. Por lo que se lavo el capilar utilizando agua pH=3 y buffer, pensando que se había quedado pegado algo en el capilar y efectivamente, al seguir leyendo dieron los siguientes tiempos de migración para la ampicilina (se reportan los de la ampicilina ya que esta delimita el tiempo de corrida)

- Día 1 comenzó con tiempos de migración de 5.292, terminado con 3.925
- Día 2 comenzó con tiempos de migración de 3.533, terminando con 3.171
- Día 3 y 4 ya no salió la ampicilina
- Día 5 se lavo nuevamente el capilar con solo buffer, saliendo al comienzo tm de 3.487, terminando con 4.596.

Al analizar los resultados se concluyo que la cantidad de ampicilina es muy grande en comparación con la bromhexina ya que esta 62.5 veces más concentrada, lo que hace que se tape el capilar constantemente y debido a que se va a acumulando en el capilar, va modificando los tiempos de migración considerablemente. Por lo que se decide trabajar con la muestra diluida con buffer fosfatos 50mM pH =3.

Como se observa en la tabla 17 los tiempos de migración para ampicilina están alrededor de 5min, esto aumenta el tiempo de análisis para cada muestra ya que con la dilución se tiene que leer primero a la bromhexina y posteriormente la ampicilina diluida.

Tabla 16. Tiempos de migración con la muestra diluida, aforando con buffer de fosfatos 50mM pH=3

	AMP	BROM
Muestra	tm	tm
1	5,146	1,504
2	5,133	1,496
3	5,162	1,500
4	5,108	1,500
5	5,229	1,504
6	5,854	1,55
7	5,583	1,529
8	5,438	1,508
9	5,500	1,513
10	5,292	1,492
11	5,150	1,483
12	4,971	1,471
13	4,954	1,467
14	5,125	1,479
15	5,379	1,492
media =	5,268	1,499
Desvest =	0,0228	0,0214
% CV =	0,43	1,42

Serán entonces:

Para la ampicilina: 3 min de lavado, 6 min de corrida = 9 min de corrida

Para la bromhexina: 3 min de lavado y 2 min de corrida = 5 min de corrida

Dando un total de 14 min de tiempo de análisis por muestra

Con buffer de citratos en las pruebas realizadas se presentaban tiempos de migración más cortos con picos coleados pero que si permiten cuantificar a los analitos, se intento con el buffer de citratos 50mM pH =3 pero ahora con la muestra diluida.

En la tabla 17 se observa que los tiempos de migración no se estabilizan sobretodo después de tres días.

Tabla 17. Tiempos de migración con la muestra diluida (Ampicilina 250µg/ml – Bromhexina 80µg/ml), aforando con buffer de citratos 50mM pH=3

Día	tm promedio BROM	% CV	tm promedio AMP	% CV
1	1,241	0,9	2,643	1,83
2	1,229	0,66	2,627	1,53
3	1,316	1,19	3,108	2,22
4	1,346	4,37	3,338	9,48

Se decide emplear una mezcla fosfatos 50mM pH=3- citratos 50mM pH = 3 (relación 40:60 respectivamente). Los picos tienen mejor forma y el tiempo de migración es menor.

Tabla 18. Tiempos de migración con la muestra diluida (Ampicilina 250µg/ml – Bromhexina 80µg/ml), aforando con buffer de fosfatos 50mM pH=3 -citratos 50mM pH=3 (relación 40:60 respectivamente)

	AMP	BROM
	tm	Tm
	2,829	1,288
	2,875	1,292
	2,658	1,246
	2,625	1,238
	2,629	1,238
media =	2,723	1,260
Desvest =	0,119	0,027
% CV =	4,38	2,16

En la tabla anterior se observa que los % CV bajaron considerablemente, por lo que se decide trabajar con buffer fosfatos- citratos por varios días y ver su comportamiento (Tabla 18).

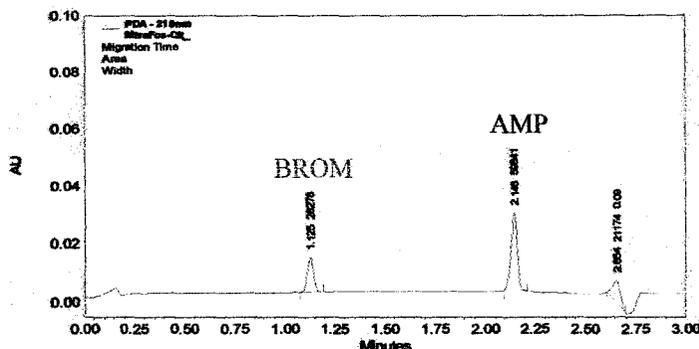


Figura 19. Electroferograma de AMP 250µg/ml – BROM 80µg/ml, en buffer de fosfatos 50mM pH=3 -citratos 50mM pH=3(relación 40:60 respectivamente)

Como se observa en la tabla 19 se siguen moviendo los tiempos de migración después de varios días de trabajo. A fin de solucionar esta falta de reproducibilidad, se retoman las propiedades de los analitos y se estudia a fondo para ver a que se puede deber esto.

Tabla 19. Tiempos de migración promedio de varios días, con la muestra diluida (Ampicilina 250µg/ml – Bromhexina 80µg/ml), aforando con buffer de fosfatos 50mM pH=3 -citratos 50mM pH=3(relación 40:60 respectivamente)

Día	tm promedio BROM	% CV	tm promedio AMP	% CV
1	1,26	2,16	2,72	4,38
2	1,197	1,59	2,431	3,09
3	1,081	0,23	2,052	0,59
4	1,122	0,4	2,132	0,76
5	1,181	0,65	2,39	0,65
6	1,207	0,47	2,55	0,94
7	1,259	0,79	2,72	1,37
7	1,275	0,88	2,827	2,29
7	1,312	1,82	3,03	3,95
8	1,486	0,59	no salió	

5.2.6 Selección del buffer y pH

En el estudio anterior mencionado en los antecedentes, se estudiaron 2 sistemas amortiguadores (buffer) que amortiguan a pH =3 en un rango de 2 unidades de pH aproximadamente centradas alrededor del pKa, para tener a nuestros analitos de interés con carga positiva.

En la figura 20 se puede observar que ambos analitos a valores de pH de 2.5 y por debajo, se encuentran en su forma ionizada.

Se observa que a pH de 3.0 la ampicilina no se encuentra al 100% como la especie catiónica, la mayor parte de ella se encuentra en su forma neutra. Aunado a este hecho, hay que mencionar que a este valor de pH el flujo electroosmótico es mínimo, por lo que la ampicilina neutra no presenta migración, por lo que solo la proporción catiónica de la ampicilina es la que presenta migración. Por lo anterior, es que se observa una falta de reproducibilidad en el tiempo de migración, sobre todo en la ampicilina, ya que la especie cargada debe de arrastrar con ella a la gran proporción de especie neutra.

A fin de evitar que predomine la especie neutra, se hace el estudio bajando el pH a 2.5 para que la mayor proporción de la muestra este cargada positivamente y migre hacia el cátodo libremente. En base a esto se decide probar con buffer fosfatos 50mM pH = 2.5, (Tabla 20)

Tabla 20. Tiempos de migración promedio de varios días, con la muestra diluida (Ampicilina 250µg/ml – Bromhexina 80µg/ml), aforando con buffer de fosfatos 50mM pH=2.5

Día	tm promedio BROM	% CV	tm promedio AMP	% CV
1	1,26	2,16	2,72	4,38
2	1,197	1,59	2,431	3,09
3	1,081	0,23	2,052	0,59
4	1,122	0,4	2,132	0,76
5	1,181	0,65	2,39	0,65
6	1,207	0,47	2,55	0,94
7	1,259	0,79	2,72	1,37
7	1,275	0,88	2,827	2,29
7	1,312	1,82	3,03	3,95
8	1,486	0,59	no salió	

Como se observa en la Tabla 20, los coeficientes de variación son muy cercanos al 2% y no hay una tendencia de los tiempos de migración, por lo que se comienzan los estudios de tratamiento de la muestra para ver si hay algún efecto de matriz que pudiera afectar en el análisis.

5.2.7 Preparación de la muestra. Tiempo de agitación

Se comenzó a trabajar con placebos cargados y comprobar las condiciones establecidas de agitación del método inicial (5min, agitación mecánica), obteniendo porcentajes de recuperación de ampicilina y de bromhexina menores a lo establecido por la farmacopea, la cual establece que el rango de aceptación para cápsulas de ampicilina sola es de 90 a 120% (para la bromhexina no se encuentra reportado). Por lo que se probó aumentar el tiempo de agitación a 15min., y ver si la recuperación era mejor. (Tabla 21).

Tabla 21. Porcentajes de recobro de los dos analitos empleando diferente tiempo de agitación de la muestra

	Agitación 5min		Agitación 15min	
	AMP	BROM	AMP	BROM
% recobro	80,97	82,69	96,78	100,38
%CV	3,21	3,46	1,27	0,54

Como se observa en la tabla 21 los porcentajes de recobro para ampicilina y bromhexina con agitación de 15min son aceptables, por lo que se empleará un tiempo de agitación de 15 minutos.

4.2.8 Condiciones Óptimas del método

- ✓ *Buffer de Fosfatos 50mM pH =2.5*
- ✓ *Muestra diluida:* se lee primero a la bromhexina a la concentración que representa la muestra al 100% (80µg/ml) cortando al tiempo de corrida a 1.5min. Posteriormente se hace una dilución para leer a la ampicilina (250µg/ml).
- ✓ *Tiempo de análisis de la muestra:* Los datos reportados en el método dicen que a 1.4 min sale la bromhexina y que a 2.6 min sale la ampicilina. Serían entonces:
Para la bromhexina; 3min de lavado y 1.5 min de corrida = 4.5 min
Para la ampicilina; 3min de lavado y 3min de corrida = 6 min
Dando un total de 10.5 min de tiempo de análisis por muestra
- ✓ *Cambio de buffer cada corrida*
- ✓ *Agitación de la muestra:* 15min agitación mecánica
- ✓ *Aforo de la muestra:* La muestra se afora con buffer fosfatos pH= 2.5, mejorando la amortiguación del pH.
- ✓ *Acondicionamiento del capilar:*
20min con buffer fosfatos 50mM pH2.5, 20psi, 25°C.
Y antes de cada jornada de trabajo lavar 5min con buffer fosfatos 50mM pH2.5 a 20psi, 25°C
- ✓ *Almacenamiento del capilar:* El capilar se deja remojado en buffer diluido (volumen 5:20) a pH 2.

Las condiciones electroforéticas establecidas y bajo las cuales se trabajo durante toda la validación del método, se encuentran reportadas a continuación en la tabla 22.

Tabla 22. Condiciones electroforéticas empleadas durante la validación

PARAMETROS	CONDICIONES
Longitud de onda	210nm
Electrolito soporte	Buffer de fosfatos 50mM, pH=2.5
Capilar	Sílice fundida de 52µm de diámetro interno y 31cm de largo
Detector	Arreglo de diodos
Tiempo de lavado entre corridas	3min con buffer
Cambio de buffer de corrida	Cada corrida
Voltaje de separación	30kv, 3min
Inyección de la muestra	0.5psi, 5seg (Hidrodinámico)
Presión de lavado	30psi
Corrientes dadas c/muestra	140µA

6.- VALIDACION

Hay ciertos cuidados que deben de tenerse al realizar la validación:

- ☞ Los buffer de separación se deben de reemplazar cada corrida, para evitar el cambio de pH en los mismos y para obtener tiempos de migración reproducibles.
- ☞ El nivel del buffer de separación en los viales, deben ser los mismos (se recomienda 1ml), para evitar diferencias de presión.
- ☞ Eliminar de 1 a 2 milímetros de recubierta de poliamida del capilar, para evitar que se adhiera la solución en la entrada del capilar, que afecte el resultado.
- ☞ Limpiar con un papel kleenex la boquilla del vial, para asegurar que no estén mojados y no sea causa de la caída de corriente.
- ☞ Las primeras cinco lecturas pueden presentar variación mientras el sistema se acondiciona, evaluar los CV y establecer si cumplen con lo requerido.

6.1 Adecuabilidad del sistema

Tabla 23. Datos para evaluar Adecuabilidad del sistema para Ampicilina y Bromhexina

Sistema	Bromhexina		Ampicilina	
	Tm (min.)	Área	Tm (min.)	Área
1	1,421	30883	2,563	68395
2	1,442	31469	2,596	70822
3	1,429	30457	2,567	68679
4	1,425	30887	2,563	68896
5	1,413	31047	2,554	67097
6	1,421	30390	2,563	68121
Promedio	1,425	30855,500	2,568	68668,333
Desv.est.	0,01	397,57	0,01	1227,49
CV (%)	0,69	1,29	0,57	1,79

Como se observa en la tabla 23 los coeficientes de variación de tiempos de migración así como de las áreas son menores del 2%. Los dos compuestos cumplen con los criterios de aceptación para adecuabilidad del sistema.

6.2 Especificidad

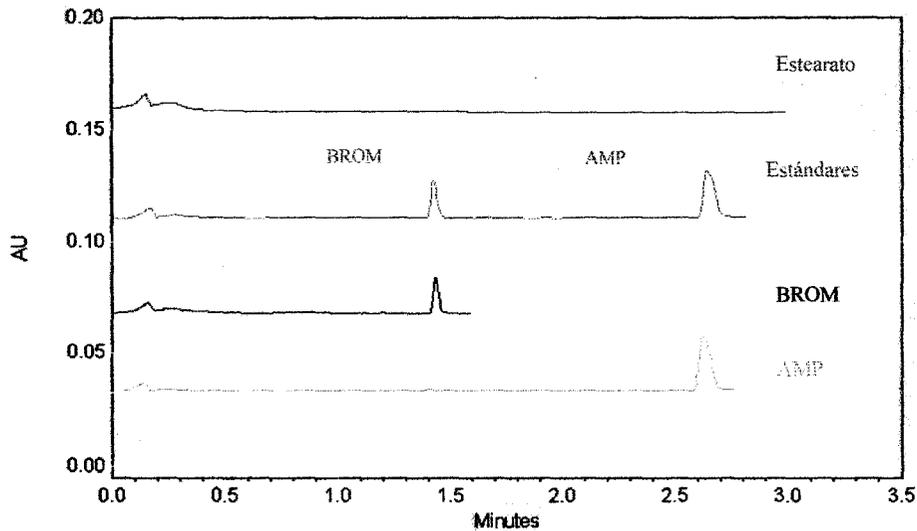


Figura 21. Electroferograma de la muestra analítica, estándares y placebo

No se observa respuesta analítica por parte del estearato de magnesio al tiempo de migración de los analitos por lo tanto el excipiente de la formulación no interfiere en el análisis y el método es específico para Ampicilina y bromhexina.

6.3 Precisión del sistema

Los datos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 24. Áreas para evaluar la precisión del sistema de Ampicilina y Bromhexina

Sistema	Bromhexina		Ampicilina	
	Tm (min.)	Area	Tm (min.)	Area
1	1,421	30883	2,563	68395
2	1,442	31469	2,596	70822
3	1,429	30457	2,567	68679
4	1,425	30887	2,563	68896
5	1,413	31047	2,554	67097
6	1,421	30390	2,563	68121
Promedio	1,425	30855,500	2,568	68668,333
Desv.est.	0,01	397,57	0,01	1227,49
CV (%)	0,69	1,29	0,57	1,79

Ya que la precisión del sistema indica el grado de dispersión entre una serie de mediciones bajo condiciones establecidas, y de acuerdo con los criterios de aceptación, en la tabla 2 se observa que el coeficiente de variación de las áreas se encuentra dentro de lo establecido, por lo que se considera que el método es preciso.

6.4 Linealidad del sistema

Tabla 25. Área en función de la concentración de Bromhexina

Nombre	T _m (min.)	Área	Concentración (µg/ml)
Sistem_1	1,433	18826	48
Sistem_1.2	1,425	19043	48
Sistem_1.4	1,417	18832	48
Sistem_2	1,425	25660	64
Sistem_2.1	1,421	25058	64
Sistem_2.2	1,421	25196	64
Sistem_3.1	1,417	28497	72
Sistem_3.2	1,413	28545	72
Sistem_3.4	1,413	28383	72
Sistem_4	1,421	30390	80
Sistem_4.1	1,421	30883	80
Sistem_4.2	1,413	31047	80
Sistem_5.5	1,417	34655	88
Sistem_5.2	1,404	35023	88
Sistem_5.3	1,429	34839	88
Sistem_6	1,413	35669	96
Sistem_6.1	1,413	35917	96
Sistem_6.2	1,404	36879	96
Sistem_7	1,417	42494	112
Sistem_7.3	1,413	43213	112
Sistem_7.5	1,413	42830	112
Promedio	1,42		
Desv.est.	0,01		
CV (%)	0,51		

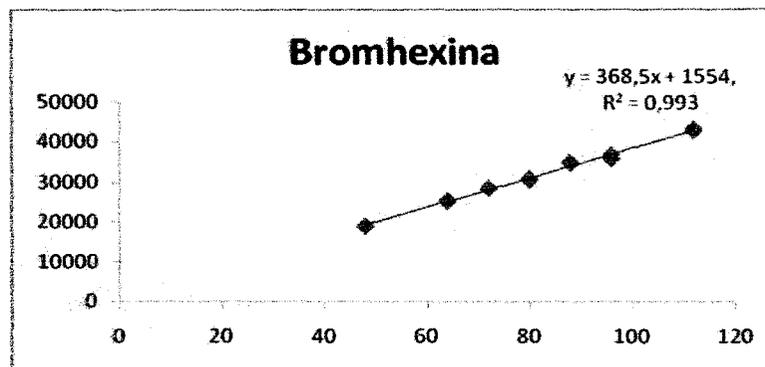


Gráfico 1. Linealidad del sistema para Bromhexina
Relación del área en función de la concentración, en un intervalo de 60-140%

Tabla 26. Resultados de regresión para linealidad del sistema de Bromhexina

Ordenada al origen (b)	1554
Pendiente (m)	368.5
Coefficiente de determinación (r^2)	0,993
Intervalo de confianza para la pendiente $\alpha = 0.05$	Límite superior: 382.44
	Límite inferior: 354.70

El intervalo de confianza para la pendiente no incluye el 0, además el coeficiente de determinación es de 0.993, por lo tanto la Bromhexina cumple con los criterios de aceptación de linealidad del sistema.

Para conocer si la relación concentración-respuesta analítica es lineal se realizó un análisis de varianza con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ junto con las siguientes hipótesis:

H_0 : No existe una relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica

H_a : Existe una relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica

Criterio de aceptación: Se rechaza H_0 si F calculada $>$ F tablas o valor crítico de F

Tabla 27. ANADEVa para Bromhexina

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	Valor crítico de F
Regresión	1	1095559408	1095559408	3098,89	1,64E-22
Residuos	19	6717120,29	353532,5		
Total	20	1102276529			

En la tabla de ANADEVa se obtiene un valor de "F" mayor al valor crítico de F por lo que se rechaza la hipótesis nula, lo que significa que estadísticamente existe una relación lineal entre la concentración y el área de Bromhexina con un nivel de confianza del 95%, además el coeficiente de determinación obtenido en la gráfica 2 nos indica que la regresión lineal explica en un 99.3% la variación de la respuesta analítica en función de la concentración de Bromhexina.

Tabla 28. Área en función de la concentración de Ampicilina

Nombre	T _m (min.)	Área (AU)	Conc. (mcg/ml)
Sistem_1	2,567	42536	150
Sistem_1.2	2,554	42039	150
Sistem_1.4	2,567	42042	150
Sistem_2	2,563	57316	200
Sistem_2.1	2,563	55901	200
Sistem_2.2	2,558	55177	200
Sistem_3.1	2,55	62699	225
Sistem_3.2	2,55	62128	225
Sistem_3.4	2,563	62878	225
Sistem_4	2,563	68121	250
Sistem_4.1	2,563	68395	250
Sistem_4.2	2,554	67097	250
Sistem_5.5	2,575	75449	275
Sistem_5.2	2,546	75492	275
Sistem_5.3	2,596	72480	275
Sistem_6	2,554	79141	300
Sistem_6.1	2,554	79678	300
Sistem_6.2	2,546	80916	300
Sistem_7	2,55	92329	350
Sistem_7.3	2,55	93245	350
Sistem_7.5	2,579	91887	350
Promedio	2,56		
Desv.est.	0,01		
CV (%)	0,48		

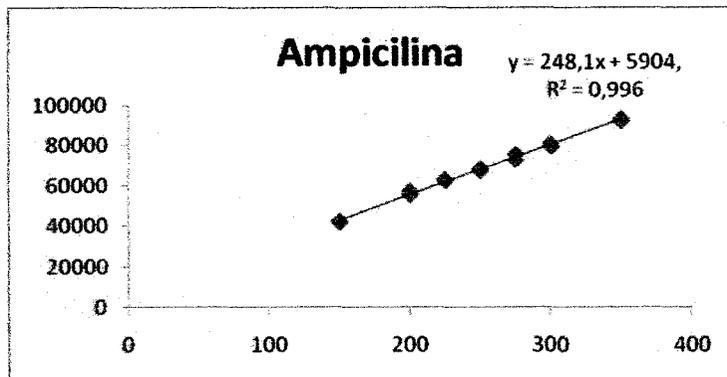


Gráfico 2. Linealidad del sistema para Ampicilina
Relación del área en función de la concentración, en un intervalo de 60-140%

Tabla 29. Resultados de regresión para linealidad del sistema de la Ampicilina

Ordenada al origen (b)	5904
Pendiente (m)	248.1
Coefficiente de determinación (r^2)	0.996
Intervalo de confianza para la pendiente	Limite superior: 255.67
$\alpha = 0.05$	Limite inferior: 240.69

El intervalo de confianza para la pendiente no incluye el 0 y el coeficiente de determinación es mayor a 0.98, por lo tanto, la linealidad del sistema para la Ampicilina cumple con los criterios de aceptación.

Para determinar la linealidad entre estas 2 variables se realizaron las siguientes hipótesis:

H_0 : No existe una relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica

H_a : Existe una relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica

Criterio de aceptación: Se rechaza H_0 si F calculada $>$ F tablas o valor crítico de F

Tabla 30. ANADEVa para Ampicilina

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	4850560215	4850560215	4808,52	2,57E-24
Residuos	19	19166116,3	1008742,97		
Total	20	4869726331			

Con este resultado se rechaza H_0 . El análisis de varianza para Ampicilina muestra estadísticamente la relación lineal entre la concentración y el área con un nivel de confianza del 95 % y de acuerdo al coeficiente de determinación obtenido en la regresión lineal el 99.6 % de la variación de la respuesta analítica se explica en función de la concentración de Ampicilina.

6.5 Exactitud y Repetibilidad del método

Tabla 31. Resultados del porcentaje de recobro de Bromhexina

Nivel (%)	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	Porcentaje (%) de recobro
90	7,2	7,18	99,75
	7,2	7,15	99,37
	7,2	7,23	100,42
	7,2	7,31	101,57
	7,2	7,21	100,19
	7,2	7,10	98,55
100	8	8,11	101,34
	8	7,96	99,46
	8	8,26	103,26
	8	8,19	102,31
	8	8,30	103,78
	8	8,24	102,97
110	8,8	8,91	101,24
	8,8	8,77	99,67
	8,8	8,83	100,39
	8,8	9,10	103,45
	8,8	8,80	100,00
	8,8	8,67	98,51
Promedio			100,901
Desv.est.			1,675
CV (%)			1,660
IC(μ)			99,6-102,6

El intervalo incluye el 100 % de recobro y con respecto a la cantidad recuperada y el coeficiente de variación es menor al 2 % por lo tanto el método es exacto y repetible para bromhexina.

Tabla 32. Resultados del porcentaje de recobro de Ampicilina

Nivel (%)	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	Porcentaje (%) de recobro
	450	448,93	99,76
	450	453,71	100,82
90	450	449,55	99,90
	450	459,82	102,18
	450	448,19	99,60
	450	444,58	98,80
	500	510,18	102,04
	500	508,83	101,77
100	500	508,48	101,70
	500	512,96	102,59
	500	516,43	103,29
	500	510,03	102,01
	550	565,92	102,89
	550	538,63	97,93
110	550	562,58	102,29
	550	575,19	104,58
	550	558,02	101,46
	550	551,44	100,26
	Promedio		101,325
	Desv.est.		1,684
	CV (%)		1,662
	IC(μ)		99,6-103

En la tabla 34 se observa que el intervalo de confianza para la media poblacional incluye el 100 % y el coeficiente de variación es menor a 2 %.

Con los resultados obtenidos, se determinó que el método cumple con los criterios establecidos en la guía de validación por lo que es exacto y repetible para ampicilina.

6.6 Linealidad del método

Tabla 33. Resultados de la cantidad adicionada contra cantidad recuperada de Bromhexina

Nivel (%)	tm (min)	Área	Conc. (µg/ml)	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	% recobro
60	1,429	18345	48	4,8	4,80	99,92
60	1,425	18243	48	4,8	4,77	99,36
60	1,438	18430	48	4,8	4,82	100,49
80	1,421	26399	64	6,4	6,36	99,35
80	1,417	27062	64	6,4	6,52	101,85
80	1,425	26253	64	6,4	6,32	98,80
90	1,417	30178	72	7,2	7,14	99,15
90	1,417	30407	72	7,2	7,19	99,90
90	1,421	30728	72	7,2	7,27	100,95
100	1,413	33205	80	8	7,92	98,99
100	1,417	33591	80	8	8,01	100,14
100	1,417	33835	80	8	8,07	100,87
110	1,429	36489	88	8,8	8,81	100,10
110	1,425	36232	88	8,8	8,75	99,40
110	1,429	36633	88	8,8	8,84	100,50
120	1,429	39862	96	9,6	9,50	99,00
120	1,425	40370	96	9,6	9,62	100,26
120	1,429	40565	96	9,6	9,67	100,74
140	1,421	49060	112	11,2	11,30	100,90
140	1,421	48706	112	11,2	11,22	100,17
140	1,425	48099	112	11,2	11,08	98,93
Promedio	1,423					99,989
Desvestid	0,006					0,825
CV (%)	0,421					0,825

Intervalo de confianza para la media poblacional	Limite superior	100.81
	Limite inferior	99.16

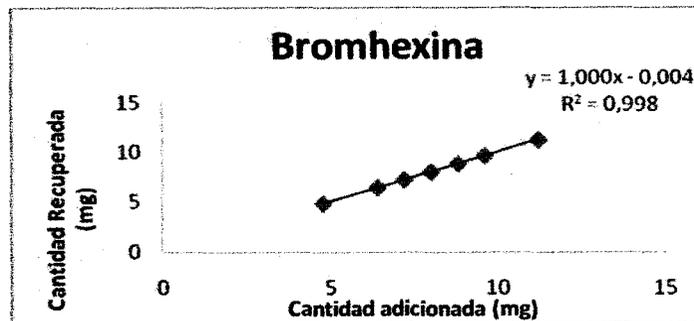


Gráfico 3. Linealidad del método para Bromhexina.

Gráfica de la cantidad adicionada vs la cantidad recuperada de bromhexina a partir de la preparación de placebos cargados, en un rango de 60 - 140 %

Tabla 34. Análisis de la regresión lineal para linealidad del método Bromhexina

Ordenada al origen (b)	0.004
Pendiente (m)	1.000
Coefficiente de determinación (r^2)	0.998
Coefficiente de variación de regresión	0.825%
Intervalo de confianza para la pendiente	Limite superior = 1.0162 Limite inferior = 0.9845
Intervalo de confianza ordenada al origen	Limite superior = 0.1265 Limite inferior = -0.1346

El coeficiente de variación de regresión, al ser menor del 2 %, indica que la precisión del método es buena para cuantificar bromhexina y como los intervalos para la pendiente y la ordenada al origen incluyen el 1 y 0 respectivamente, se puede recuperar el 100 % de la cantidad adicionada.

Para determinar si existe una relación entre la cantidad adicionada de bromhexina con la cantidad recuperada se formularon las siguientes hipótesis:

H_0 : La relación entre cantidad adicionada y cantidad recuperada no es lineal.

H_1 : La relación entre cantidad adicionada y cantidad recuperada es lineal.

Criterios de aceptación: Se rechaza H_0 si F calculada > F tablas o valor crítico de F

Tabla 35. ANADEVa para la c cantidad recuperada de bromhexina

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	80,711	80,711	17437,07	1,28E-29
Residuos	19	0,088	0,0046		
Total	20	80,799			

De acuerdo con los resultados de las tablas de ANADEVa se rechaza H_0 , por lo tanto la relación entre estas dos variables es lineal con un nivel de confianza del 95% y el coeficiente de determinación indica que el 99.88 % de la variabilidad de la concentración recuperada esta en función de la cantidad adicionada.

Tabla 36. Resultados de la cantidad adicionada contra cantidad recuperada de Ampicilina

Nivel (%)	tm (min)	Área	Conc. (µg/ml)	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	%recobro
60	2,663	39599	150	300	300,03	100,01
60	2,692	39261	150	300	299,23	99,74
60	2,717	39925	150	300	302,50	100,83
80	2,642	58072	200	400	398,93	99,73
80	2,679	59372	200	400	407,86	101,97
80	2,692	57239	200	400	393,21	98,30
90	2,642	66514	225	450	448,21	99,60
90	2,688	67221	225	450	452,97	100,66
90	2,704	66606	225	450	448,83	99,74
100	2,638	72586	250	500	501,00	100,20
100	2,679	72395	250	500	499,68	99,94
100	2,692	72344	250	500	499,33	99,87
110	2,704	80517	275	550	550,05	100,01
110	2,729	80571	275	550	550,42	100,08
110	2,737	80441	275	550	549,53	99,91
120	2,704	91275	300	600	610,99	101,83
120	2,696	87728	300	600	587,25	97,87
120	2,708	89896	300	600	601,76	100,29
140	2,683	109019	350	700	703,06	100,44
140	2,696	108771	350	700	701,46	100,21
140	2,717	107844	350	700	695,48	99,35
Promedio	2,691					100,028
Desvest	0,027					0,919
CV (%)	1,001					0,919

Intervalo de confianza para la media poblacional	Limite superior	100,95
	Limite inferior	99,11

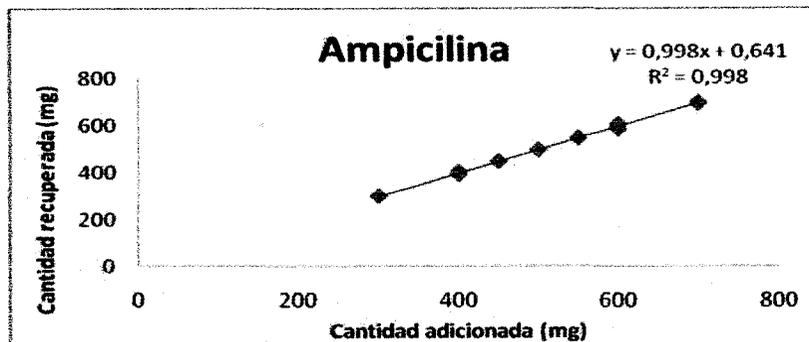


Gráfico 4. Linealidad del método para Ampicilina.

Gráfica de la cantidad adicionada vs la cantidad recuperada de ampicilina
A partir de la preparación de placebos cargados, en un rango de 60 – 140 %

Tabla 37. Análisis de la regresión lineal para linealidad del método de Ampicilina

Ordenada al origen (b)	0.641
Pendiente (m)	0.998
Coefficiente de determinación (r^2)	0.998
Coefficiente de variación de regresión	0.92 %
Intervalo de confianza para la pendiente $\alpha = 0.025$	Limite superior = 1.0170
	Limite inferior = 0.9807
Intervalo de confianza ordenada al origen $\alpha = 0.025$	Limite superior = 9.9758
	Limite inferior = -8.6923

El método es preciso para cuantificar Ampicilina porque el coeficiente de variación de regresión es menor al 2 % y se puede recuperar el 100 % de la cantidad adicionada porque el intervalo de confianza para la ordenada al origen es 0 y para la pendiente es 1 (Ver tabla 37). Este modelo también nos indica que el 99.84 % de la variación en la cantidad recuperada de ampicilina se explica con la cantidad adicionada.

Para determinar si existe una relación entre la cantidad adicionada de bromhexina con la cantidad recuperada se formularon las siguientes hipótesis:

H_0 : La relación entre cantidad adicionada y cantidad recuperada no es lineal.

H_1 : La relación entre cantidad adicionada y cantidad recuperada es lineal.

Criterios de aceptación: Se rechaza H_0 si F calculada > F tablas o valor crítico de F

Tabla 38. ANADEVa para la cantidad recuperada de ampicilina

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	314297,271	314297,271	13294,664	1,67673E-28
Residuos	19	449,176311	23,6408585		
Total	20	314746,447			

Como el valor obtenido de F es menor al de tablas se rechaza H_0 por lo que la relación entre la cantidad adicionada y recuperada es lineal.

6.7 Reproducibilidad del método

Tabla 39. Porcentaje de recobro de Bromhexina por 2 analistas en dos días diferentes

Día	% recuperado Analista 1	% recuperado Analista 2	Promedio y CV
1	100,36	100,77	Promedio = 100,17
	99,83	99,03	CV = 0,44%
	100,72	100,32	
2	100,01	99,58	Promedio = 100,01
	99,64	100,37	CV = 0,72%
	99,59	100,9	
Promedio y CV	Promedio = 100,02	Promedio = 100,16	Promedio _{global} = 100,09
	CV = 0,44 %	CV = 0,72 %	CV _{global} = 0,57 %

Para poder determinar si el día y el analista puede influir en el porcentaje recuperado de Bromhexina se llevó a cabo un análisis de varianza anidado con un nivel de significancia de $\alpha = 0.1$ y para ello se formularon las siguientes hipótesis:

H_0 : El día y el analista no tienen efecto sobre el porcentaje recuperado de Bromhexina

H_1 : El día y/o el analista sí afectan el porcentaje de recobro de Bromhexina

Criterios de aceptación: Si $p\text{-value} > 0.1$ se acepta H_0 , de lo contrario se rechaza H_0

Tabla 40. ANADEVa para reproducibilidad del método para bromhexina

Origen	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de P
Modelo	0,609667	3	0,203222	0,54	0,6691
Residual	3,02	8	0,3775		
Total (Corr.)	3,62967	11			
Suma de cuadrados tipo III					
Origen	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de P
Analista	0,0736333	1	0,0736333	0,20	0,6704
Día (Analista)	0,536033	2	0,268017	0,71	0,5202
Residual	3,02	8	0,3775		
Total (corregido)	3,62967	11			

Este análisis de varianza muestra que el analista y el día no afectan el porcentaje recuperado de Bromhexina, por lo tanto se acepta H_0 . Este parámetro analítico cumple con el criterio establecido por la guía de validación usada al tener un CV global menor al 2 % de la cantidad recuperada por lo tanto el método es reproducible entre analistas y días para la cuantificación de Bromhexina.

Tabla 41. Porcentaje de recobro de Ampicilina por 2 analistas en dos días diferentes

Día	% recuperado Analista 1	% recuperado Analista 2	Promedio y CV
1	105,92	104,08	Promedio =104,59
	104,08	103,88	CV = 0,85 %
	105,38	104,17	
2	106,24	103,72	Promedio =104,92
	105,44	105,28	CV = 0,87%
	104,21	104,62	
Promedio	Promedio=105,21	Promedio 104,29	Promedio _{global} =104,75
CV	CV = 0,84 %	CV = 0,55 %	CV _{global} = 0,82 %

Para saber si estas dos variables de estudio afectan la cantidad recuperada de Ampicilina se realizó un análisis de varianza anidado con un nivel de significancia $\alpha = 0.1$ junto con las siguientes hipótesis:

H_0 : No hay efecto del analista y el día en el porcentaje de recuperación de Ampicilina

H_1 : Existe un efecto de día y/o analista en el porcentaje recuperado de Ampicilina

Criterios de aceptación: Si p-valor > 0.1 se acepta H_0 , si p-valor < 0.1 se acepta H_1

Tabla 42. ANADEVa para reproducibilidad del método para ampicilina

Origen	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de P
Modelo	2,95257	3	0,984189	1,53	0,2802
Residual	5,1508	8	0,64385		
Total (Corr.)	8,10337	11			
Suma de cuadrados tipo III					
Origen	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Valor de F	Valor de P
Analista	0,333333	1	0,333333	0,52	0,4923
Día (Analista)	2,61923	2	1,30962	2,03	0,1931
Residual	5,1508	8	0,64385		
Total (corregido)	8,10337	11			

En la tabla de ANADEVa se observa que el día si afecta la cantidad recuperada de Ampicilina con un nivel de confianza de 90 %. Como se muestra en el gráfico 21, el intervalo de confianza de las medias para día se traslapan a una significancia del 99 % por lo tanto estos valores son iguales.

La guía de validación establece que el porcentaje de recobro de Ampicilina debe tener un coeficiente de variación menor al 2 %, para este caso se obtuvo un valor de 0.82 %, por lo tanto el método es reproducible para cuantificar Ampicilina.

RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS EVALUADOS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AMPICILINA

Tabla 43. Parámetros de validación del método analítico para la cuantificación de ampicilina

Parámetro	Niveles	Especificaciones	Resultados	Conclusiones
Adecuabilidad del sistema	1 solución que representa el 100% corrida 6 veces	$CV \leq 2\%$	$CV = 1.79\%$	Conforme
Especificidad	Someter al método a un placebo analítico	La respuesta debe ser debida al analito	No hay respuesta analítica	Conforme
Precisión del sistema	6 soluciones a la concentración que representa el 100%	$CV \leq 1.5\%$	$CV = 0.73\%$	Conforme
Linealidad del sistema	7 soluciones a una concentración del 60, 80, 90, 100, 110, 120 y 140 % de Ampicilina respectivamente	$r^2 \geq 0.98$ IC de m: no debe incluir el 0	$r^2 = 0.996$ Lim Sup: 255.67 Lim Inf: 240.69	Conforme
Exactitud y repetibilidad	6 muestras de un placebo cargado	CV de % de recobro $< 2\%$ y el IC para la media de % de recobro debe incluir el 100 % o estar dentro del intervalo 98-102 %	$CV = 1.662\%$ Lim sup = 103 Lim Inf = 99.6	Conforme
Linealidad del método	7 soluciones de un placebo cargado a una concentración de 60, 80, 90, 100, 110, 120 y 140 % de Ampicilina respectivamente	$r^2 \geq 0.98$ IC para m: debe incluir el 1 IC para b: debe incluir el 0 Para % recuperado: $CV < 2\%$ IC debe incluir el 100% o estar dentro del intervalo de 98-102%	$r^2 = 0.9984$ IC de m = LS = 1.0170 LI = 0.9807 IC de b = LS = 9.9758 LI = -8.6923 Para % de recobro : $CV = 0.919\%$ IC de media poblacional : LS = 100.95 LI = 99.11	Conforme
Reproducibilidad (Día, analista)	2 analistas diferentes analizando la misma muestra por triplicado en 2 días diferentes	CV global del % de recobro $< 2\%$	CV global = 0.82 %	Conforme

RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS EVALUADOS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE BROMHEXINA

Tabla 44. Parámetros de validación del método analítico para la cuantificación de ampicilina

Parámetro	Niveles	Especificaciones	Resultados	Conclusiones
Adecuabilidad del sistema	1 solución que representa el 100% corrida 6 veces	$CV \leq 2\%$	$CV = 1.29\%$	Conforme
Especificidad	Someter al método a un placebo analítico	La respuesta debe ser debida al analito	No hay respuesta analítica	Conforme
Precisión del sistema	6 soluciones a la concentración que representa el 100 %	$CV \leq 1.5\%$	$CV = 1.22\%$	Conforme
Linealidad del sistema	7 soluciones a una concentración del 60, 80, 90, 100, 110, 120 y 140 % de Bromhexina respectivamente	$r^2 \geq 0.98$ IC de m: no debe incluir el 0	$r^2 = 0.993$ Lim Sup: 382.44 Lim Inf: 354.73	Conforme
Exactitud y repetibilidad	6 muestras de un placebo cargado	CV de % de recobro $< 2\%$ y el IC para la media de % de recobro debe incluir el 100 % o estar dentro del intervalo 98-102 %	$CV = 1.660\%$ Prom % recobro = Lim sup = 102.6 Lim Inf = 99.6	Conforme
Linealidad del método	7 soluciones de un placebo cargado a una concentración de 60, 80, 90, 100, 110, 120 y 140 % de Bromhexina respectivamente	$r^2 \geq 0.98$ IC para m: debe incluir el 1 IC para b: debe incluir el 0 Para % recuperado: $CV < 2\%$ IC debe incluir el 100% o estar dentro del intervalo de 98-102%	$r^2 = 0.9988$ IC de m : LS = 1.0162 LI = 0.9845 IC de b: LS = 0.1265 LI = -0.1346 Para % de recobro : $CV = 0.825\%$ IC de media poblacional : LS = 100.81 LI = 99.16	Conforme
Reproducibilidad (Día, analista)	2 analistas diferentes analizando la misma muestra por triplicado en 2 días diferentes	CV global del % de recobro $< 2\%$	CV global = 0.57 %	Conforme

7.- CONCLUSIONES

- ↓ Se optimizó el método analítico para cuantificar Ampicilina y Bromhexina por electroforesis capilar en cápsulas. Las condiciones óptimas determinadas para el análisis son: buffer fosfatos 50mM pH 2.5, detección a 210nm, longitud total de 31.8 cm, temperatura de 25°C del capilar, una inyección hidrodinámica (5 psi por 5 s).

- ↓ Se realizó la validación del método para la determinación de contenido químico de Ampicilina y Bromhexina, evaluándose los parámetros de adecuabilidad, precisión y linealidad del sistema y del método, especificidad, exactitud y repetibilidad. Al cumplir con todos los criterios de aceptación en cada uno de los parámetros de desempeño de un método analítico que establece la guía de Validación de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México y que está avalado por la Secretaría de Salud, se puede concluir que este método es preciso, exacto y reproducible para llevar a cabo la cuantificación de Ampicilina y Bromhexina en capsulas. Se obtuvo el método definitivo de análisis validado y listo para ser aplicado en la rutina del Laboratorio de Control de Calidad.

8.- REFERENCIAS

1. Abrego Reyes Víctor Hugo. Aplicaciones de la electroforesis capilar para la determinación de compuestos químicos a partir de diferentes matrices. Tesis licenciatura. Cuautitlán Izcalli, México: UNAM, Año 2006.
2. Adamovics, J. A. (1997). "Chromatographic analysis of pharmaceuticals. Chromatographic science series". Segunda Edición, Ed. Marcel Dekker, USA. Vol. 74.
3. Altria, K. D. Analysis of Pharmaceuticals by capillary electrophoresis. Vieweg Publishing, Wiesbaden, 1998. pp. 1-176.
4. Altria, K. D. Capillary electrophoresis guidebook: Principles, operations, and applications., Chapman and Hall, Londres. 1996. pp. 1-349
5. Bryskier André, M.D. Antimicrobial Agents "Antibacterials and Antifungals". ASM Press. Washington, DC 2005.
6. Camillery, P. Capillary electrophoresis: theory and practice. 2da. Ed. CRC Press, Boca Ratón. Fl. 1997. 1-576.
7. Castagnino Juan Miguel, Electroforesis capilar, Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana Vol. XXXIII, No. 3, 297-324, Argentina 1999
8. Castillo, R.M.A., Revilla, V. A. L, López, A. R. (2002). Fundamentos sobre electroforesis capilar. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
9. Chung Chow Chan, et-al. Analytical method validation and instrument performance verification. A John Wiley and sons publication, USA, 2004.
10. Cohen, Yves. Análisis químicos farmacéuticos de medicamentos. Editorial Limusa, México, 1998.
11. Cruz O., D.A., Torres V., K.G., Revilla V., A.L., López A., R., Desarrollo de una metodología analítica para la determinación de bromhexina y amoxicilina en formulaciones farmacéuticas por electroforesis capilar. Tesis de Licenciatura, UNAM FES-Cuautitlán, 2006.
12. Electrokinetic separation whit micellar solution and open-tubular-capillaries. Terabe, S. et al. Anal. Chem. 1984 (56), 111-113.
13. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Octava edición, Vol. II. México 2004
14. Foret, F., et al. Capillary zone electrophoresis. VCH Weinheim, 1993, pp 1-395.
15. Genaro, Alfonso R. "Remington farmacia". Veinteava Edición. Ed. Medica Panamericana. USA, 2000

16. Guía de validación de métodos analíticos. Colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos. Edición 2002.
17. Guzman, N. A. Capillary electrophoresis technology. Edit. Marcel Dekker. NY. pp 1-83.
18. Hamish Small y Theodore E. Miller Jr. Anal. Chem. 54 (1982), 462-469
19. Heegaard, N.H.H., Nilsson, S., Guzman, N.A. (1998). Affinity capillary electrophoresis: important application areas and some recent developments. Journal of Chromatography B, 715: 29-54.
20. Handbook of capillary electrophoresis. Landers, J. P. et, al, 1994. Edit. CRC Press, Boca Ratón. pp. 147-206.
21. <http://www.monografias.com/trabajos10/antib/antib.shtml> (septiembre, 2008)
22. <http://es.wikipedia.org/wiki/Ampicilina> (septiembre, 2008)
23. http://www.engormix.com/floxanova_20_s_products1692-11479.htm (septiembre, 2008)
24. <http://calidadbioquimica.com.ar/evacal.htm> (octubre 2008)
25. <http://www.fcv.unl.edu.ar/archivos/grado/catedras/bacteriologia/informacion/clases/ANTIBIOTICOS.ppt> (octubre 2008)
26. http://en.wikipedia.org/wiki/Capillary_electrophoresis (octubre 2008)
27. ICH Topic Q2A. Note for guidance on validation of analytical methods. Definitions and terminology, 1 June 1995.
28. Jandik, T., et. al. Capillary zone electrophoresis of small molecules and ions. VCH Publishers, Cambridge, 1993. pp 1-425.
29. J.J. Berzas Nevado*, G. Castañeda Penãlvo, F.J. Guzmán Bernardo Determination of sulfametoxazole, sulfadiazine and associated compounds in pharmaceutical preparations by capillary zone electrophoresis. Journal of Chromatography A, 918 (2001) 205-210. Spain 2001.
30. Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries., Anal. Chem., 1981, (53) : 1298-1302
31. Khaledi, M. G. High performance capillary electrophoresis: Theory, techniques and applications. Chemical analysis series. Wiley and Sons, NY. Vol. 146. 1998 pp 1-878.
32. Kuhn, R. Capillary electrophoresis: Principles and practices., Edit. Springer-Verlag. Berlín. pp. 1-439.

33. Labcompliance. www.labcompliance.com/methods/meth_val.htm Año 2005
34. Li, S. F. Y. Capillary electrophoresis principles, practice and applications. *Journal of Chromatography Library*. 1992 (52), 1-608
35. Ludwing Huber y Stephan A. Goerge, Eds., *Diode array detection in HPLC*, New York, Marcel Dekker, 1993, Chapter 3
36. Moffat, A. C. , Osselton, M. D., Widdop, B. (2004). "Clarke's Analysis of Drugs and Poisons". Tercera edición.
37. Nieto Garcia L., Villaseñor Solis A. C. Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de cloxinato de lisina y diclofenaco sódico por electroforesis capilar. Tesis licenciatura, Cuautitlán Izcalli, México: UNAM, Año 2008, pp. 2-20
38. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Intercambiabilidad de medicamentos
39. Norma Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-1998 Buenas Prácticas de Fabricación para fármacos
40. Pérez de la Cruz, Leticia. Lineamientos básicos para la validación de los métodos analíticos de uso farmacéutico. México; UNAM. Facultad de Química, 2006.
41. Petruccelli MA, Píscopo MV, Unzaga MF, Cerdá RO, Marino FP. Estudio lectinohistoquímico del aparato mucociliar de pollos infectados experimentalmente con *Mycoplasma gallisepticum* y tratados con mucolítico y antibiótico. *Cátedra de Patología de Aves y Pílferos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Argentina 2004 ANALECTA VETERINARIA 2003; 23 (2): 7-10*
42. *Practical capillary electrophoresis*. Weinberger, R. 2a. Ed., Academic press, San Diego, Sea. 2000 pp. 1-462
43. PLM. *Diccionario de especialidades farmacéuticas*. Ed. 54. Thomson PLM, S.A. de C.V. México 2008
44. Righetti, P. G., William, H. *Capillary electrophoresis in analytical biotechnology*. CRC Press, Boca Raton. 1996. pp. 1-576.
45. Robert P. Oda, Thomas C. Spelsberg y James Landers, *LC-GC 12*, (1994), 50-51
46. Rodríguez Páez José Luis. Tesis: Desarrollo y validación de una técnica analítica por electroforesis capilar para tabletas efervescentes con multiactivos. FES Zaragoza, 2007.
47. Rouessac, F. "Análisis químico", Ed. Mc Graw Hill, España, 2003.

48. SSA. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993, Buenas Prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos. Año 1993
49. Skoog, A., Douglas, (2000). "Química Analítica". 7ª edición. Mc Graw – Hill. México.
50. Skoog, D; Holler, F.; Nieman, T. "Principios de análisis instrumental", Capítulo 30: EC y electrocromatografía, 5ta. Ed. McGrawill, Madrid, España, 2001
51. Skoog, D; James, L. "Análisis instrumental", 4ta. Ed. McGrawill, España, 1994
52. Sumano H, Gracia I, Capistran A, Meade G, Rivero A, Ruiz-Ramirez L. Use of ambroxol and bromhexine as mucolytic for enhanced diffusion of furaltadone into tracheobronchial secretions in broilers. *British Poultry Science*. 1995; 36: 503-507.
53. Szepesi, Gabor. HPLC in pharmaceutical análisis. Vol 1. Editorial CRC Press, USA, 1990, pp. 1-4, 191-193
54. Takeda H, Misawa M, Yanaura S. A Role of Lysosomal Enzymes in the Mechanism of Mucolytic action of Bromhexine. *Japan. J Pharmacol*. 1983; 33: 455-461.
55. Watson, D. G. (2005). "Pharmaceutical analysis. A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists". Segunda Edición, Ed. Elsevier, China.