

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
“ZARAGOZA”**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA
ANALÍTICA POR ELECTROFORESIS CAPILAR
PARA TABLETAS EFERVESCENTES CON
MULTIACTIVOS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:**

JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ PÁEZ

**ASESORES: Q.F.B. Ma. TERESA MENDOZA MATA
Dra. Ma. GABRIELA VARGAS MARTÍNEZ**

AGOSTO 2007



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.

En Paz

*Muy cerca de mi ocaso, yo te bendigo, vida,
porque nunca me diste ni esperanza fallida,
ni trabajos injustos, ni pena inmerecida;
porque veo al final de mi rudo camino
que yo fui el arquitecto de mi propio destino;
que si extraje la miel o la hiel de las cosas,
fue porque en ellas puse hiel o mieles sabrosas:
cuando planté rosales, coseché siempre rosas.*

*...Cierto, a mis lozanías va a seguir el invierno:
¡mas tú no me dijiste que mayo fuese eterno!*

*Hallé sin duda largas noches de mis penas;
mas no me prometiste tú sólo noches buenas;
y en cambio tuve algunas santamente serenas...*

*Amé, fui amado, el sol acarició mi faz.
¡Vida, nada me debes! ¡Vida, estamos en paz*

Amado Nervo

Sinodales

Q. Ma. Teresa Mendoza Mata.

Dra. Ma. Gabriela Vargas Martínez.

Q.F.B. Francisca Robles López.

Q.F.B. Leticia Cecilia Juárez

Q.F.B. Graciela Rojas Vásquez

A quienes les agradezco infinitamente el interés y dedicación en la revisión del presente trabajo.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES

Armando Rodríguez Abascal y Ma. Luisa Páez García.

Quiero agradecerles lo que ahora soy...

Gracias por darme la vida..... por su amor, por las caricias, por el dolor, por las sonrisas por el sufrimiento, por los regaños y por el aliento.....

Gracias por enseñarme a crecer, a través del sufrimiento, curándome las heridas y consolándome en mis lamentos....

Gracias por el ejemplo de la honradez, del entusiasmo y la calidez, por los regaños y desacuerdos, por las verdades y descontentos.....

A MIS HERMANOS

Liliana y Rodolfo

Por ser mis hermanos ayer, hoy y siempre.

BAYER DE MÉXICO S.A. DE C.V.

Deseo hacer patente mi más profundo reconocimiento y agradecimiento al Laboratorio Farmacéutico "Bayer de México S.A. de C.V.", división Consumer Care y en especial al Gerente de Aseguramiento de Calidad Javier Vergil Pantoja por haberme brindado la oportunidad de presentar el resultado de la constante búsqueda de innovación tecnológica y optimización analítica. Por ser la empresa donde inicie mi formación profesional hasta la fecha.

A Patricia y Ma. Inés por su valiosa participación en el desarrollo y validación del presente trabajo.

A todos y cada uno de mis compañeros del departamento de Aseguramiento de Calidad de Bayer de México S.A. de C.V., por sus palabras de aliento.

A MON PETIT

AIDA ARACELI GONZALEZ RANGEL

Por caminar conmigo, por brindarme su apoyo, amor y cariño incondicional, que me ha alimentado con energía y fortaleza para enfrentar con mayor fuerza y optimismo los grandes retos en nuestra vida.

A MIS DOS LUCEROS

Uriel y Selene

Por ser la alegría en mi vida y por la oportunidad de verlos crecer....

A MIS AMIGOS DE SIEMPRE

Heriberto

Luis Antonio

Miguel Angel

Saul

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS DE UNIVERSIDAD

Ana Yololt

Marina

Carolina

Eduardo

Lilia

*Gracias por todos los momentos
que hemos compartido
momentos llenos de sentimientos
y pensamientos compartidos,
sueños y anhelos,
secretos, risas y lágrimas,
y sobre todo, amistad.*

Índice

Resumen	1
I Introducción	2
II Marco Teórico	3
2.1 Forma Farmacéutica Efervescente	3
2.2 Electroforesis Capilar	5
2.3 Modos de Electroforesis	7
2.4 Consideraciones Instrumentales	9
2.4.1 Tipos de capilar y configuración	10
2.4.2 Introducción de la Muestra y Tecnología del Inyector	10
2.4.3 Suministro de Corriente	13
2.4.4 Tipos de Detector	14
2.4.5 Consideraciones Analíticas	15
2.4.6 Parámetros de Operación	17
2.5 Cromatografía de Líquidos de alta Resolución vs Electroforesis Capilar, como técnicas competitivas y complementarias	21
2.6 Validación	24
2.6.1 Exactitud	24
2.6.2 Precisión	25
2.6.3 Especificidad	26
2.6.4 Límite de Detección	27
2.6.5 Límite de Cuantificación	28

2.6.6 Linealidad e Intervalo	29
2.6.7 Robustez	31
III Planteamiento del Problema	32
IV Objetivos	34
V Diseño Experimental	35
VI Metodología	38
6.1 Desarrollo del Método Analítico	38
6.2 Validación del Método de Análisis	39
VII Resultados y Análisis de Resultados	44
7.1 Mediciones utilizando Cromatografía Capilar Micelar	44
7.2 Desarrollo del método utilizando Electroforesis Capilar de Zona (CZE).	48
7.3 Validación Analítica	52
VIII Conclusiones	55
IX Recomendaciones	57
X Referencias Bibliográficas	58
XI Anexo. Resultados de Validación	59
XII Anexo-Evaluación de Costos	85

Resumen

En el presente proyecto se desarrolló una metodología de análisis por Electroforesis Capilar como respuesta a la necesidad de encontrar una alternativa de evaluación analítica, que resolviese la necesidad de reducir los tiempos de utilización de equipos y analistas, un aumento en la capacidad y flexibilidad de análisis de los productos terminados evaluados, una reducción en el uso de solventes y reactivos, que a su vez se viese reflejado en la disminución considerable en la generación de residuos peligrosos.

Por lo que en primera instancia se evaluó todo el marco teórico de esta tecnología, el conocimiento de la composición de las fórmulas, planteando una serie de pruebas que permitan obtener una definición apropiada y separación de todos los activos (en este caso cuatro). Posteriormente durante el desarrollo del método se realizó la optimización de los parámetros más importantes, para asegurar que el capilar, concentración del buffer, pH del buffer y condiciones instrumentales del equipo encontradas fueran las ideales, es decir el método de análisis sea posible de validar, de acuerdo a los criterios de aceptación establecidos. Por lo que, al final se obtuvo el método definitivo de análisis validado y listo para ser aplicado en la rutina del Laboratorio de Control de Calidad.

I. Introducción

La electroforesis capilar es una técnica de separación ampliamente usada en diferentes áreas de análisis. Esta técnica es de rutina en los análisis de hospitales y clínicas, particularmente en los análisis de proteínas de suero, así también ha tenido un incremento considerable de aplicación a través de la identificación del DNA en investigaciones criminales, por lo que los laboratorios forenses cuentan con métodos validados para garantizar su resultado. De la misma forma, tiene aplicaciones para la separación de pequeñas moléculas, análisis quiral, análisis de iones, y carbohidratos entre otros.

En la industria farmacéutica se ha extendido el uso de la electroforesis capilar, para lo que son separaciones de productos biotecnológicos, principalmente para separaciones quirales y que cuentan con la autorización por FDA (Food Drug Administration-USA) que es la entidad regulatoria en los Estados Unidos de América, así como también para productos biotecnológicos que se comercializan en la Comunidad Europea y que se encuentran descritos en las monografías individuales, así como un capítulo general de la Farmacopea Europea y la Farmacopea Americana.

La finalidad de este trabajo, fue el incorporar esta tecnología como parte del grupo de instrumentación analítica de un Laboratorio de Control de Calidad, para el análisis de tabletas de producto terminado con multiactivos. Esto implicó el desarrollo de un método de análisis único para ocho formulaciones diferentes de producto terminado, con la identificación y cuantificación de sus respectivos principios activos y la consiguiente validación para ser utilizado como un método de rutina.

II. Marco Teórico

2.1 Forma Farmacéutica Efervescente

Las tabletas efervescentes son tabletas sin recubrir, que generalmente contienen sustancias ácidas y carbonatos o bicarbonatos, que reaccionan rápidamente en la presencia de agua con la liberación de dióxido de carbono. Las mezclas efervescentes han sido conocidas por más de 250 años. La famosa sal de “Rochelle” (tartrato de sodio) data desde el año 1731, junto con otras mezclas efervescentes.

Las tabletas efervescentes se encuentran descritas en las farmacopeas, y se encuentran disponibles comercialmente, esta forma farmacéutica provee una serie de ventajas sobre las tabletas orales convencionales:

1. Son administradas en solución chispeante y con un sabor agradable.
2. Se puede administrar a pacientes que se les dificulta tragar tabletas o cápsulas.
3. No se tienen problemas de disolución debido a que se administra en solución, esto es, que la velocidad de absorción y la extensión de la biodisponibilidad se evitan.
4. Los fármacos que son inestables cuando se prepararan en soluciones acuosas, son frecuentemente más estables en tableta efervescente.

La formulación de una tableta efervescente, adicional a la sustancia ácida, bicarbonato o carbonato, y el fármaco, incluyen excipientes tales como: lubricantes, antiadherentes, desintegrantes, endulzantes, saborizantes, colorantes, surfactantes, agentes antiespumantes, entre otros, que son necesarios para proveer al producto final un desempeño adecuado en la manufactura; junto con condiciones de humedad y temperatura ambientales controladas, debido a que se pierde reactividad de la tableta con el tiempo por la exposición a la humedad ambiental. [1].

También, una tableta efervescente puede ser tan simple o compleja en su formulación, este factor se tiene que considerar para el desarrollo de una técnica de análisis del o los fármacos que la componen.

Los productos antigripales son conocidos como medicamentos mono o multiactivos en diversas formas farmacéuticas, que ayudan a aliviar los síntomas de la gripe común, tales como flujo nasal.

2.2 Electroforesis Capilar

La electroforesis capilar (EC) es un método físico de análisis basado en la migración de especies químicas cargadas eléctricamente dentro de un capilar, cuando éstas se encuentran disueltas o suspendidas en una solución electrolítica, bajo la influencia de un campo de corriente eléctrica [1], como se describe en la figura 1.

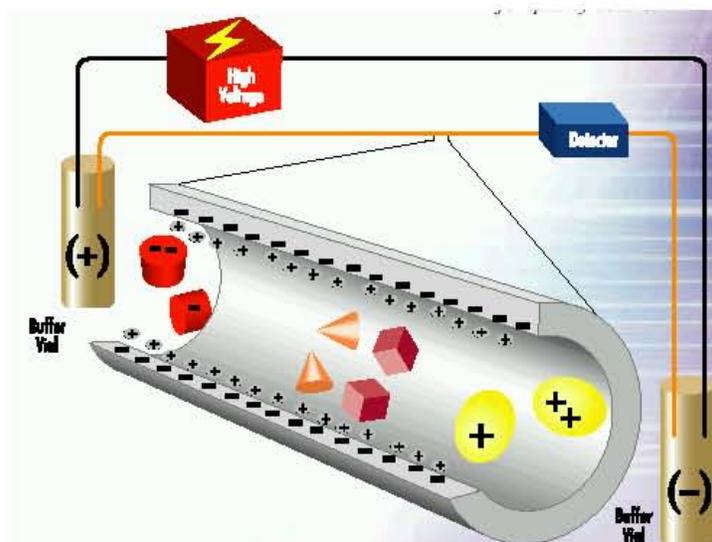


Figura 1. Esquema general del mecanismo de separación por EC.

El uso de capilares como un canal de migración en electroforesis, ha permitido realizar separaciones a un nivel comparable a la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), aunque con algunas diferencias operacionales, ventajas y desventajas relativas al HPLC. Este método de análisis es comúnmente conocido como electroforesis capilar (EC). Durante una típica operación EC con un capilar sin recubrimiento interno y lleno con un buffer, conocido como “Electrolito Soporte”, los grupos silanol presentes en la pared interna del capilar de vidrio se ionizan, liberando protones al buffer y la superficie de la pared comienza a cargarse negativamente, inclusive a un pH bastante bajo (pKa promedio de los grupos silanol pH 6.0). Los cationes o solutos que tiene una carga parcial positiva en el medio buffer, son electrostáticamente atraídas por la carga negativa de la pared del capilar, formando una doble capa eléctrica. El inicio de la electroforesis, por una aplicación de voltaje a través de la longitud del capilar, provoca que la porción de la solución en la

doble capa eléctrica se mueva hacia el final del cátodo en el capilar. Este movimiento de la solución bajo la fuerza de un campo eléctrico es denominado flujo electroosmótico (EOF), esquematizado en la figura 2. El grado de ionización de los grupos silanol de la pared interna del capilar, depende principalmente del pH del buffer de operación y en las modificaciones que pueden ser adicionadas al electrolito. A un bajo pH, el grupo silanol tiene una baja ionización por lo que el EOF se disminuye. En algunos casos los disolventes orgánicos, tales como el metanol o acetonitrilo, son adicionados a los buffers acuosos para incrementar la solubilidad del soluto y otros aditivos o para afectar el grado de ionización de la muestra. La adición de tales modificadores orgánicos generalmente causa un decremento en el EOF.

El detector está localizado hacia el final del cátodo y del capilar. El EOF es usualmente más grande que la movilidad electroforética, así incluso los aniones son arrastrados hacia el cátodo y al detector. En un capilar común de sílice fundida sin recubrimiento y conteniendo un buffer de fosfatos a pH de 7.0 [1], el orden usual de aparición de los solutos en un electroferograma son primero las especies catiónicas, los solutos neutros y las especies aniónicas.[2]

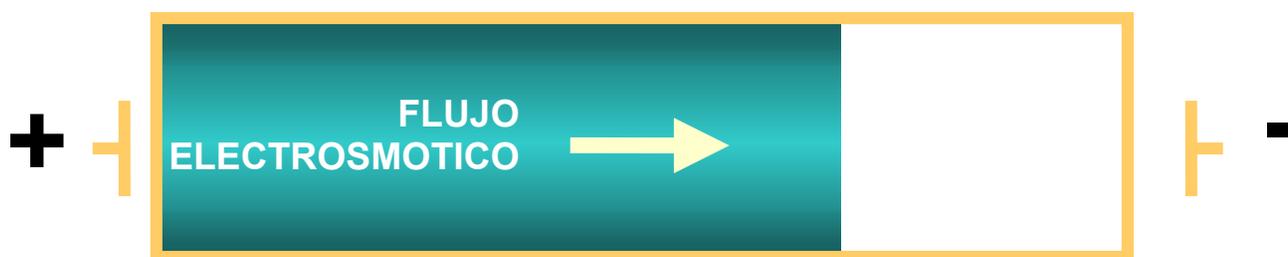


Figura 2. Representación esquemática del Flujo Electroosmótico (EOF)

2.3 Modos de Electroforesis Capilar

Actualmente, existen cinco modos principales de operación de EC:

- Electroforesis capilar de zona (CZE).
- Cromatografía capilar micelar electrocinética (MEKC).
- Electroforesis capilar en gel (CGE).
- Enfoque isoelectrónico capilar o Isoelectroenfoque capilar (CIEF).
- Isotacoforesis capilar (CITP).

En el caso de la electroforesis capilar de zona (CZE) que es una de las más ampliamente usadas por su versatilidad y simplicidad, las separaciones son controladas por las diferencias en la movilidad relativa de los componentes individuales de la muestra o solución de prueba. Las diferencias de movilidad están en función de la carga y el tamaño del analito, bajo las condiciones específicas del método.[3] Estos pueden ser optimizados por un apropiado control en la composición del buffer, del pH y la fuerza iónica. Los resultados de una típica separación por CZE se describe en la figura 3.

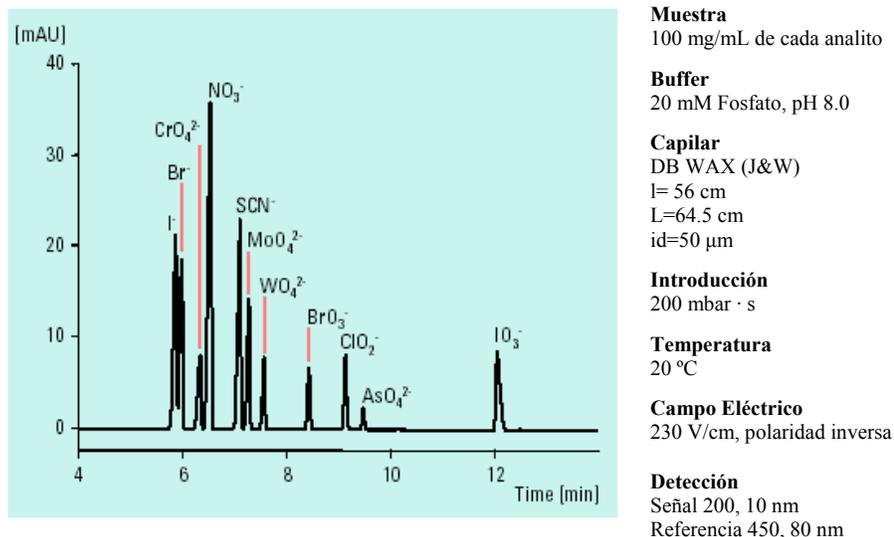


Figura 3: Electroferograma de la separación de iones inorgánicos por CZE.

En la Cromatografía capilar micelar electrocinética (MEKC), surfactantes iónicos son adicionados al buffer de operación a una concentración superior a la concentración micelar crítica. Las micelas proveen una fase pseudo estacionaria con el cual los analitos pueden partitionarse. Esta técnica es útil para la separación de sustancias neutras principalmente o para analitos con baja solubilidad en agua; cabe mencionar que esta técnica también puede ser utilizada para la separación de analitos iónicos, pero la separación en estos casos, es una combinación entre su partición dentro de las micelas y electromigración iónica. Los surfactantes son moléculas que contienen una parte hidrofóbica y otra hidrofílica en su estructura, que cuando se disuelven en una solución acuosa la parte hidrofóbica forma conglomerados con las colas no polares al centro (zona no polar) y las cabezas polares que son la parte hidrofílica que se encuentran de cara a la solución acuosa, figura.4. [4-6]

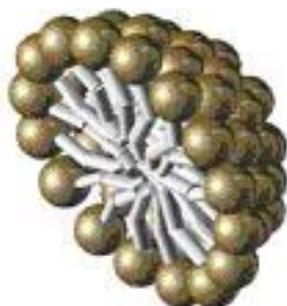


Figura 4. Estructura de una Micela.

La electroforesis capilar en gel (CGE), que es un análogo de la filtración en gel, usa capilares llenos de gel para la separación de moléculas sobre la base de una relativa diferencia en sus respectivos tamaños (pesos moleculares) y formas, actuando como una malla molecular. [7-9] Se usó primeramente para la separación de proteínas, péptidos y oligómeros. El gel puede tener la ventaja de decrecer el EOF y también la reducción significativa de la adsorción de la proteína dentro de la pared interna del capilar, lo cual,

puede reducir el efecto de coqueo o deformación de picos en la señal del analito, que se observa principalmente en la separación de las proteínas. Lo anterior no ocurre con moléculas pequeñas.

En el enfoque isoelectrico capilar (CIEF) las sustancias son separadas sobre la base de sus relativas diferencias en sus puntos isoelectricos, es decir, se separan moléculas anfotéricas como aminoácidos, péptidos o proteínas. Esto se lleva a cabo logrando un estado de estabilidad en zonas de muestras dentro de un gradiente de buffers de pH (buffer de anfólitos), donde el pH es bajo hacia el ánodo y alto hacia el cátodo. El gradiente se establece, por la aplicación de un voltaje que cruza el capilar, lleno con una mezcla de componentes acarreadores que son buffer de anfólitos que tienen diferentes valores de pH. [10-11].

La Isotacoforesis capilar (CITP) emplea dos buffers (uno de alta movilidad llamado líder y otro de baja movilidad llamado terminador), que engloba zonas del analito dentro de ellos. El análisis se lleva a cabo aplicando una corriente constante (en vez de voltaje), lográndose una velocidad constante de los analitos después de su separación. Aniones y cationes pueden ser analizados en extensas zonas separadas. En adición, las concentraciones del analito son la misma en cada zona, esto es, la longitud de cada zona es proporcional a la cantidad particular del analito. [12-14]

2.4 Consideraciones Instrumentales

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. [15]

Las consideraciones primarias de la instrumentación incluyen el tipo de capilar y configuración, modos de muestreo, suministro de energía y modos de detección.

2.4.1. Tipos de capilar y Configuración

Los capilares usados en CZE son usualmente fabricados de sílice fundida, sin recubierta interna. Algunos instrumentos están configurados con un estilo de capilar de libre posición, esto es, que el capilar no está confinado dentro de un cartucho para control de temperatura. En otros instrumentos comerciales, el capilar está resguardado dentro de un cartucho. Ambas configuraciones ofrecen específicas ventajas y desventajas. La habilidad del instrumento para acomodar capilares de diferentes diámetros, longitudes y tipos, es una importante consideración. Existen capilares con una amplia variedad de recubrimientos internos que se encuentran disponibles comercialmente para ser usados, pero deben de tener la suficiente información e indicaciones por parte del proveedor, ya que esto tiene que ser considerado en el método a utilizar. [16]

2.4.2. Introducción de la Muestra y Tecnología del Inyector (introducción)

Los modos de introducción de la muestra en el capilar incluyen electromigración (modo electrocinético) y presiones de inyección positiva y negativa (modo hidrostático). [17-19].

En la introducción por electromigración, la muestra en solución es electroforisada dentro del vial, cuando se inserta el capilar y el electrodo dentro del vial, que contiene la muestra, se aplica un campo de alto voltaje; la muestra entra en el capilar por una combinación de electroforesis y EOF. [20] Por consiguiente, los analitos con diferente movilidad son

cargados dentro del capilar a diferentes magnitudes. La conductividad de la muestra y los solutos estándar también afectan el EOF y el volumen de introducción, figura 5 y 6.

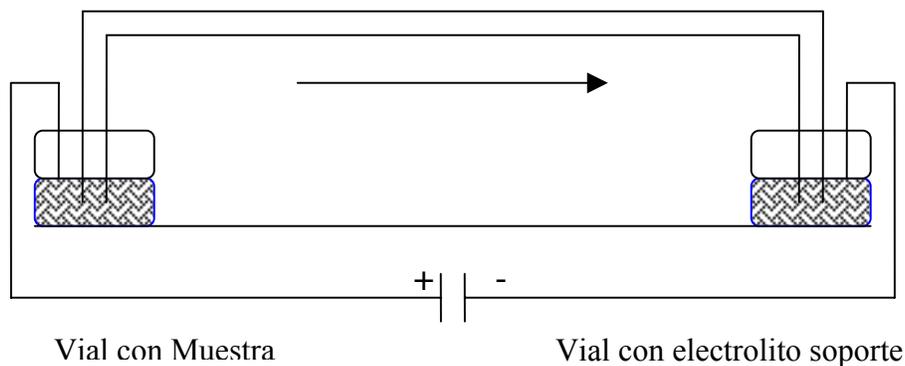


Figura 5. Inyección de la muestra con modo electrocinético (voltaje).

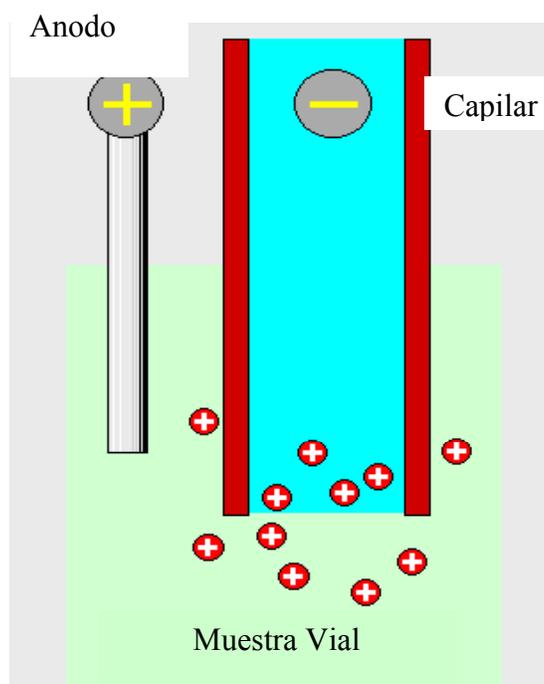


Figura 6. Esquema del funcionamiento del modo electrocinético

En el modo hidrodinámico, la introducción de la muestra puede realizarse por presión negativa, ejerciendo una presión negativa (vacío) al inicio del capilar y del detector se logra que la solución muestra se introduzca al final del capilar. Las introducciones de presión positiva se presurizan en el vial de muestra, forzando a que la muestra se introduzca al capilar; la presión de introducción carga todos los componentes de la muestra en el capilar a la misma longitud, esto es generalmente lo más reproducible y el más frecuente modo de introducción usado, figura 7-9. El volumen de muestra introducido depende de la longitud del capilar y el diámetro interno, voltaje o presión aplicada. Los típicos volúmenes de muestra introducidos dentro del capilar se encuentran entre 1 y 20 nanolitros.

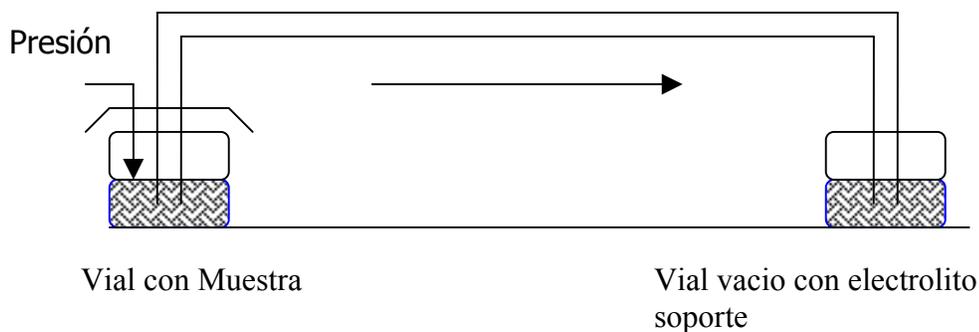


Figura 7. Inyección de muestra con modo hidrodinámico (presión).

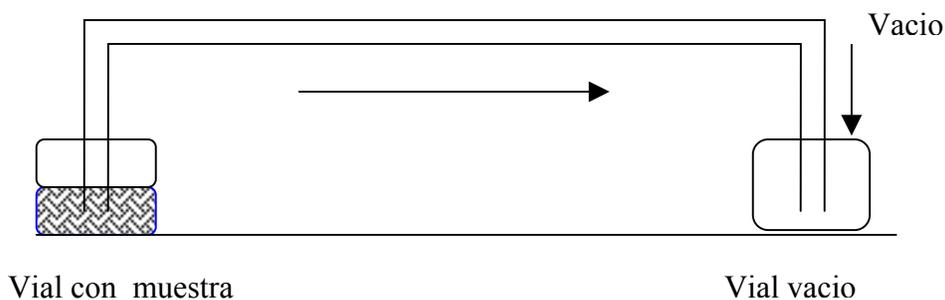


Figura 8. Inyección de muestra con modo hidrodinámico (vacío).

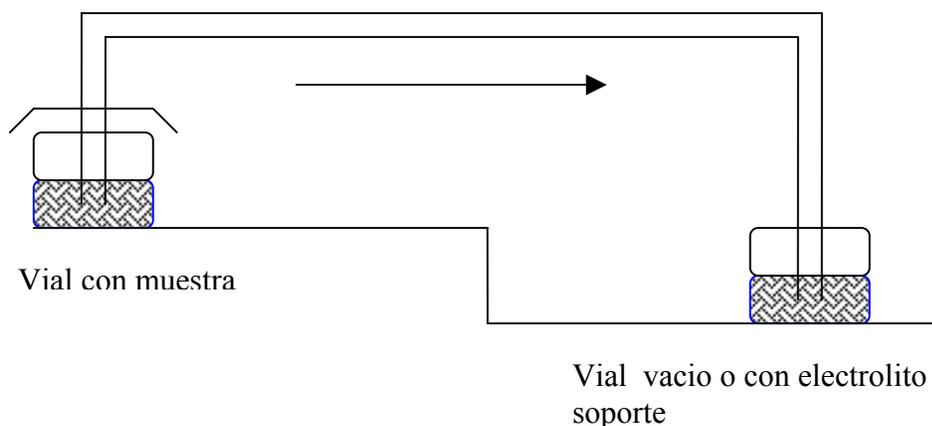


Figura 9. Inyección de muestra con modo hidrodinámico (sifón)

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 [21]. 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.

2.4.3. *Suministro de Corriente*

Muchas unidades comerciales de electroforesis capilar disponibles, tienen un suministro de corriente directa, que son capaces de incrementar la potencia en una rampa o en modos de función paulatinas; para lograr y mantener el voltaje de operación deseado de una manera constante. Esto puede ayudar para asegurar la relativa constancia de la línea base. Además, de que estas fuentes de poder tienen la característica de ser autoreversibles, es decir, se puede seleccionar indistintamente la polaridad de los electrodos. [15]

Otra característica esencial del suministro de poder es su utilidad en la introducción de la muestra al final del cátodo o del ánodo del capilar. Debido a que es impráctico reubicar un detector en línea al final de un instrumento a otro, es benéfico poder especificar si la inyección de la muestra es al final del cátodo o del ánodo.

2.4.4. Tipos de Detector

Los sistemas de electroforesis capilar, generalmente, ofrecen detectores de UV- visible y de fluorescencia inducida por láser. Los detectores UV de escaneo rápido o de arreglo de diodos, están también disponibles para muchos instrumentos de electroforesis capilar comerciales. [22,23]

El acoplamiento de EC a un espectrómetro de masas ofrece la posibilidad de obtener información estructural en conjunto con los datos de migración electroforética.

La detección de fluorescencia, ofrece una amplia sensibilidad, para muestras que contienen pequeñas cantidades de analitos UV activos. La aplicación de fluorescencia a compuestos etiquetados como no absorbente de UV puede ser útil. Alternativamente, los analitos que no absorben la radiación UV o no fluorescentes, pueden ser detectados indirectamente por la adición de un cromóforo o fluoróforo, respectivamente al buffer: las especies que no absorben son detectadas a través de la ausencia de la señal esperada para especies que absorben. Los detectores de conductividad y pulso amperométrico pueden también ser usados, pero generalmente, no están disponibles comercialmente.

A continuación se describe brevemente en la tabla 1, los tipos de detectores que se pueden acoplar a un sistema de Electroforesis Capilar, su límite de detección, así como sus características generales.

Tabla 1. Tipo de Detectores

Método	Límite de Detección (molar)*	Características Generales
Absorción UV-VIS	10^{-5} a 10^{-8}	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Universal. ➤ El arreglo de diodos ofrece información espectral.
Fluorescencia	10^{-7} a 10^{-9}	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Usualmente requiere derivación de la muestra.
Fluorescencia inducida por Láser	10^{-14} a 10^{-16}	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Extremadamente sensible. ➤ Usualmente requiere derivación de la muestra. ➤ Costoso. ➤ Fácil de operar.
Amperometría	10^{-10} a 10^{-11}	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Sensible. ➤ Selectivo, se usa únicamente para analitos electro activos. ➤ Requiere modificaciones especiales de capilares y electrónica.
Conductividad	10^{-7} a 10^{-8}	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Universal. ➤ Requiere modificaciones especiales de capilares y electrónica.
Espectroscopia de masas	10^{-8} a 10^{-9}	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Sensible y ofrece información estructural. ➤ La interfase es complicada.
Amperometría, fluorescencia UV indirecta	10-100 veces que el método directo.	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Universal. ➤ Más baja sensibilidad que los métodos directos.

* Asume volúmenes de 10 nanolitros.

2.4.5. 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:

2.4.5.1 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.

2.4.5.2 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.

2.4.5.3 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.

2.4.5.4 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.

2.4.5.5 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.

2.4.6. Parámetros de Operación

Los puntos críticos mayores en un sistema EC son: inicialización del sistema, procedimiento de enjuague del capilar, corrida de la muestra, adecuabilidad del sistema análisis de la muestra, manejo de datos y cierre del sistema.

2.4.6.1 Inicialización del sistema.- Es necesario una apropiada selección del capilar con una longitud específica, diámetro interno y recubrimiento. Lo anterior son consideraciones hechas para la separación, resolución, fuerza iónica del buffer, así como efectos de pH a una composición adecuada del buffer. Este es preparado, desgasificando, si es necesario hay que hacerlo pasar a través un filtro apropiado. Todos los disolventes incluyendo el agua son grado HPLC o EC.

2.4.6.2 Procedimiento de enjuague del capilar.- Se obtiene una consistente mejora en los tiempos de migración y resolución generalmente, si un procedimiento de enjuague definido es seguido. Las condiciones del capilar y el procedimiento de enjuague son muy específicos para el analito, matriz, y método. Por consiguiente estos procedimientos son desarrollados como parte del método, siendo especificados en la monografía individual. El enjuague puede involucrar el uso de soluciones tales como

agua, ácido fosfórico 0,1 M, e hidróxido de sodio 0,1M. Antes de iniciar el análisis del espécimen de prueba, el capilar debe ser enjuagado con cinco veces el volumen del capilar, utilizando el buffer de operación que se va a usar en la prueba. Cuando la composición del buffer cambia, es aconsejable enjuagar el capilar con cinco veces el volumen del capilar por cada nuevo buffer, permitiendo al capilar estar libre del buffer anterior. El uso de nuevos capilares de sílice con recubrimiento, usualmente requiere un procedimiento de regeneración, para activar los grupos silanol de la superficie. Este procedimiento incluye un extenso enjuague con una solución de hidróxido de sodio. Los capilares con recubrimiento son enjuagados de acuerdo a los procedimientos del fabricante, debido a que un inapropiado enjuague puede remover o dañar el recubrimiento. Los capilares pueden ser dedicados a métodos particulares o tipos de buffer, para evitar la contaminación cruzada.

2.4.6.3 *Corrida de la muestra.*- Un capilar apropiado, electrolito y procedimiento de introducción; son seleccionados para lograr una adecuada resolución, sensibilidad y separación, con una buena definición y forma del pico. La precisión de introducción requerida para un método específico, puede usar un estándar interno. El estándar interno es seleccionado con la consideración de que tiene la habilidad de separarse adecuadamente de los analitos. El desempeño del sistema es mejorado por enjuague del capilar entre introducciones, suministrando un buffer fresco a los viales de origen y destino, usados durante la aplicación del voltaje. Las réplicas de introducción de la muestra de un mismo vial pueden mejorarse previniendo que no ocurra una contaminación cruzada. Si la contaminación cruzada ocurre, la punta del capilar debe ser enjuagada con una breve inserción al interior de un vial, conteniendo el buffer usado antes de insertar el capilar dentro del vial del electrolito o muestra.

Los parámetros de operación son especificados en cada monografía individual para minimizar efectos de voltaje, fuerza iónica y pH. El instrumento es preparado para operar con la apropiada configuración del capilar y condiciones de introducción, dentro del rango dinámico lineal establecido en el detector; una precisión de migración aceptable es asegurada por la selección apropiada del diluyente de la muestra,

separación del electrolito, aditivos del electrolito y condiciones del tratamiento del capilar. Se debe tener precaución de evitar una sobrecarga del capilar con muestra, porque esto disminuye la eficiencia y reproducibilidad.

2.4.6.4 Adecuabilidad del sistema.- Los parámetros de medición incluyen la reproducibilidad del inyector (introducción de la muestra), selectividad del sistema, eficiencia del sistema, y coe. La resolución entre analitos y otros componentes son determinados por el uso de una mezcla de prueba de estándares.

Los parámetros típicos usados para probar la adecuabilidad del sistema incluye la desviación estándar (CV), factor de capacidad (k')- solo en MEKC, el número de platos teóricos (N), sensibilidad (Limite de detección o cuantificación), número de platos teóricos por metro (TPM), factor de coe (T), y resolución (R).

La forma del pico es estrechamente examinada; idealmente, el pico debe ser simétrico, sin cabeceo y sin un excesivo coe. Si estas condiciones no son cumplidas se toman acciones correctivas antes de proceder con el análisis. La integración del pico es también examinada para asegurar que la respuesta del mismo sea correctamente cuantificada.

Las réplicas de introducciones de una preparación de estándar conocida puede ser usada para determinar la reproducibilidad de un sistema EC. La información de cinco o más introducciones de réplicas son usadas para calcular el CV, a menos que otra cosa se indique en la monografía individual la desviación estándar relativa para la replica de introducciones no debe ser más de 3,0 por ciento; el valor mínimo de precisión para introducción es determinado específicamente en el método EC, especialmente cuando se determinan componentes a niveles traza.

2.4.6.5 Análisis de la muestra.- Una vez que la adecuabilidad del sistema ha sido establecido las alícuotas de la preparación del estándar y muestras son introducidas. Los

estándares son introducidos antes o después de las muestras e intermitentemente a través del análisis.

2.4.6.6 Manejo de datos.- Las áreas comunes son las áreas de pico que con más frecuencia se usan en los cálculos cuantitativos. Esto es, determinado por la división del área de la integración entre el área del pico integrado por el tiempo de migración del analito. Esto compensa el hecho de que en EC, en comparación a HPLC cada analito viaja a través del detector a diferente velocidad. A menos que esta normalización se halla realizado, los analitos de lento movimiento (migración tardía) tienen un incremento desproporcional en las áreas del pico, comparado con aquellos componentes de migración temprana.

2.4.6.7 Cierre del sistema.- Después del análisis, el capilar es enjuagado acorde con las instrucciones especificadas en cada monografía o aquellas recomendadas por el fabricante. Por ejemplo, el capilar puede ser enjuagado con agua destilada para eliminar los componentes del buffer y que éste sea llenado con aire o nitrógeno por la colocación como enjuague de un vial vacío. Naturalmente los viales de origen y destino se vacían de buffer y se enjuagan con agua desionizada

2.5 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución vs Electroforesis Capilar, como técnicas competitivas y/o complementarias

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC o CLAR en español) y la electroforesis capilar son dos técnicas de separación, que tienen diferentes principios, basados en las características intrínsecas de las moléculas de interés. Es importante señalar que la EC es una técnica alternativa y/o complementaria a la de HPLC, un ejemplo claro, es el uso conjunto de ambas técnicas para permitir la mejor caracterización de los contenidos de impurezas de los fármacos. La selección entre ellas, depende de las características particulares de cada método para un ensayo individual.

Los dos sistemas están disponibles comercialmente, dependiendo de la aplicación en particular tienen pequeñas variaciones. A continuación, se muestran esquemáticamente la composición de cada sistema, figura 10.

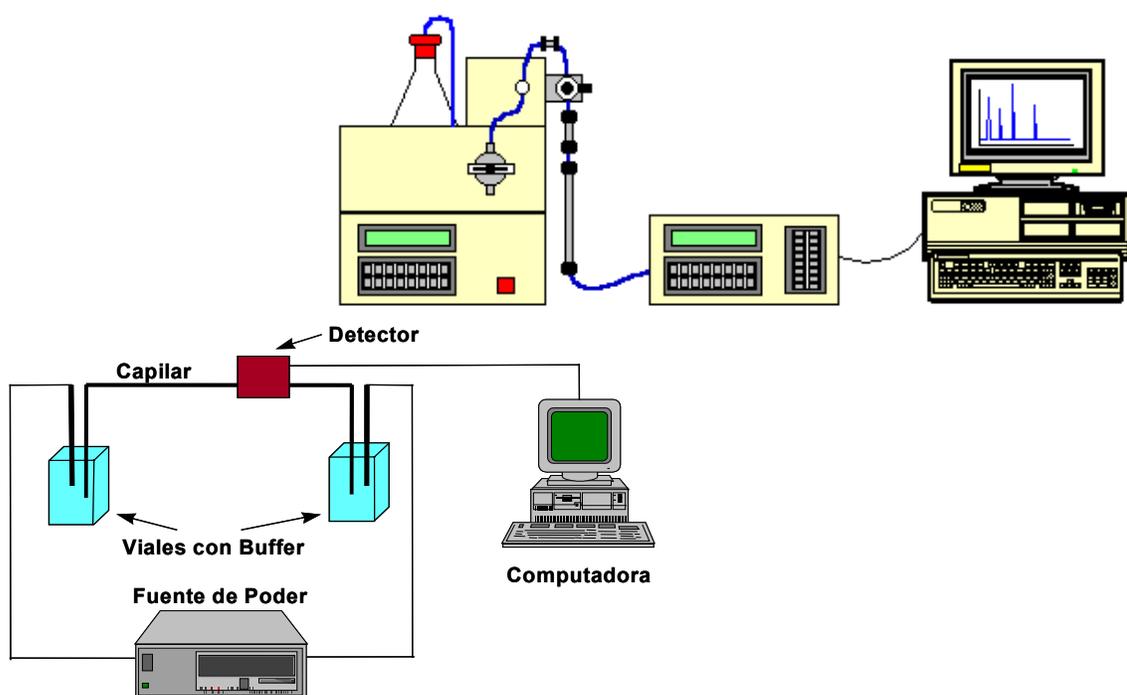


Figura 10. Esquema sistemas de Cromatografía de Líquidos y Electroforesis Capilar

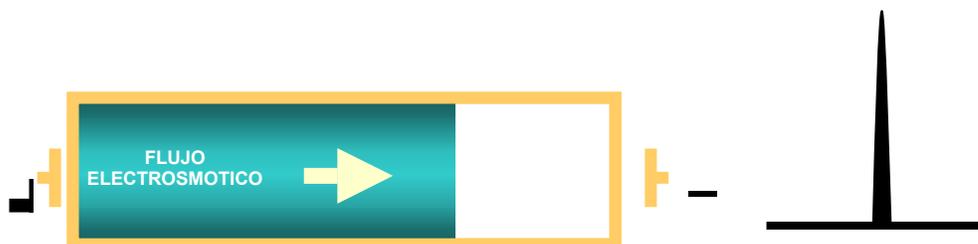
En el caso de HPLC se utiliza una bomba para impulsar un líquido (fase móvil) que está contenido en un reservorio, el cual, está compuesto fundamentalmente de sales y disolventes, a una concentración que permita la separación de los analitos de interés, este líquido pasa a través del inyector, que utilizando un sistema de válvulas introduce la muestra de interés (en orden de microlitros) al sistema, el analito junto con la fase móvil se dirigen hacia la columna, que es considerada el corazón de la separación. La columna contiene una fase sólida denominada fase estacionaria, que dependiendo de la aplicación en particular, es de diferente composición química. Al cruzar la columna, el analito ya se encuentra separado de la matriz de la muestra y se encuentra listo para dirigirse al detector, que fundamentalmente se trata de una ventana de flujo con una referencia, que detecta los cambios de absorbancia, voltaje, etc., enviando una señal ya procesada a un integrador (software de aplicación) que lo traduce en un pico o señal cromatográfica (cromatograma), integrándolo y entregando un dato numérico, conocido como número de cuentas.

Para EC, la bomba es sustituida por el efecto del flujo electroosmótico, la fase móvil es sustituida por un líquido que contiene un buffer iónico a una concentración de mili moles. La inyección (introducción) de la muestra al sistema, es través del mismo capilar que se utiliza como aguja del inyector. Por el diseño del vial, la cantidad introducida (nanolitros) es determinada por la presión y el tiempo en que se aplica esta presión, es decir, a mayor presión, mayor cantidad de muestra se introduce al sistema, y si, adicionalmente el tiempo en que se mantiene esta presión se aumenta, la cantidad de muestra se incrementa. El capilar es el equivalente a la columna en HPLC, que es de sílice fundida, recubierta externamente por un polímero que le proporciona flexibilidad y protección, así, en conjunto con el buffer, el flujo electroosmótico y un voltaje aplicado, se lleva a cabo la separación del analito de interés de la matriz original de la muestra. En caso de EC no existe una celda de flujo, una parte del capilar actúa como celda, es decir, una parte del capilar es transparente, se denomina ventana, y está conectado al detector a través de una sonda de fibra óptica, que determina los cambios en absorbancia y los refleja en una señal grafica conocida como electroferograma.

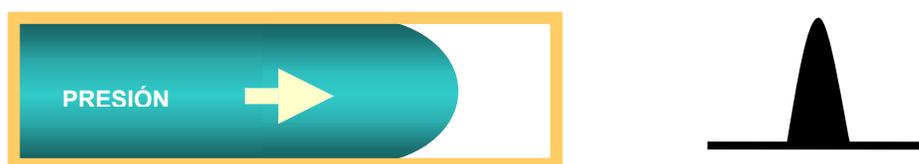
En la tabla 2 se describen las diferencias y similitudes entre HPLC y EC. De forma similar la figura 11 esquematiza los perfiles de flujo entre ambos sistemas.

Tabla 2. Comparación Cromatografía de Líquidos y Electroforesis Capilar

	HPLC	EC
Separación	Partición de un compuesto entre dos fases separadas	Diferencia de movilidad de los compuestos bajo un campo eléctrico.
Diámetro del tubo	Opcional,	< 100 micras
Perfil de Flujo	Laminar	Plano
Movimiento del Líquido	Balance entre la presión y al resistencia por viscosidad.	Balance entre al fuerza eléctrica y el arrastre por viscosidad.
Caracterización de los solutos	Tiempo de Retención relativo (k').	Movilidad Efectiva (μ_{eff}).
Volumen de la muestra	μL .	nL.
Gráfico	Cromatograma.	Electroferograma.



Perfil de flujo en electroforesis.



Perfil de flujo cromatografía

Figura 11. Flujo Electrosmótico vs Flujo Laminar

2.6 Validación.

Las buenas prácticas de fabricación y control requieren que los métodos analíticos empleados para evaluar las especificaciones establecidas sean apropiados.

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, por medio de estudios de laboratorio, que un método es apropiado para el uso propuesto. A continuación se definen cada uno de los atributos necesarios para validar un método analítico junto con una breve descripción de cómo deben determinarse.

2.6.1. Exactitud

La exactitud de un método analítico es la proximidad entre el resultado obtenido y el valor real. La exactitud debe establecerse en todo el intervalo especificado para el método analítico.

Determinación.- En el caso de la valoración de una sustancia la exactitud puede determinarse por la aplicación del método analítico a una muestra de pureza conocida (como por ejemplo, una sustancia de referencia) o por comparación de los resultados del método analítico propuesto, con los de otro método cuya exactitud halla sido establecida.

En el caso de la valoración de una sustancia en un producto farmacéutico, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del método analítico a mezclas preparadas con todos los componentes del producto a las cuales se les ha agregado cantidades conocidas del analito dentro del intervalo del método.

Si no es posible obtener muestras de todos los componentes del producto, puede ser aceptable agregar cantidades conocidas del analito al producto o comparar los resultados obtenidos con un segundo método cuya exactitud haya sido establecida.

En el caso del análisis cuantitativo de impurezas, la exactitud debe evaluarse sobre muestras (sustancia o producto farmacéutico) a las que se les han agregado cantidades conocidas de impurezas. Si es imposible obtener muestras de impurezas y/o los productos de degradación, es aceptable comparar los resultados obtenidos por un método independiente (método farmacopéico u otro método analítico validado). En ausencia de otra información, puede ser necesario calcular la cantidad de impureza comparando la respuesta de la sustancia, en estos casos debe emplearse el factor de respuesta si se conoce.

2.6.2. Precisión

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados del ensayo individual cuando el método se aplica repetidamente a varias alícuotas de una muestra homogénea. La precisión de un método analítico, generalmente se expresa como la desviación estándar o desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. La precisión puede ser considerada en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. La repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones operativas en un intervalo de tiempo corto. La precisión intermedia expresa las variaciones intra laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc. La reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios (estudios colaborativos).

Determinación.- La precisión de un método analítico, se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea, lo cual permite un cálculo estadísticamente válido de la desviación estándar o la desviación estándar relativa. En este contexto, las valoraciones son análisis independientes que se llevan a cabo siguiendo el procedimiento analítico completo desde la preparación de la muestra hasta el resultado final del ensayo.

La repetibilidad puede evaluarse empleando un mínimo de nueve determinaciones, que cubran el intervalo especificado para el método (como por ejemplo, tres concentraciones / tres repeticiones de cada una ó un mínimo de seis determinaciones al 100 por ciento del valor declarado).

2.6.3. Especificidad

La especificidad es la capacidad de un método para evaluar inequívocamente el analito en presencia de los componentes que pueden estar presentes, tales como impurezas, productos de degradación, componentes de la matriz, etc.

La falta de especificidad de un método analítico puede ser compensado por otros procedimientos analíticos. Para ensayos de identificación, esta definición implica asegurar la identidad del analito, para ensayos de pureza implica asegurar que el método permita una exacta determinación del contenido de impurezas, es decir las sustancias relacionadas, límite de metales pesados, límite de impurezas orgánicas volátiles, de productos de degradación, etc. Para valoraciones, es asegurar un resultado que permita establecer el contenido o potencia del analito en una muestra.

Determinación.- En el caso del análisis cualitativo (ensayos de identificación) debe demostrarse la capacidad de discriminar entre sustancias de estructuras estrechamente relacionadas que pudieran estar presentes. La discriminación del método, puede ser confirmada mediante la obtención de resultados positivos (como por ejemplo, por comparación con una sustancia de referencia), a partir de muestras que contienen el analito, junto con los resultados negativos, a partir de muestras que no contienen el analito. Además, el ensayo de identificación puede aplicarse a materiales estructuralmente parecidos o estrechamente relacionados al analito, para confirmar que no se obtiene una respuesta positiva.

En el caso del análisis de impurezas, la especificidad puede establecerse por el agregado de cantidades apropiadas de impurezas a la sustancia o al producto farmacéutico y demostrando que estas impurezas son determinadas con la precisión y exactitud necesarias.

En el caso de una valoración, se debe demostrar que el método no se ve afectado por la presencia de impurezas o excipientes. En la práctica esto puede realizarse agregando, a la sustancia o al producto farmacéutico, cantidades apropiadas de impurezas o excipientes y demostrando que el resultado de la valoración no se ve afectado por la presencia de estos materiales extraños. Si no se dispone de los productos de degradación o impurezas, la especificidad puede ser demostrada por comparación de los resultados del ensayo con muestras que contienen impurezas o productos de degradación a través de un segundo método independientemente (como por ejemplo, métodos farmacopéicos u otro método analítico validado).

Estas comparaciones deberían incluir muestras almacenadas bajo condiciones exigentes: luz, calor, humedad, hidrólisis ácido base y oxidación. En el caso de ensayos cromatográficos para impurezas deberían compararse los perfiles cromatográficos.

Para métodos cromatográficos instrumentales, deben desarrollarse cromatogramas para demostrar la especificidad. Los ensayos de pureza de pico, como por ejemplo, empleando arreglo de diodos o espectrometría de masa, pueden ser útiles para demostrar que el pico cromatográfico del analito no incluye a otro componente.

2.6.4. Límite de Detección

El límite de detección es la concentración más baja de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, en una muestra bajo las condiciones experimentales establecidas.

Determinación.- Existen diversas maneras para determinar el límite de detección, dependiendo de que se trate de un método instrumental o no instrumental. Pueden emplearse otras aproximaciones a las presentadas a continuación:

Para métodos no instrumentales, el límite de detección es generalmente determinado por el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito y estableciendo el mínimo nivel al cual el analito puede ser detectado en forma confiable. Este procedimiento puede emplearse también para métodos instrumentales.

En el caso de métodos instrumentales que exhiben ruido de fondo, puede emplearse una aproximación, basada en la comparación de las señales medidas con muestras que contienen pequeñas cantidades conocidas de analito con muestras de blanco y determinando la relación señal-ruido. Una señal- ruido de 3:1 o 2:1 se considera generalmente aceptable para estimar el límite de detección.

Otras aproximaciones se basan en la determinación de la pendiente de la recta de calibración y la desviación estándar de la respuesta.

Cualquiera que sea el método empleado, el límite de detección debería ser luego confirmado por medio del análisis de un número apropiado de muestras con concentraciones cercanas o el límite de detección propuesto.

2.6.5. Límite de Cuantificación

El límite de cuantificación es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud en una muestra, bajo las condiciones experimentales establecidas. El límite de cuantificación se expresa en las mismas unidades de concentración empleadas para el analito de la muestra.

Determinación.- Existen diversas maneras para determinar el límite de cuantificación, dependiendo si el método es instrumental o no instrumental. Pueden emplearse otras aproximaciones a las presentadas a continuación:

Para métodos no instrumentales, el límite de cuantificación es generalmente determinado por el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el mínimo nivel al cual el analito puede ser cuantificado con precisión y exactitud. Este procedimiento puede emplearse también para métodos instrumentales.

En el caso de métodos instrumentales que exhiben ruido de fondo, puede emplearse una aproximación basada en la comparación de las señales medidas con muestras que contienen pequeñas cantidades conocidas de analito con muestras blanco y determinando la relación señal-ruido. Una relación señal-ruido de 10:1 se considera generalmente aceptable para estimar el límite de cuantificación.

Otras aproximaciones, se basan en la determinación de la pendiente de la recta de calibración y la desviación estándar de la respuesta.

Cualquiera que sea el método empleado, el límite de cuantificación debe ser confirmado por medio del análisis de un número apropiado de muestras con concentraciones cercanas o en el límite de cuantificación propuesto.

2.6.6. Linealidad e Intervalo

La linealidad de un método analítico es su capacidad de producir resultados directamente proporcionales a la concentración de analito dentro de un intervalo dado. En algunos casos puede ser necesaria la aplicación de transformaciones matemáticas para obtener una recta.

El intervalo se refiere al rango de concentraciones de analito que pueden ser determinadas con precisión, exactitud y linealidad. Normalmente, el intervalo se expresa con las mismas unidades que los resultados del ensayo.

Determinación de linealidad e intervalo.- La linealidad debe establecerse a lo largo del intervalo del método analítico. Se debe establecer por medio de un método estadístico apropiado (como por ejemplo, cálculo de regresión de mínimos cuadrados). En algunos casos, para obtener la proporcionalidad entre los resultados y las concentraciones, los datos deben ser sometidos a una transformación matemática antes del análisis de regresión. Los datos obtenidos a partir de la mejor recta pueden ser útiles para estimar matemáticamente el grado de linealidad. Debe informarse el coeficiente de correlación, la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión.

El intervalo del método es validado al comprobar que el método analítico es preciso, exacto y lineal, cuando es aplicado a muestras que contienen el analito en los extremos del intervalo así como dentro del mismo.

Para establecer la linealidad, deben investigarse un mínimo de cinco concentraciones. También se recomienda considerar los siguientes intervalos:

- Para la valoración de una sustancia (o un producto farmacéutico): de 80 a 120 por ciento de la concentración de ensayo.
- Para la determinación de una impureza: de 50 a 120 por ciento de la especificación.
- Para la determinación de uniformidad de contenido: un mínimo de 70 a 130 por ciento de la concentración de ensayo a menos que se justifique otro intervalo de acuerdo a la naturaleza de la forma farmacéutica.

- Para ensayos de disolución: ± 20 por ciento del intervalo especificado (como por ejemplo, si la especificación para un producto de liberación prolongada cubre una región de 20 por ciento después de una hora, hasta 90 por ciento, luego de 24 horas, el intervalo validado debe ser de 0 a 110 por ciento del valor declarado).

2.6.7. Robustez

La robustez de un método analítico, es una medida de su capacidad de no verse afectado por variaciones pequeñas, pero deliberadas, en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad. Ejemplos de variaciones que deben de estudiarse durante la evaluación de la robustez de un método son: diferentes instrumentos, diferentes lotes de reactivos, diferentes tiempos de valoración, diferentes temperaturas de columnas cromatográficas (distintos lotes o proveedores), etc. La robustez se expresa normalmente como la falta de influencia de las variables operativas y del entorno sobre los resultados del ensayo.

Determinación.- La robustez de un método analítico se determina mediante el análisis de alícuotas a partir de lotes homogéneos, empleando condiciones operativas y ambientales diferentes, pero que están dentro de los parámetros especificados en la valoración. El grado de reproducibilidad de los resultados del ensayo, es luego determinado como una función de las variables de la valoración. Esta reproducibilidad puede compararse con la precisión de la valoración bajo condiciones normales, para obtener una medida de la robustez del método analítico.

III. Planteamiento del Problema.

La técnica de electroforesis es una tecnología que no se encuentra incorporada a la instrumentación analítica del Laboratorio de Control de Calidad de Bayer de México, mientras que la técnica de HPLC utilizada, presenta una serie de restricciones respecto a la versatilidad del mismo:

- Cada fórmula requiere ser analizada en forma individual.
- El análisis de cada fórmula requiere tiempo de acondicionamiento del equipo.

Lo anterior es debido a la composición de las diferentes fórmulas de tabletas efervescentes, así como el uso de disolventes y la generación de residuos peligrosos. La Electroforesis Capilar por otra parte, es una técnica de análisis confiable, eficaz y flexible para una gama de productos, sin la interferencia de la composición entre fórmulas, que se reflejará en la versatilidad analítica, reducción del tiempo de respuesta para tener producto en el mercado y reducir costos. Esto con la consecuente disminución en la utilización de reactivos y disolventes como parte de la técnica de análisis, que repercute directamente en la generación de residuos peligrosos, llevándolos a un nivel mínimo o nulo.

Para integrar esta técnica en forma rutinaria, como prueba de liberación para el análisis de las diferentes formulaciones de tabletas efervescentes (antigripales) evaluadas, fue necesario establecer una estrategia para el desarrollo de la metodología analítica, basado en la referencia documental disponible de las condiciones de análisis, así como las características de carga y masa de cada uno de los excipientes y activos; con la respectiva modificación de los parámetros de operación del equipo de electroforesis, cambiando las condiciones de análisis, hasta obtener una separación de las señales de los activos en forma apropiada, definida, simétrica y reproducible.

Tomando en cuenta las condiciones óptimas de la técnica, se procedió a realizar la validación analítica correspondiente, para demostrar experimentalmente, que los resultados obtenidos por esta técnica son confiables para dictaminar que el producto cumple con las especificaciones de calidad previamente establecidas.

Al final de todo el proceso, se tiene una metodología analítica validada, confiable, versátil, de bajo costo, que se incorpora a la gama de técnicas analíticas utilizadas en un Laboratorio de Control de Calidad.

IV. Objetivos

1.- Objetivo General.

- Desarrollar y validar una técnica de análisis por Electroforesis Capilar para producto terminado tabletas efervescentes con multiactivos

2.- Objetivos Particulares.

- Aumentar la productividad del Laboratorio de Control de Calidad, a través del uso de un método analítico por Electroforesis Capilar flexible, versátil y eficaz.
- Reducir el consumo de reactivos y disolventes utilizados en el Laboratorio de Control de Calidad, así como de generación de residuos peligrosos.

V. Diseño Experimental

Población de Estudio

Este trabajo esta enfocado a la identificación y cuantificación de los siguientes activos:

- A: Antihistamínico 1
- B: Antihistamínico 2
- C: Descongestionante
- D: Antitusivo

Que se encuentran en las siguientes formulaciones de producto terminado tabletas:

Fórmula 1 (B y C)

Fórmula 2 (C)

Fórmula 3 (B, C y D)

Fórmula 4 (B y C)

Fórmula 5 (B y C)

Fórmula 6 (A, C y D)

Fórmula 7(B, C y D)

Fórmula 8 (B y D)

Criterios de Inclusión:

1. Que sea una forma farmacéutica de producto terminado.
2. Que contenga al menos uno de los activos descritos anteriormente.
3. La tableta se disuelva en un medio acuoso.
4. Que no tenga activos que se degraden en un medio acuoso.

Criterios de Exclusión

- 1 Que contenga activos que se degraden en un medio acuoso.
2. Tabletas que requieran disolventes para la disolución de la muestra y su cuantificación.

Variables

El desarrollo y validación del método analítico por Electroforesis Capilar presenta la siguientes variables:

- Composición de activos y excipientes de cada formulación evaluada.
- Relación carga / masa de los activos y excipientes de las fórmulas evaluadas.
- Selección del modo de operación de Electroforesis Capilar.
- Selección del capilar como longitud, diámetro, con o sin recubrimiento interno y el buffer a usar (características iónicas, concentración y pH).
- Las referentes al equipo tales como: voltaje, temperatura del capilar, temperatura de la muestra, presión y tiempo para la toma de muestra.

Materiales

Equipos

1. Electroforesis Capilar Beckman-Coulter MDQ con detector de arreglo de diodos, (Fullerton, CA, USA).
2. Potenciómetro Beckman Φ 690.
3. Balanza Analítica Sartorius BP210
4. Capilares de diferentes diámetros y longitudes Beckman-Coulter (Fullerton, California, USA).

Reactivos

1. Tetraborato de Sodio R.A.
2. Ácido Clorhídrico RA
3. Hidróxido de Sodio RA.
4. Trietanolamina RA, sigma.
5. Agua Purificada.
6. Fosfato de Sodio monobásico, Merck.
7. Acido o-fosfórico.
8. Acetonitrilo HPLC.

VI. Metodología

6.1 Desarrollo del método analítico

6.1.1. Calificación y/o auditoria de los equipos instrumentales a utilizar, de acuerdo a los procedimientos internos.

6.1.2. Utilizar como referencia los activos y la tableta de la fórmula 5 como referencia, para iniciar el estudio, utilizando las siguientes condiciones iniciales:

- Una longitud del capilar de 57 cm y un diámetro de 75 micras.
- Un tiempo de introducción de la muestra de 5 seg. a una presión de 0.5 psi.
- Un voltaje de 17.7 Kv.
- Longitud de Onda de 194 nm.
- Polaridad Normal.
- Buffer de fosfatos a 40 mM y pH 5.0

6.1.3. Preparación de las soluciones estándar de los activos a la concentración deseada de análisis.

6.1.4. Introducción de la muestra al sistema de Electroforesis Capilar, con parámetros establecidos.

6.1.5. Obtención del electroferograma y análisis de la separación, tiempo de migración y forma de la señal.

6.1.6. Cambio de parámetro de acuerdo a los resultados obtenidos con los parámetros establecidos en el punto 6.1.2.

6.1.7. Obtención de una separación y forma de las señales de los activos.

6.1.8. Preparación de una tableta de producto terminado de cada una las fórmulas descritas y su introducción al sistema.

6.1.9. Evaluación de la separación y forma de la señal de las muestras introducidas al equipo de electroforesis, así como también la pureza del mismo a través del detector de arreglo de diodo.

6.1.10. Si los resultados de las muestras descritas en el punto 6.1.9 son aceptables, evaluar la factibilidad de validación del método desarrollado con la ejecución de una linealidad del método, utilizando la fórmula 5 como representativa de las demás.

6.1.11. Si las condiciones de validación son satisfactorias, proceder a iniciar la validación del método analítico con todos los parámetros de medición descritos internamente. Si no es así proceder desde el punto 6.1.6.

6.2 Validación del método de análisis.

Concluido el desarrollo del método se procede a validar el método de acuerdo a los parámetros establecidos.

6.2.1. Selectividad

6.2.2.1 Identificar todos y cada uno de los componentes de las ocho formulaciones a evaluar. Activos y excipientes.

6.2.2.2 Todos aquellos excipientes que sean comunes entre fórmulas, considerar aquel que esté en mayor cantidad de las ocho fórmulas y preparar a la concentración

en mg/mL, del contenido de una tableta. Utilizando el buffer encontrado en el desarrollo del método como medio de disolución.

6.2.2.3 Para los activos, aquellos que sean comunes y con la misma cantidad por tableta, preparar la concentración en mg/mL del contenido de una tableta.

6.2.2.4 Para los activos que son comunes, pero tienen diferentes cantidades por tableta, considerar aquel que contenga la mayor cantidad, preparar una solución a la concentración en mg/mL del contenido de una tableta.

6.2.2.5 Para los activos que no son comunes, considerar la preparación de acuerdo a la concentración en mg/tab de la fórmula correspondiente.

6.2.2.6 Editar y programar el equipo de Electroforesis Capilar para el análisis de todas las muestras.

6.2.2.7 El criterio de aceptación es que no exista señal de los excipientes que intervengan o se sobrepongan a los mismos tiempos de migración que el de los activos a identificar y cuantificar.

6.2.2. *Linealidad y Precisión del Sistema.*

6.2.2.1 Preparar una solución madre conteniendo todos los activos a evaluar.

6.2.2.2 Tomar alícuotas de diferentes volúmenes de la solución madre para la preparación de soluciones de 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 y 150 por ciento de la muestra final de las preparaciones de las 8 formulaciones. Esto por duplicado, excepto la del 100 por ciento que se prepara por sextuplicado.

6.2.2.3 Editar y programar el equipo de Electroforesis Capilar con la secuencia de introducción de las muestras, iniciando por la de menor a mayor concentración.

6.2.2.4 El criterio de aceptación es que el coeficiente de correlación (r^2) ≥ 0.98 .

6.2.3. *Linealidad y Precisión del Método*

6.2.3.1 Tabular todos los excipientes de las 8 formulaciones.

6.2.3.2 Para aquellos excipientes comunes, identificar la formulación que contenga la mayor cantidad de este excipiente en mg/tab

6.2.3.3 Preparar una mezcla de excipientes (placebo) que contenga todo los excipientes que no son comunes entre las 8 formulaciones y aquellos que son comunes, considerando para la evaluación el de mayor cantidad en mg/tab.

6.2.3.4 Considerar la formulación con mayor peso promedio como referencia para la preparación de los niveles de la curva y los ajustes de cantidad de placebo a utilizar.

6.2.3.5 Pesar en forma independiente cada uno de los activos a los niveles de concentración de 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 y 150 por ciento y adicionar a un matraz volumétrico apropiado, junto con la cantidad de placebo ajustado por triplicado, excepto el 100 por ciento que se prepara por sextuplicado.

6.2.3.6 Disolver con el buffer de disolución.

6.2.3.7 Editar y programar el equipo de electroforesis capilar con la secuencia de introducción de la muestra, iniciando por la de menor a mayor concentración.

6.2.3.8 Los criterios de aceptación son: $r^2 \geq 0.98$ y un CV de los por ciento recuperados ≤ 1.5 por ciento, el promedio de los por ciento recuperados debe de estar entre el 98-102 por ciento a un intervalo de confianza del 95 por ciento

6.2.4. *Precisión del Método*

6.2.4.1 Preparar 6 muestras de placebos cargados al 100 por ciento.

6.2.4.2 Preparar solución de estándares para la apertura y cierre de secuencia de análisis.

6.2.4.3 Editar y programar la secuencia de análisis en el equipo de Electroforesis Capilar, iniciando con un estándar, después muestra, estándar, muestra, hasta completar el análisis de las 6 muestras de placebos cargados.

6.2.4.4 El criterio de aceptación es tener un CV < 2.0 por ciento

6.2.5. *Precisión Intermedia.*

6.2.5.1 Preparar 6 muestras de análisis de cada una de las 8 fórmulas, con su respectiva composición de activos y excipientes.

6.2.5.2 Preparar la solución estándar conteniendo todos los activos a cuantificar

6.2.5.3 Editar y programar el equipo de Electroforesis Capilar con la secuencia de introducción de la muestra.

6.2.5.4 La formas de realizar esta determinación es considerando a dos químicos analistas, dos días diferentes y un solo equipo de electroforesis

6.2.5.5 El criterio de aceptación es el de obtener un $CV < 2.0$ por ciento para cada una los activos por fórmula evaluada.

6.2.6. Límite de Detección y Cuantificación.

6.2.6.1 De una solución preparada a un 100 por ciento de la concentración de los activos tomar alícuotas de 50 por ciento en forma descendente, es decir, de la muestra original tomar 5 mL y diluir a 10 mL de buffer, de esta última solución tomar 5 ml y diluir a 10 ml con buffer, y así sucesivamente hasta tener 10 diluciones preparadas.

6.2.6.2 Editar y programar la secuencia de análisis, considerando al introducción de la muestra desde el de menor a mayor concentración. Realizar la determinación por triplicado.

6.2.6.3 El criterio de aceptación es de: $r^2 \geq 0.98$ y un límite de detección y cuantificación calculado a un intervalo de confianza del 95 por ciento.

VII. Resultados y Análisis de Resultados

7.1 Mediciones utilizando Cromatografía Capilar Micelar Electrocinética

Las ocho formulaciones evaluadas pueden agruparse por contener algunos de los cinco principios activos llamados A, B, C, D, y E. Los principios activos A, B, C y D poseen una baja concentración con respecto al E (alrededor de 125 veces más en contenido).

El propósito inicial fue separar todos y cada uno de los principios activos en una sola corrida, por lo que primero se realizó el estudio utilizando estándares secundarios de cada uno de los analitos. Para tal propósito se utilizó una muestra de producto terminado que contenía A, C y E a una concentración de 50 ppm. Como primera estrategia se aplicó la técnica de Cromatografía Capilar Micelar Electrocinética (MEKC), adicionando lauril sulfato de Sodio (SDS) como surfactante al electrolito soporte (buffer de fosfatos). Esta estrategia se seleccionó debido a que este tipo de separaciones en medio micelar son adecuadas cuando tenemos mezclas de compuestos neutro y cargados, ya que la electroforesis de zona (CZE) es una técnica que no puede separar compuestos neutros¹.

Se realizó el estudio a algunos de los parámetros más importantes de la separación en MEKC como son el pH, concentración de SDS y posible adición de un disolvente orgánico con el fin obtener las condiciones óptimas.

Considerando que E es un compuesto neutro a pH menores de 10.82 y tanto A como C tienen carga positiva a pH menores de 9, por lo que se trató de separar a todos los analitos cuando todos poseían una forma neutra. Esto se logró utilizando un electrolito soporte (buffer) a pH 9.34.

¹ Utilizando CZE para esta separación, otros componentes neutros de la formulación (i.e. colorantes, saborizantes, edulcorantes etc) coeluirían con el pico del principio activo E (neutro a las mismas condiciones) por lo que esta metodología resultaría en medidas no específicas para el analito.

Utilizando un buffer de boratos 11.7 mM + fosfatos 8.3 mM con la adición de 20mM de SDS a pH 9.34 las señales del placebo interfieren con los principios activos. Con la finalidad de eliminar las señales interferentes del placebo se realizaron adiciones de acetonitrilo. La presencia de este disolvente (siete por ciento) desplazó las señales del placebo a otros tiempos de migración, pero aun interfiriendo con el pico de C que se encuentra deformado, ver fig. 12.

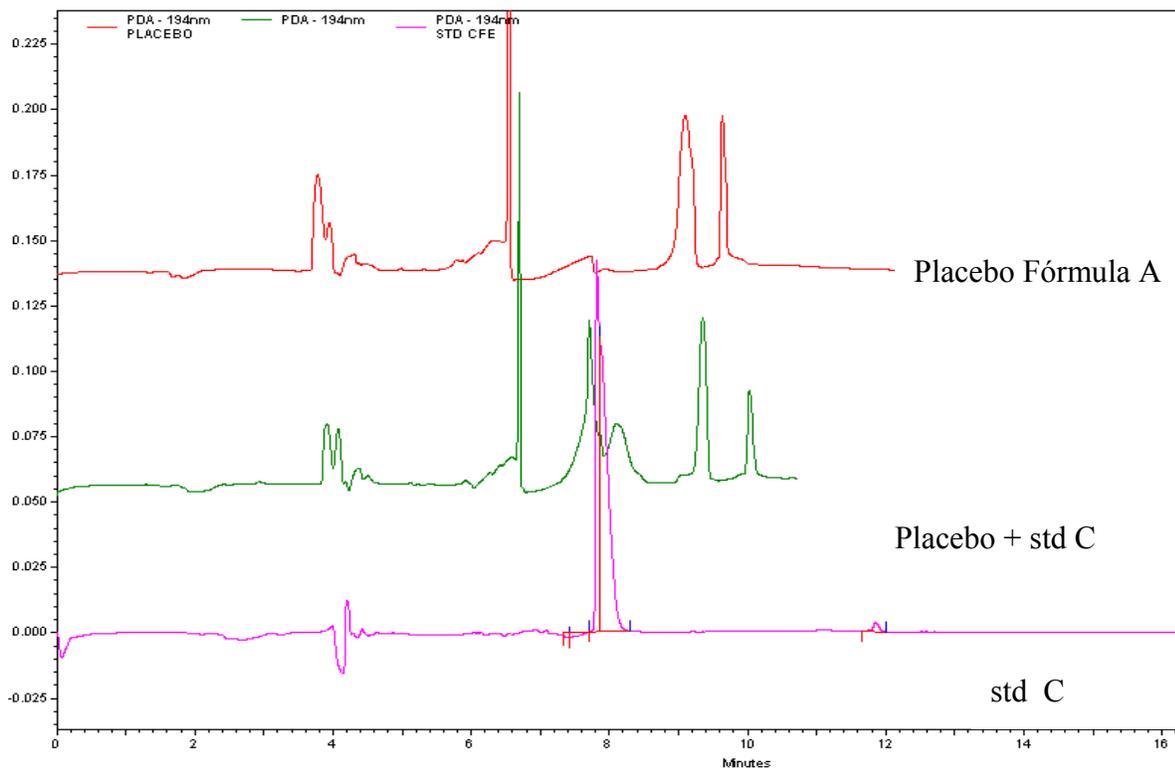
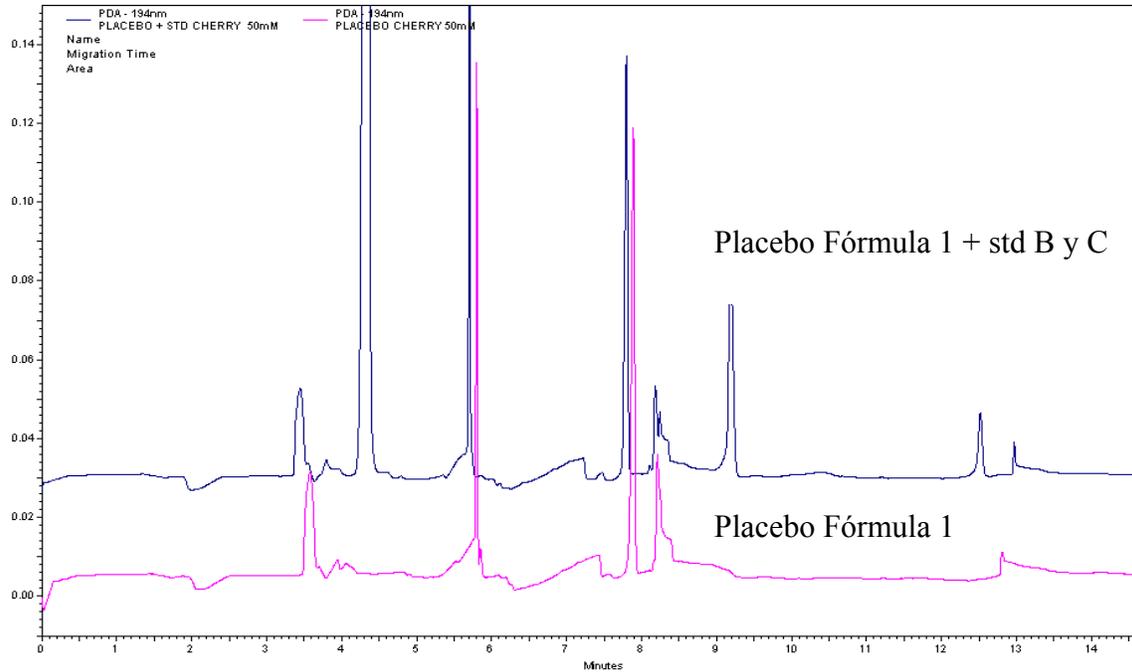


Figura 12. Electroferogramas de la influencia de la concentración de Acetonitrilo (7 por ciento) en el desplazamiento del Placebo y el principio activo C. Capilar de sílice fundida 61.5 cm de longitud total (54.5 cm de longitud a la ventana del detector), Buffer de Boratos 11.7 mM + Buffer de Fosfatos 8.3 mM, con la adición de 20 mM de SDS, inyección hidrodinámica 2 psi por 5 s (inlet), 30 kV polaridad normal del capilar), 25 °C.

Con subsecuentes adiciones de una mayor concentración de SDS y el aumento en la fuerza iónica (concentración del buffer) hicieron posible la completa separación de los analitos que se muestra en la fig. 13. Bajo estas condiciones se obtiene una alta resolución y selectividad, se realizó el análisis de precisión en tiempos de migración y áreas bajo la curva de los picos de cada uno de los principios activos, estos resultados se aprecian en la tabla 3.



as

condiciones que la figura 12.

Tabla 3. Evaluación de la precisión en áreas y tiempos de migración para los analitos A,C,y E, en producto terminado. Condiciones de la figura 13.

	Componente E		Componente C		Componente B	
	² C.V. (T.M.)	² C.V. (Áreas)	² C.V. (T.M.)	² C.V. (Áreas)	² C.V. (T.M.)	² C.V. (Áreas)
194 nm	0.249	1.612	0.350	3.152	0.273	8.540
230 nm	0.249	2.251	0.350	4.990	0.273	4.541

² Utilizando 12 inyecciones consecutivas.

En la tabla anterior se observa que los C.V en tiempos de migración resultan aceptables, mientras que el mismo parámetro en áreas está por arriba de los límites establecidos (<1.5 por ciento). Aumentando aun más la concentración de SDS (70mM, ver tabla 4) y con la utilización de uno o hasta dos estándares internos (tabla 5) no se observó una mejoría significativa en los CV de las áreas bajo la curva de los analitos.

Tabla 4. Evaluación de la precisión en áreas y tiempos de migración para los analitos A, C y E, en producto terminado. Condiciones de la figura 13, (exceptuando que se utilizó 70 mM de SDS).

	Componente E		Componente C		Componente B	
	³ C.V. (T.M.)	³ C.V (Areas)	³ C.V. (T.M.)	³ C.V (Areas)	³ C.V. (T.M.)	³ C.V (Areas)
194 nm	0.253	2.116	0.312	1.196	0.466	3.776

³ EL C.V se evaluó de una relación de áreas y de 12 inyecciones consecutivas.

Tabla 5. Evaluación de la precisión en áreas y tiempos de migración para los analitos B,C,y E, en producto terminado. Condiciones de la tabla 2, exceptuando que se utilizaron dos estándares internos.

Relación de Áreas	⁴ Componente E/Cafeina	⁴ Componente C /Clorhidrato de Pseudoefedrina	⁴ Componente B/Clorhidrato de Pseudoefedrina
194 nm	1.116	2.401	4.662

⁴ EL C.V se evaluó de una relación de áreas y de 12 inyecciones consecutivas. Esto hace que el método evaluado no sea aceptable para iniciar una validación.

En base a estos resultados se procedió a realizar el desarrollo por Electroforesis Capilar de Zona (CZE).

7.2 Desarrollo del método utilizando Electroforesis Capilar de Zona (CZE).

Tomando en cuenta que no fue posible la validación del método utilizando micelas se cambio de estrategia. Se aprovechó que la mayoría de los analitos poseen carga positiva a bajo pH, se utilizó un buffer de fosfatos a pH 3.5 para realizar la separación. Se pudo observar que existe una separación de los analitos A y C, mientras que E tuvo una retención tan alta que aún en corridas de 20 minutos no se observó su señal, esto debido a que ese pH el analito E predomina en su forma neutra por lo que no posee movilidad por si misma y únicamente es arrastrada por el flujo electroosmótico (FEO) que a ese pH es muy bajo. Por lo tanto en subsecuentes mediciones ya no se considero al componente E para continuar el desarrollo del método.

Se probaron dos diferentes valores de pH para la separación de B y C, estos electroferogramas se pueden observar en la figura 14, a pH 3.72 eluye primero el componente C(alrededor de 12 min), y alrededor de los 12.5 min el componente B. Al realizar esta misma separación a pH 2.5 la resolución entre ambos picos aumenta considerablemente, además de que se invierte el orden de elución de los componentes. Este fenómeno puede explicarse considerando que a un menor valor de pH 2.7, el componente B adquiere dos cargas positivas, en comparación a pH 3.72 donde el componente B adquiere una sola carga positiva.

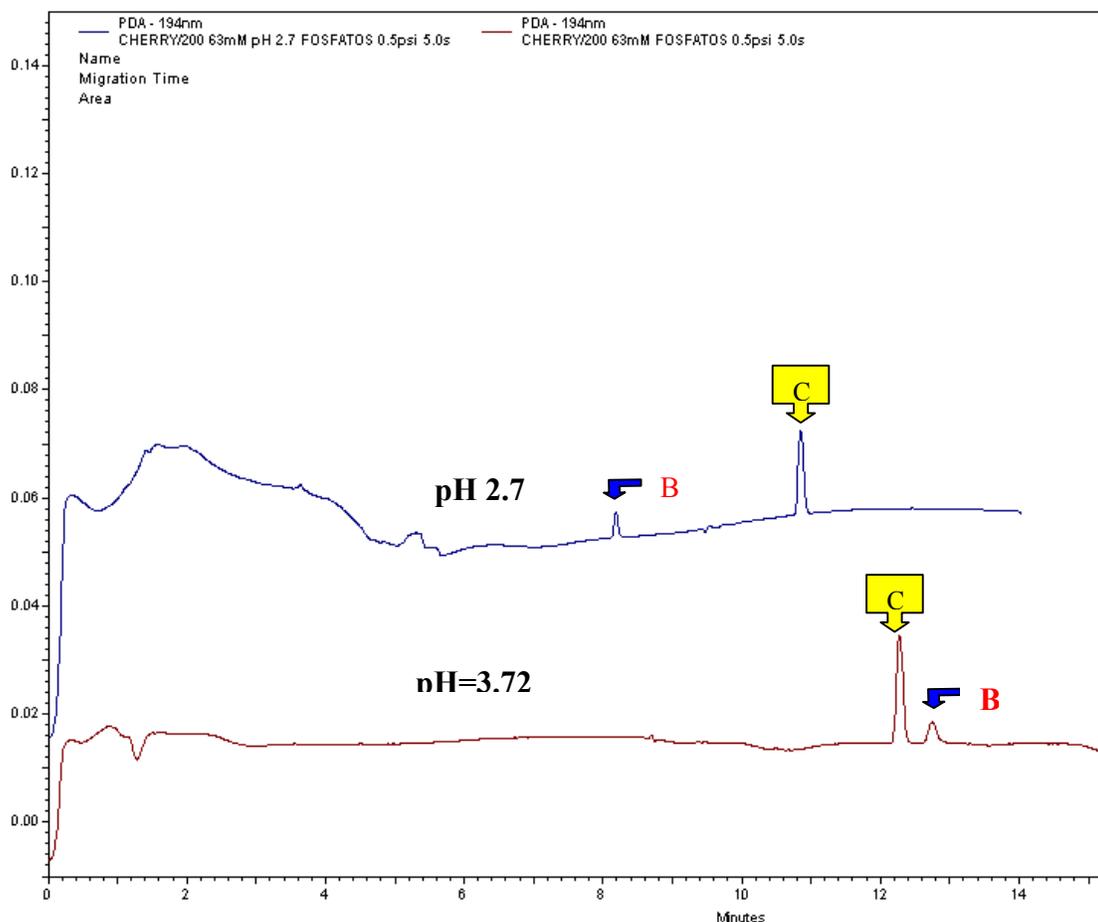


Figura 14. Electroferogramas de la influencia del pH en el orden de elución de los principios activos B y C. Condiciones: Capilar de sílice fundida 61.5 cm de longitud total (54.5 cm de longitud a la ventana del detector), Buffer de Fosfatos 63 mM, inyección hidrodinámica 2 psi por 5 s (inlet), 25 kV polaridad normal del capilar), 25 °C.

Posteriormente, se probaron diferentes concentraciones del buffer (Ácido o-fosfórico más Trietanolamina), los electroferogramas obtenidos pueden verse en la figura 15. Como podemos notar a mayor concentración del buffer, hay una mejora en la eficiencia y aunque con un aumento en el tiempo de análisis. Al evaluar la linealidad del método bajo estas

condiciones ninguna de las condiciones anteriores cumplió con los criterios establecidos ($r^2 > 0.98$, $C.V < 1.5$).

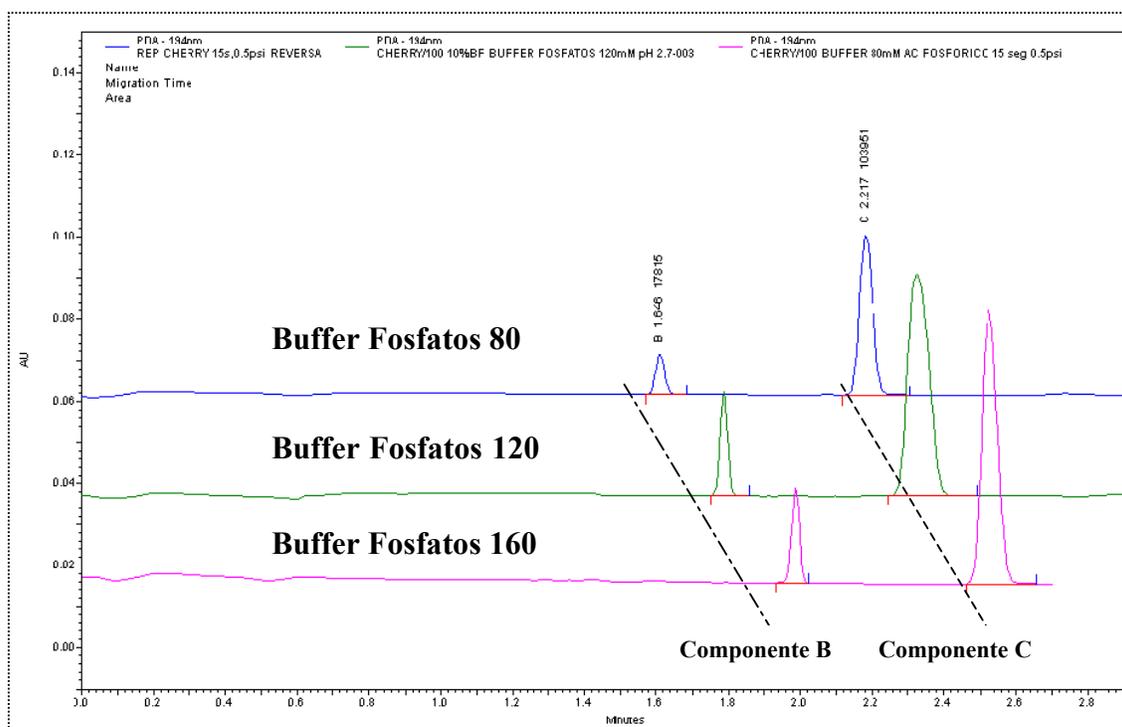


Figura 15. Electroferogramas de la influencia de la concentración del Buffer en la separación de A y C en producto terminado. Condiciones: Capilar de sílice fundida 61.4 cm de longitud total (7 cm de longitud a la ventana del detector), Buffer de Fosfatos +Trietanolamina, inyección por el lado corto del capilar (outlet), Polaridad Inversa (-30 kV), 25 °C.

Debido a lo anterior, se decidió introducir un estándar interno a la metodología con el fin de mejorar los resultados obtenidos. Se probaron diferentes compuestos como son: Clorhidrato de Pseudoefedrina, Fenilalanina, Metildopa, Difenilalanina y Fenacetina, todos ellos, compuestos cargados positivamente a las condiciones de análisis. Se decidió utilizar Pseudoefedrina como estándar interno debido a que tuvo una buena resolución entre B y C, además de que se observa como pico con buena simetría y eficiencia.

El siguiente parámetro a evaluar fue el volumen introducido de la muestra. Siendo que se puede introducir un mayor volumen de muestra aumentando el tiempo de inyección o aumentando la presión utilizada, se evaluaron ambas opciones. Se determinó que el CV cumple con el parámetro establecido cuando la inyección se realiza utilizando 2 psi, por 5

s., y además de que el pH se incrementa a 3.1, cambiando la longitud y polaridad del capilar. El Electroferograma obtenido a estas condiciones óptimas puede verse en la figura 16.

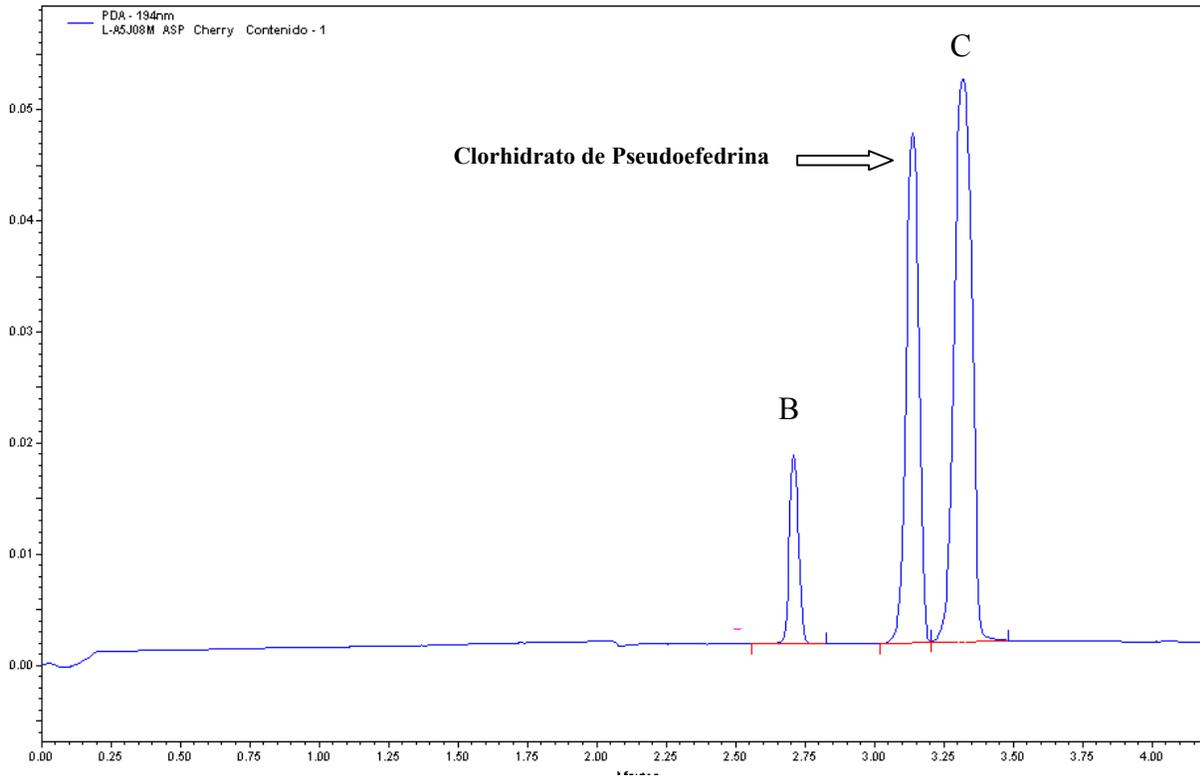


Figura 16. Electroferogramas de la separación de A y C en el producto terminado 1 utilizando las condiciones óptimas. Condiciones: Capilar de sílice fundida 31.5 cm de longitud total (24.5 cm de longitud a la ventana del detector), Buffer de Fosfatos 120 mM, ajustado a pH 3.1 con Trietanolamina, inyección hidrodinámica 2 psi por 5 s (inlet), 30 kV polaridad normal del capilar), 25 °C.

Al fabricarse productos con principios activos de estructura molecular parecidos, se decidió aplicar esta misma metodología a un total de ocho productos y el electroferograma tipo puede verse en la figura 17.

Cabe hacer mención que la composición de las diferentes fórmulas son parecidas, por lo que se propuso la utilización de un placebo común para efectos de validación, considerando que el placebo para todos los casos no presenta ninguna señal.

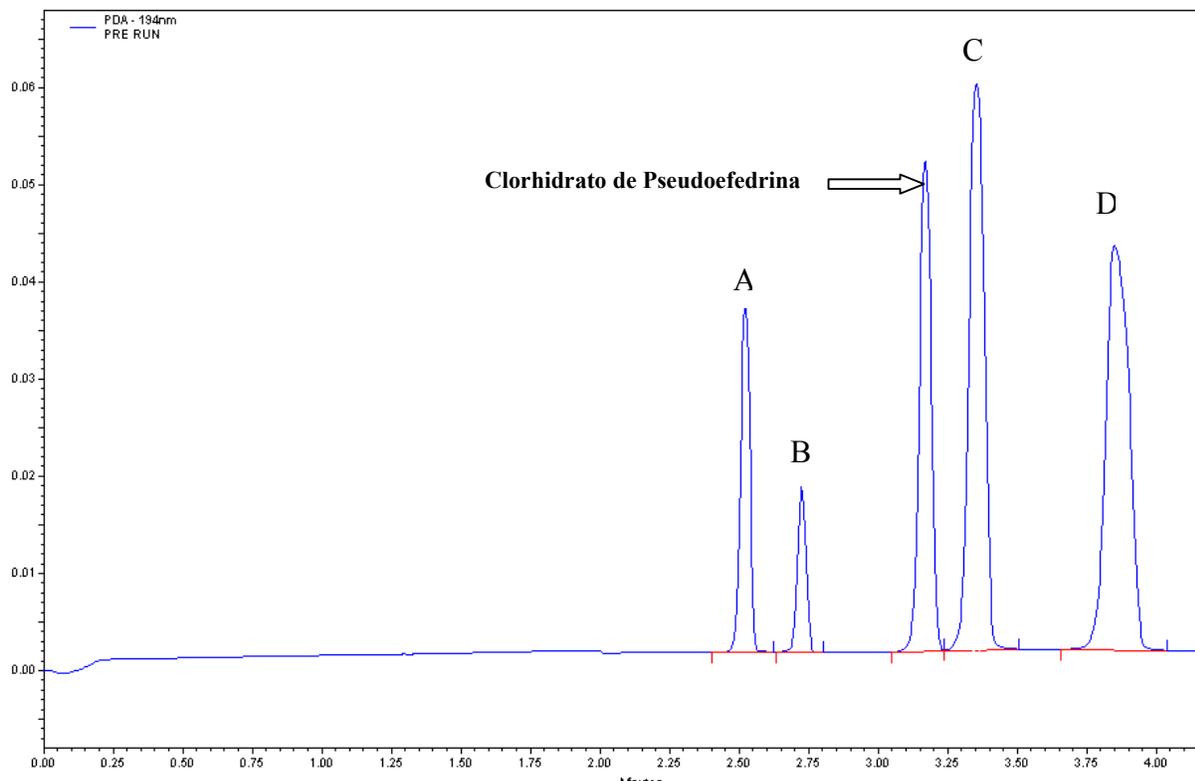


Figura 17. Electroferogramas de la separación de A, B, C y D en los productos terminados 1,2,3,4,5,6,7 y 8 utilizando las mismas condiciones que la figura 6

7.3 Validación Analítica.

El método es específico para la cuantificación de los Activos A,B,C y D en las fórmulas de los productos 1,2,3,4,5,6,7 y 8.

El sistema es lineal en el rango de 50 a 150 por ciento para los cuatro activos, sin embargo los C.V's de los factores respuesta se encuentran por arriba de lo establecido en

un método del HPLC (≤ 1.5 por ciento), que es un valor aceptable considerando que no existe ninguna referencia para este tipo de técnica analítica. Por otra parte, el sistema es preciso para los cuatro activos.

El método es lineal para la cuantificación de los cuatro activos, sin embargo no se incluye el 100 por ciento en la cuantificación de los activos A, B y C caso contrario del activo D que si incluye el 100 por ciento. Estas variaciones son para el activo A de 0.54 por ciento (equivalente a 0.034 mg/tab), para el activo B de 0.22 por ciento (0.011 mg/tab), para el activo C de 0.64 por ciento (0.013 mg/tab), y para el activo D de 0.14 por ciento (0.018 mg/tab), las cuales no son significativas de acuerdo a la cantidad en mg/tab y se cumple con el criterio de que los valores promedio se encuentran dentro del rango del 98-102 por ciento.

La exactitud del método se realizó en tres niveles de concentración, considerando el 80 por ciento y 120 por ciento como referencia para las formulaciones con contenido de 10 y 15 mg del activo D y el 100 por ciento para la concentración objetivo de los demás activos.

Al nivel del 80 por ciento todos los activos cumplen con el C.V. en los factores respuesta, pero ninguno de estos 4 activos incluye el 80 por ciento, cuantificándose más de este valor, lo que implica que el activo A (a concentración de 5 mg/tab) tiene 1.73 por ciento (0.087 mg/tab), el activo B (a concentración de 4 mg/tab) tiene un 0.52 por ciento (0.0208 mg/tab), el activo C (a concentración de 1.6 mg/tab) tiene un 0.93 por ciento (0.0148 mg/tab), y el activo D (a concentración de 10.0 mg/tab) tiene un 0.83 por ciento (0.083 mg/tab), que no son significativos y cumplen con el criterio de que los valores promedio se encuentran dentro del rango del 98-102 por ciento.

Al Nivel del 100 por ciento los cuatro activos cumplen con el C.V. y factor respuesta, y los activos A y C incluyen el 100 por ciento. El activo A tiene un 0.25 por ciento mayor al 100 por ciento (0.016 mg/tab), el activo B tiene un 0.37 por ciento menor al 100 por ciento (0.018 mg/tab), el activo C tiene un 0.008 por ciento (0.036 mg/tab), y finalmente el activo

D con un 0.43 por ciento más del 100 por ciento (0.054 mg/tab),m que en resumen no son significativos.

Al nivel del 120 por ciento los cuatro activos cumplen con el C.V. y factores respuesta y ninguno incluye el 100 por ciento, cuantificándose en todos los casos más del 100 por ciento. Esto implica que el activo A tiene un 0.60 por ciento mayor al 100 por ciento (0.045 mg/tab), el activo B también con un 0.60 por ciento (0.036 mg/tab), el activo C con 1.03 por ciento (0.0247 mg/tab), y el activo D un 0.045 por ciento(0.067 mg/tab), siendo estas diferencias no significativas

El método es preciso para los cuatro activos, incluyendo al activo D a las concentraciones de 10 y 15 mg.

El método es reproducible al límite establecido de < 2 por ciento como referencia (utilizado para métodos de cromatografía), usando placebos cargados para las ocho formulaciones, y así eliminar el efecto de la variabilidad de los activos en cada una de las formulaciones y por ende evaluar la variabilidad del método sin la interferencia de la variación del producto.

El límite de detección y cuantificación de los cuatro activos cumplen con el coeficiente de determinación, sin embargo la ordenada al origen no cruza por cero, todos a un nivel de confianza del 95 y 99 por ciento. Se reportan estos valores para efectos de información en los procesos de verificación de limpieza.

La validación analítica y su respectivo resumen de las ocho fórmulas se encuentra descrito en el anexo de Resultados de Validación.

VIII. Conclusiones

Se logró exitosamente desarrollar un método analítico para la determinación de los principios activos A, B, C y D presentes en ocho diferentes formulaciones de tabletas efervescentes, utilizando la técnica de Electroforesis Capilar. La metodología propuesta requiere de cuatro minutos para lograr la separación y cuatro minutos de lavado entre muestras, obteniéndose picos simétricos con eficiencias promedio de 23000. De la misma forma la validación analítica fue satisfactoria para las ocho formulaciones, cumpliendo con todos los criterios establecidos por la compañía.

Utilizando la técnica de Electroforesis Capilar, se aumenta el tiempo de respuesta por parte del laboratorio, ya que esta metodología permite analizar indistintamente las ocho formulaciones, en contraste con HPLC, donde no es posible inyectar todos los productos en la misma secuencia, por efecto de la composición de los placebos.

Hubo una reducción dramática en el uso de reactivos para análisis, ya que en Electroforesis Capilar se utilizan Buffer acuosos, por lo que no es necesario procesar los residuos como peligrosos, incluyéndose únicamente el sistema de tratamiento de la planta. En cuanto a costos de reactivos en Electroforesis Capilar, por ejemplo para 300 lotes de análisis (Uniformidad de Contenido y Contenido) es necesario un costo de \$ 7,015 USD/300 lotes, mientras que para HPLC el análisis de la misma cantidad de lotes involucra un costo \$ 7,915 USD/300 lotes, lo que representa un ahorro de \$ **900 USD/300 lotes**.

Como podemos ver al ser Electroforesis Capilar una técnica miniaturizada permite utilizar pequeños volúmenes de disolventes y reactivos con una mínima o nula generación de residuos peligrosos. Adicionalmente el costo de las columnas utilizadas también disminuye considerablemente, por ejemplo, medio metro de columna capilar tiene un costo de \$ 115 USD que tiene un promedio de vida de aproximadamente de 3000 inyecciones, mientras que una columna de HPLC tipo CN tiene un costo de aproximadamente \$ 500 USD con un tiempo de vida media de 300-500 inyecciones.

La Electroforesis capilar es una técnica que puede ser validada satisfactoriamente para ser utilizada como método de rutina en un laboratorio de Control de Calidad, para el análisis del producto, antes de su venta.

El control de calidad en la Industria Farmacéutica es especialmente riguroso porque el producto final está destinado a consumo humano. La determinación del contenido de principio activo, productos de degradación, Uniformidad de Contenido y ensayos para seguimiento de estabilidad, así como impurezas relacionadas, subproductos de síntesis de las materias primas que se utilizan para la fabricación de un medicamento, son pruebas de rutina en un laboratorio farmacéutico. El elevado poder de resolución de la Electroforesis Capilar la hace una técnica adecuada para este tipo de pruebas donde la separación de compuestos con una estructura química muy parecida es una actividad diaria.

Finalmente la Electroforesis Capilar resulta ser un método alternativo y/o complementaria de las técnicas tradicionales que se utilizan con mayor frecuencia en los laboratorios en México.

IX. Recomendaciones

- Realizar un lavado (muy importante) entre cada introducción de muestra, para obtener tiempos de migración reproducibles.

- Los buffers de separación se reemplacen cada numero de corridas, para evitar el cambio de concentración en los mismos.

- Los extremos del capilar deben tener la misma longitud.

- El nivel del buffer se separación en los viales, deben ser los mismos, para evitar diferencias de presión.

- Después de la introducción de la muestra o estándar, realizar un paso de enjuague de los extremos del capilar (parte externa), para eliminar los restos de la muestra anterior.

- Eliminar de 1 a 2 milímetros de recubierta de poliamida del capilar, para evitar que se adhiera solución en la entrada del capilar, que afecte el resultado

X. Referencias Bibliográficas.

- 1.- Swarbrick J., C. Boylan J., *Encyclomedia of Pharmaceutical Technology*, 5, (1992).p 45-71.
- 1.- Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D. 1981. "Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries". *Anal. Chem.*, 53, (1981), 1298-1302.
- 2.- Takao Tsuda, Kazuhiro Nomura y Genkichi Nakagawa, *J. Chromatogr.* 248, (1982), 241-247.
- 3.- Paul D. Grossman, "Free solution capillary electrophoresis, in capillary electrophoresis", Paul D. Grossman y Joel Colburn, Eds., San Diego, Academic Harcourt Brace Jovanovich, 1992, pp. 111-132.
- 4.- Shigeru Terabe , Koji Otsuka, Kunimichi Ichikawa, Akihiro Tsuchiya y Teiichi Ando, *Anal. Chem*, 56, (1984), p. 111-113
- 5.- Shigeru Terabe , Koji Otsuka y Teiichi Ando, *Anal. Chem*, 57, (1985), p. 834.
- 6.- D. Edward Burton, M.J. Sepaniak y M.P. Maskarinec, *J. Chrom. Sci.*, 24, (1986), p. 347-351.
- 7.- A.S. Cohen y B.L. Karger, *J. Chromatogr.* 397(1987), 409-417.
- 8.- Andras Guttman y Nelson Cooke, *Anal. Chem.* 63, (1991), 2038-2042
- 9.- Andras Guttman, Bart Wanders y Nelson Cooke, *Anal. Chem.* 64, (1992), 2348-2351
- 10.- Mingde Zhu, David L. Hansen, Sam Burd y Frank Gannon, *J. Chromatogr.* 480, (1989), 311-319.
- 11.- Kiyohito Shimura y Barry L. Karger, *Anal. Chem.* 66, (1994), 9-15
- 12.- P. Jandik y W.R. Jones, *J. Chromatogr.* 546, (1991), 431-443
- 13.- Peter Stehle, Hans-Peter Bahsitta y Peter Furst, *J. Chromatogr.* 370, (1986), 131-138
- 14.- Frantisek Foret, Eva Szoko y Barry Karger, *J. Chromatogr.* 608, (1992), 3-12
- 15.- Robert P. Oda, Thomas C. Spelsberg y James Landers, *LC-GC* 12, (1994), 50-51
- 16.- K.D. Lukacs y J.W. Jorgenson, *J. High Res. Chromatog.* 8, (1985), 407-411
- 17.- Shigeru Terabe , Koji Otsuka y Teiichi Ando, *Anal. Chem*, 61, (1989), 251-260
- 18.- Michael Albin, Paul D. Grossman y Stephen E. Moring, *Anal. Chem.* 65, (1993), 489A-497^a
- 19.- F.E.P. Mikkers, F. M. Everaerts y Th. P.E.M. Verheggen, *J. Chromatogr.* 169, (1979), 1-10
- 20.- Xiaohua Huang, Manuel J. Gordon y Richard N. Zare, *Anal. Chem.* 60, (1988), 375-377
- 21.- Kevin D. Altria, *LC-GC*, 11 (1993), 438-442
- 22.- Ludwig Huber y Stephan A. Goerge, Eds., *Diode array detection in HPLC*, New York, Marcel Dekker, 1993, Chapter 3
- 23.- Hamish Small y Theodore E. Miller Jr. *Anal. Chem.* 54 (1982), 462-469
- 24.- *European Pharmacopeia*, fifth edition. Convention of the Elaboration of a European Phramacopeia, 2005.

XI. Anexo-Resultados de Validación.

11.1 Linealidad y Precisión del Sistema

11.1.1. Linealidad del Sistema del Antihistamínico 1 (Activo A):

Linealidad del Sistema Activo A			
Nivel (%)	Conc. mg/mL	Área Std/Area ISTD	Factor Respuesta
50	0.77850	18.73700	4.155E-02
	0.77850	18.93600	4.111E-02
60	0.93400	22.49300	4.152E-02
	0.93400	21.94650	4.256E-02
70	1.05400	25.73450	4.096E-02
	1.05400	25.17250	4.187E-02
80	1.24550	28.82800	4.320E-02
	1.24550	28.53700	4.365E-02
90	1.40150	33.53750	4.179E-02
	1.40150	32.96350	4.252E-02
100	1.55700	37.23050	4.182E-02
	1.55700	37.11850	4.195E-02
110	1.71250	40.74700	4.203E-02
	1.71250	40.82950	4.194E-02
120	1.86850	43.10850	4.334E-02
	1.86850	44.78500	4.172E-02
130	2.02400	48.38450	4.183E-02
	2.02400	42.60900	4.750E-02
140	2.18000	51.41450	4.240E-02
	2.18000	50.85450	4.287E-02
150	2.33550	54.22550	4.307E-02
	2.33550	54.72950	4.267E-02
Promedio FR			4.235E-02
CV			1.615

Regresión Lineal Concentración vs Área	
a	8.045E-03
b	23.32785
r²	0.99806

11.1.2. Linealidad del Sistema del Antihistamínico 2 (Activo B):

Linealidad del Sistema Activo B			
Nivel (%)	Conc. mg/mL	Área Std/Área ISTD	Factor Respuesta
50	0.75150	31.80150	2.363E-02
	0.75150	31.98000	2.350E-02
60	0.90150	37.94100	2.376E-02
	0.90150	37.02750	2.435E-02
70	1.05150	43.78800	2.401E-02
	1.05150	42.25050	2.489E-02
80	1.20300	48.31950	2.490E-02
	1.20300	47.59050	2.528E-02
90	1.35300	56.68335	2.387E-02
	1.35300	55.05450	2.458E-02
100	1.50300	63.17400	2.379E-02
	1.50300	62.71350	2.397E-02
110	1.65300	69.49350	2.379E-02
	1.65300	69.33000	2.384E-02
120	1.80450	71.22750	2.533E-02
	1.80450	75.61050	2.387E-02
130	1.95450	81.31200	2.404E-02
	1.95450	79.36050	2.463E-02
140	2.10450	86.51850	2.432E-02
	2.10450	84.39300	2.494E-02
150	2.25450	90.12000	2.502E-02
	2.25450	92.86350	2.428E-02
Promedio FR			2.430E-02
CV			2.293

Regresión Lineal	
Concentración vs Área	
a	7.973E-03
b	40.28677
r²	0.99535

11.1.3. Linealidad del Sistema del Descongestionante (Activo C):

Linealidad del Sistema Activo C			
Nivel (%)	Conc. mg/mL	Área Std/Área ISTD	Factor Respuesta
50	0.98100	112.90425	8.689E-03
	0.98100	112.72800	8.702E-03
60	1.17675	134.32425	8.761E-03
	1.17675	133.42650	8.819E-03
70	1.37325	155.77875	8.815E-03
	1.37325	155.86725	8.810E-03
80	1.56975	174.75000	8.983E-03
	1.56975	174.77100	8.982E-03
90	1.76550	196.74675	8.973E-03
	1.76550	196.98975	8.962E-03
100	1.96200	216.63375	9.057E-03
	1.96200	216.12825	9.078E-03
110	2.15775	234.89400	9.186E-03
	2.15775	234.32550	9.208E-03
120	2.35425	255.59775	9.211E-03
	2.35425	254.81400	9.239E-03
130	2.55000	275.32875	9.262E-03
	2.55000	275.76225	9.247E-03
140	2.74650	292.09125	9.403E-03
	2.74650	7042.46925	3.900E-04
150	2.94300	313.88025	9.376E-03
	2.94300	312.51150	9.417E-03
Promedio FR			9.071E-03
CV			2.617

Regresión Lineal Concentración vs Área	
a	2.038E-01
b	101.63414
r²	0.99948

11.1.4. Linealidad del Sistema del Antitusivo (Activo D):

Linealidad del Sistema Activo D			
Nivel (%)	Conc. mg/mL	Área Std/Area ISTD	Factor Respuesta
50	3.71040	249.66600	1.486E-02
	3.71040	253.01640	1.466E-02
60	4.45320	298.18560	1.493E-02
	4.45320	292.64040	1.522E-02
70	5.19480	341.12280	1.523E-02
	5.19480	334.74240	1.552E-02
80	5.93640	378.86760	1.567E-02
	5.93640	375.01560	1.583E-02
90	6.67920	435.86040	1.532E-02
	6.67920	427.91280	1.561E-02
100	7.42080	479.56320	1.547E-02
	7.42080	477.67440	1.554E-02
110	8.16360	521.76480	1.565E-02
	8.16360	521.34000	1.566E-02
120	8.90520	550.55760	1.617E-02
	8.90520	566.36520	1.572E-02
130	9.64680	611.82480	1.577E-02
	9.64680	599.03640	1.610E-02
140	10.38960	648.89760	1.601E-02
	10.38960	642.11160	1.618E-02
150	11.13120	684.78840	1.625E-02
	11.13120	693.06120	1.606E-02
Promedio FR			1.561E-02
CV			2.827

Regresión Lineal Concentración vs Área	
a	2.639E-01
b	59.3364
r²	0.99842

11.1.5. Precisión del Sistema del Antihistamínico 1 (Activo A) y Antihistamínico 2 (Activo B):

Precisión del Sistema Activo A		
Nivel (%)	Área Std/Área ISTD	Factor Respuesta
100	37.23050	4.182E-02
	37.11850	4.195E-02
	37.06850	4.200E-02
	37.15150	4.191E-02
	36.94200	4.215E-02
	36.93450	4.216E-02

Precisión del Sistema Activo B		
Nivel (%)	Área Std/Área ISTD	Factor Respuesta
100	63.17400	2.379E-02
	62.71350	2.397E-02
	62.70900	2.397E-02
	62.37750	2.410E-02
	62.10150	2.420E-02
	62.44500	2.407E-02

11.1.6. Precisión del Sistema del Descongestionante (Activo C) y del Antitusivo (Activo D)

Precisión del Sistema Activo C		
Nivel (%)	Área Std/Área ISTD	Factor Respuesta
100	216.63375	9.057E-03
	216.12825	9.078E-03
	215.94900	9.085E-03
	216.72450	9.053E-03
	215.93550	9.086E-03
	215.45475	9.106E-03

Precisión del Sistema Activo D		
Nivel (%)	Área Std/Área ISTD	Factor Respuesta
100	479.56320	1.547E-02
	477.67440	1.554E-02
	476.12160	1.559E-02
	477.41640	1.554E-02
	474.79800	1.563E-02
	475.49160	1.561E-02

11.2 Linealidad y Exactitud del Método

11.2.1. Linealidad del Método Antihistamínico 1 (Activo A):

Linealidad del Método Activo A			
Nivel (%)	Cantidad Adicionada (mg)	Cantidad Recuperada (mg)	% Recuperado
50	15.7	15.7	100.3
	15.6	15.6	100.0
	15.7	15.8	100.6
60	18.8	18.9	100.8
	18.8	19.0	101.1
	18.8	19.0	100.8
70	21.9	22.3	101.6
	21.9	22.2	101.1
	21.9	22.3	101.8
80	25.0	25.5	102.0
	25.1	25.4	101.2
	25.0	25.6	102.2
90	28.2	28.3	100.4
	28.1	28.3	100.5
	28.2	28.3	100.5
100	31.3	31.4	100.3
	31.3	31.4	100.5
	31.3	31.3	100.2
110	34.4	34.6	100.4
	34.4	34.3	99.7
	34.4	34.2	99.6
120	37.5	37.8	100.8
	37.5	37.7	100.5
	37.6	37.8	100.7
130	40.7	40.7	100.1
	40.7	40.8	100.4
	40.7	40.8	100.2
140	43.8	43.8	99.9
	43.8	43.9	100.2
	43.8	43.9	100.2
150	46.9	46.7	99.6
	46.9	46.9	99.9
	46.9	46.7	99.6

Promedio % Rec. 100.5
C.V 0.66

Regresión Lineal Cant Adic vs Cant Recup	a	7.606E-02
	b	0.99205
	r²	0.9998

11.2.2. Exactitud del Método Antihistamínico 1 (Activo A)

Exactitud del Método Activo A			
Nivel (%)	Área Std/Área ISTD	Factor Respuesta	% Recuperado
80	25.0	25.5	102.0
	25.1	25.4	101.2
	25.0	25.6	102.2
	25.0	25.5	101.8
	25.0	25.4	101.6
	25.0	25.4	101.6
Promedio % Recuperado			101.7
C.V.			0.34

Exactitud del Método Activo A			
Nivel (%)	Área Std/Área ISTD	Factor Respuesta	% Recuperado
100	31.3	31.4	100.3
	31.3	31.4	100.5
	31.3	31.3	100.2
	31.3	31.5	100.5
	31.3	31.3	100.2
	31.3	31.2	99.8
Promedio % Recuperado			100.3
C.V.			0.26

Exactitud del Método Activo A			
Nivel (%)	Área Std/Área ISTD	Factor Respuesta	% Recuperado
120	37.5	37.8	100.7
	37.5	37.7	100.4
	37.6	37.8	100.5
	37.6	37.7	100.3
	37.5	37.9	100.9
	37.6	37.9	100.8
Promedio % Recuperado			100.6
C.V.			0.23

11.2.3. Linealidad del Método Antihistamínico 2 (Activo B):

Linealidad del Método Activo B			
Nivel (%)	Cantidad Adicionada (mg)	Cantidad Recuperada (mg)	% Recuperado
50	5.0	5.1	101.0
	5.1	5.1	100.0
	5.1	5.1	100.0
60	6.0	6.0	100.0
	6.0	6.0	100.0
	6.1	6.1	100.0
70	7.1	7.1	100.0
	7.0	7.1	100.7
	7.0	7.1	101.4
80	8.0	8.1	101.3
	8.1	8.2	101.2
	8.0	8.1	101.3
90	9.0	9.0	100.0
	9.0	9.1	100.6
	9.1	9.1	100.0
100	10.0	10.0	100.0
	10.1	10.1	100.5
	10.1	10.1	100.0
110	11.1	11.2	100.9
	11.1	11.0	99.5
	11.0	11.0	100.0
120	12.1	12.3	101.7
	12.0	12.1	100.8
	12.1	12.2	100.8
130	13.0	13.2	101.2
	13.0	13.2	101.5
	13.1	13.2	100.8
140	14.1	14.2	100.7
	14.1	14.2	101.1
	14.0	14.2	101.4
150	15.0	15.1	100.7
	15.0	15.2	101.3
	15.0	15.1	100.7

Promedio % Rec. 100.6
C.V 0.59

Regresión Lineal Cant Adic vs Cant Recup	a	-1.400E-02
	b	1.01407
	r²	0.9997

11.2.4. Exactitud del Método Antihistamínico 2 (Activo B):

Exactitud del Método Activo B			
Nivel (%)	Área Std/Área ISTD	Factor Respuesta	% Recuperado
80	8.0	8.1	101.3
	8.1	8.2	101.2
	8.0	8.1	101.3
	8.0	8.1	100.6
	8.0	8.1	100.6
	8.0	8.1	100.6
Promedio % Recuperado			100.9
C.V.			0.36

Exactitud del Método Activo B			
Nivel (%)	Área Std/Área ISTD	Factor Respuesta	% Recuperado
100	10.0	10.0	100.0
	10.1	10.1	100.5
	10.1	10.1	100.0
	10.0	10.1	100.5
	10.1	10.1	100.0
	10.1	10.0	99.5
Promedio % Recuperado			100.1
C.V.			0.38

Exactitud del Método Activo B			
Nivel (%)	Área Std/Área ISTD	Factor Respuesta	% Recuperado
120	12.1	12.2	101.2
	12.0	12.1	100.8
	12.1	12.2	100.4
	12.0	12.1	100.8
	12.1	12.3	101.7
	12.0	12.2	101.3
Promedio % Recuperado			101.0
C.V.			0.45

11.2.5. Linealidad del Método Antidescongestionante (Activo C):

Linealidad del Método Activo C			
Nivel (%)	Cantidad Adicionada (mg)	Cantidad Recuperada (mg)	% Recuperado
50	13.2	13.3	101.1
	13.2	13.2	100.4
	13.2	13.2	100.0
60	15.8	15.8	100.3
	15.8	15.8	100.0
	15.8	15.8	100.3
70	18.4	18.5	100.5
	18.4	18.5	100.5
	18.4	18.6	101.4
80	21.1	21.3	101.0
	21.1	21.2	100.7
	21.1	21.2	100.5
90	23.7	23.7	100.2
	23.7	23.7	100.2
	23.6	23.7	100.2
100	26.3	26.1	99.2
	26.3	26.2	99.6
	26.3	26.1	99.4
110	28.9	29.0	100.2
	28.9	28.8	99.5
	28.9	28.8	99.7
120	31.6	31.9	101.0
	31.5	31.7	100.6
	31.6	31.7	100.3
130	34.1	34.2	100.3
	34.2	34.4	100.7
	34.2	34.4	100.6
140	36.8	36.7	99.7
	36.8	36.7	99.7
	36.8	36.7	99.9
150	39.4	39.2	99.4
	39.4	39.5	100.1
	39.4	39.4	100.0

Promedio % Rec. 100.2
C.V 0.52

Regresión Lineal Cant Adic vs Cant Recup	a	2.760E-02
	b	0.9964
	r²	0.9998

11.2.6. Exactitud del Método Antidescongestionante (Activo C):

Exactitud del Método Activo C			
Nivel (%)	Área Std/Área ISTD	Factor Respuesta	% Recuperado
80	21.1	21.3	101.0
	21.1	21.2	100.7
	21.1	21.2	100.5
	21.0	21.1	100.5
	21.1	21.1	100.2
	21.1	21.1	100.2
Promedio % Recuperado			100.5
C.V.			0.3

Exactitud del Método Activo C			
Nivel (%)	Área Std/Área ISTD	Factor Respuesta	% Recuperado
100	26.3	26.1	99.2
	26.3	26.2	99.6
	26.3	26.1	99.4
	26.3	26.4	100.2
	26.3	26.3	99.8
	26.3	26.2	99.6
Promedio % Recuperado			99.6
C.V.			0.35

Exactitud del Método Activo C			
Nivel (%)	Área Std/rea ISTD	Factor Respuesta	% Recuperado
120	31.6	31.9	101.0
	31.5	31.7	100.6
	31.6	31.7	100.3
	31.5	31.7	100.6
	31.6	31.8	100.6
	31.6	31.7	100.5
Promedio % Recuperado			100.6
C.V.			0.23

11.2.7. Linealidad del Método Antitusivo (Activo D)

Linealidad del Método Activo D			
Nivel (%)	Cantidad Adicionada (mg)	Cantidad Recuperada (mg)	% Recuperado
50	31.3	31.5	100.8
	31.3	31.3	100.0
	31.3	31.2	99.7
60	37.5	37.6	100.3
	37.5	37.6	100.3
	37.6	37.7	100.3
70	43.8	44.0	100.5
	43.8	44.0	100.5
	43.8	44.3	101.1
80	50.1	50.5	100.9
	50.1	50.5	100.9
	50.0	50.4	100.7
90	56.3	56.5	100.4
	56.3	56.6	100.5
	56.3	56.4	100.3
100	62.5	62.2	99.4
	62.5	62.3	99.7
	62.6	62.2	99.4
110	68.8	69.1	100.4
	68.8	68.5	99.6
	68.8	68.8	100.1
120	75.1	75.3	100.3
	75.1	75.3	100.3
	75.1	75.4	100.4
130	81.3	81.0	99.6
	81.3	81.4	100.2
	81.3	81.5	100.2
140	87.5	87.3	99.8
	87.5	87.3	99.7
	87.5	87.5	100.0
150	93.8	93.0	99.1
	93.8	93.5	99.6
	93.8	93.4	99.6

Promedio % Rec. 100.1
C.V 0.66

Regresión Lineal Cant Adic vs Cant Recup	a	1.036E-01
	b	0.9923
	r²	0.9998

11.2.8. Exactitud del Método Antitusivo (Activo D):

Exactitud del Método Activo D			
Nivel (%)	Cantidad Adicionada (mg)	Cantidad Recuperada (mg)	% Recuperado
80	50.1	50.5	100.9
	50.0	50.5	101.0
	50.0	50.4	100.7
	50.0	50.4	100.7
	50.1	50.5	100.9
	50.0	50.5	100.9
Promedio % Recuperado			100.8
C.V.			0.1

Exactitud del Método Activo D			
Nivel (%)	Cantidad Adicionada (mg)	Cantidad Recuperada (mg)	% Recuperado
100	62.5	62.2	99.4
	62.5	62.3	99.7
	62.6	62.2	99.4
	62.5	62.3	99.7
	62.6	62.6	100.0
	62.6	62.1	99.2
Promedio % Recuperado			99.6
C.V.			0.29

Exactitud del Método Activo D			
Nivel (%)	Cantidad Adicionada (mg)	Cantidad Recuperada (mg)	% Recuperado
120	75.1	75.3	100.3
	75.1	75.3	100.3
	75.1	75.4	100.3
	75.1	75.4	100.4
	75.1	75.6	100.7
	75.1	75.6	100.7
Promedio % Recuperado			100.5
C.V.			0.2

11.3 Precisión del Método

Precisión del Método				
Analito Muestra	Activo A mg/tab	Activo B mg/tab	Activo C mg/tab	Activo D mg/tab
1	6.22	2	5.19	10.1
2	6.22	1.99	5.23	10.11
3	6.17	1.98	5.28	10.04
4	6.24	2.05	5.18	10.06
5	6.17	2.05	5.29	10.02
6	6.22	2.01	5.21	10.09
Promedio	6.21	2.01	5.23	10.07
C.V.	0.47	1.5	0.88	0.36

Precisión del Método				
Analito Muestra	Activo A mg/tab	Activo B mg/tab	Activo C mg/tab	Activo D mg/tab
1	6.33	2.01	5.19	15.05
2	6.29	2.08	5.28	15
3	6.25	2.04	5.29	14.97
4	6.17	2.08	5.25	14.93
5	6.18	2.08	5.25	14.97
6	6.19	2.04	5.14	14.92
Promedio	6.24	2.06	5.23	14.97
C.V.	1.05	1.44	1.1	0.32

11.4 Precisión Intermedia

Fórmula 1

Precisión Intermedia								
Fórmula 1	Dia 1				Dia 2			
	Analista 1		Analista 2		Analista 1		Analista 2	
Activo	C	B	C	B	C	B	C	B
Unidades	mg/tab		mg/tab		mg/tab		mg/tab	
No. de Muestra								
1	5.22	2.03	5.29	2.01	5.21	2.00	5.24	1.99
2	5.22	2.03	5.23	2.02	5.22	1.98	5.21	2.00
3	5.22	2.05	5.28	1.99	5.23	2.01	5.25	2.01
4	5.22	2.04	5.25	2.03	5.15	1.97	5.25	2.01
5	5.19	2.05	5.29	1.99	5.25	2.02	5.23	1.99
6	5.21	2.05	5.24	1.97	5.23	2.00	5.24	1.99
Promedio	5.21	2.04	5.26	2.00	5.22	2.00	5.24	2.00
C.V.	0.23	0.48	0.51	1.11	0.66	0.93	0.29	0.49

Resultado Global		
Activo	C	B
Promedio	5.23	2.01
C.V.	0.58	1.21

Precisión Intermedia

Fórmula 2

Precisión Intermedia				
Fórmula 2	Dia 1		Dia 2	
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
Activo	C	C	C	C
Unidades	mg/tab	mg/tab	mg/tab	mg/tab
No. de Muestra				
1	5.25	5.22	5.22	5.25
2	5.29	5.22	5.31	5.15
3	5.32	5.18	5.3	5.15
4	5.28	5.23	5.26	5.3
5	5.28	5.22	5.25	5.27
6	5.33	5.24	5.29	5.16
Promedio	5.29	5.22	5.27	5.21
C.V.	0.55	0.39	0.65	1.3

Resultado Global	
Activo	C
Promedio	5.25
C.V,	0.99

Precisión Intermedia

Fórmula 3

Precisión Intermedia												
Fórmula 3	Dia 1						Dia 2					
	Analista 1			Analista 2			Analista 1			Analista 2		
Activo	C	B	D	C	B	D	C	B	D	C	B	D
Unidades	mg/tab			mg/tab			mg/tab			mg/tab		
No. de Muestra												
1	5.23	1.98	9.94	5.24	1.99	9.75	5.20	1.99	9.85	8.18	1.97	9.75
2	5.20	1.98	9.85	5.12	1.97	9.71	5.31	2.01	10.01	8.18	2.00	9.84
3	5.25	1.98	9.86	5.11	1.98	9.72	5.27	2.01	9.95	5.19	1.95	9.72
4	5.25	2.00	9.92	5.10	1.95	9.59	5.26	1.99	9.91	5.18	1.98	9.79
5	5.26	1.99	9.93	5.11	1.96	9.70	5.29	2.00	10.04	5.16	1.97	9.73
6	5.25	1.98	9.91	5.12	1.98	9.69	5.25	2.01	9.93	5.19	1.98	9.79
Promedio	5.24	1.99	9.90	5.13	1.97	9.69	5.26	2.00	9.95	5.18	1.98	9.77
C.V.	0.42	0.42	0.38	1.03	0.75	0.56	0.72	0.49	0.69	0.21	0.83	0.46

Resultado Global			
Activo	C	B	D
Promedio	5.20	1.98	9.83
C.V,	1.18	0.85	1.17

Precisión Intermedia

Fórmula 4

Precisión Intermedia								
Fórmula 4	Dia 1				Dia 2			
	Analista 1		Analista 2		Analista 1		Analista 2	
Activo	C	B	C	B	C	B	C	B
Unidades	mg/tab		mg/tab		mg/tab		mg/tab	
No. de Muestra								
1	5.20	1.95	5.20	2.01	5.36	2.09	5.26	2.03
2	5.27	2.09	5.24	2.01	5.26	2.09	5.23	2.02
3	5.21	2.04	5.30	2.02	5.29	2.06	5.24	2.01
4	5.24	2.06	5.27	2.00	5.25	2.00	5.27	2.02
5	5.21	2.07	5.25	2.01	5.26	2.04	5.25	2.02
6	5.26	2.04	5.26	2.02	5.23	2.02	5.25	2.04
Promedio	5.23	2.04	5.25	2.01	5.28	2.05	5.25	2.02
C.V.	0.56	2.39	0.63	0.37	0.87	1.80	0.27	0.51

Resultado Global		
Activo	C	B
Promedio	5.25	2.03
C.V.	0.65	1.62

Precisión Intermedia

Fórmula 5

Precisión Intermedia								
Fórmula 5	Dia 1				Dia 2			
	Analista 1		Analista 2		Analista 1		Analista 2	
Activo	C	B	C	B	C	B	C	B
Unidades	mg/tab		mg/tab		mg/tab		mg/tab	
No. de Muestra								
1	5.23	2.05	5.22	2.02	5.24	2.07	5.21	1.99
2	5.18	2.00	5.22	1.98	5.28	1.98	5.21	2.00
3	5.22	2.03	5.24	2.00	5.28	2.05	5.26	2.01
4	5.20	2.05	5.24	2.02	5.28	2.07	5.23	2.01
5	5.19	2.02	5.24	2.01	5.26	2.05	5.25	2.05
6	5.17	2.02	5.23	2.01	5.22	2.06	5.24	2.02
Promedio	5.20	2.03	5.23	2.01	5.26	2.05	5.23	2.01
C.V.	0.45	0.96	0.19	0.75	0.48	1.65	0.39	1.02

Resultado Global		
Activo	C	B
Promedio	5.23	2.02
C.V.	0.56	1.33

Precisión Intermedia

Fórmula 6

Precisión Intermedia												
Fórmula 6	Dia 1						Dia 2					
	Analista 1			Analista 2			Analista 1			Analista 2		
Activo	C	D	A	C	D	A	C	D	A	C	D	A
Unidades	mg/tab			mg/tab			mg/tab			mg/tab		
No. de Muestra												
1	5.23	9.75	6.14	5.41	10.20	6.32	5.23	10.05	6.22	5.26	9.95	6.26
2	5.21	9.90	6.23	5.24	9.93	6.12	5.19	9.95	6.20	5.25	9.84	6.15
3	5.14	9.72	6.14	5.23	9.94	6.22	5.20	9.98	6.22	5.24	9.82	6.16
4	5.20	9.74	6.17	5.26	9.96	6.24	5.26	9.87	6.21	5.23	9.90	6.20
5	5.16	9.57	6.12	5.21	9.90	6.17	5.27	9.95	6.26	5.25	9.93	6.21
6	5.18	9.73	6.15	5.23	9.94	6.19	5.23	9.96	6.26	5.23	9.88	6.20
Promedio	5.19	9.74	6.16	5.26	9.98	6.21	5.23	9.96	6.23	5.24	9.89	6.20
C.V.	0.64	1.08	0.63	1.40	1.11	1.10	0.60	0.58	0.41	0.23	0.51	0.63

Resultado Global			
Activo	C	D	A
Promedio	5.23	9.89	6.2
C.V,	0.95	1.28	0.81

Precisión Intermedia

Fórmula 7

Precisión Intermedia												
Fórmula 7	Día 1						Día 2					
	Analista 1			Analista 2			Analista 1			Analista 2		
Activo	C	B	D	C	B	D	C	B	D	C	B	D
Unidades	mg/tab			mg/tab			mg/tab			mg/tab		
No. de Muestra												
1	5.21	2.03	10.4	5.22	2.02	10.5	5.23	2.03	10.4	5.34	2.04	10.6
2	5.18	2.02	10.4	5.25	2.02	10.5	5.24	1.99	10.3	5.33	2.01	10.6
3	5.15	2.02	10.3	5.27	2.04	10.5	5.26	2.05	10.5	5.23	2.00	10.4
4	5.28	2.04	10.5	5.25	2.04	10.5	5.25	2.01	10.3	5.28	2.02	10.4
5	5.19	1.99	10.3	5.26	2.02	10.5	5.29	1.96	10.3	5.25	1.98	10.2
6	5.20	2.01	10.4	5.29	2.04	10.5	5.20	1.99	10.2	5.24	2.01	10.4
Promedio	5.20	2.02	10.4	5.26	2.03	10.5	5.25	2.01	10.3	5.28	2.01	10.4
C.V.	0.84	0.85	0.72	0.44	0.54	0.00	0.58	1.60	1.00	0.89	1.00	1.44

Resultado Global			
Activo	C	B	D
Promedio	5.25	2.02	10.4
C.V.	0.86	1.10	1.07

Precisión Intermedia

Fórmula 8

Precisión Intermedia									
Fórmula 8	Dia 1				Dia 2				
	Analista 1		Analista 2		Analista 1		Analista 2		
Activo	B	D	B	D	B	D	B	D	D
Unidades	mg/tab		mg/tab		mg/tab		mg/tab		
No. de Muestra									
1	1.96	14.5	1.97	14.5	1.96	14.5	1.93	14.3	
2	1.95	14.5	1.96	14.4	1.97	14.5	1.98	14.4	
3	1.95	14.5	1.96	14.3	1.65	14.4	1.96	14.4	
4	1.94	14.4	1.95	14.3	1.96	14.5	1.92	14.2	
5	1.93	14.4	1.93	14.1	1.95	14.5	1.93	14.2	
6	1.96	14.5	1.93	14.1	1.96	14.5	1.92	14.2	
Promedio	1.95	14.5	1.95	14.3	1.96	14.5	1.94	14.3	
C.V.	0.60	0.36	0.86	1.12	0.38	0.28	1.26	0.69	

Resultado Global		
Activo	B	D
Promedio	1.95	14.4
C.V,	0.85	0.94

Resumen Validación Analítica

Parámetro	Límites	Resultados	Resultados	Resultados	Resultados
		Activo A	Activo C	Activo B	Activo D
Especificidad		Específico	Específico	Específico	Específico

Linealidad del Sistema	$r^2 \geq 0.98$	0.9981	0.9995	0.9953	0.9985
	C.V. FR (reportar)	1.62	2.62	2.29	2.83
	Rango por ciento	50-150	50-150	50-150	50-150
Precisión del Sistema	C.V. ≤ 1.5 por ciento	0.32	0.22	0.59	0.38
Linealidad del Método	$r^2 \geq 0.98$	0.9998	0.9998	0.9997	0.9998
	Pendiente ≈ 1	0.9921	0.9964	1.0141	0.9923
	Ordenada al origen ≈ 0	0.0761	0.0276	-0.0140	0.1036
	C.V. por ciento Recuperado ≤ 1.5 por ciento	0.66	0.52	0.59	0.49
	Intervalo de Confianza al 95 por ciento, promedio entre 98-102 por ciento	100.3-100.8 No incluye el 100 por ciento Promedio=100.5	100.0-100.4, No incluye el 100 por ciento, Promedio=100.2	100.4-100.9, No incluye el 100 por ciento, Promedio=100.6	100.0-100.3, Incluye el 100 por ciento, Promedio=100.1
	Rango por ciento	50-150	50-150	50-150	50-150
Exactitud del Método 80 por ciento	C.V. Cantidad Recuperada < 2 por ciento	0.34	0.30	0.36	0.10
	Int. Conf al 95 por ciento, promedio entre 98-102 por ciento	101.4-102.1 No Incluye el 100 por ciento Promedio=101.7	100.2-100.8 No incluye el 100 por ciento, Promedio=100.5	100.6-101.3, No incluye el 100 por ciento, Promedio=100.9	100.7-100.9, No incluye el 100 por ciento, Promedio=100.8
Resumen de la Validación Analítica					
Parámetro	Límites	Resultados	Resultados	Resultados	Resultados
		Activo A	Activo C	Activo B	Activo D

Exactitud del Método 100 por ciento	C.V. Cantidad Recuperada < 2 por ciento	0.26	0.35	0.38	0.29
	Int. Conf al 95 por ciento, promedio entre 98-102 por ciento	100.0-101.0, Incluye el 100 por ciento, promedio=100.2	99.3-100.0, Incluye el 100 por ciento. Promedio=99.6	99.7-100.5, Incluye el 100 por ciento, promedio=100.1	99.3-99.9, No Incluye el 100 por ciento, Promedio=99.6
Exactitud del Método 120 por ciento	C.V. Cantidad Recuperada < 2 por ciento	0.23	0.23	0.45	0.20
	Int. Conf al 95 por ciento, promedio entre 98-102 por ciento	100.4-100.8, No incluye el 100 por ciento, Promedio =100.6	100.4-100.8, No incluye el 100 por ciento, Promedio=100.6	100.6-101.5, No incluye el 100 por ciento, promedio=101.0	100.2-100.7, No incluye el 100 por ciento, promedio=100.5
Precisión del Método, para dosis de 10 mg	C.V.< 2 por ciento	0.47	0.88	1.50	0.36
Precisión del Método para 15 mg	C.V.< 2 por ciento	1.05	1.10	1.44	0.32

Resumen de la Validación Analítica

Parámetro	Límites	Resultados	Resultados	Resultados	Resultados
		Activo A	Activo C	Activo B	Activo D

Precisión Intermedia	C.V.< 2 por ciento	0.8 (Fórmula 6)	0.7 (Fórmula 4) 1.1 (Fórmula 3) 0.6 (Fórmula 5) 0.6 (Fórmula 1) 1.0 (Fórmula 6) 1.0 (Fórmula 2) 0.9 (Fórmula 7)	1.6 (Fórmula 4) 0.9 (Fórmula 3) 0.9 (Fórmula 8) 1.3(Fórmula 5) 1.2 (Fórmula 1) 1.1 (Fórmula 7)	1.2 (Fórmula) 0.9 (Fórmula 8) 1.3 (Fórmula 6) 1.1 (Fórmula 8)
Limite de Detección y Cuantificación	$r^2 \geq 0.98$	1.00	1.00	1.00	1.00
	Limite Detección al 95 por ciento Confianza	0.0014 mg/mL	0.0009 mg/mL	0.0007 mg/mL	0.0018 mg/mL
	Limite de Detección al 99 por ciento Confianza	0.0019 mg/mL	0.0012 mg/mL	0.0010 mg/mL	0.0025 mg/mL
	Limite de Cuantificación al 95 por ciento Confianza	0.0021 mg/mL	0.0013 mg/mL	0.0011 mg/mL	0.0027 mg/mL
	Limite de Cuantificación al 99 por ciento Confianza	0.0029 mg/mL	0.0018 mg/mL	0.0015 mg/mL	0.0037 mg/mL

XII. Anexo-Evaluación de Costos.

Costo Lote - Análisis de las 8 formulaciones por la técnica de HPLC:

<u>Consumibles</u>	Costo USD (Dólares Americanos)
Viales de HPLC con septa precortada	\$ 9.50
Columna de HPLC, CN (para 400 inyecciones promedio)	\$ 500.00
 <u>Reactivos</u>	
Fase Móvil (Acetonitrilo HPLC+Dihidrogenofosfato de Potasio)	\$ 2.80
 <u>Residuos Peligrosos</u>	
3.0 litros	\$ 0.75

Observaciones:

El tiempo de duración de la columna es de 400 inyecciones, equivalente a analizar 40 lotes de producto terminado.

Costo Lote - Análisis de las 8 formulaciones por la técnica de EC:

Consumibles

	Costo USD (Dólares Americanos))
Viales de Electroforesis	\$ 15.0
Capilar (para 3000 inyecciones promedio)	\$ 115.00

Reactivos

Ácido o-fosfórico + Trietanolamina	\$ 8.00
------------------------------------	---------

Residuos Peligrosos

Ninguno	\$ 0.00
---------	---------

Observaciones:

El tiempo de duración del capilar promedio es de 3000 inyecciones equivalente a analizar 300 lotes de producto terminado.

Tomando como referencia la capacidad máxima de análisis de EC, que es de 300 lotes de producto terminado, utilizando un solo capilar, y los costos mencionados arriba para este tipo de análisis, el monto total es de \$ 7,015 USD/300 lotes, mientras que para analizar el mismo numero de lotes por HPLC, el costo es de \$ 7,915 USD/300 lotes, con la utilización de equivalente de 8 columnas

HPCL. Esto implica un ahorro en consumo de reactivos y tratamiento de residuos peligrosos por EC de \$ 900 USD/300 lotes de producto terminado en comparación con HPLC.

Este breve análisis, únicamente refleja el costo relacionado a los reactivos y materiales auxiliares principales que están involucrados en el análisis de las 8 formulaciones evaluadas.

Adicionalmente se evaluó el impacto en costo de los tiempos directos e indirectos de los análisis de las 8 formulaciones, no observándose un ahorro significativo debido a que el tiempo de preparación de las muestras y el tiempo de uso de los equipos no cambio en forma dramática. Sin embargo, existen beneficios en la versatilidad de análisis, disposición del producto para venta, una metodología de análisis más limpia y segura para el químico analista, así como un beneficio al medio ambiente en la reducción de la generación de residuos peligrosos y su manejo.