

300627



UNIVERSIDAD LA SALLE

16
24

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS
INCORPORADA A LA U. N. A. M.

" LA ELECTROFORESIS CAPILAR: UN NUEVO
METODO ANALITICO EN EL CONTROL DE
CALIDAD "

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
CLARA ANGELICA REYES RAMIREZ

ASESOR DE TESIS:
Q.F.B. ANGELINA OCHOA ISLAS

MEXICO, D. F.

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

"AGRADECIMIENTOS"

A Dios:

El señor es mi piloto; no iré a la deriva. Él me iluminó a través de las oscuras aguas; Él me dirigió en los profundos canales; Él llevó mi bitácora. Él me guió por la estrella de santidad en su nombre. Sí, aunque navegue entre los truenos y tempestades de la vida, no temeré a ningún peligro; pues tú estás conmigo. Tú amor y Tus cuidados; ellos me amparan. Tú preparas ante mí un puerto en la patria de la eternidad; lubrificas las olas con aceite; mi nave flota en calma. Seguramente la luz del Sol y las estrellas me favorecerán en el viaje que hago y descansaré por siempre en el puerto de mi Dios.

A mi entorno espiritual:

Por su incondicional intercesión ante mi Dios.

A mis padres:

Con todo el amor y gratitud que pudiera dedicar en este trabajo; pues a su amor, cuidados, consejos y apoyo incondicional, debo gran parte de lo que soy.

A tí R.L.Z.:

Pues desde que te conocí has sido el gran amor y la luz que ilumina mi vida.

A mis hermanas: Toña y Chepina

Esperando siempre exista el fuerte lazo de cariño y apoyo que hasta hoy nos ha unido.

A mis sobrinos: Alfredo, Karla, Sofia y Rodrigo

Pues su cariño y el deseo de tratar de ser siempre su guía, me motivó a luchar y salir adelante sin desfallecer.

A mis mejores amigas durante la carrera:

Paty Portales y Rosy Alcaraz.

A Rosy, Gerardo, Juan Carlos y Jaqueline:

Por valiosa amistad.

A la Universidad La Salle:

Por haber reforzado mis valores humanos y darme las bases académicas que me sustentarán en adelante.

A mi Directora de tesis y jurado asignado:

Agradezco su valiosa dirección para el desarrollo de la misma a mi directora de tesis: Q.F.B. Angelina Ochoa Islas y a mis revisores y jurado asignado: Q.F.B. Ma. de Jesús Ramírez Palomares, M. en C. Arnulfo Romero Uscanga, I.B.Q. Ma. Eugenia Martínez Salgado, Q. Irene Montalvo Velarde.

A MSD y a mi jefe J. Julio Espinosa:

Por brindarme las bases laborales y el apoyo que me impulsaron a concluir este trabajo.

INDICE

CAPITULO I

INTRODUCCION.....5

CAPITULO II

OBJETIVOS.....9

CAPITULO III

CONTROL DE CALIDAD

- 3.1 Concepto de calidad y concepto de control.....11
- 3.2 Concepto de control de calidad.....12
- 3.3 El desarrollo del control de calidad.....13
- 3.4 El control de calidad en la industria farmacéutica....15

CAPITULO IV

METODOS DE SEPARACION

- 4.1 Concepto de cromatografía.....22
- 4.2 Tipos de cromatografía.....23

CAPITULO V

ELECTROFORESIS CAPILAR

5.1	Concepto de lectroforesis capilar.....	30
5.2	Características de la electroforesis capilar.....	32
5.3	Equipo (Descripción).....	37
5.4	Condiciones de operación.....	38
5.5	Alternativas en el método de detección.....	40
5.6	Uso y aplicaciones de la electroforesis capilar en el laboratorio de control de calidad.....	46
5.7	Ventajas de la electroforesis capilar sobre el HPLC...56	

CAPITULO VI

RESULTADOS Y DISCUSION

6.1	Algunos ejemplos del uso de la electroforesis capilar en el control de calidad.....	61
6.2	Interpretación de resultados en la electroforesis capilar.....	63

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

7.1	Conclusiones.....	65
-----	-------------------	----

	<i>BIBLIOGRAFIA.....</i>	68
--	--------------------------	----

CAPITULO I
INTRODUCCION

INTRODUCCION

La electroforesis capilar comenzó a ser difundida en los inicios de la década de los 80's por Jorgenson y Luckas (1983), quienes demostraron la excepcional eficiencia que puede obtenerse utilizando la electroforesis en capilares. Este trabajo en la separación electroforética de biomoléculas, sin proponérselo desarrolló la instrumentación comercial y la investigación de su futura aplicación en áreas donde el uso de la electroforesis convencional no era frecuente. Una de esas áreas es el control de calidad en la industria farmacéutica, donde la aplicación de la electroforesis fué restringida debido a la naturaleza semicuantitativa de esta técnica. La introducción de la electroforesis capilar permite un análisis cuantitativo y automatizado de las sustancias usadas comúnmente en el análisis farmacéutico (Altria and Rogan, 1994).

La determinación y cuantificación de las propiedades químicas de las drogas, tales como la pureza, ensayo, quilaridad y confirmación de la identidad, son rutinariamente realizadas por HPLC. Recientemente la electroforesis capilar ha estado siendo aplicada en la realización de estos análisis cotidianos de las drogas, lo que permite ser un complemento y en algunos casos la alternativa para el análisis (Altria and Rogan, 1994).

A partir de 1986 la aplicación de la electroforesis capilar al análisis de las drogas se ha incrementado copiosamente (Altria and Simpson, 1986, Fujiwara and Honda, 1987).

Este método facilita la separación de las partículas debido al alto voltaje que genera a su vez el flujo electroforético y electroosmótico del buffer a través del tubo capilar, teniendo una gran eficiencia en la separación de las moléculas (Li, 1992).

Las ventajas obtenidas por el uso de la electroforesis capilar, son entre las más significativas: reducción del tiempo de análisis, alta resolución, menor gasto de reactivos, inyector automático de muestras y el poder usar diferentes tipos de detectores (Altria, 1994). Sus criterios de validación son similares a los empleados en la validación de los métodos de HPLC, por lo que pueden realizarse sin ningún inconveniente en el laboratorio de control de calidad (Altria and Chanter, 1993).

Todas estas ventajas, hacen que la electroforesis capilar sea considerada en aquellos casos en los que el HPLC tenga inconvenientes en su uso, por ejemplo, que se consuma demasiado tiempo o no se logre una separación eficiente de algunos compuestos, como es el caso de algunos isómeros (Altria, 1994).

El evaluar a la electroforesis capilar como un método analítico de elección en el laboratorio de control de calidad es de

importancia fundamental para difundir su uso y obtener los beneficios que de él se derivan (ahorro en el consumo de tiempo, reactivos y un mayor poder de resolución). Dados estos beneficios se presentará a la electroforesis capilar como una alternativa viable que cubre eficientemente las necesidades actuales del laboratorio de control de calidad.

CAPITULO II
OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluar a la electroforesis capilar como un método analítico de elección en el laboratorio de control de calidad.

OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Determinar los beneficios del uso de la electroforesis capilar en la industria farmacéutica.
- b) Indicar las ventajas de la electroforesis capilar sobre el HPLC.

CAPITULO III
CONTROL DE CALIDAD

3.1 CONCEPTO DE CALIDAD Y CONCEPTO DE CONTROL

Actualmente la vida cotidiana depende totalmente de la ejecución y operación satisfactoria de productos y servicios. Esta situación la ha propiciado un aumento en la demanda del cliente por una mayor durabilidad y confiabilidad en productos y servicios. Es la calidad tanto como el precio lo que atrae de regreso a los clientes (Howard, 1989).

La calidad está determinada por el cliente, no por el ingeniero, la mercadotecnia, ni por la gerencia. Está basada en la experiencia real del cliente con el producto o servicio, medida contra sus necesidades y siempre representa un objetivo. La calidad del producto y/o servicio puede definirse como:

La resultante total de las características del producto y servicio, de factores tales como: La ingeniería, la fabricación, la mercadotecnia y el mantenimiento a través de los cuales el producto o servicio en uso satisface las necesidades del cliente.

Algunos términos como confiable, servicial y durable, en algunas ocasiones se han tomado como definiciones de la calidad del producto. Estos términos son en realidad características individuales, que en conjunto constituyen la calidad del producto o servicio (Feigenbaum, 1986).

El control se define como un proceso para delegar responsabilidad y autoridad para alcanzar la meta fijada en la empresa.

El control efectivo es hoy un requisito central para cumplir existosamente con los objetivos fijados.

Donde este control ha fallado, ha sido causa principal de aumentos en los costos y reducción en el ingreso de las compañías. El ritmo de la innovación tecnológica está aumentando rápidamente para muchos productos y servicios. Esto coloca una demanda igualmente en aumento para la integración práctica y económica de esta nueva tecnología en las prácticas operacionales de la compañía (Howard, 1989).

3.2 CONCEPTO DE CONTROL DE CALIDAD

El proporcionar un producto o servicio en el cual su calidad haya sido diseñada, producida y conservada a un costo económico y que satisfaga por entero al consumidor. Para lograr esta meta se debe de contar con un sistema que abarca a toda la compañía: el control de la calidad. El control de la calidad es un sistema efectivo de los esfuerzos de varios grupos en una organización para la integración del desarrollo, del mantenimiento y de la

superación de la calidad con el fin de hacer posibles mercadotecnia, ingeniería, fabricación y servicio a satisfacción total del consumidor y al nivel más económico (Howard, 1989).

El control de la calidad proporciona las bases fundamentales de la motivación de calidad para todos los empleados y representantes de la compañía desde altos ejecutivos hasta trabajadores como obreros, personal de oficina, agentes y personal de servicio. La capacidad del control de la calidad es una de las fuerzas principales para lograr una productividad total vastamente mejorada (Feigenbaum, 1986).

3.3 EL DESARROLLO DEL CONTROL DE CALIDAD

El desarrollo del control de calidad, como lo conocemos hoy, ha abarcado todo este siglo. Desde un punto de vista histórico, los cambios principales en el enfoque al trabajo de el control de calidad han ocurrido aproximadamente cada 20 años y puede resumirse de la siguiente manera (Feigenbaum, 1986):

Primera etapa: Operador de control de calidad (inherente a la fabricación hasta finales del siglo XIX). En este sistema un trabajador o un número reducido de ellos tenía a su cargo la manufactura completa del producto y así cada trabajador controlaba totalmente la calidad de su trabajo.

Segunda etapa: Capataz de control de calidad (principios de 1900). En este periodo se encuentra el arribo de las factorías modernas, en las que una agrupación de hombres realizan tareas semejantes y pueden ser supervisados por un capataz, el cual asume la responsabilidad por la calidad del trabajo.

Tercera etapa: En la primera guerra mundial los sistemas de fabricación se vuelven más complejos, implicando el control de gran número de trabajadores por cada uno de los capataces de producción. De este modo aparecen en escena los inspectores de tiempo completo y a ésta etapa se le denomina control de la calidad por inspección.

Cuarta etapa: De el paso anterior surgieron las organizaciones de inspección (1920 - 1930) separadas de la producción y suficientemente grandes para ser encabezadas por superintendentes. Sin embargo las enormes necesidades de producción requerida durante la Segunda Guerra Mundial, desarrolló la cuarta etapa del control de calidad, que se conoce como: el control estadístico de la calidad. De este modo, hubo una extensión de la inspección y se transformó hasta lograr una mayor eficiencia en las grandes organizaciones de inspección. Se proporcionó entonces gráficas de control y muestreo a los inspectores. La contribución más significativa de ésta etapa fué la inspección por muestreo, en lugar de la inspección al 100%. Sin embargo, el control de calidad permaneció restringido a las

áreas de producción y su crecimiento fue relativamente lento.

Quinta etapa: (control total de la calidad). Cuando las empresas comenzaron a desarrollar una estructura operativa y de toma de decisiones para la calidad del producto que fuera lo suficientemente efectiva como para tomar acciones adecuadas en los descubrimientos del control de calidad y costos menores. Se hizo posible el revisar las decisiones regularmente, en lugar de ocasionalmente, al analizar resultados en el proceso y tomar la acción de control en la fuente de manufactura o de provisión, finalmente, el detener la producción cuando fuera necesario. Junto al control estadístico de la calidad se reunieron muchas técnicas adicionales como: medición, confiabilidad, equipo de información de la calidad, motivación para la calidad, etc.

Como el control de la calidad ha llegado a tener un gran impacto en las prácticas de administración e ingeniería, ha proporcionado las bases para la evolución del control total de la calidad en la organización, la administración de la calidad total y la calidad como una nueva estrategia principal en los negocios (Howard, 1989).

3.4 EL CONTROL DE CALIDAD EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA

La alta calidad de los productos farmacéuticos es el resultado del minucioso cumplimiento de procedimientos escritos para

realizar todas las operaciones que intervienen en su elaboración. Las materias primas deben caracterizarse y adquirirse de abastecedores de buena reputación para poder obtener productos estables y uniformes cuando estos materiales queden incorporados en la forma posológica terminada. Las instalaciones deben estar diseñadas de una forma adecuada y los equipos deben ser los apropiados para eliminar el potencial de contaminación cruzada de un producto por otro, planificar la circulación del material y los movimientos del personal para reducir la probabilidad de que se mezclen productos y para que el aire y el agua que se proveen para la producción sean adecuados en cantidad y calidad para las operaciones que se realizan en particular. El personal de producción debe ser capacitado como corresponda para cumplir su trabajo y las instrucciones que se siguen deben darse por escrito, ser aprobadas por personas responsables y cumplirse al pie de la letra. Los departamentos de embarque tienen la responsabilidad de cuidar que los productos estén a salvo de manipulaciones y condiciones ambientales adversas mientras están en tránsito hacia los centros de distribución y los clientes. El control de calidad está presente en todo momento, vigilando cada una de las operaciones y otorgando la aprobación final para la distribución sólo después de haber verificado y comprobado que cada paso de este proceso se ha completado correctamente (Remington, 1992).

La importancia de tener una organización que permita el fácil desarrollo de las actividades y el control de la variedad de operaciones es vital; representa y asegura la participación en el campo de la producción, que cada día es más exigente.

Una organización altamente funcional y aún en las no muy grandes, presenta sus actividades en base a organigramas. Estas gráficas, son dibujos en donde las unidades de mando y sus relaciones, pueden representarse visualmente con ayuda de símbolos y líneas, proporcionando una imagen de las distintas funciones y su autoridad. Además, señalan la dirección del tránsito de las comunicaciones y su control (Feigenbaum, 1986).

El organigrama puede ser modificado, dependiendo de la importancia, recursos económicos y capacidad de producción de la industria.

Algunas definiciones de los puestos en la industria farmacéutica son las siguientes (Feigenbaum, 1986):

Dirección General: Tendrá funciones que le competen a toda gerencia de cualquier empresa, siendo la encargada de hacer valer y cumplir los objetivos, por los que fué creado el laboratorio.

Dirección Técnica: Depende de la dirección general, teniendo como objetivo, el de planear, dirigir y controlar las

operaciones, que permitan el adecuado funcionamiento del área productiva de la planta, además, supervisa al departamento de desarrollo, de fabricación, de almacenes y mantenimiento, tiene también como finalidad, la de lograr la producción de los medicamentos con la calidad requerida y necesaria, para que el producto no sólo sea estrictamente bien elaborado, sino que señale la técnica más eficiente en su fabricación.

Dirección Administrativa: Depende de la dirección general, su función es la de coordinar todas las operaciones concernientes a la contabilidad y finanzas de la planta, supervisa al departamento de contabilidad.

Dirección de Control de Calidad: Esta dirección pertenece al departamento de asistencia técnica y depende directamente de la dirección general. Su objetivo, es llevar a cabo todo el control analítico necesario, de verificar y garantizar la calidad del producto por medio del departamento de control químico y microbiológico supervisando también al departamento de inspección.

Departamento de Control Químico: Depende de la dirección de control de calidad. Es responsable de ensayar y aprobar materias primas, procesos internos y productos terminados. El departamento de control químico debe tener gente capacitada académicamente y con experiencia para realizar los análisis, a menudo complejos,

que se requieren para evaluar la aceptabilidad de un producto. Pero el personal adecuado no es lo único que el departamento requiere, porque también se debe contar con equipos que permitan hacer análisis oportunos y exactos. Estos equipos siguen tornándose cada vez más sofisticados y aportan más información sobre los compuestos de lo que antes se sabía y esto ha conducido a un nivel de exactitud y detectabilidad que hasta ahora se desconocía. También se debe contar con especificaciones detalladas, así como métodos de ensayo para poder medir los productos. Las especificaciones comprenden los criterios para evaluar el producto y los límites para la aceptación o rechazo de cada parámetro crítico. La norma de ensayar y aceptar sólo materias primas de alta calidad es esencial en la preparación de productos. Parte de esta aceptación es sólo comprar materias primas a abastecedores conocidos de buena reputación. A los efectos de asegurar esta condición, es fundamental que el control de calidad forme parte de un programa aprobado de antemano por todos los abastecedores potenciales. Esta aprobación siempre incluye el ensayo del material y en muchos casos requiere una inspección de las instalaciones del abastecedor para determinar si son las adecuadas. Las pruebas realizadas por el departamento de control químico normalmente se hallan en varias fuentes de consulta, El United States Pharmacopeia/National Formulary (USP) es la principal fuente de consulta, es publicada en un programa quinquenal por la Convención Farmacopeica de Estados Unidos. Los patrones establecidos por la USP han sido reconocidos como

oficiales por el Congreso de Estados Unidos y también los reconoce la Ley Federal de Alimentos, Drogas y Cosméticos. Además de los procedimientos definidos en la USP, muchas veces las compañías preparan sus propias especificaciones para ensayos si los productos no figuran en la USP (Remington, 1992).

Departamento de Control Microbiológico: Este departamento depende de la dirección de control de calidad. Sus funciones son las de prevenir, detectar, identificar y controlar las contaminaciones por microorganismos en los productos que se laboran en la planta; así mismo, a toda materia que por su naturaleza lo requiera.

Departamento de Inspección: Depende de la dirección de control de calidad. Su objetivo es efectuar el control en proceso de las materias y productos. Su función, es la de supervisar y controlar la inspección física en la elaboración de productos, para evaluar las materias primas, materiales en general y del producto terminado.

CAPITULO IV
METODOS DE SEPARACION

4.1 CONCEPTO DE CROMATOGRAFIA

La parte del control de calidad en la industria farmacéutica que tiene en los métodos de separación uno de sus principales pilares es el departamento de control químico. Los avances conseguidos en este campo repercuten directamente en el desarrollo de métodos cada vez más versátiles y que cumplen con una serie de requerimientos que son permanentemente actualizados, es por ello que es necesario conocer los métodos de separación que han sido más utilizados en el análisis, para poder determinar y evaluar los beneficios obtenidos de los diferentes métodos analíticos, hasta llegar al más reciente: La electroforesis capilar (Altria, 1993).

En años recientes la cromatografía ha pasado a primer plano como medio para separar y analizar sustancias orgánicas e inorgánicas. Pueden emplearse desde grandes cantidades hasta cantidades microscópicas y los análisis pueden ser cualitativos o cuantitativos. A menudo los métodos cromatográficos son más eficaces que otros métodos destinados a la separación e identificación de soluciones que contienen los principios activos de las drogas. Estas técnicas tienen gran aplicación en los trabajos de análisis para determinar la identidad y pureza de las drogas y derivados de origen natural (Tyler, 1979).

La cromatografía puede ser definida como un método de separación analítica en el cual el flujo de un solvente favorece la separación de sustancias por medio de un medio poroso adsorbente (Tyler, 1979., Rioduero, 1980).

La eficacia de la separación depende de factores como la naturaleza química de los componentes a separar, del disolvente y del adsorbente; la geometría de la columna; la velocidad y el flujo de la disolución y del disolvente utilizado en el desarrollo del cromatograma (Ayres 1989).

Las dos principales subdivisiones son: la cromatografía en solución y la cromatografía gaseosa (Tyler, 1979).

4.2 TIPOS DE CROMATOGRAFIA

CROMATOGRAFIA EN PAPEL.

La cromatografía sobre papel es de uso más corriente, debido a la sencillez de los elementos que requiere y a la facilidad con que pueden efectuarse simultáneamente un gran número de análisis. Una mezcla sólida se disuelve en un solvente adecuado y una pequeña porción de la muestra se coloca sobre unas marcas previamente hechas en la tira de papel filtro. La tira de papel se coloca en un contenedor cerrado que contiene un disolvente, éste último se desplaza por el papel y separa a los

constituyentes de la mezcla. Los diferentes constituyentes recorren diferentes distancias dependiendo de la naturaleza de las mismas (Goodman, 1986).

Las manchas resultantes o el trazado de la distribución de las mismas sobre el papel se llaman cromatogramas. Las sustancias se identifican por las características (color, tamaño, forma, aspecto bajo la luz blanca o ultravioleta) de las manchas que producen en el cromatograma, y comparando a éstas con cromatogramas similares de la droga o sustancia conocida (Tyler, 1979).

CROMATOGRAFIA EN COLUMNA.

La cromatografía en columna se define como "el paso de una solución a través de una columna de una sustancia finamente subdividida, que retarda selectivamente el paso de ciertos componentes de la solución" (Bobbit, 1968).

Cada componente desciende a una velocidad característica. Una vez seca, la columna presenta una serie de bandas correspondientes a los compuestos que se han separado. Esta columna, que se denomina cromatograma, se retira del tubo y luego se divide según las bandas para someter cada una de éstas a un análisis individual. De acuerdo con sus coeficientes de adsorción, los distintos constituyentes de la muestra se separan

de la solución y son adsorbidos a distintas distancias desde lo alto de la columna (Tyler, 1979; Bobbit, 1968).

CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA.

La cromatografía en capa delgada resulta particularmente útil para el análisis de pequeñas cantidades de sustancias. Se caracteriza por la aplicación de un adsorbente seco y finamente pulverizado en una capa delgada y uniforme, sobre una lámina de vidrio. Una vez aplicadas las muestras sobre la superficie de la capa delgada se introducen en una cámara saturada previamente con un solvente o mezcla de solventes. La identificación positiva de un componente se efectúa comparando las manchas resultantes que representan a la muestra y a la sustancia patrón respectivamente, de la misma manera que para la cromatografía en papel. La relación entre la distancia que la sustancia a ensayar recorre y la distancia a que ha llegado la fase móvil a partir del punto de aplicación sobre la capa delgada, se denomina R_F de la sustancia. Los valores R_F de muchos compuestos han sido establecidos y tabulados con fines de referencia (Stahl, 1969).

CROMATOGRAFIA DE GASES.

La cromatografía de gases es un método específico, donde la fase móvil es un gas. Se emplean dos tipos: la cromatografía de gas-líquido y la cromatografía de gas-sólido, según el tipo de

fase estacionaria por la cual circula el gas. En la primera de ellas, la fase líquida estacionaria consiste en una fina película adherida a un soporte sólido e inerte finamente dividido que no retarda el pasaje de la muestra a través de ella. Como soporte sólido puede utilizarse tierra silíceo y polvo de ladrillo refractario para cromatografía. En la cromatografía de gas-sólido, la fase sólida estacionaria está representada por un adsorbente activo, como el alumbre, gel de silicio o carbón adheridos a un soporte (Zweing, 1972).

La sustancia por analizarse se vaporiza e introduce en la fase gaseosa móvil, penetra en la columna y se distribuye entre el gas y la fase estacionaria (líquida o sólida), en la cual habrá de adsorberse. La eficacia de este método depende de varios factores como el soluto, el tipo de solvente líquido, la cantidad total de solvente, la temperatura a la que se efectúa el proceso y la velocidad de flujo de gas. El material que se analiza por este método debe ser susceptible de vaporizarse o de ser finamente subdividido por nebulización o rociado (Tyler, 1979).

El aparato de cromatografía gaseosa debe utilizarse con cuidado para obtener resultados precisos. Generalmente se complementa con un sistema de registro que permite obtener un gráfico permanente de los resultados (Tyler, 1979).

CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

Los adelantos modernos en sistemas cromatográficos que emplean grandes presiones de entrada y son altamente sensibles, se conocen como cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). El principio se basa en columnas de pequeño calibre (2 a 5 mm) rellenas de pequeñas partículas (3 a 5 μ) aglomeradas que permiten la obtención de un rápido equilibrio entre la fase móvil y la fase estacionaria. La técnica también requiere sistemas de bombeo que ejerzan presiones de hasta 444 kilos por cm^2 en la fase móvil, a fin de alcanzar velocidades de flujo de cerca de varios mililitros por minuto en la columna. Como muchas veces se utilizan pequeñas cantidades de muestra (< 20 μg), es imperioso contar con detectores sensibles.

Con este tipo de cromatografía se realizan separaciones de alta velocidad comparables a las de cromatografía gaseosa, pero con la ventaja de que se pueden separar materiales no volátiles o termolábiles. Dado que en estas categorías entran muchas drogas, la cromatografía líquida de alta resolución se ha convertido en un importante método analítico (Giddings, 1975).

Otra de las ventajas que usa este método es el de poder usar la fase normal o fase reversa, dependiendo de la polaridad de la fase móvil y de la fase estacionaria, lo que contribuye a realizar una separación mucho más eficiente. El flujo es otra de

las variables que se puede manejar en este tipo de cromatografía, ya que la fase móvil está constituida por un sólo solvente o mezcla de solventes, el llamado *flujo isocrático*. Puede usarse un cambio de solvente por otro al paso del tiempo, lo que puede contribuir muy favorablemente a realizar una mejor separación, para realizar este tipo de flujo, llamado *por cambio de flujo*, se deben usar dos bombas para ejercer la presión que necesita cada una de las fases móviles y el cambio de solvente durante el transcurso del tiempo (Zweig, 1972).

Existen otros métodos de separación usados recientemente en el control de calidad, como los electroforéticos, basados en principios distintos a los anteriormente descritos y que están cobrando un interés preponderante en el control de calidad farmacéutico.

CAPITULO V
ELECTROFORESIS CAPILAR

5.1 CONCEPTO DE ELECTROFORESIS

La gran mayoría de las moléculas de interés farmacéutico debido a sus características de tamaño, carga y a su comportamiento en un campo eléctrico pueden ser analizadas por métodos de separación eléctricos como la electroforesis (Morrison, 1988., Clausen, 1989).

DEFINICION DE ELECTROFORESIS.

La electroforesis es un método de separación simple y altamente sensitivo usado en el análisis farmacéutico, la biología, la biología molecular, la bioquímica y otros muchos campos de estudio y se define como el movimiento de moléculas cargadas en un campo eléctrico (Equipar, 1994; Kuhn, 1993).

Bajo la influencia de un campo eléctrico, las moléculas cargadas emigran en la dirección del electrodo que porta la carga opuesta. Durante este proceso, las substancias deben de estar en una solución acuosa. A causa de su variación de carga y masa, las diferentes moléculas de una mezcla pueden moverse a diferentes velocidades y así ser separadas en fracciones simples (Reiner, 1993).

MOVILIDAD ELECTROFORETICA.

La movilidad electroforética es la velocidad con que una molécula emigra por la acción de un campo eléctrico. Esta movilidad es afectada directamente por la intensidad del campo eléctrico aplicado (Clausen, 1989), también es una medida característica de cada molécula.

ELECTROOSMOSIS.

La electroosmosis es un fenómeno básico en todas los procesos de separación electroforética. Puede ser descrita como el movimiento de un líquido en una superficie cargada causada por un campo eléctrico. Este movimiento también es llamado flujo electroosmótico. Se le puede encontrar cada vez que se aplica un voltaje a un sistema líquido que está en contacto íntimo con una superficie cargada (Kuhn, 1993).

La electroosmosis es uno de los efectos más antiguos descubiertos. Mientras que en los principios de la electroforesis se realizaron muchos intentos para suprimir la electroosmosis (Hjertén, 1967), James Jorgenson (Jorgenson, 1981, 1983) fué quien demostró primero el poder de la electroforesis en capilares de pequeño calibre utilizando el efecto de la electroosmosis.

La electroforesis capilar es una familia de varias técnicas

relacionadas, la cual emplea tubos capilares de sílica fundida con un diámetro interno de 20 a 200 micras, teniendo una gran eficiencia en la separación de moléculas. Generalmente las separaciones están basadas en el principio del flujo eléctrico de los iones en solución. La electroforesis capilar es una técnica muy versátil, ya que puede ser manipulada a conveniencia de los requerimientos que se tengan en el momento por la alteración de alguno de los factores que intervienen en el desarrollo de la misma, por ejemplo: Las propiedades de el electrolito usado, el pH, el largo del capilar etc. (Rogan, 1994).

5.2 CARACTERÍSTICAS DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR.

Las separaciones analíticas en el control de calidad deben ser realizadas para obtener en un corto periodo de tiempo, la información cualitativa y cuantitativa acerca de la composición de una muestra. Esta información sólo es obtenida, si la técnica de separación presenta una eficiencia satisfactoria. Los logros de los métodos de separación con el manejo de diferentes técnicas relacionadas, como la electroforesis capilar, muestran la aplicación directa de las fuerzas del campo eléctrico en los métodos analíticos (Kuhn, 1993).

En la electroforesis capilar las moléculas separadas pasan por el detector a diferentes velocidades. Las moléculas cuyo movimiento electroforético esté en la misma dirección del flujo

electroosmótico se mueven más rápidamente que las moléculas neutras, las cuales se mueven a su vez más rápidamente que las moléculas cuyo movimiento electroforético está en dirección opuesta al flujo electroosmótico, ésto provoca como consecuencia que el tiempo en que los componentes de la muestra con diferentes movilidades electroforéticas requieren para pasar al detector no es el mismo para todos (Kuhn, 1993).

La eficiencia de un sistema electroforético para el control de calidad, es medida por el número de platos teóricos en el capilar. La resolución es definida como la capacidad de separar dos picos en una misma corrida (Giddings, 1969). Es sumamente importante entender los efectos de los factores que influyen en el desempeño de la electroforesis capilar, entre las más importantes están: Los efectos dispersivos, la fuerza del campo eléctrico, las dimensiones del capilar, la temperatura, el buffer y el pH (Kuhn, 1993).

Los efectos dispersivos: La anchura de los picos en las gráficas obtenidas en la electroforesis capilar es el resultado de un número de efectos (ejemplos: condiciones de trabajo, tipo de instrumental usado, tipo de reactivos etc.) los cuales contribuyen a la extensión de una zona, éstos son llamados efectos dispersivos. Los diferentes efectos no pueden ser totalmente eliminados, pero su impacto sobre la eficiencia de la separación puede ser controlado tomando en cuenta la naturaleza

de estos efectos por lo que es conveniente un diseño apropiado del instrumental y el equipo usado, también influye una cuidadosa selección de las condiciones de trabajo (kuhn, 1993).

FUERZA DEL CAMPO ELECTRICO.

La fuerza del campo eléctrico aplicada a través del capilar determina la dirección de la migración de los iones en la electroforesis capilar. El campo eléctrico aplicado con mayor fuerza puede reducir el tiempo de análisis. Sin embargo, la producción de calor limita la aplicación de campos eléctricos más fuertes (Jorgenson, 1981,1983).

DIMENSIONES DEL CAPILAR.

El corazón de cada sistema de electroforesis capilar es el capilar en sí mismo. Las dimensiones del tubo comúnmente usadas en electroforesis capilar se encuentran en un rango entre 10 a 100 μm de diámetro interno, 375 μm de diámetro externo y de 10 a 100 cm de longitud. La elección de las dimensiones del capilar tiene un efecto directo sobre varios factores, tales como: El tiempo de migración, la resolución, la detección y la disipación de calor. Los tubos con diámetro de unas pocas micras están comercialmente disponibles y el paso de luz a través de la sílica fundida es bastante aceptable hasta los 190 nm. (Kuhn, 1993).

El diámetro interno del tubo capilar influye en el desempeño de

la separación. Los tubos con diámetros pequeños son preferibles a causa del calor producido por la corriente eléctrica. El calor se genera uniformemente a través del tubo, pero la disipación toma lugar a través de las paredes de sílica solamente. La temperatura tiene como efecto resultante un cambio en la viscosidad a través del capilar, mejorando el flujo. Jorgenson estudió el efecto del diámetro del tubo sobre la eficiencia. Demostró que el número de platos teóricos decrece de aproximadamente 250,000 platos teóricos para capilares con diámetros internos por debajo de 80 μm a aproximadamente 100,000 platos para un capilar de 100 μm . Simultáneamente observó que el calor es mucho mejor disipado en capilares con pequeño diámetro. Los tiempos de análisis pueden ser disminuidos significativamente si son aplicados altos voltajes a capilares con diámetros internos de 10 a 20 μm . Si las diferencias de movilidad en los componentes son lo suficientemente altas, la separación puede ser realizada en menos de un minuto (Jorgenson, 1987).

LA TEMPERATURA.

Como ya se mencionó, la elevación de la temperatura en la electroforesis capilar es una variable que puede beneficiar el desarrollo de la técnica o lo puede perjudicar, la temperatura usualmente es considerada en un contexto diferente al de otras técnicas de separación, debido a la pérdida en eficiencia por el excesivo calor generado. Por lo tanto, el control de la temperatura es comúnmente usado para mejorar la eficiencia de la

separación, pero ésta no debe rebasar el límite de la pérdida de eficiencia.

El mayor efecto de la temperatura es el de reducir el tiempo de análisis debido a que induce cambios en la viscosidad.

EL SISTEMA ELECTROLITICO.

El sistema electrolítico juega otro importante rol en la realización de la electroforesis capilar. Propiedades tales como el pH y la composición del electrolito, afectan al sistema de una forma determinante, es por ello que se prefiere utilizar una solución buffer como electrolito. La composición del buffer puede mejorar la eficiencia así como la selectividad en muchos casos (Kuhn, 1993).

LA ELECCION DEL BUFFER.

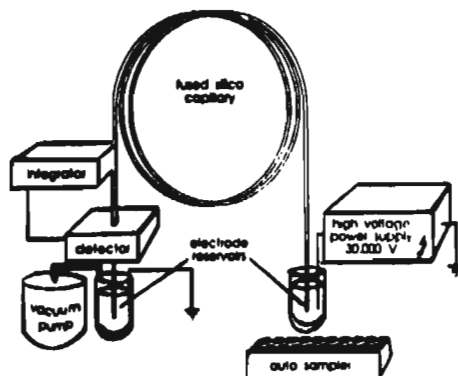
La elección del sistema buffer usado como solución electrolítica tiene una gran influencia sobre la separación y debe ser hecha cuidadosamente. Muchos sistemas buffer tienen capacidad sólo en un limitado rango de pH. Particularmente útiles son los buffers con alta capacidad (actúan en un amplio rango de pH). Una gran variedad de sistemas buffer pueden ser usados en electroforesis capilar. Muchos de ellos son adecuados para problemas específicos de separación, mientras que otros son utilizados para uso convencional (Kuhn, 1993).

EL pH.

El valor del pH de la solución electrolítica en la electroforesis capilar es el más importante parámetro de separación de un sistema. El pH del electrolito presenta una fuerte influencia sobre la carga neta, lo que afecta directamente la movilidad de la muestra (Kuhn, 1993).

5.3 EQUIPO (DESCRIPCION).

La electroforesis capilar es una técnica simple con respecto a la instrumentación necesaria. Se puede realizar la electroforesis capilar con un instrumento que consiste básicamente en un capilar de sílica fundida, una fuente de poder, un detector, un registrador y un sistema buffer. Los modernos instrumentos para la electroforesis capilar están equipados adicionalmente con un automuestreador para inyección de muestra que permite análisis en serie, columna termoestática y una computadora para el control instrumental y captura de los datos (Kuhn, 1993).



5.4 CONDICIONES DE OPERACION DEL EQUIPO.

LA COLUMNA CAPILAR.

La capacidad de la columna capilar para permitir el paso de luz UV es determinante para la detección de las muestras. De acuerdo a Engelhardt los capilares muestran una alta transparencia a la luz UV entre 190 y 210 nm (Engelhardt, 1992).

La preparación del capilar a utilizar es una operación que debe ser realizada con especial cuidado, ya que de ello depende la realización exitosa de la electroforesis capilar.

Los capilares usados deben ser cortados al tamaño adecuado para cada tipo de análisis en particular, dependiendo de las características de la muestra a analizar y el tiempo que se requiera para el análisis. Los capilares que son almacenados con solución buffer deben ser evitados. El solvente buffer puede evaporarse dejando cristales sólidos de sal los cuales obstruirían el capilar (Kuhn, 1993).

PREPARATIVOS PREVIOS A LA INYECCION.

La inyección de la muestra es un procedimiento crucial en la electroforesis capilar. Hasta un sistema electroforético optimizado produce separaciones insatisfactorias si la inyección

ha sido realizada sin el cuidado necesario.

Una de las mayores ventajas de la electroforesis capilar está en el hecho de que sólo se requiere un mínimo en volúmenes de muestra (por ejemplo: 20 μ l) para el análisis, pero sólo unos pocos nanolitros son realmente inyectados. En la práctica, se necesita un instrumento simple para permitir la introducción de la muestra en la escala de los microlitros. Sin embargo, volúmenes pequeños de muestra pueden evaporarse durante el tiempo del análisis, por lo que el uso de un vial es necesario, el cual puede ser cerrado por una tapa. Un microvial conteniendo aproximadamente 20 μ l de muestra es ensamblado en un vial de vidrio con un resorte. Durante la inyección el microvial asciende por el capilar y el electrodo para asegurar que el capilar se sumerja al fondo de la muestra. La evaporación del solvente en la muestra durante el análisis en serie, se minimiza por la adición de una pequeña cantidad de agua dentro del vial de vidrio, así se humedece el espacio superior en el vial. Se debe tener mucho cuidado de que no existan burbujas en la muestra en solución.

El buffer y la muestra en solución pueden contener impurezas disueltas o sólidas. Para minimizar estos problemas el buffer y la muestra deben utilizar en su preparación agua doblemente destilada y otros componentes de alta pureza. Se debe filtrar la solución final buffer a través de un filtro con poros de 0.2 - 0.4 μ m previniendo la obstrucción del tubo. Aunque muy pocas

veces se encuentran condiciones para la formación de burbujas, la desgasificación de las soluciones es también recomendada (Kuhn, 1993).

LA INYECCION.

Para la inyección, una presión debe ser aplicada a lo largo del capilar por: Alta presión o vacío.

En la práctica, el vial con buffer es reemplazado por el vial con la muestra, así que el capilar está inmerso en la solución de la muestra. Para permitir la introducción de la muestra, el vial-muestra es entonces presurizado (inyección a presión) o sometido a vacío. Después de que la inyección es completada el vial con la muestra es reemplazado por el vial con buffer y el proceso de separación puede entonces comenzar (Kuhn, 1993).

Una gran ventaja de la electroforesis capilar se halla en su automatización. Un automuestreador es una parte de este equipo en los modelos mas modernos (Reiner, 1993).

5.5 ALTERNATIVAS EN EL METODO DE DETECCION.

LOS DETECTORES USADOS EN LA ELECTROFORESIS CAPILAR.

Los detectores para electroforesis capilar han recibido una

gran atención en los años recientes, como una consecuencia directa de la capacidad de este método para detectar muestras muy pequeñas. Los requerimientos más importantes para el diseño de detectores adecuados para los sistemas de separación electroforética son:

- Tener un diseño tal, que los componentes de la muestra, no se mezclen al pasar por el detector.
- Tener una señal de ruido muy baja, de tal manera que los componentes que estén en pequeña cantidad, puedan ser distinguidos.
- Celdas para la detección de pequeños volúmenes.
- Baja contribución a la anchura de los picos (alta resolución).
- Alta sensibilidad.
- Gran rango para que el análisis cuantitativo se pueda llevar a cabo.
- Buena resistencia a cambios de temperatura.
- Confiable y fácil de usar.

Obviamente, aún no está disponible el detector que satisfaga todas estas propiedades. Para una aplicación en particular debe seleccionarse el sistema de detección más apropiado que se tenga.

El fin de un detector es el de monitorear la composición del líquido que pasa por el capilar y por lo tanto hacer posible un registro de la variación de la composición de una muestra con respecto al tiempo. Existen diferentes tipo de detectores, los

cuales tienen aplicaciones diferentes según el tipo de moléculas que se separen. Conociendo como trabaja un detector en términos generales, es posible determinar el detector que cubre mejor las necesidades particulares (Reiner, 1993).

Se han propuesto detectores basados en varios principios de operación, sin embargo, sólo algunos son lo suficientemente versátiles para usarse y producirse comercialmente. A continuación se mencionarán sólo aquellos que son más usados.

- 1 - Detector espectrofotométrico (UV/vis).
- 2 - Detector de índice de refracción.
- 3 - Detector de fluorescencia.

DETECTOR DE ESPECTROFOTOMETRICO (UV/vis).

Estos detectores son los de más uso y responden a aquellas sustancias que absorben luz visible o ultravioleta. Una gran cantidad de compuestos caen dentro de esta categoría, incluyendo sustancias aquellas de interés farmacéutico (Renier, 1993).

Existen diferentes categorías de detectores espectrofotométricos:

- a) *Detectores de longitud de onda fija.* Utilizan filtros para fijar la longitud de onda a 254 nm.
- b) *Detectores con longitud de onda seleccionable.* En éstos se

intercambian filtros, lo cual permite seleccionar diferentes longitudes de onda directamente de una lámpara de mercurio.

- c) *Detectores de longitud de onda variable.* Permiten una gran flexibilidad para la obtención de longitudes de onda.
- d) *Detectores de barrido (uv/vis).* La característica principal de este detector es que se puede pasar rápidamente por varias longitudes de onda durante el paso de una sustancia. Esto permite obtener un espectro de absorción para identificar la longitud de onda óptima para la muestra en particular (Reiner, 1993).

DETECTOR DE INDICE DE REFRACCION.

Este detector también es conocido como refractómetro diferencial. Se basa en el hecho de que la mayoría de los líquidos tienen diferente índice de refracción. El detector mide la diferencia entre la fase móvil pura y la muestra que pasa por la columna. Sin embargo, es poco popular por las siguientes razones: Tiene menos sensibilidad que otros detectores, es sensible a variaciones de temperatura y a los cambios de presión (Reiner, 1993).

DETECTOR DE FLUORESCENCIA.

La fluorescencia es una técnica muy efectiva cuando se realizan análisis de sustancias que existen en cantidades muy pequeñas (trazas).

Para especificar la definición de fluorescencia es necesario saber que cuando una molécula recibe energía pasa de un nivel de energía normal a un estado de energía conocido como excitado. Esta energía debe disiparse para que la molécula regrese a su estado normal de energía. Cuando la molécula regresa a su nivel normal de energía, instantáneamente produce una emisión de energía en forma de luz, entonces se dice que fluoresce.

El detector de fluorescencia aplica el principio anteriormente descrito para determinar concentraciones muy pequeñas de sustancias, lo que le permite ser un método de detección muy sensible (Reiner, 1993).

MANEJO DE LOS DATOS.

La salida de información de un detector es en forma de una señal eléctrica. Esta señal puede ser manejada de diversas maneras. La manera más simple de disponer de la información es llevarla a un registrador para papel. Esta es la manera más popular y económica de manejar la información.

Instrumentos alternativos al registrador en papel son desde un integrador de sistemas hasta computadoras de alta capacidad con software (programas) específico (Reiner, 1993).

INSTRUMENTOS COMERCIALES.

Al mismo tiempo del rápido desarrollo de la electroforesis capilar en la década de 1980, numerosos instrumentos han sido desarrollados y ahora están comercialmente disponibles.

Todos los instrumentos que hay en el mercado, se pueden usar en la aplicación de técnicas modificadas de electroforesis capilar.

Muchos instrumentos son equipados con un detector de columna de UV con una celda de volúmen en nanolitros. La aplicación más común es el rango de absorbancia de UV abajo de 190 nm, hacen que este detector sea el más popular.

Tres fabricantes ofrecen detectores de fluorescencia y dos de ellos ofrecen detectores de fluorescencia inducida por láser, lo que los hace más costosos.

Este tipo de detector puede ser usado en el análisis de fármacos o sus metabolitos en muestra biológicas como son sangre, suero u orina que requieren alta sensibilidad (Reiner, 1993).

5.6 USO Y APLICACIONES DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR EN EL LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD.

La gran mayoría de las moléculas de interés farmacéutico adquieren carga eléctrica superficial cuando están suspendidas en medios polares, por ejemplo, los ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos, hormonas, colorantes, etc. (Clausen, 1989).

Debido a sus características de tamaño, carga y su comportamiento en un campo eléctrico, estas sustancias pueden ser analizadas por métodos de separación eléctricos como la electroforesis capilar (Morrison, 1988., Clausen, 1989)

La electroforesis capilar es un método de separación simple y altamente sensitivo, en la actualidad es usado en una gran cantidad de disciplinas, entre éstas se encuentran: la biología, la biología molecular, la bioquímica, la hematología, la genética, la química orgánica, la química inorgánica, los análisis clínicos, la inmunología, la fisiología, la farmacología, la toxicología, etc., por mencionar sólo algunas.

Las áreas de aplicación se pueden describir en las siguientes categorías:

a) *Determinación de impurezas relacionadas.*- Esta es una de las más importantes determinaciones que se llevan a cabo en el

análisis de una substancia, ya que en ésta se determina que tipo de impurezas contiene la muestra analizada, por lo que este método nos permite conocer la naturaleza de impurezas presentes en la muestra analizada con total certeza.

b) *Ensayo de picos principales.*- La importancia de esta determinación radica en el hecho de conocer los componentes constitutivos de una muestra, el método de electroforesis capilar tiene la ventaja de poder realizar la determinación en condiciones que en otros métodos no puede operar. Ejemplo de ello lo encontramos cuando al analizar una muestra es necesario someterla a pH extremo (ya sea básico o ácido), las columnas cromatográficas generalmente no pueden trabajar en esas condiciones y se hace necesario tratar previamente la muestra antes de llevar a cabo su análisis por HPLC.

c) *Análisis quiral.*- Este tipo de análisis es fundamental dentro de algunas clases de industrias, entre ellas, la farmacéutica. ya que el poder diferenciar la utilidad de algunos compuestos con propiedades ópticas bien definidas, es primicia fundamental de algunos análisis.

d) *Confirmación de identidad.*- Esta es sin duda la más importante de las áreas de aplicación de este tipo de método analítico, ya que de él depende la confirmación de la existencia de la substancia analizada.

e) *Determinaciones estequiométricas.* Esta determinación es la que marca una diferencia fundamental entre el método de electroforesis capilar y los ya conocidos; ya que el primero es capaz de separar y diferenciar tipos estequiométricos de una sustancia que no pueden ser diferenciados por otro método.

Todas estas aplicaciones se pueden realizar en industrias, laboratorios o centros de investigación, donde sea necesario un análisis rápido, seguro, preciso y exacto (Altría, 1993).

La viabilidad del empleo de la electroforesis capilar para el análisis de sustancias de interés farmacéutico fué demostrada en 1987 usando un equipo básico (Fujiwara, 1987).

Desde entonces, están disponibles equipos comerciales de alta confiabilidad y el número de investigadores en el uso de esta técnica se ha incrementado rápidamente (Altría, 1993).

EL ANALISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO POR MEDIO DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR.

El análisis cualitativo en la electroforesis capilar provee información acerca de la identidad de la sustancia analizada por medio de la aparición de un pico característico en la gráfica. Este propósito viene acompañado por la comparación del tiempo de aparición (tiempo de retención) de un pico en particular con

datos de un compuesto conocido. Si tienen el mismo tiempo de retención, los compuestos son idénticos.

La comparación de picos por su tiempo de retención requiere condiciones experimentales altamente constantes. Pequeños cambios en las condiciones de operación como son: la temperatura, el pH del buffer, el campo eléctrico, etc., alteran la movilidad de los compuestos lo cual hace que no se identifiquen los picos adecuadamente. Resultados imprevistos pueden obtenerse si no se realizan los siguientes procedimientos sugeridos:

Primero, la regeneración (cambio frecuente) del buffer es esencial para mantener las características constantes de éste durante el desarrollo del análisis.

Segundo, la influencia de la temperatura por el calentamiento, calor, producido por la corriente eléctrica, es disminuido por el uso frecuente de un voltaje constante.

La alta reproducibilidad de los tiempos de retención necesitan de un efectivo control de temperatura para eliminar o minimizar variables dependientes de la temperatura (viscosidad, pH, etc.).

Tercero, la influencia del lavado del capilar y la secuencia de lavado fué estudiada por Smith y col. (1991), la mejor reproducibilidad se encontró cuando el capilar fué lavado entre

cada corrida.

El análisis cuantitativo provee información de la cantidad y la concentración de una sustancia que se encuentra en una muestra.

Esta información se obtiene de la altura o preferiblemente del área del pico obtenido de la gráfica de la muestra. La altura del pico se puede leer directamente de la gráfica, a diferencia de la determinación del área del pico, que requiere de un sistema de integración. La cantidad desconocida de la sustancia puede ser calculada por la comparación del área del pico con el área de los picos de las muestras de referencia con concentración conocida.

La viabilidad del empleo de la electroforesis capilar para el análisis de sustancias de interés farmacéutico fué demostrada en 1987 usando un equipo básico (Fujiwara, 1987., Altria, 1987). Existen ejemplos de que la mayoría de las drogas comúnmente comercializadas por los laboratorios farmacéuticos ya han sido analizadas en el laboratorio de control de calidad por electroforesis capilar (Altria, 1993).

La electroforesis capilar es una técnica relativamente nueva en la separación y ya han aparecido varios artículos con múltiples aplicaciones en el control de la calidad. Todos reportan que si se sigue un cuidadoso examen de la condiciones de operación, se obtendrán resultados altamente satisfactorios en las corridas.

Mención especial merecen la determinación de algunas sustancias (Ej:penicilinas, sulfonamidas, cefalosporinas, neomicina, quinina, benzodiacepinas, diltiazem, ranitidina, cimetidina, teofilina, testosterona, paracetamol, barbitúricos, etc...) analizadas comúnmente en la industria farmacéutica y cuyo análisis es complicado por los métodos tradicionales de análisis.

ANALISIS DE DROGAS.

Las drogas son un grupo muy heterogéneo de compuestos que cubren ácidos, bases y sustancias neutras.

Drogas de tipo farmacéutico (ingredientes activos) y fármacos (formas de dosificación) son analizados de forma idéntica, verificando el contenido del principio activo y su pureza. Además de identificar los productos de degradación después de un período de almacenamiento o después de su fecha de caducidad. La identificación se realiza con la comparación de un estandar de referencia con la muestra. Es rutinario el realizar la comparación del tiempo en que aparece el pico problema y el pico del estandar de referencia. El contenido del ingrediente activo es determinado por la relación de áreas de pico, entre las áreas de pico de la muestra y las áreas de pico del estandar de referencia con concentración conocida (estandar externo). Para la determinación de impurezas se requiere la cuantificación de productos en presencia de grandes cantidades de muchos

compuestos. En general el sistema de detección debe ser tan sensible que pueda detectar contaminantes del orden de 0.01% y poder cuantificar picos arriba del orden de 0.05%. Para este análisis de pureza se requiere (Kuhn, 1993):

- a) Alta eficiencia en la separación de compuestos.
- b) Un sistema de detección apropiado para la muestra.

Es admirable que al poco tiempo que apareció la electroforesis, haya tenido un gran desarrollo, dando grandes frutos en la investigación de vanguardia en el campo farmacéutico. Estas aplicaciones cubren un amplio rango, desde pequeños iones hasta moléculas muy complejas. Se sabe que actualmente algunas de las más importantes aplicaciones de la electroforesis capilar, fueron desarrolladas en las últimas dos décadas.

Una gran cantidad de aplicaciones de electroforesis capilar se han desarrollado para resolver problemas analíticos especiales, la electroforesis capilar convencional se puede aplicar para sustancias que tienen carga eléctrica neta (positiva o negativa) pero no para sustancias neutras. por lo que se ha desarrollado un tipo de electroforesis capilar que puede ser aplicado a este último caso, la electroforesis capilar micelar, merece atención especial como una subclase de la electroforesis capilar, a continuación se mencionarán algunas de sus características:

La electroforesis capilar micelar (también conocida como

cromatografía electrocinética micelar, cuyas siglas en inglés son MEKC), permite el análisis de moléculas sin carga, esto extiende el rango de aplicación de la electroforesis capilar. El primer trabajo sobre esta técnica fué presentado por Terabe y col. (1984, 1985). Que mediante el uso de surfactantes (moléculas que contienen una región hidrofílica y una región hidrofóbica) son capaces de formar micelas (agregados moleculares) facilitando la separación.

LA VALIDACION EN LA ELECTROFORESIS CAPILAR.

Los métodos usados para el análisis de fármacos han sido cuidadosamente validados en sus características de funcionamiento tales como exactitud, precisión, linealidad, selectividad, límite de cuantificación y detección (Kuhn, 1993).

EJEMPLO DE UN METODO DE VALIDACION DE ELECTROFORESIS CAPILAR (LA QUINOLONA) (ALTRIA, 1993).

Una clase alternativa de fármacos se han desarrollado como complemento a los antibióticos tradicionales, debido al desarrollo de resistencia de muchos microorganismos. Uno de estos grupos es el de las quinolonas en la cual la Ciprofloxacina es la más activa.

Antibióticos como las quinolonas tienen su límite de

solubilidad en pH de 2 y de 11, presentando considerables problemas en su análisis por HPLC. Es posible desarrollar un método adecuado por HPLC para su análisis, sin embargo, se prefiere la electroforesis capilar por ser más adecuada para las condiciones de operación, que son rápidamente desarrolladas y que se validaron, en el ejemplo a citar, para la separación y cuantificación de este compuesto. La validación del método incluye la medición de la precisión, linealidad, la determinación de los límites de cuantificación y de detección.

Para la validación del método por electroforesis capilar, se siguieron los mismos lineamientos que se sugieren para la validación de un método para HPLC.

LINEARIDAD.

En la práctica usual, se cumple la determinación de la linealidad (que se comporta como una línea recta), en un amplio rango de concentraciones de la muestra, que asegura un rango lineal con el sistema de detección usado.

Para el pico obtenido en el ensayo, se probó la linealidad del método de electroforesis capilar en un rango de 1-150% de la concentración (0.5 mg/ml).

PRECISION Y TIEMPO DE MIGRACION

El concepto de precisión al igual que en el HPLC nos indica la

capacidad del método para reproducir un mismo resultado a una misma concentración de una muestra específica y está determinada por el cálculo de la desviación estandar. En este caso la muestra fué inyectada (0.5 mg/ml) 10 veces y se obtuvo un valor aceptable de desviación estandar de 0.6 % para el pico obtenido. La desviación estandar para el tiempo de migración fué de 0.4 %.

LIMITE DE CUANTIFICACION.

Se define el límite de cuantificación como la más pequeña concentración de muestra que puede ser reproduciblemente cuantificada, cerca de la línea basal; En este caso la muestra conteniendo un equivalente de 0.3 % de la concentración (0.5 mg/ml) pudo ser cuantificada.

LIMITE DE DETECCION.

Se define como la más pequeña concentración que puede ser claramente detectada cerca de la línea base. Se obtuvo la solución conteniendo el equivalente a 0.1 % de la concentración (0,5 mg/ml).

La validación del método muestra buenos resultados en términos de linealidad, precisión, niveles mínimos de detección y de cuantificación. Además que los picos obtenidos por el disolvente no interfieren en la cuantificación (Altria, 1993).

Los resultados obtenidos son comparables con los esperados para un método de HPLC. Sin embargo, los datos que se obtienen por HPLC no son tan confiables, en comparación con los generados por la electroforesis capilar, debido al pH usado (básicamente por dos razones, primero: la solubilidad de la muestra sólo se obtiene en un rango estrecho de pH y segundo : las columnas de HPLC sólo funcionan a determinados rangos de pH y un pH extremo puede dañarlas e incluso inutilizarlas) durante el análisis (Altria, 1993).

Las condiciones de uso para el equipo de electroforesis capilar fueron:

A la muestra se le aplicó un voltaje de +20 kV por 20 minutos; el detector fué utilizado en un rango de detección UV a 272 nm, con una temperatura de operación de 30° C; el capilar utilizado medía 72 cm de largo por 50 µm de diámetro interno y era de sílica fundida; el electrolito usado fué Borax 50 mM con un ajuste de pH a 1.5, la muestra se preparó a una concentración de 0.5 mg/ml disuelta en NaOH 0.1 M (Altria, 1993).

5.7 VENTAJAS DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR SOBRE EL HPLC.

Se mencionó anteriormente una de las ventajas de la electroforesis capilar con respecto a el método por HPLC, el uso de un pH extremo (muy ácido o muy básico) para la preparación de

la muestra, ya que estas condiciones afectarían a las columnas de HPLC.

Se ha encontrado que con la electroforesis capilar se obtiene una alta eficiencia, selectividad, simetría de picos y velocidad para realizar el análisis mucho mayor comparada a la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Otra gran ventaja estriba en los volúmenes de reactivos y muestras que en la electroforesis capilar es del orden de μl , mientras que en el HPLC es de ml ; un ejemplo de lo anteriormente mencionado se muestra en la determinación de las drogas consideradas ilícitas (morfina, heroína, codeína, diazepam, cocaína, metadona, etc).

La cromatografía líquida de alta resolución también ha sido empleada para la determinación de las drogas ilícitas pero en general carece del poder de resolución de la electroforesis capilar (Verpoorte, 1984., Lurie, 1986).

Para una parte de muestras de las drogas ilícitas el HPLC (Wittwer, 1983., Lurie, 1983., Krull, 1986., Lurie, 1990) proporciona una resolución adecuada, pero muestra picos pobres para muchos componentes básicos. Muchas de estas determinaciones de drogas requieren de tratamientos previos a la muestra y la separación puede ser muy larga (Lurie, 1990).

Según el autor, se obtuvieron aproximadamente 35 picos. Los

estudios realizados por HPLC con detector de arreglo de diodos y cromatografía de gases mostraron que muchos de los resultados cromatográficos no eran homogéneos (Weinberger, 1991).

Para la separación por electroforesis capilar se utiliza un buffer acuoso, con las siguientes condiciones: un capilar de 100 cm x 50 μ m, un voltaje de 25 kV, temperatura: 50°C, pH 8.5 y un detector con una longitud de onda de 210 nm (Weinberger, 1991).

Dando crédito a la publicación, se encontró que los resultados tienen una buena capacidad de resolución (separación entre un pico y otro) de los picos. Aproximadamente el doble de los resultados fueron analizados satisfactoriamente por la electroforesis capilar que por HPLC (Weinberger, 1991).

El sistema de electroforesis capilar es excelente considerando que no requiere de tratamientos específicos de la muestra y es aplicable a una larga variedad de muestras, especialmente aquellas a las que es difícil analizar por HPLC y por cromatografía de gases (Weinberger, 1991).

Entre las principales ventajas de la electroforesis capilar con respecto al HPLC tenemos:

- 1.- Un volumen mucho menor de reactivos utilizados.

2.- No requiere de tratamientos especiales para poder analizar una muestra.

3.- Puede trabajar en condiciones extremas de pH.

4.- No requiere de una columna especial para cada muestra.

5.- El poder de resolución es mucho mayor (en el caso de la electroforesis es de 900,000 platos teóricos, mientras que el del HPLC es de 100,000) (Weinberger, 1991).

CAPITULO VI
RESULTADOS Y DISCUSION.

6.1 ALGUNOS EJEMPLOS DEL USO DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR EN EL CONTROL DE CALIDAD.

Las aplicaciones de la electroforesis capilar en el control de calidad farmacéutico pueden describirse en diferentes categorías: La determinación de los picos principales en las muestras analizadas, el análisis de impurezas en la muestra, confirmación de la identidad de la sustancia analizada.

Un estudio de las áreas cubiertas y de algunas sustancias de interés farmacéutico que han sido analizadas por medio de la electroforesis capilar (todos éstos son métodos ya probados e incluso usados ya en algunos países desarrollados. Desde 1987, existe una parte del Journal Chromatography dedicada a la electroforesis capilar, donde han aparecido artículos dedicados a sustancias utilizadas comúnmente en la industria farmacéutica) se muestra a continuación:

Antibióticos: Penicilinas (Swartz, M. 1991), Sulfonamidas (Ng, C.L. 1992), Bencilpenicilina (Hoyt, A.M. 1989), Cefalosporinas (Nishi, H. 1989), Acetilcefuroxima (Altria, K.D. 1990), Neomicina (Ackermans, M.T. 1992).

Agente contra el paludismo: Quinina (Altria, K.D. 1988).

Antidepresores: Fluparoxam (Altria, K.D. 1991), Benzodicepinas (Johansson, M. 1991), Dilitiazem (Nishi, H. 1990).

Antiulcerosos: Ranitidina (Altria, K.D. 1990), Cimetidina (Soini, H. 1991, Arrowood, S. 1991).

Broncodilatadores: Inolina (Nishi, H. 1990b), Salbutamol (Ackermans, M.T. 1992b), Teofilina (Thormann, W. 1992).

Esteroides: Corticosteroides (Miyashita, Y. 1990), Testosterona (Vindevogel, J. 1991).

Anticancerígeno: Metotrexato (Roach, M.C. 1988).

Analgésicos: Varios (Moring, S.E. 1990), Paracetamol (Perrett, D. 1992).

Agentes mucolíticos: Carboximetilcisteína (Tanaka, Y. 1990).

Drogas de abuso: Barbitúricos (Thormann, W. 1991), Varios (Wernly, P. 1992).

Antimigraña: Sumatriptan (Altria, K.D. 1993).

Vitaminas: Varias (Jegle, U. 1993).

6.2 INTERPRETACION DE RESULTADOS EN LA ELECTROFORESIS CAPILAR.

Para obtener la información de la identidad de los compuestos y su cuantificación se mide directamente el tiempo de retención y el área de cada pico en particular, comparando los datos obtenidos con los de un compuesto conocido. Si resultan tener el mismo tiempo de retención y la misma movilidad electroforética, los compuestos son los mismos y la cuantificación se hace comparando el área obtenida con el área de un compuesto de concentración conocida (Kuhn, 1993).

La comparación de picos requiere condiciones experimentales estrictamente constantes, por lo que es recomendable seguir las indicaciones dadas.

CAPITULO VII
CONCLUSIONES

7.1 CONCLUSION.

En los años anteriores, la electroforesis capilar ha pasado de ser una curiosidad de laboratorio a un método establecido para la separación y el análisis en el control de calidad de los países industrializados. Las áreas de aplicación se establecen en categorías como la determinación de impurezas, el ensayo de los picos principales, confirmación de identidad, etc. Con nuevos procedimientos químicos y de separación que están siendo actualizados continuamente, se puede anticipar un amplio campo de aplicaciones en los años siguientes. En la actualidad sus aplicaciones son muy diversas, van desde la determinación de metabolitos en muestras biológicas hasta el análisis de iones en macromoléculas como las proteínas.

Otros avances sólo son cuestión de tiempo. En muchos aspectos el HPCE (Electroforesis Capilar de Alta Resolución) es el siguiente paso en el desarrollo analítico después del HPLC de los 70's y los 80's. En poco tiempo el HPLC se convirtió en un método analítico que ahora es rutinariamente usado por los laboratorios de control de calidad alrededor del mundo. Hasta hoy, todavía es el más valioso método de separación para sustancias orgánicas y biológicas. Una diferencia, sin embargo, entre el desarrollo del HPCE relacionado al HPLC es que la velocidad de desarrollo del HPCE es más rápida debido a la experiencia acumulada de el HPLC.

Las predicciones para las futuras aplicaciones del HPCE son altamente positivas. En los próximos años veremos el rápido crecimiento de éste en aplicaciones muy diversas. Una gran variedad de problemas serán mejor resueltos usando esta técnica.

Se está demostrando que la electroforesis capilar es un método analítico que provee una mejor separación, un tiempo de análisis menor y un consumo de reactivos de alta pureza inferior a los de el HPLC. Lo que conlleva un ahorro económico, de tiempo y de recursos.

La electroforesis capilar de alta resolución tiende hacia la miniaturización. Realmente los estudios están desarrollando electroforesis capilar sobre chips (Guzman, 1993). Haciendo que el método pueda ser completamente compatible con el análisis de drogas en el laboratorio de control de calidad.

La rapidez y eficiencia de la electroforesis capilar nos dice que aparecerán varias aplicaciones para moléculas de diferentes características, principalmente en aquellas cuya determinación sea complicada por otros métodos analíticos.

Se necesita realizar un esfuerzo en nuestro país para hacer que el HPCE se convierta en un importante método de separación en los 90's. Para su implementación en el laboratorio de control de calidad se deben tomar en cuenta los siguientes puntos:

Primero, se han de difundir las ventajas de su uso y posteriormente incrementar el número de aplicaciones, haciendo énfasis en aquellos ya probados y con resultados aceptables, lo cual servirá para ampliar y modernizar los métodos existentes actualmente en el laboratorio de control de calidad.

Segundo, la instrumentación y las necesidades químicas deben ser más sólidas para convertirlo en un amplio método de rutina.

Tercero, la electroforesis capilar emerge como un método práctico y versátil que es compatible con los automuestreadores, que permite manejar un número considerable de muestras lo que conlleva a una mejor administración de los recursos y a un aumento en la productividad.

Se puede concluir que la electroforesis capilar es un método de separación simple, pero altamente sensible, cuyas aplicaciones en la determinación de sustancias de interés farmacéutico está en pleno desarrollo y que es usado en una amplia gama de disciplinas tan diversas como la industria química, la industria petrolera, la industria alimentaria, la industria cosmética, etc.

BIBLIOGRAFIA.

1. - Ackermans, M.T., Everaerts F.M. and Beckers, J.L. J. *Determination of aminoglycoside antibiotics in pharmaceutical by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection coupled with micellar electrokinetic capillary chromatography.* Chromatogr. 606:229-235, (1992).
2. - Ackermans, M.T., Beckers, J.L., Everaerts, F.M. and I.G.J.A. *Comparison of isotachopheresis, capillary zone electrophoresis and high-performance liquid chromatography for the determination of salbutamol, terbutaline sulphate and fenoterol hydrobromide in pharmaceutical dosage form.* J. Chromatogr. 590:341-353, (1992).
3. - Altria, K.D. and Chanter, Y.L. *Validation capillary electrophoresis. Method for the determination of a quinolone antibiotic and its related impurities.* J. Chromat. 652:459-463, (1993).
4. - Altria, K.D. *Determination of salbutamol related impurities by capillary electrophoresis.* J. Chromatogr., 634:323-328, (1993).

5. - Altria, K.D. *Quantitative aspects of the application of capillary electrophoresis to the analysis of pharmaceuticals and drug related impurities.* J. Chromatogr. 646:245-257, (1993).
6. - Altria, K.D. and Filbey, S.D. *Determination of pharmaceuticals drugs for the capillary electrophoresis.* J. Liq. Chromatogr. 16:2281-2288, (1993).
7. - Altria, K.D. and Smith, N.W. *Pharmaceutical analysis by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic capillary chromatography.* J. Chromatogr. 538:506-509, (1991).
8. - Altria, K.D. and Rogan, M.M. *Electrokinetic capillary chromatography in the analysis pharmaceutical.* J. Pharm. Biomed. Anal. 8:1005-1011, (1990).
9. - Altria, K.D. and Simpson, C.F. *presented at 1st International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Barcelona, September 1987.* J. Pharm. Biomed. Anal. 6:801, (1988).
10. - Arrowood, S. and Hoyt, A.M. *Determination of cimetidine in pharmaceutical preparations by capillary zone electrophoresis.* J. Chromatogr. 586:177-180, (1991).

- 11.- Balchunas, A.T. and Sepaniak, M. Gradient elution for micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Anal. Chem.* 60:617-621, (1988).
- 12.- Bobbit, J.M. Schwarting, A.E. and Gritter, R.J. *Introduction to Chromatography*, New York, Reinhold Publishing Corporation, New York. pp. 25-30, (1968).
- 13.- Clausen, J. *Técnicas Inmunoquímicas para la Identificación y Estimación de Macromoléculas*. Ed el Manual Moderno, México. pp. 123-127, (1989).
- 14.- Chrambach, A. *The practice of quantitative gel electrophoresis*. VCH Weinheim. pp. 85-93, (1985).
- 15.- Cohen, A.S. and Karger, B.L. *High-Performance Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Peptides and Proteins*. *J. Chromatogr.* 397:409-417, (1987).
- 16.- Cohen, A.S., Terabe, S., Smith, J.A. and Karger, B.L. *High performance capillary electrophoretic separation of bases, nucleosides and oligonucleotides: Retention and manipulation via micellar solutions and metal additives*. *Anal. Chem.* 59:1021-1027, (1987).

- 17.- Cohen, A.S., Najarian, D.R., Paulus, Guttman, A., Smith, J.A. and Karger, B.L. *Rapid Separation and Purification of Oligonucleotides by High-Performance Capillary Gel Electrophoresis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:9660-9663, (1988).
- 18.- Dose, E.V. and Guiochon, G.A. *Internal Standardization Techniques for Capillary Zone Electrophoresis*. Anal. Chem. 63:1154-1158, (1991).
- 19.- Engelhardt, H. *Lecture at "HPLC/CE '92 Bùrgenstock Symposium" September 8-9, Bùrgenstock, Switzerland*. pp. 15, (1992).
- 20.- Equipar, Comp. Walter, L. *Introducción a la Electroforesis*. Pharma News. pp. 20-22, (1994).
- 21.- Feigenbaum, A.V. *Control total de la calidad*. Compañía Editorial Continental, 2a. Ed., México. pp. 30-45, (1986).
- 22.- Fujiwara, S. and Honda, S. *Determination of ingredients of antipyretic analgesic preparations by micellar electrokinetic capillary chromatography*. Anal. Chem., 59:2773-2776, (1987).
- 23.- Giddings, J.C., Eligrushka and Keller, R.A. *Advances in Chromatography*. Marcel Decker Inc. New York. 12:185-190, (1975).

- 24.- Goodman, A. *Diccionario Ilustrado de Química*. Ed. Everest, España. pp. 101, (1986).
- 25.- Grassman, W. Hanning, K. and Knedel, M. *Deut. Med. Wschr.* 76:333, (1951).
- 26.- Grose, J., Balchunas, A.T., Swaile, D.F., Sepaniak, M.J. *HRC & CC, J. High. Resolut. Chromatogr. Commun.* 11:554-559, (1988).
- 27.- Guttman, A., Cohen, A.S., Heiger, D.N., and Karger, B.L. *Analytical and Micropreparative Ultrahigh Resolution of Oligonucleosides by Polyacrylamide Gel High-Performance Capillary Electrophoresis.* *Anal. Chem.* 62:137-141, (1990).
- 28.- Guzman, N.A. (ed). *Capillary Electrophoresis Technology.* *Chromatographic Science Series.* U S A. 64:132-145, (1993).
- 29.- Hanning, K. *Electrophoresis.* Academic Press, New York. 2:423, (1967).
- 30.- Hjertén, S. *Free Zone Electrophoresis.* *Chromatogr. Rev.* 9:122-239, (1967).
- 31.- Hjertén, S.J. *High Performance Electrophoresis: The Electrophoretic Counterpart of High-Performance Liquid Chromatography.* *J. Chromatogr.* 270:1-6, (1983).

- 32.- Hjertén, S. *High Performance Electrophoresis - Elimination of Electroendosmosis and Solute Adsorption*. J. Chromatogr. 347:189-198, (1985).
- 33.- Howard, S.G. and Shelly, J.G. *Cómo mejorar la calidad y la productividad con el método Deming*. Ed. Norma. Colombia. pp. 5-10, (1989).
- 34.- Hoyt, A.M. and Sepaniak. *Electrophoresis Capillary in Quantitative Analysis*. Anal. Lett. 861:231-234, (1989).
- 35.- Huang, X., Gordon, M.J., Zare, R.N., *Bias in Quantitative Capillary Zone Electrophoresis Caused by Electrokinetic Sample Injection*. Anal. Chem. 60:375-377, (1988).
- 36.- Issaq, H.J. Atama, G.M., Muschik and Janini, G.M. *The Effect of Electric Field Strength, Buffer Type and Concentration on Separation Parametres in Capillary Zone Electrophoresis*. Chromatographia. 32:155-161, (1991).
- 37.- Jegle, U. *Separation of water-soluble vitamins via high performance capillary electrophoresis*. J. Chromatogr. 652:495-501, (1993).

- 38.- Jandik, P. and Jones, W.R. *Optimization of Detection Sensitivity in the Capillary Electrophoresis of Inorganic Anions*. J. Chromatogr. 546:431-443, (1991).
- 39.- Johansson, M. Pavelka, R. and Henion, J.D. *Determination of small drug molecules by capillary electrophoresis atmospheric pressure ionization mass spectrometry*. J. Chromatogr. 559:515-520, (1991).
- 40.- Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D. *Zone electrophoresis in open tubular glass capillaries*. Anal. Chem. 53:1298-1302, (1981).
- 41.- Jorgenson, J.W. *Capillary Zone Electrophoresis*. ACS Symp. Ser. 335:182-198, (1987).
- 42.- Jorgenson, J.W. and Lukacs, K.D. *High Resolution Separations Based on Electrophoresis and Electroosmosis*. J. Chromatogr. 218:209-216, (1981).
- 43.- Jorgenson, J.W. and Lukacs, K.D. *Zone Electrophoresis in Open Tubular Glass Capillaries*. Anal. Chem. 53:1298-1302, (1981).
- 44.- Jorgenson, J.W. and Lukacs, K.D. *Capillary Zone Electrophoresis*. Science 222:266-272, (1983).

- 45.- Kuhn, R., Harfsteter, S. *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*. Springer-Verlag Berlin, Printed in Germany. pp. 45-53, (1993).
- 46.- Krull, I.S., Lurie, I.S. In *Forensic Science*; Davies, G. Ed.; American Chemical Society: Washington, DC, pp. 153-200, (1986).
- 47.- Lauer, H.H. and McManigill, D. *Capillary Zone Electrophoresis of Proteins in Untreated Fused Silica Tubing*. *Anal. Chem.* 58:166-170, (1986).
- 48.- Lurie, I.S. In *High Performance Liquid Chromatography*; Lurie, I.S., Wittwer, J.D., Eds.; Marcel Dekker: New York. pp 161-264, (1983).
- 49.- Lurie, I.S. *Liquid Chromatography-Gas Chromatography*. *J. Liq. Chromatogr.* 8:454-466, (1990).
- 50.- Lurie, I.S., Moore, J.M., Cooper, D.A. In *Ultratrace Analysis of Pharmaceuticals and Other Compounds of Interest*; Ahuja, S. Ed. John Wiley and Sons. New York. pp. 319-352, (1986).
- 51.- Miyashita, Y., Terabe, S. and Nishi, H. *Capillary Electrophoresis Analysis*. *Chromatogram*. 11:7, (1990).

- 52.- Moring, S.E., Colburn, J.C., Grossman, P.D. and Lauer, H.H.
Analytical Aspects of an Automated Capillary Electrophoresis System. LC-GC. 8:34-46, (1990).
- 53.- Morrison, R.T. and Boyd, R.N. *Química Orgánica.* Ed. Iberoamericana, 2da. edición (1988).
- 54.- Mosher, R.A. Saville, D.A. and Thormann, W. *The Dynamics of Electrophoresis.* VCH Weinheim. pp. 79-83, (1992).
- 55.- Ng, C.L., Lee, H.K. and Li, S.F.Y. *Systemic optimization of capillary electrophoretic separation of sulphonamides.* J. Chromatogr. 598:133-138, (1992).
- 56.- Nishi, H., Tsumagari, N., Kakimoto, T., Terabe, S. J. *Separation of water-soluble vitamins by micellar electrokinetic chromatography.* Chromatogr. 465:331-342, (1989).
- 57.- Nishi, H., Tsumagari, N., Kakimoto, T., Terabe, S. J. *Separation of Beta-lactam antibiotics by micellar electrokinetic chromatography of ionic substances.* Chromatogr., 477:259-270, (1989).
- 58.- Nishi, H., Tsumagari, N. and Terabe, S. *Effect of tetraalkylammonium salts on micellar electrokinetic*

chromatography of ionic substances. *Anal. Chem.*, 61:2434-2439, (1989).

59.- Nishi, H., Fukuyama, T., Matsuo, M. and Terabe, S. J. *Separation and determination of lipophilic corticosteroids and benzothiazepin analoges by micellar electrokinetic chromatography using bile salts.* *Chromatogr.* 513:279, (1990).

60.- Nishi, H., Fukuyama, T., Matsuo, M. and Terabe, S. *Chiral separation of trimetoquinol hydrochloride and related compounds by micellar electrokinetic chromatography using sodium taurodesoxycholate solutions and application to optical purity determination.* *Anal. Chim. Acta.* 236:281-286, (1990b).

61.- Perrett, D. and Ross, G. *Trends. Capillary Electrophoresis in the practice.* *Anal. Chem.* 11:156, (1992).

62.- Petrucci, R.H. *Química General.* Fondo Educativo Interamericano. pp. 243, (1984).

63.- Porath, J. *In Methods in Immunology and Immunochemistry* Williams, C.A. and Chase, M.W. Eds Academic Press. New York. 2:67, (1968).

64.- Reiner, W. *Electrophoresis in Practice: A Guide to Theory and Practice.* Ed VCH. RFA. pp. 57-65, (1993).

- 65.- Remington. *Farmacia*. tomo II. Panamericana. 17a. Ed. Argentina. pp. 235, (1992).
- 66.- Rilbe, M., Simpson, F. Whitaker, M. *Electrophoresis Techniques*. Ed. Colin. Academic Press. London. pp 14-25, (1983).
- 67.- Roth, J.H., Thomas, H., Dieter, S. *Determination of picogram amounts of lipoxin A4 and lipoxin B4 by chemical high performance chromatography with electroforesis detection*. *J. Chromatogr.* 428:129, (1988).
- 68.- Rioduero. *Diccionario de Química*. Ed Ediplesa, Primera edición. pp. 100, (1980).
- 69.- Rogan, M.M. and Altria, K.D. *Introduction to Quantitative Applications of Capillary Electrophoresis in Pharmaceutical Analysis*. Beckman Instruments, USA. pp. 2-10, (1994).
- 70.- Rose, D.J. and Jorgenson, J.W. *Fraction Collector for Capillary Zone Electrophoresis*. *J. Chromatogr.* 438:23-34, (1988).
- 71.- Salomon, K., Burgi, D.S., Helmer, J.C. *Evaluation of Fundamental Properties of a Silica Capillary in Capillary Electrophoresis*. *J. Chromatogr.* 559:69-80, (1991).

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- 72.- Smith, S.C., Strasters, J.K. and Khaledi, M.G. *Influence of Operating Parameters on Reproducibility in Capillary Electrophoresis*. *J. Chromatogr.* 559:57-68, (1991).
- 73.- Soini, H., Tsuda, T. and Novotny, M.V. *Electrochromatographic solid-phase extraction for determination of cimetidine in serum by micellar electrokinetic capillary chromatography*. *J. Chromatogr.* 559:547-558, (1991).
- 74.- Sthal, E., ed: *Thin-Layer Chromatography a Laboratory Handbook*, 2nd ed. New York. Springer-Verlag, Inc. pp. 75-83, (1969).
- 75.- Stites, P.D. *Inmunología Básica y Clínica*. ed. el Manual Moderno, 6a ed. México. D.F. pp. 242, (1988).
- 76.- Svensson, H. and Brattsten. *Electrokinetic Capillary Chromatography in the Analysis Pharmaceutical*. *I. Ark. Kemi* 1:401, (1949).
- 77.- Swartz, M. *Capillary Electrophoresis in Separations the Pharmaceuticals Samples*. *J. Liq. Chromatogr.* 14:923, (1991).
- 78.- Tanaka, Y. and Thormann, W. *Capillary Zone Electrophoresis*. *Electrophoresis*. 11:760, (1990).

- 79.- Terabe, S., Otsuka, K. and Ando, T. *Electrokinetic Chromatography with Micellar Solution and Open-Tubular Capillary*. Anal. Chem. 57:834-841, (1985).
- 80.- Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A. Ando, T. *Electrokinetic Separations with Micellar Solutions and Open-Tubular Capillaries*. Anal. Chem. 56:111-113. (1984).
- 81.- Thormann, W., Meier, P., Marcolli, C. and Binder, F. *Analysis of barbiturates in human serum and urine by highperformance capillary electrophoresis micellar electrokinetic capillary chromatography with a column multi wavelength detection*. J. Chromatogr. 545:445-460, (1991).
- 82.- Thormann, W., Minger, A., Molteni, S. and Gebauer, P. J. *Determination of substituted purines in bodyfluids by micellar electrokinetic capillary chromatography with direct sample injection*. Chromatogr. 593:275-288, (1992).
- 83.- Tyler, V. E., Brady, L.R., Robbers, J.E. *Farmacognosia*. Ed. El Ateneo, 2a. ed. Argentina. pp. 21-24, (1979).
- 84.- Vanorman, B.B., Liversidge, G.G., McIntire, G.L., Olefirowicz, T.M. and Ewing, A.G. *Effects of Buffer Composition on Electroosmotic Flow in Capillary Electrophoresis*. J. Microcol. Sep. 2:176-180, (1990).

- 85.- Verpoorte, R. and Svendsen, A.B. *Chromatography of Alkaloids, Part B: gas-liquid chromatography and high performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography Library, Elsevier, Amsterdam. 23-B:85-96, (1984).
- 86.- Vindevogel, J. and Sandra P. *Resolution optimization in micellar electrokinetic chromatography: use of Plackett-Burman statistical design for the analysis of testosterone esters*. Anal. Chem. 63:1530-1536, (1991).
- 87.- Wainwright, A.P. *Application of Capillary Electrophoresis in Analysis Microbiological*. Microcol. 2:166-175, (1990).
- 88.- Wallingford, R.A., Ewing, A.G. *Retention of ionic and nonionic catecols in capillary zone electrophoresis with micellar solutions*. J. Chromatogr. 441:299-309, (1988).
- 89.- Weinberger, R. *Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography of Illicit Drug Substances*, Anal. Chem. 63:823-827, (1991).
- 90.- Wernly, P. and Thormann, W. *Analisis of illicit drugs in human urine by micellar electrokinetic capillary chromatography with on-column fast scanning polychrome absorption detection*. Anal. Chem. 63:2878, (1992).

- 91.- Wittwer, J.D. In *High-Performance Liquid Chromatography*.
Lurie, I.S., Wittwer, J.D., Eds., Marcel Dekker: New York. pp
53-160, (1983).
- 92.- Zweig, G., and Sherma, J., eds.: *Handbook of Chromatography*,
Vols. I-II, Cleveland, Ohio, CRC Press. pp. 135-142, (1972).