



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUATITLÁN

“DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE SIBUTRAMINA EN PARCHES DERMATOLÓGICOS POR ELECTROFORESIS CAPILAR”

TESIS

U. N. A. M.
PARA OBTENER EL TÍTULO DE FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUATITLÁN

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO



PRESENTA:

ANGELA ADRIANA FERNÁNDEZ RUIZ
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASESORA:

DRA. ALMA LUISA REVILLA VÁZQUEZ

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2010

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CUAUTILÁN. AV. CALLE DE LA UNIÓN S/N. CUAUTILÁN, ESTADO DE MÉXICO. TEL: 01 (52) 521 510 0000. WWW.UTICUAUTILAN.UMEXICO.MX



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVERRA DE
MEXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

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

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos
comunicar a usted que revisamos la Tesis:
Desarrollo de un Método analítico para la cuantificación
de Sibutramina en parches dermatológicos por electroforesis
canilar.

que presenta la pasante: Anzela Mariana Fernández Ruiz
con número de cuenta: 30120398-0 para obtener el título de:
Química Farmacéutica Bióloga

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de Marzo de 2010

PRESIDENTE DAR. Juan José Díaz Escquivel

VOCAL QFR. Elia Granaños Enriquez

SECRETARIO Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez

PRIMER SUPLENTE Dra. Eva María Molina Triniçad

SEGUNDO SUPLENTE MI. Claudia Mariano Hernández



AGRADECIMIENTOS

- ❖ *A la Universidad Nacional Autónoma de México por la calidad en la formación académica que he recibido, por recibirme desde adolescentes hasta el día de hoy que me permite salir como profesionista de alto nivel.*
- ❖ *A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por ser mi segunda casa, por enseñarme los valores éticos, morales, profesionales, y la educación recibida que permitirá mi desempeño como profesionista contribuyendo a formar un país con un futuro más próspero y justo para las futuras generaciones.*
- ❖ *A la Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez por todo su apoyo, consejos y conocimientos brindados durante el desarrollo de este proyecto. Gracias por mostrarse siempre dispuesta a apoyarme y a enseñarme siempre. Gracias por su dedicación e interés en la realización de este proyecto y en la redacción de esta tesis y toda su paciencia.*
- ❖ *A Dios por que me ha permitido terminar esta faceta de mi vida y por que me ha acompañado siempre en el camino.*
- ❖ *A mis padres María del Rosario y Alberto Fernández Morales, por el apoyo y la confianza que me han brindado siempre.*
- ❖ *A mis compañeros de la carrera, en especial a Ángel Daniel, y del Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos*
- ❖ *A los sinodales por su atención y tiempo dedicado para el mejoramiento de este trabajo.*
- ❖ *Al Proyecto PAPIIT IN208608.*

ÍNDICE GENERAL

1.	Introducción	1
2.	Objetivos	2
3.	Generalidades	3
3.1	Sibutramina	3
3.1.1	Propiedades Físicoquímicas	3
3.1.2	Indicaciones terapéuticas	4
3.1.3	Mecanismo de acción	4
3.1.4	Farmacocinética y farmacodinamia	5
3.2	Electroforesis Capilar	7
3.2.1	Instrumentación para EC	7
3.2.2	Fundamento de la separación	8
3.2.3	Flujo electroosmótico	9
3.2.4	Factores que afectan la velocidad de migración	10
3.2.5	Aplicaciones	13
3.2.6	Principales ventajas de la electroforesis capilar	14
3.3	Validación	15
3.3.1	Precisión del Sistema y del Método	15
3.3.2	Especificidad	17
3.3.3	Adecuabilidad del Sistema	18
3.3.4	Linealidad del Sistema y del Método	18
3.3.5	Exactitud	19
4.-	Parte Experimental	20
4.1	Equipo	20
4.2	Reactivos	20
4.3	Diagrama de la Metodología general	21
4.4	Preparación del Electrolito soporte	24
4.5	Preparación de Soluciones para la Validación del Método	24
4.5.1	Adecuabilidad del Sistema	25
4.5.2	Especificidad	25
4.5.3	Precisión del Sistema	25
4.5.4	Linealidad del Sistema	25
4.5.5	Linealidad del Método	26

4.5.6 Exactitud y Repetibilidad del Método	27
4.5.7 Precisión Intermedio del Método	27
5. Resultados y Análisis	28
5.1 Optimización del Método analítico	28
5.2 Medio de disolución	28
5.3 Longitud de Absorción	28
5.4 pH del Electrolito Soporte	31
5.5 Selección del Buffer	35
5.6 Selección de la Concentración de Buffer Citratos.	38
5.7 Condiciones Optimas del Método	40
6. Validación	
6.1 Adecuabilidad	41
6.2 Especificad	42
6.3 Precisión del Sistema	42
6.4 Linealidad del Sistema	45
6.5 Exactitud y Respetabilidad	46
6.6 Linealidad del Método	48
6.7 Reproducibilidad del Método	
7. Homogeneidad del parche Dermatológico	49
8. Conclusiones	51
9. Referencias	52

Símbolos y Abreviaturas

Significado

SIB	Sibutramina
ANOVA	Análisis de varianza
EC	Electroforesis Capilar
t_m	Tiempo de migración
nm	Nanómetros
g	Gramos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
M	Molar
μg	Microgramos
kV	Kilovoltios
Desvest	Desviación estándar
CV	Coefficiente de variación
μA	Microampers
λ	Longitud de onda
min	Minutos
conc	Concentración
Cant ad	Cantidad adicionada
Cat rec	Cantidad recuperada
IC(β_0)	Intervalo de confianza para la ordenada al origen
IC(β_1)	Intervalo de confianza para la pendiente
IC(μ)	Intervalo de confianza para la media poblacional
T_{ini}	Tiempo inicial
T_{fin}	Tiempo final
Lim _{inf}	Límite inferior
Lim _{sup}	Límite superior
NaOH	Hidróxido de Sodio
HCl	Acido clorhídrico

1.- INTRODUCCIÓN

En los últimos años la obesidad se ha convertido en un problema relevante de salud pública, por ser una patología sobre el bienestar personal asociando unos elevados índices de morbimortalidad, sobre todo cardiovasculares.

Dentro de los principios activos existentes para atacar la obesidad, la sibutramina presenta una eficacia moderada a corto y medio plazo en la reducción del peso en la obesidad o el sobrepeso. La sibutramina es un fármaco emparentado con la anfetamina que se utiliza como tratamiento complementario de una dieta hipocalórica, para lograr la pérdida de peso y su mantenimiento. Está indicada en pacientes obesos con un Índice de Masa Corporal (IMC) igual o mayor de 30 kg/m² o con un IMC mayor de 27 kg/m², y que además presente factores de riesgo asociados a la obesidad, (diabetes, dislipidemias o hipertensión) y que hayan fracasado con otros tratamientos.

Este activo se comercializa en forma de tabletas, pero en la FES-Cuautitlán, se esta estudiando la factibilidad de formularla en parches dermatológicos.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método analítico por electroforesis capilar para cuantificar sibutramina en parches dermatológicos, ya que actualmente no existe un método farmacopéico o algún artículo científico en el que se reporte la cuantificación de Sibutramina por electroforesis capilar solo por HPLC.

1.- OBJETIVOS

Objetivo General:

- Establecer las condiciones experimentales que permitan la determinación de Sibutramina en parches dermatológicos por electroforesis capilar y evaluar los parámetros de desempeño del método para determinar la confiabilidad del mismo.

Objetivos Particulares:

- Optimizar las condiciones de análisis en base a las propiedades fisicoquímicas de la Sibutramina a fin de establecer las condiciones iniciales de análisis por electroforesis capilar y variar los parámetros necesarios para lograr un pico simétrico en un tiempo de análisis corto.
- Evaluar los parámetros estadísticos de desempeño como son: especificidad, adecuabilidad, precisión, linealidad del sistema y del método, exactitud y reproducibilidad, especificados en la guía de validación de métodos analíticos editada por el colegio nacional de QFB's, para determinar la confiabilidad del método desarrollado.

3.-GENERALIDADES

3.1 SIBUTRAMINA

3.1.1 Propiedades Fisicoquímicas

La sibutramina (clorhidrato de sibutramina monohidratado) es una mezcla racémica de los enantiómeros (+) y (-) de la ciclobutanametanamina correspondiendo químicamente a la 1-(4-clorofenil) ciclobutil-3-metilbutil-N, N-dimetil-amina (Figura 1). Su composición cuantitativa es H 9.36% C 72.96% N 5.01% Cl 12.67%.²⁰

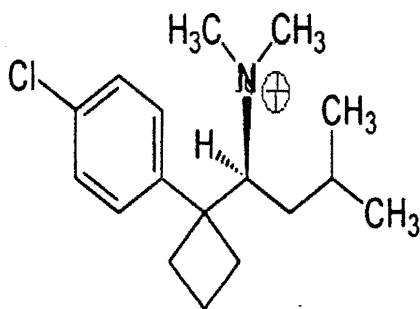


Figura 1. Estructura de la Sibutramina.²⁹

La sibutramina es un fármaco emparentado con la anfetamina, que se utiliza como tratamiento complementario de una dieta hipocalórica para lograr la pérdida de peso y su mantenimiento. Está indicada en pacientes obesos con un Índice de Masa Corporal (IMC) igual o mayor de 30 kg/m² o con un IMC mayor de 27 kg/m², y que además presente factores de riesgo asociados a la obesidad, (diabetes, dislipidemias o hipertensión) y que hayan fracasado con otros tratamientos.²¹

*Estimado empleando el software ACD LABS.

Principio activo; Clorhidrato Monohidratado de Sibutramina.

Fórmula Empírica; C₁₇H₂₆ClN.²⁰

Peso molecular; 279.85 g/ mol.²⁰

pKa (HL/H+L)= 9.7 ± 0.20 *

Coefficiente de partición (octanol agua); 30.9 (pH 5.0).²⁰

Naturaleza Química; Básica

Solubilidad; soluble en agua; 2.9 mg/ml a pH 5.2. Metanol, acetona.²⁰

3.1.2 Indicaciones terapéuticas

Tratamiento de la obesidad cuando la pérdida de peso esta indicada médicamente; obesidad y sobrepeso relacionados con complicaciones médicas como diabetes, hiperlipidemia, hipertensión, artrosis. La sibutramina debe emplearse como parte de un programa integral de control de peso que incluya dieta y ejercicio.²¹

3.1.3 Mecanismo de acción

Se basa en la inhibición de la recaptación de los neurotransmisores monoamínicos del SNC (noradrenalina, serotonina y en menor medida de la dopamina) que intervienen en la regulación de la ingesta de alimentos (Figura 2), tanto en modelos animales como humanos, en los que disminuye la cantidad y la duración de éstas. También se postula la posible influencia sobre la producción de calor corporal (termogénesis), estudiado en ratas a dosis de 10 mg/día (McNeely y Goa, 1998), ya que es una vía que aumenta el gasto energético y facilita la pérdida de peso. Este proceso puede estar mediado por vía central, a través del sistema nervioso simpático, o periférica, con la activación de receptores adrenérgicos beta 3.

La acción directa de la sibutramina se ejerce a través de sus metabolitos amínicos primarios y secundarios (M1 y M2) que presentan una potencia unas 100 veces mayor que la de la propia sibutramina, al inhibir la recaptación de noradrenalina y serotonina, y, en menor medida de la dopamina (este último discutido por algunos autores) (Figura 2). Muestras plasmáticas obtenidas de voluntarios tratados con sibutramina produjeron una inhibición significativa de la recaptación de noradrenalina (73%) y serotonina (54%), sin inhibición significativa de la recaptación de dopamina (16%).²⁸

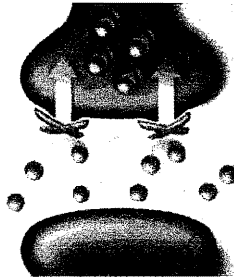


Figura 2. Inhibición de la recaptación de neurotransmisores en la sinapsis neuronal²⁸.

La sibutramina no parece presentar acción anticolinérgica o antihistaminérgica. En diversos estudios tampoco parece que libere monoaminas, ni inhiba a la monoamino-oxidasa (MAO), *in vitro* o *in vivo*. Por otra parte, la sibutramina y sus metabolitos (M1 y M2) no muestran afinidad por receptores de neurotransmisores, entre ellos los serotoninérgicos (5-HT1 [5-HT1A, 5-HT1B], 5-HT2-A, 5-HT2C), adrenérgicos (β 1, β 2, β 3, α 1, α 2), dopaminérgicos (de tipo D1 y de tipo D2), muscarínicos, histaminérgicos (H1), benzodiazepínicos y de NMDA, por lo que se le atribuye una acción selectiva.²⁸

3.1.4 Farmacocinética y Farmacodinamia en Humanos

La sibutramina es inhibidor de la recaptura de serotonina y noradrenalina central y periférico. Actúa mediante sus metabolitos aminados primarios y secundarios. Disminuye la ingesta calórica al reducir el umbral de la sensación de saciedad posprandial, a través del aumento de la función central de los sistemas de noradrenalina y serotonina sobre los receptores α 1 y $5HT_{2A/2C}$ y al elevar el gasto energético al incrementar la tasa metabólica mediante el incremento de la función periférica de noradrenalina en los receptores β 3.²⁸

La sibutramina se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal y sufre metabolismo de primer paso para producir dos metabolitos activos N-desmetilados. Las concentraciones máximas de los metabolitos (M1 y M2) se alcanzan después de 3 horas de la administración. La vida media de los metabolitos es de 14 horas. Los metabolitos se eliminan principalmente por orina. Los metabolitos activos se unen en 94% a proteínas

plasmáticas. La administración con alimentos no afecta notablemente la farmacocinética de la sibutramina. La farmacocinética en obesos es similar a la de sujetos normales.²¹

Los pacientes que responden a la sibutramina pierden dos kilogramos o más durante el primer mes de tratamiento; puede reducir las concentraciones de triglicéridos, colesterol y lipoproteínas de baja densidad mientras que aumentan los niveles de lipoproteínas de alta densidad.²¹

Precauciones y advertencias

Se debe evitar su administración conjunta con anti depresivos tipo IMAO. Suspender los IMAO 2 semanas antes de iniciar el tratamiento con sibutramina, o suspender la sibutramina 2 semanas antes de iniciar la administración de IMAO. No debe asociarse con otros agentes anorexígenos de acción central. Debe administrarse con precaución en pacientes con hipertensión preexistente o con enfermedad coronaria. Se aconseja abstenerse de manejar vehículos u operar maquinaria pesada. No se recomienda en menores de 18 años y mayores de 65 años, embarazadas o durante la lactancia. Durante el tratamiento con sibutramina debe evitarse el embarazo por medios adecuados, a efectos de prevenir efectos potenciales sobre el feto.²⁹

Contraindicaciones

Hipersensibilidad a la sibutramina. Pacientes con antecedentes de anorexia nerviosa, bulimia nerviosa. Embarazo y lactancia.

Toxicidad

Los estudios de carcinogénesis, mutagénesis, y efectos sobre la fertilidad han demostrado que la sibutramina no posee efectos carcinogénicos ni mutagénicos y no produce alteraciones de la fertilidad. De los estudios de reproducción en conejos, un estudio puso de manifiesto una incidencia ligeramente superior de anomalías cardiovasculares fetales en los grupos de tratamiento, en comparación con el grupo de control, mientras que otro estudio reveló una incidencia menor que en los controles.

Reacciones Secundarias y Adversas.

Los eventos adversos reportados en los estudios clínicos fueron: cefalea, resequedad de la boca, anorexia, constipación insomnio náusea, sudoración, aumento de la presión arterial, taquicardia y alteraciones en el sentido del gusto.²⁹

3.2 ELECTROFORESIS CAPILAR

La electroforesis es un método de separación basado en las diferencias en la velocidad de migración de especies cargadas en un campo eléctrico aplicado.⁶

El proceso electroforético se ha definido como “el movimiento diferencial o migración de iones en disolución por atracción o repulsión en un campo eléctrico”. Un electrodo positivo (ánodo) y uno negativo (cátodo) se coloca en una disolución conteniendo iones, cuando se aplica un voltaje a los electrodos, los iones de diferente carga, se mueven a través de la disolución hacia el electrodo de carga opuesta.⁷

3.2.1 Instrumentación para electroforesis capilar

La electroforesis capilar es una técnica amortiguadora que utiliza capilares de sílice fundida rellenos de una disolución tampón, estrechos, de 25 a 100 μm de diámetro interno y de 40 a 100 cm de largo, uniendo dos depósitos de disolución tampón que contiene también electrodos de platino (Figura 3). La introducción de la muestra se realiza por un extremo y la detección en el otro. Se aplica un potencial de 5 a 30 kV a través de los dos electrodos.

La introducción de la muestra se efectúa frecuentemente por inyección a presión, en la que un extremo del capilar se inserta en un recipiente que contiene la muestra. Entonces el recipiente es elevado brevemente por encima del nivel del capilar para obligar a la muestra a entrar al tubo. Otra opción consiste en aplicar vacío al extremo del tubo.⁶

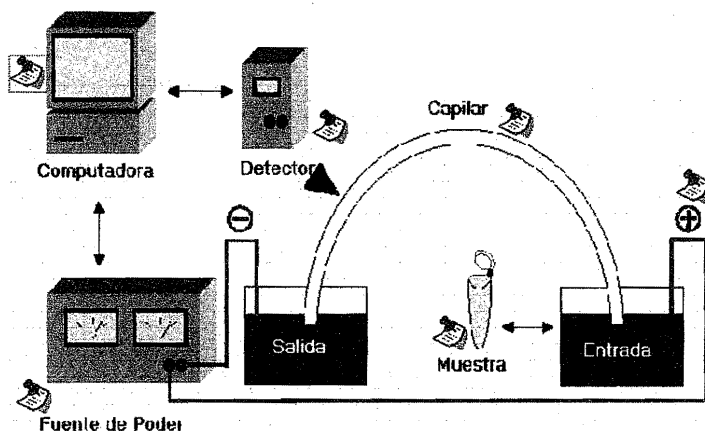


Figura 3. Representación esquemática de la separación Electroforética.⁹

3.2.2 Fundamentos de las separaciones electroforéticas

La separación electroforética está basada en las diferencias de velocidad de los analitos en presencia de un campo eléctrico. La velocidad de un analito cuando ningún flujo electroosmótico está presente se explica por la ecuación: $V = \mu E$

La velocidad de migración de un ión, v , en centímetros por segundo, en el seno de un campo eléctrico, es igual al producto de la intensidad del campo eléctrico E ($V\text{ cm}^{-1}$) por la movilidad electroforética μ ($\text{cm}^2\text{ V}^{-1}\text{ S}^{-1}$), esto es:

$$V = \mu E$$

La movilidad electroforética es directamente proporcional a la carga eléctrica del analito e inversamente proporcional a los factores de retardo por rozamiento.⁸

El campo eléctrico es una simple función de la aplicación del voltaje y la longitud del capilar (voltios/com). La movilidad electroforética depende de la especie iónica, del tamaño, de la carga de la temperatura, de la concentración y de la naturaleza del analito.⁹

3.2.3 Flujo Electroosmótico

El uso de capilares de sílice provoca un flujo electroosmótico (FEO) que hace mover a iones y moléculas presentes en el medio electroforético hacia el cátodo a ciertas condiciones de pH.⁷

El flujo electroosmótico se origina por la presencia del campo eléctrico en una solución iónica cuando entra en contacto con una superficie sólida cargada. Por ejemplo, en un capilar de sílice fundida, la interfase se pone en contacto con la solución que contiene el electrolito soporte, la superficie del sólido está con carga negativa debido a la ionización del grupo silanol (a pH mayor de 4-5) y conjuntamente con sus contraiones forman una doble capa eléctrica. Los iones presentes en el sistema (incluyendo a los contraiones de los grupos silanol, H^+) bajo la influencia del voltaje aplicado son desplazados hacia el cátodo (o ánodo, de acuerdo a su carga) y arrastrando disolvente con ellos dada su solvatación, originando así el denominado flujo electroosmótico (Figura 4).⁹

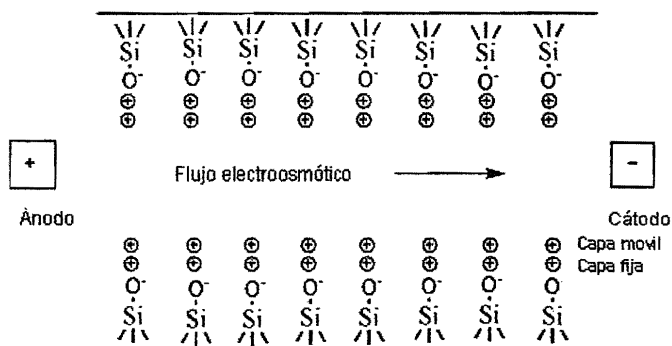


Figura 4. Representación esquemática del Flujo Electroosmótico.³⁰

Los principales factores que afectan a la movilidad electroosmótica son la constante dieléctrica, la viscosidad de la disolución de separación y el valor del potencial zeta. Dicha viscosidad de la disolución de separación también dependerá de la temperatura a la cual se lleve a cabo la separación electroforética. La movilidad del flujo electroosmótico (EOF por sus siglas en inglés) variará acorde con el pH de la disolución de separación, de tal forma

que a valores de pH elevados, la movilidad del FEO será significativamente más importante que a pH bajos (Figura 5).

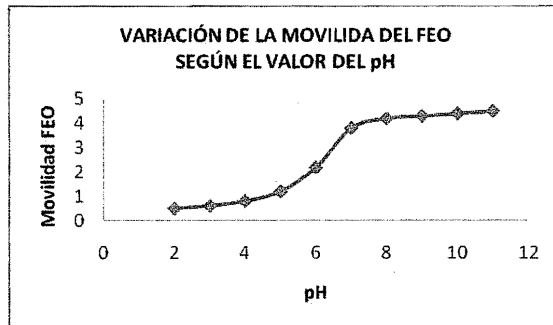


Figura 5. Dependencia de la movilidad del EOF con el pH, para un capilar de sílice fundida.⁷

Cuando se aplica una diferencia de potencial entre los dos electrodos de platino separados por un medio conductor que es el buffer, el equilibrio de las velocidades electroforéticas de los iones de la muestra se alcanza en un periodo muy corto (10^{-6} s), con lo que se puede afirmar que las velocidades con las que se mueve cada molécula son constantes durante prácticamente todo el tiempo de análisis. Entonces la separación se da por las diferentes movilidades de los analitos, ya que cada ión tiene su propia constante de movilidad (μ_{efectiva}).¹⁵

3.2.4 FACTORES QUE AFECTAN LA VELOCIDAD DE MIGRACIÓN DEL ANALITO.

1) La naturaleza de los compuestos con carga eléctrica ven afectada su velocidad de migración de varias formas, como se describe a continuación.

CARGA.- La velocidad de migración aumenta cuando hay un incremento de la carga del analito, generalmente, la migración de la carga depende del pH.

TAMAÑO.-La velocidad de migración es menor en las moléculas grandes, debido al incremento de las fuerzas de fricción y electrostáticas ejercidas por el medio circundante.

FORMA.-Las moléculas de tamaño similar, pero con diferentes formas, tales como las proteínas fibrosas y las globulares, exhiben distintas características de migración a causa de los diferentes efectos de las fuerzas de fricción y electrostáticas⁹.

2) El **electrolito soporte (buffer o sistema amortiguador)** determina y estabiliza el pH del medio de soporte, por lo que afecta la velocidad de migración de los compuestos en diversas formas⁹.

Se requiere de un buffer que pueda mantener un pH constante que mantiene la carga de los compuestos. Los sistemas efectivos de buffer tienen un intervalo de dos unidades de pH aproximadamente centradas alrededor del valor de pK_a ⁹. Un buffer para ser utilizado en EC debe poseer las siguientes características.

- Buena capacidad de amortiguación en el intervalo seleccionado.
- Baja movilidad, para minimizar la generación de corriente.
- Baja absorbancia a la longitud de onda de detección⁹.

A medida que la fuerza iónica del buffer aumenta al aumentar su concentración, la proporción de corriente conducida por éste crece y la participación de la muestra en dicha conducción de corriente disminuye. Una elevada fuerza iónica del buffer incrementa la intensidad global de corriente y, consecuentemente, la producción de calor⁹.

Con bajas fuerzas iónicas, la proporción de corriente conducida por el buffer se reducirá y la participación en la conducción de corriente por parte de la muestra crecerá, aumentando su velocidad de migración. Una fuerza iónica pequeña reduce la corriente global y se traduce en una menor producción de calor, pero la difusión y la pérdida de resolución resultante son menores. Por ello la selección de la fuerza iónica es determinante, y generalmente se elige dentro de una gama de fuerzas iónicas comprendida entre 0.05-0.1 mol/L⁹.

El pH tiene poca influencia sobre los compuestos completamente ionizados tales como las sales inorgánicas, pero en los compuestos orgánicos el pH determina la magnitud de la ionización de los ácidos orgánicos, es decir aumenta con el pH, mientras que lo inverso ocurre con las bases orgánicas; por lo tanto, su velocidad de migración depende del pH⁹.

La dirección, y también la magnitud de la migración de los anfolitos son por lo tanto, dependientes del pH, y se pueden emplear buffers que van desde un pH de 1 hasta un pH de 11 para producir las separaciones requeridas⁹.

3) EL CAMPO ELÉCTRICO.

La ley de OHM establece la relación entre la intensidad de la corriente I (en Amperios), el voltaje (en voltios) y la resistencia R (en Ohmios), de acuerdo a la ecuación²⁷:

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

La separación de iones en un campo eléctrico esta, por lo tanto, influida por estos tres factores⁹.

INTENSIDAD DE CORRIENTE: entre los electrodos la corriente en la disolución es conducida completamente por los iones del buffer y de la muestra; por lo que la velocidad de migración es proporcional a la intensidad de corriente. La distancia recorrida por los iones será proporcional al periodo de tiempo durante el cual se ha suministrado la corriente. Por tanto, para asegurar una buena reproducibilidad, la corriente debe mantenerse constante durante la electroforesis, es decir, debe utilizarse corriente continua⁹.

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

RESISTENCIA: la velocidad de migración es inversamente proporcional a la resistencia, la cual depende del tipo y tamaño del medio de soporte y de la fuerza iónica del buffer. La resistencia aumenta con la longitud del medio de soporte y disminuye con la anchura de

este y con el aumento de la fuerza iónica del buffer. Durante la electroforesis se reduce calor en una cantidad igual a I^2R voltios, y la resistencia disminuye cuando la temperatura aumenta⁹.

FACTORES QUE AFECTAN LA REPRODUCIBILIDAD DEL TIEMPO DE MIGRACIÓN.

Tabla 1 .Factores que afectan la reproducibilidad del tiempo de migración¹⁶.

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

De la misma forma, puede ser necesario el reemplazo frecuente del buffer con la finalidad de mantener reproducibles los tiempos de migración¹⁶. En la tabla 1, se muestra los factores más comunes que causan variaciones en los tiempos de migración, así como las causas que los originan y como pueden solucionarse.

3.2.5 APLICACIONES

El avance de la electroforesis capilar se ha extendido en el área biomédica, en el campo de las proteínas, péptidos, DNA, análisis de líquidos de perfusión, monitoreo de drogas o fármacos, marcadores genéticos tumorales y neurobioquímicos, drogas xenobióticas, de abuso y pericias forenses (Tabla 2)¹⁷.

Tabla 2. Áreas de aplicación de la técnica de EC⁹.

ÁREA	APLICACIÓN
INDUSTRIA FARMACÉUTICA	CONTROL DE LA PUREZA DE MATERIAS PRIMAS Y MEDICAMENTOS. PRUEBAS DE DISOLUCIÓN. ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD Y BIOEQUIVALENCIA.
MEDICINA	DETERMINACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS (MEDICAMENTOS) Y SUS METABOLITOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS.
CRIMINALÍSTICA	ANÁLISIS DE EXPLOSIVOS, FARMACOS Y SUS METABOLITOS, METALES PESADOS, ETC; EN MUESTRAS DIVERSAS.
INDUSTRIA ALIMENTICIA	ANÁLISIS DE COLORANTES ALIMENTICIOS, VITAMINAS, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE IONES METÁLICOS, CONTROL DE CALIDAD DE LOS PRODUCTOS ALIMENTICIOS.
INVESTIGACIONES BIOQUÍMICAS	ANÁLISIS DE PROTEÍNAS BIOLÓGICAMENTE ACTIVAS, PÉPTIDOS, AMINOÁCIDOS Y SUS DERIVADOS.

3.2.6 VENTAJAS DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR

- ◆ La disipación del calor en un tubo capilar es rápida, por lo que el efecto del calor de Joule es menor, permitiendo que se apliquen mayores voltajes de separación.
- ◆ Debido a la rápida disipación del calor, es posible aumentar el voltaje aplicado (hasta de 30kV) disminuyendo así el tiempo de análisis.
- ◆ El gasto en reactivos es mínimo.
- ◆ Casi no hay generación de residuos tóxicos por lo que los daños al ambiente son casi nulos.
- ◆ La cantidad de muestra necesaria para el análisis se reduce a unos cuantos microlitros.
- ◆ Se pueden utilizar una gran variedad de detectores tanto “en línea” o “fuera de línea” o varios a la vez.

- ◆ Es posible acoplar los equipos de electroforesis capilar a otros equipos analíticos.
- ◆ El costo de cada capilar es insignificante en comparación con el de una columna cromatografía u otra columna en general. Un metro de capilar cuesta 20USD aprox.
- ◆ Se cuenta con equipos completamente automatizados que permiten analizar más de 100 muestras sin necesidad de atención en el equipo.

3.3 Validación

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se demuestra, mediante estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.¹³ También se define como la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad de preestablecidos.²⁴

A través de la validación se confirma que el método es consistente para la aplicación para la que fue desarrollado. . El último objetivo de un método de validación es el producir los mejores resultados analíticos posibles. Para obtener estos resultados, todas las variables del método deben de ser consideradas, incluyendo el procedimiento de muestreo, los pasos para la preparación de la muestra, todas las condiciones electroforéticas, el tipo de detección, etc. El alcance de la validación va a depender del propósito del método ²⁴. Pruebas compéndiales y procedimientos de ensayo, varían significativamente dependiendo del tipo de método analítico usado, y del tipo de información requerida para la validación de un método analítico va a depender de la naturaleza del método ¹⁸.

Pruebas para la validación de métodos analíticos

Los parámetros de desempeño evaluados son diferentes dependiendo del tipo de método analítico. Para un método que se enfoca a la determinación del contenido químico se indican los siguientes parámetros de desempeño a estudiar, de acuerdo a algunos documentos regulatorios (tabla 3).

Tabla 3. Parámetros de desempeño a evaluar de acuerdo a diversos documentos normativos.

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

(-) indica que el parámetro no es evaluado normalmente

(+) indica que el parámetro sí es evaluado normalmente

*Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método.

** No se indica si es requerido

3.3.1 Precisión del sistema y del método

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

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

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

- *Repetibilidad*: Es la precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y métodos. Se prepara por lo menos un sextuplicado de soluciones a la concentración del analito que represente el 100% de la muestra procesada para su medición, o se realizan por lo menos 9 determinaciones

(3 concentraciones/3 réplicas de cada una); preparadas por dilución o por pesadas independientes; se mide la respuesta analítica bajo las mismas condiciones. Debe reportarse la desviación estándar y el coeficiente de variación, este último debe ser menor o igual a 1.5%.

- *Precisión intermedia*: Es la precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días o con diferente equipo. El objetivo es asegurar que se obtengan los mismos resultados cuando muestras similares sean analizadas una vez desarrollado el método.

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

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

3.3.2 Especificidad

Es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta analítica debida única y exclusivamente al analito de interés.¹³ Es la habilidad para determinar de manera inequívoca al analito en presencia de otros componentes (impurezas, productos de degradación, excipientes).²⁵ Con esta prueba se demuestra que no existe interferencia proveniente de los demás componentes.²⁶

Para demostrar la especificidad de un método analítico es necesario realizar la identificación del analito¹⁹. Se establecen las posibles sustancias interferentes y se

adicionan cantidades conocidas de éstas, solas (placebo) o combinadas a la muestra (placebo cargado) y se evalúa su respuesta bajo las mismas condiciones de análisis²³.

3.3.3 Adecuabilidad del sistema

Se refiere a la verificación de que el sistema opera con base a criterios que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico. La evaluación de adecuabilidad del sistema permite verificar que el sistema de medición funcione adecuadamente, independiente de las condiciones ambientales. Para evaluar la adecuabilidad del sistema se debe inyectar por quintuplicado la solución que contiene al analito, se reporta la respuesta y se calcula el coeficiente de variación, que no debe ser mayor del 2%.

3.3.4 Linealidad del sistema y del método

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

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

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

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

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

3.3.5 Exactitud

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

Adicionando cantidades conocidas de un analito de referencia que este perfectamente caracterizado a la muestra y expresar la exactitud como la cantidad recuperada con respecto a la cantidad adicionada (recobro) ³⁰.

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

Se reporta el % de recobro

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

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

1. PARTE EXPERIMENTAL

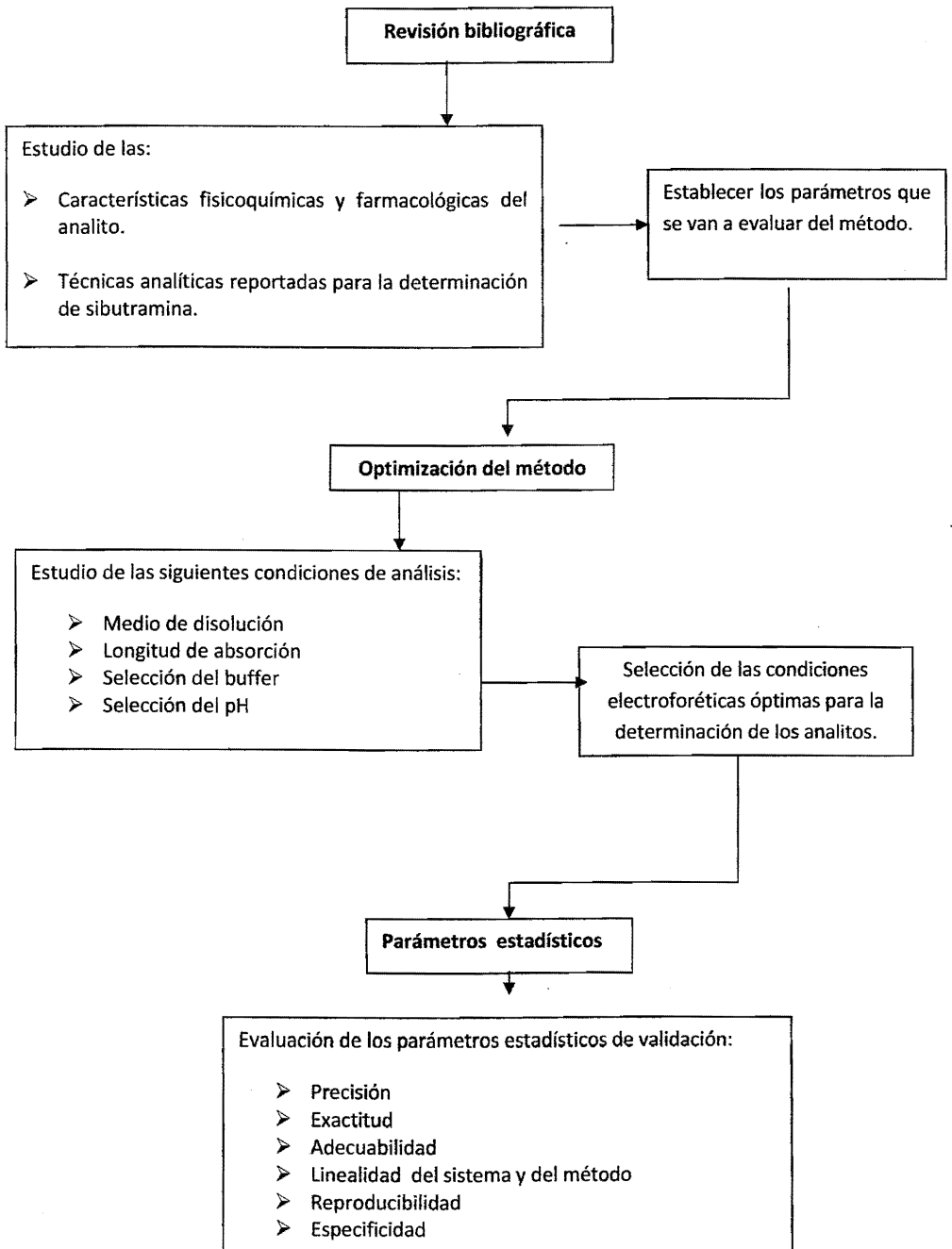
4.1 Equipos.

- Equipo de electroforesis capilar P/ACE MDQ, Beckman Coulter, con detector de arreglo de diodos DAD, acoplado a una computadora mediante el software 32 KARAT (Beckman Coulter, USA).
- Desionizador de agua tipo 1 (milliQ Plus Millipore ®, USA).
- Potenciómetro HI 931401, Hanna Instruments.
- Agitador Magnético (Thermolyne, MIRAKTM).
- Balanza Analítica (BOECO Alemania, 0.0001 g de precisión).
- Espectrofotometro PERKIN ELMER UV/VIS (Espectrofotometro Lambda)

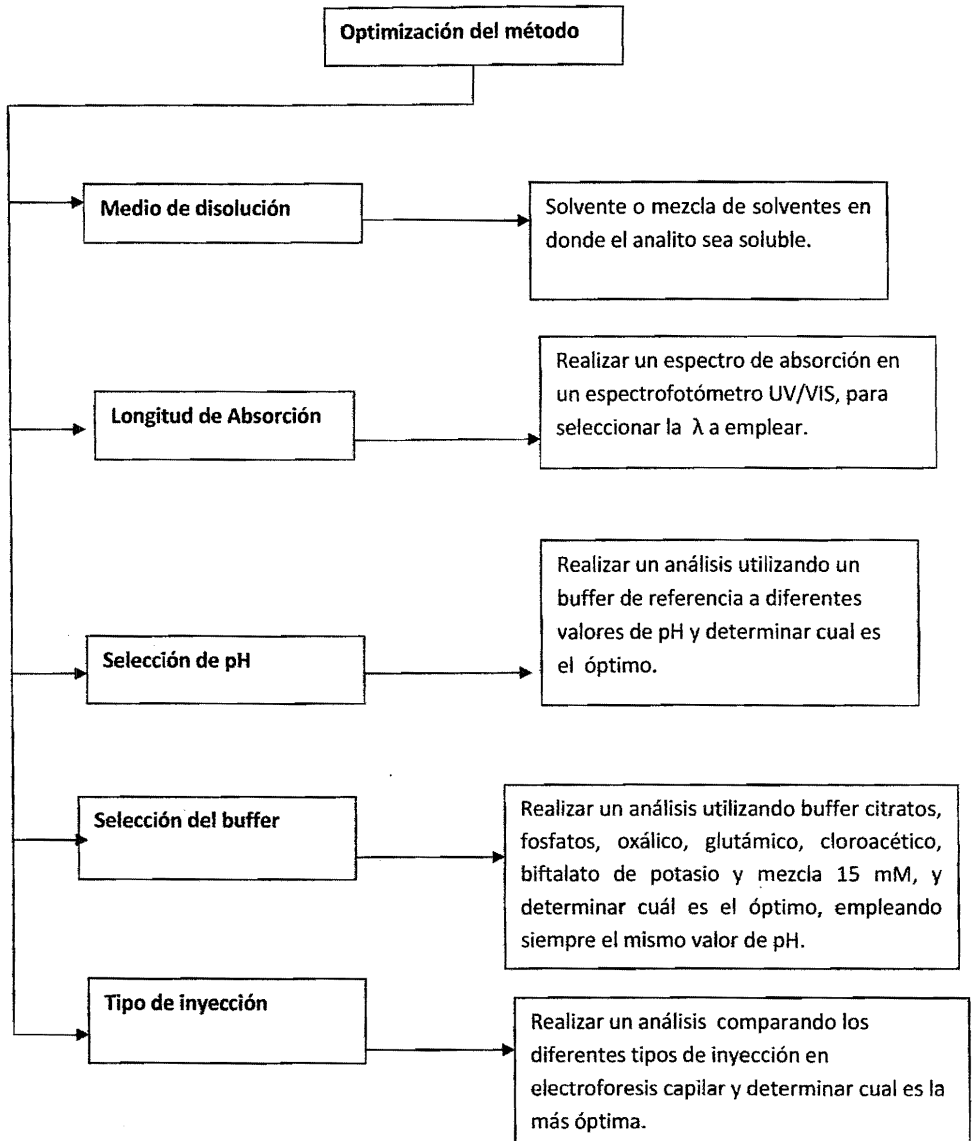
4.2 Reactivos.

- Ácido clorhídrico (JT Baker, grado reactivo analítico).
- Materia prima: clorhidrato monohidratado de Sibutramina.
- Hidróxido de sodio, J. T. Baker (Xalostoc, Edo. De Mex., México).
- Agua desionizada. (MilliQ, Millipore USA)
- Fosfato de sodio monobásico, J. T. Baker (Xalostoc, Edo. De Mex., México)
- Acido cítrico J. T. Baker, 99.6% (Xalostoc, Edo. De Mex., México)
- Acido oxálico J. T. Baker, grado reactivo analítico Phillipsburg N. J.
- Biftalato de potasio, T. Baker, grado reactivo analítico (Xalostoc, Edo. De Mex., México)
- Ácido DL-Glutámico monohidratado, grado reactivo analítico.
- Acido monocloroacético T. Baker, 99.6% (Xalostoc, Edo. De Mex., México)

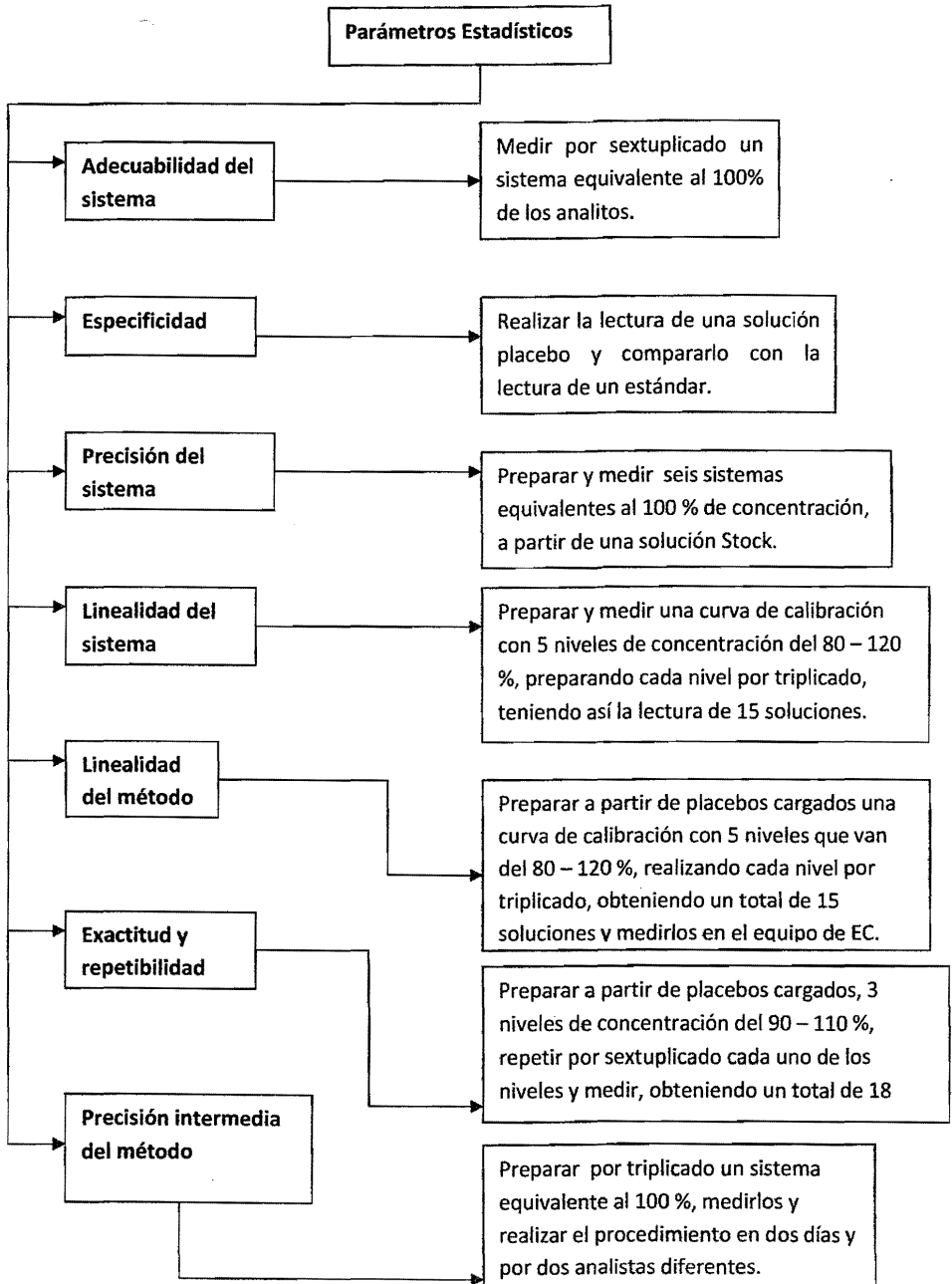
METODOLOGÍA GENERAL



Optimización del método analítico.



Validación del método analítico.



ACONDICIONAMIENTO DE UN CAPILAR NUEVO:

1. Lavar 10 min 20 psi con agua desionizada a 25°C
2. Lavar 10 min 20 psi con agua NaOH 0.1M a 25°C
3. Lavar 20 min 20 psi con NaOH 0.1M a 40°C
4. Lavar 10 min 20 psi con agua desionizada a 25°C
5. Lavar 10 min 20 psi con buffer Citratos 30mM pH=3 a 25°C

Lavado al inicio de la jornada de trabajo:

1. Lavar 5min 20psi con agua desionizada a 25°C
2. Lavar 3min 20psi con agua NaOH a 25°C
3. Lavar 5min 20psi con agua desionizada a 25°C
4. Lavar 10min 20psi con buffer Citratos 30 mM a pH=3 a 25°C

4.4 PREPARACIÓN DEL ELECTROLITO SOPORTE

Pesar aproximadamente exacto 0.63 g de ácido cítrico cristal en un vaso de precipitado de 50 ml, adicionar 25 ml de agua desionizada, agitar mecánicamente a 500 rpm por 5 min. vertir la solución a un vaso de precipitado de 100 ml, poner 70 ml de agua desionizada y ajustar el pH=3 con NaOH 0.1 M, , transferir a una matraz volumétrico de 100 ml y llevar a la marca de aforaro con agua desionizada. Concentración final 30 mM.

Nota: la solución tiene una caducidad de 3 días bajo refrigeración.

4.5 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALITICO.

La detección se efectuó a 223 nm en un equipo PACE/MDQ utilizando un capilar de sílice fundida de 30 cm de longitud total y 75 µm de diámetro interno usando buffer de citratos 30 mM a pH 3.0 como medio de soporte y como medio de disolución. Inyección hidrodinámica: 0.5 psi por 5 segundos. Voltaje de separación de 30 kV. Tiempo de lavado entre corridas de tres minutos con buffer.

4.5.1 Adecuabilidad del sistema.

1. Pesar lo más exactamente posible el equivalente a 14 mg de Sibutramina.
2. Disolver en 20 ml de agua desionizada.
3. Agitar con barra magnética a 500 rpm 10 min
4. Llevar al aforo de 50 ml con agua desionizada. (Stock A)
5. Se toman 5 ml de la solución stock A y se llevan al aforo de 50 ml con agua desionizada. (stock B)
6. Se toman 5 ml de la solución stock B y se llevan al aforo de 10 ml con agua desionizada (sistema al 100%)
7. Se mide el sistema por sextuplicado.

4.5.2 Especificidad.

1. Preparar un (placebo) que contenga los mismos componentes que la formulación original y en la misma proporción, a excepción del fármaco (sibutramina).
2. Cortar un cuadro de 4 cm² del parche y se siguen los pasos del 2 al 7 de adecuabilidad del sistema.

4.5.3 Precisión del sistema.

1. Tomar 5 ml de la solución Stock B y colocarlos en un matraz volumétrico de 10 ml, llevar a la marca de aforo con agua desionizada. (Sistema 100%) (sibutramina 5.0393×10^{-5} M).
2. Repetir por sextuplicado el paso anterior con el fin de obtener 6 sistemas.
3. Medir las soluciones en el equipo de EC.

4.5.4 Linealidad del sistema.

1. Se siguen los pasos del 1 al 5 de adecuabilidad del sistema.
2. Preparar una curva de Calibración de 5 puntos, a cinco niveles de concentración siguiendo la Tabla 4 realizando la preparación independiente de cada sistema a partir de la solución Stock B.

3. Cada nivel debe medirse por triplicado, para reportar la relación concentración vs área y calcular el valor de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza de la pendiente (IC (β_1)).

Tabla 4. Preparación de la curva de calibración.

Sistema	1	2	3	4	5
Stock(ml)	3	4	5	6	7
Conc (mmol/ml)	10^{-5}				
Sibutramina	3	4	5	6	7
% Contenido	60	80	100	120	140

Nota: los sistemas se aforan a 10ml con agua desionizada

4.5.5 Linealidad del método.

1. Prepara un (placebo) que contenga los mismos componentes que en la formulación original y en la misma proporción, a excepción del fármaco (sibutramina).
2. Cortar un cuadro de 4 cm² del parche y colocarlo en un vaso de precipitado de 50 ml.
3. Pesar lo más exactamente posible el equivalente a 14 mg de Sibutramina.
4. Disolver en 20 ml de agua desionizada.
5. Agitar con barra magnética a 500 rpm 10 min.
6. Filtrar la solución resultante.
7. Llevar al aforo de 50 ml con agua desionizada. (Stock A)
8. Se toman 5ml del stock A y se llevan a la marca de aforo de 50 ml con agua desionizada. (stock B).
9. Preparar una curva de calibración de 5 puntos, a cinco niveles de concentración siguiendo la tabla, realizando la preparación independiente de cada sistema a partir de la solución Stock B.
10. Se mide cada solución por triplicado.
11. Determinar la cantidad recuperada de analito.
12. Reportar la relación cantidad adicionada vs recuperada.

4.5.6 Exactitud y repetibilidad del método.

1. Preparar siguiendo los pasos del 1 al 8 de Linealidad del Método, con el stock B los sistemas 2, 3, y 4 de la tabla 8.
2. Se debe realizar la preparación del ensayo de manera independiente por sextuplicado.
3. Los placebos adicionados deben ser analizados por un mismo analista bajo las mismas condiciones.
4. Determinar la cantidad recuperada del analito.

4.5.7 Precisión intermedia del método (Reproducibilidad entre día y analista).

1. Repetir por triplicado del paso 1 al 8 de Linealidad del Método.
2. Se toman 5 ml de la solución stock B y se llevan a la marca de aforo de 10 ml con agua desionizada.
3. Se repite el paso 1 al 2 por triplicado, con el fin de obtener 3 soluciones al 100%.
4. El procedimiento anterior, debe repetirse en dos días y por dos analistas diferentes.

5.- RESULTADOS Y ANÁLISIS.

5.1 OPTIMIZACION DEL MÉTODO ANALÍTICO.

La siguiente metodología fue desarrollada en la sección de Química Analítica en el Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos L-401.

La selección apropiada de las condiciones experimentales está íntimamente relacionada con la selección de la composición del buffer de separación. Algunos parámetros (por ejemplo la temperatura) necesitan ser definidos experimentalmente, mientras que otros (por ejemplo el pH del buffer), pueden ser definidos conociendo las características del analito a estudiar como solubilidad, pKa, etc.

5.2 Medio de disolución

Para poder hacer un análisis por EC, es necesario que el analito de interés se encuentre disuelto. Como previamente se encontró en la bibliografía que la sibutramina era soluble en agua se decidió que el medio de disolución sería el agua.

5.3 Longitud de Absorción

Se obtuvo el espectro de absorción para una solución de sibutramina a una concentración de 1.2×10^{-4} M (Figura 6) en un espectrofotómetro (PERKIN ELMER UV/VIS) para determinar la longitud a trabajar.

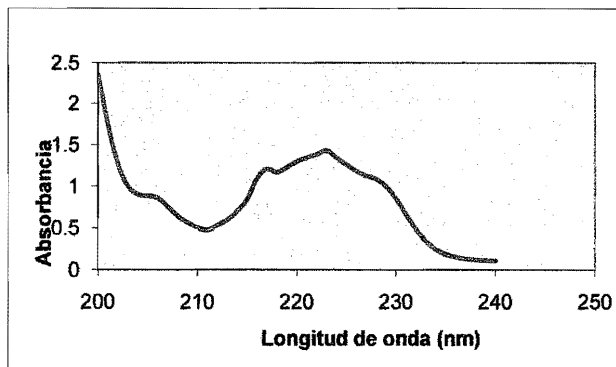


Figura 6. Espectro de absorción para sibutramina [1.2×10^{-4} M].

La longitud de onda seleccionada para la determinación de sibutramina fue de 223 nm porque ahí se presenta un máximo de absorción.

Una vez seleccionado la longitud de onda óptima se establecieron las condiciones iniciales adecuadas para la realización del método.

La sibutramina es un catión a pH menor de 8.5, por lo cual, se planteo trabajar en medio ácido donde la influencia del flujo electroosmótico es mínima.

En cuanto a las demás condiciones, estas se establecieron en base a un método ya optimizado que se utilizo para la determinación de bromhexicina y ampicilina en suspensión (Tabla 5).

Tabla 5. Condiciones electroforéticas iniciales.

PARAMETROS	CONDICIONES
Longitud de onda	223nm
Electrolito soporte	Buffer de fosfatos 50mM, pH=3
Capilar	Sílice fundida de 50µm de diámetro interno y 31cm de largo
Tiempo de lavado entre corridas	3min con buffer
Cambio de buffer de corrida	Cada 3 corridas
Voltaje de separación	30 kV
Inyección de la muestra	0.5psi, 5seg
Presión de lavado	20psi

Estas condiciones se utilizaron al inicio del método para establecer los parámetros adecuados de trabajo.

Se realizo una primera corrida para determinar en cuanto tiempo saldría el analito y se comparo con un blanco respectivamente, para demostrar que el pico obtenido sea de la Sibutramina (Figura 7).

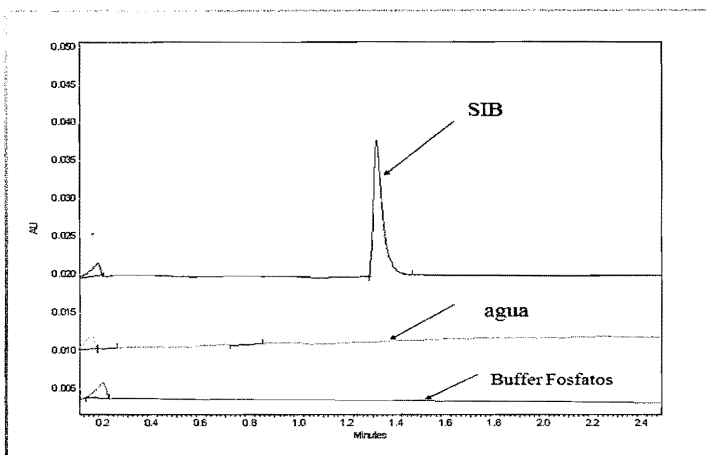


Figura 7. Electroferograma para SIBUTRAMINA (1.2×10^{-3} M) a pH = 3 electrólito soporte buffer Fosfatos 50 mM.

Otras condiciones: capilar de sílice fundida de 31 cm de longitud total, 20.5cm de longitud efectiva, D. I. 50 μ m, inyección hidrodinámica 0.5 psi por 5 s, 30kV, detección a 223 nm. Temperatura del capilar 25°C.

Como se observa en la Tabla 6, al medir tres repeticiones de la solución de sibitramina bajo las mismas condiciones de análisis, se obtienen coeficientes de variación menores al 2% tanto para el tiempo de migración (t_m) como para área de pico.

Tabla 6. Coeficientes de variación para el tiempo de migración y área del pico de sibutramina (1.2×10^{-3} M) usando Buffer Fosfatos 50 mM, pH 3.

Sibutramina	t_m (min)	área
repeticion_1	1.304	46795
repeticion_2	1.292	47103
repeticion_3	1.313	45405
PROMEDIO	1.303	46434
CV (%)	0.809	1.948

A continuación se llevó el estudio de la influencia del pH en el tiempo de migración y forma del pico, aunque el tiempo de análisis obtenido a pH 3, se considera aceptable.

5.4 pH del electrolito soporte.

El pH del electrolito soporte es uno de los parámetros más importante a manipular. Al elegir el pH se definen las cargas netas de los componentes de la muestra y por lo tanto la magnitud y dirección de sus movilidades dentro del capilar, bajo la influencia del flujo electroosmótico presente.

Las especies químicas presentes en función del pH se esquematizan a continuación (Fig 8).

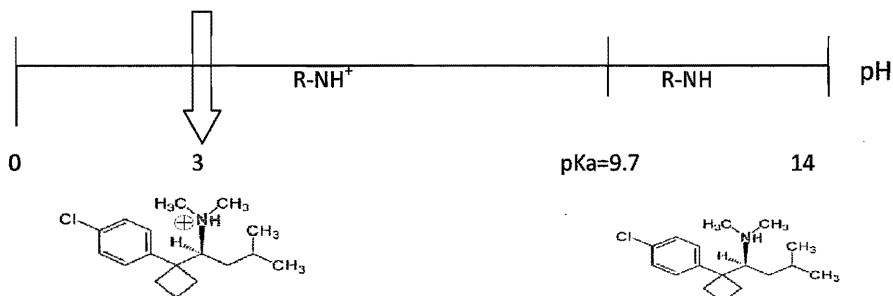


Figura 8. Diagrama lineal de zonas de predominio para SIBUTRAMINA en función del pH.

En la figura 8 se observa que a un pH por debajo de 9.0 el analito está en estado ionizado, es decir se encuentra en forma de catión, por lo que se espera que el pico del analito salga antes que el flujo electroosmótico.

Se realizaron corridas de Sibutramina con Buffer de Fosfatos a una concentración de 50 mM a valores de pH de 3, 5 y 7 (Figura 9).

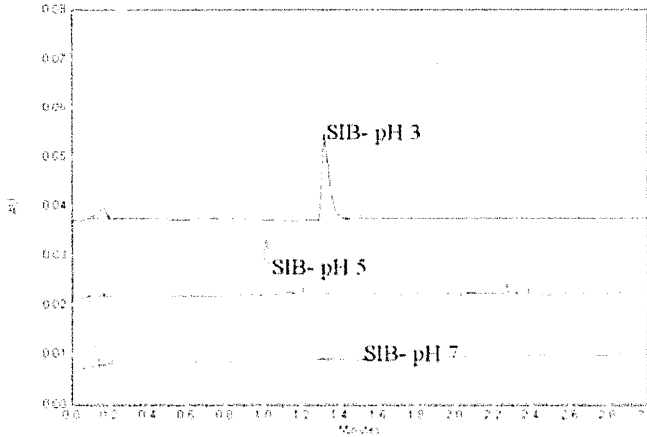


Figura 9. Electroferograma para SIBUTRAMINA (1.2×10^{-3} M) a diferentes pH con Buffer Fosfatos 50mM. Otras condiciones, como se mencionan en la figura 7.

Como se observa en la figura 9, el tiempo de migración de la sibutramina no cambia significativamente en función del pH, sin embargo los coeficientes de variación de los tiempos de migración y área del pico si varían, (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación de los coeficientes de variación de los tiempos de migración y área del pico de sibutramina (1.2×10^{-3} M). Buffer Fosfatos 50 mM a diferente valor de pH.

pH	t_m (min)	CV (%)	área	CV(%)
3	1.303	0.80	46434	1.94
5	1.024	0.22	26776	19.99
7	1.504	2.65	36483	3.24

Posteriormente se decidió seguir es estudio con pH básicos 8, 8.5, y 9.5, utilizando buffer de boratos (Figura 10).

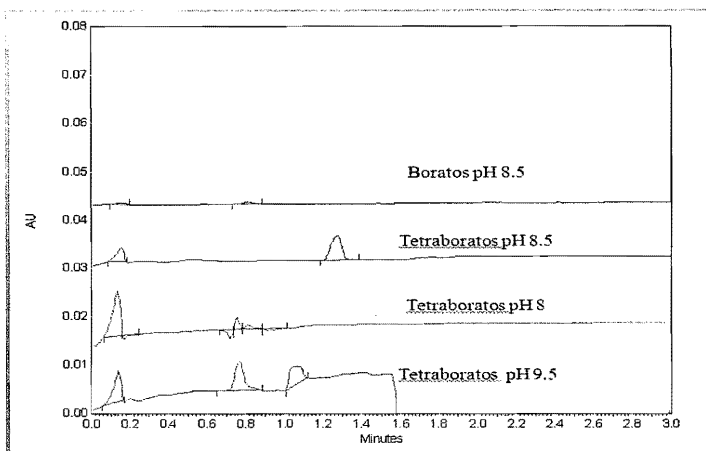


Figura 10. Electroferograma para SIBUTRAMINA (1.2×10^{-3} M) en Buffer Boratos 50mM en pH alcalino. Otras condiciones, como se menciona en la figura 7.

Al realizar las corridas con buffer boratos a pH alcalino, se observa que la línea base es más irregular al igual que la forma del pico. El tiempo de migración cambia de 1.3 min a 0.8 min, lo cual pudiera ser una ventaja, sin embargo, al trabajar a pH básico el capilar se tapo después de solo algunas corridas y finalmente se rompió, lo que consecuentemente llevo a realizar pruebas de solubilidad de la sibutramina (tabla 8).

Tabla 8. Resultados de las pruebas de solubilidad de sibutramina (1.2×10^{-3} M) en los diferentes medios empleados para el análisis por EC.

SOLUBILIDAD DE LA SIBUTRAMINA			
MEDIO	pH		
Buffer Fosfatos	3	5	7
	Soluble	Soluble	Precipita
Buffer Boratos	8	8.5	9.5
	Precipita	Precipita	Precipita

Aunado al hecho de la poca solubilidad de la sibutramina en medio alcalino y a los resultados obtenidos de las corridas electroforéticas (Tabla 9), se decide seguir el estudio en medio ácido.

Tabla 9. Comparación de los coeficientes de variación de los tiempos de migración y área de sibutramina a una concentración de 1.2×10^{-3} M con Buffer Boratos 50 mM a diferente pH.

pH	t_r (min)	CV (%)	área	CV (%)
8	0.780	0.29	3752	4.73
8.5	0.923	0.25	19989	13.82
9.5	No se pudo determinar			

Como se observa en la figura 11, en la cual se pusieron todos los electroferogramas obtenidos en el estudio de la influencia del pH, el pico más eficiente (más angosto y alto) se obtuvo a pH de 3.0. Siendo que los tiempos de migración no cambian de una manera drástica, pero si los coeficientes de variación con respecto al pH, se tiene una razón más para continuar el estudio a pH ácido.

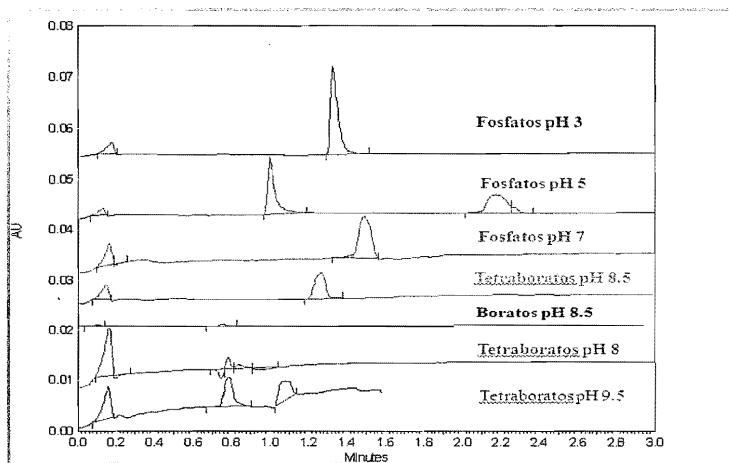


Figura 11. Electroferograma para SIBUTRAMINA (1.2×10^{-3} M) a diferentes valores de pH con diferentes buffer 50mM. Otras condiciones, como se menciona en la Figura 7.

Continuando con el estudio a pH ácido, se siguió empleando el buffer Fosfatos 50 mM. Cabe mencionar que los fosfatos tienen los siguientes valores de pK_a : 2.12, 7.12, 12.31.

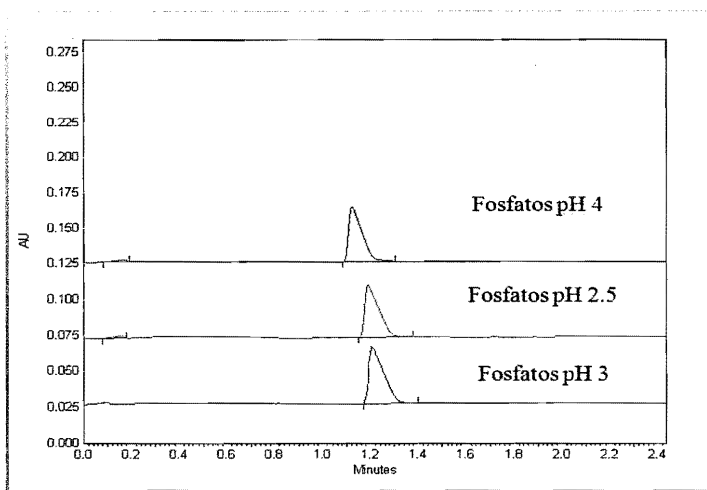


Figura 12. Electroferograma para SIBUTRAMINA (1.2×10^{-3} M) en medio ácido; Buffer Fosfatos 50mM. Otras condiciones, como se menciona en la figura 7.

Tabla10. Comparación de los coeficientes de variación de los tiempos de migración y área de sibutramina a diferente pH, empleando Buffer Fosfatos 50 mM.

pH	t_m (min)	CV (%)	área	CV(%)
2.5	1.193	1.80	145949	5.64
3.0	1.256	0.84	170356	1.36
3.5	1.314	0.67	175496	0.83
4.0	1.107	4.90	146679	5.30

En la Tabla 10, se observa que a un pH de 3.5 se tiene un mejor coeficiente de variación, y que el cambio en los tiempos de migración es poco significativo, por lo que se decide posteriormente hacer el estudio comparando diferentes tipos de buffers con valores de pKa cercanos a este valor.

5.5 Selección del tipo de buffer

Dentro de la optimización del método analítico es importante asegurar que la variación en los tiempos de migración de cada una de las lecturas sea siempre la menor, comúnmente

cuando la capacidad amortiguadora es mayor, la variación en los tiempos de migración se ve disminuida. Por lo que se realizó un estudio para comparar el comportamiento de la sibutramina en diferentes buffer (Tabla 11) que presentan amortiguamiento a pH=3.

Tabla 11. Sistemas químicos que amortiguan a pH de 3.0

NATURALEZA QUÍMICA	pKa		
Citratos	3.08	4.74	5.40
Fosfatos	2.12	7.12	12.3
Oxálatos	1.25	4.27	--
Glutamatos	2.24	--	--
Ac. Cloroacético	0.7	1.3	2.85

Se trabajo con los diferentes tipos de Buffer, dando mejores picos con el Buffer Citratos, Fosfatos y Oxálico, ya que los picos obtenidos con el buffer glutámico y cloroacético son menos eficientes (más anchos y menos altos), como se observa en la figura 13.

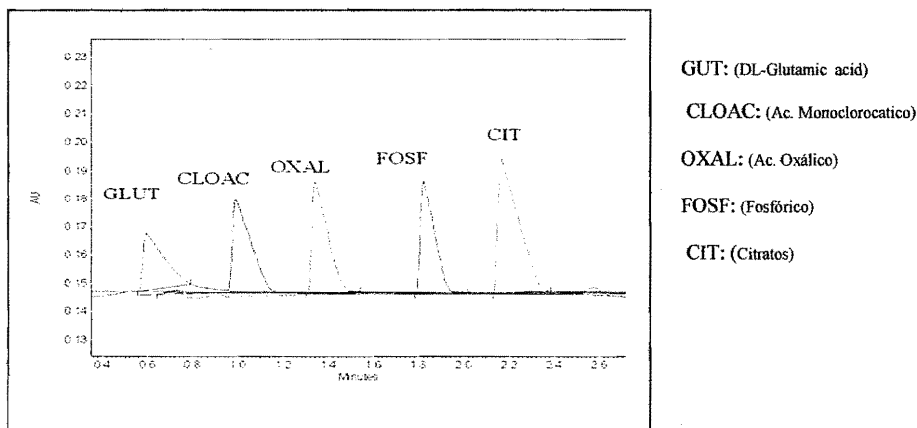


Figura 13. Electroferograma para SIBUTRAMINA (1.2×10^{-3} M) a pH=3; con diferentes tipos de Buffer, todos a 15 mM. Otras condiciones, como se menciona en la figura 7.

En la figura 14 se observa los mejores picos obtenidos con los diferentes tipos de buffer (Citratos, Oxálico y Fosfatos), siendo el más eficiente el pico obtenido con el Buffer de Citratos, además se tienen como parámetro el CV como se muestra en la tabla 11.

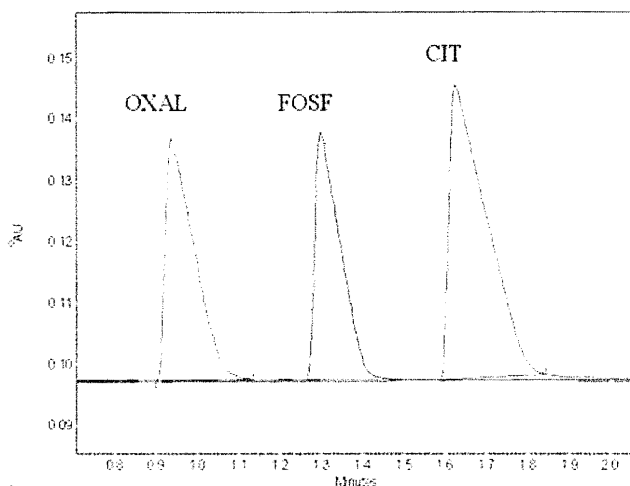


Figura 14. Electroferograma para SIBUTRAMINA (1.2×10^{-3} M) a pH = 3 comparando tres buffers Citratos, Fosfatos y Oxálico. Otras condiciones, como se menciona en la figura 7.

Tabla 11. Comparación de los coeficientes de variación de los tiempos de migración y área de sibutramina con diferente tipo de buffer.

NATURALEZA QUÍMICA	pH	t_m (min)	CV(%)	área	CV(%)
CITRATOS	3.00	1.400	0.49	297026	0.60
FOSFATOS	3.00	1.256	0.84	170356	1.36
OXALICO	3.07	1.321	0.60	184111	3.03
GLUTAMICO	3.02	1.065	2.26	127389	0.98
CLOROACETICO	3.00	1.288	0.35	181071	1.03

Como se observa en los datos de la tabla 11, amortiguando a pH=3 se presentan coeficientes de variación menores al 3% en general. Estos valores en % de CV se obtuvieron a partir del promedio de 3 corridas de cada solución buffer. Se selecciona como el óptimo el Buffer Citratos, porque el área de pico obtenida es la mayor en comparación con los otros buffers y presenta los menores Coeficientes de variación tanto para tiempo de migración como para área de pico.

Posteriormente, se determinó la concentración adecuada, probando concentraciones de 24, 30 y 50 mM.

Cambio de Capilar

Como se menciona anteriormente que el capilar se rompió, se monto otro capilar con condiciones similares: Capilar de sílice fundida, 75 μ m de diámetro interno y 32 cm de longitud al detector. Este cambio se menciona debido a que el diámetro interno del capilar afecta el área del pico a obtener.

5.6 Concentración de Buffer de Citratos

Para la determinación de la concentración óptima de buffer citratos se trabajo con estas tres concentraciones de buffer de Citratos por ser los más recurrentes en otros métodos de determinación de principios activos.

La concentración óptima de buffer de citratos a la cual se trabajo fue a 30 mM ya que el % de CV fue el mínimo en comparación con los demás valores de la concentración de 24 y 50 mM (tabla 12), cabe mencionar que las corridas de cada concentración se realizaron 6 veces cada una obteniendo el promedio en % de CV.

Tabla 12. Comparación de los coeficientes de variación de los tiempos de migración y área de sibutramina con diferentes concentraciones de Buffer Citratos.

BUFFER CITRATOS					
Concentración (mM)	pH	t _m (min)	CV(%)	área	CV(%)
24	3.0	1,455	0,41	8314	1,28
30	3.0	1,496	0,26	8682	0,22
50	3.0	1,455	0,41	8564	4,65

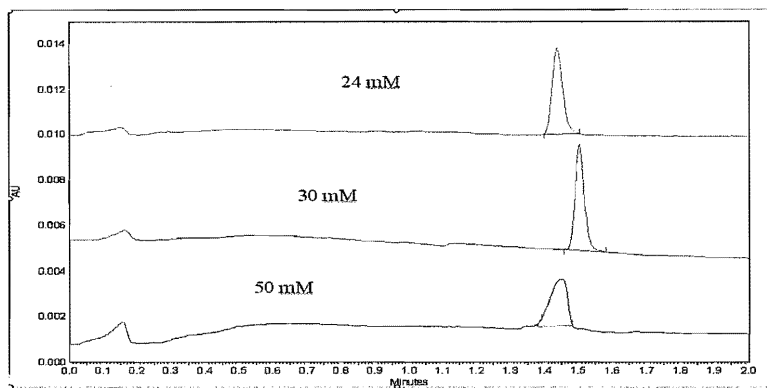


Figura 15. Efecto de la concentración del buffer en la forma del pico. Otras condiciones: capilar de sílice fundida de 31 cm de longitud total, D. I. 75 μm , inyección hidrodinámica 0.5 psi por 5 s, 30 kV, detección a 223 nm. Temperatura del capilar 25°C.

Otra manera de haber establecido la concentración óptima de buffer de Citratos es haber observado en el electroferograma (figura 15), ya que se observa un pico más eficiente (alto y delgado).

Una vez analizados los parámetros de la optimización del método, se determinó que las condiciones óptimas con las que se debía llevar a cabo la validación son los que se presentan en la tabla 13.

Tabla 13. Parámetros y Condiciones para la validación del Método.

PARAMETROS	CONDICIONES
Longitud de onda	223nm
Electrolito soporte	Buffer de Citratos 30 mM, pH=3
Capilar	Sílice fundida de 75 μm de diámetro interno y 31cm de Longitud Efectiva
Tiempo de lavado entre corridas	3min con buffer
Cambio de buffer de corrida	Cada 3 corridas
Voltaje de separación	30 kV
Inyección de la muestra	0.5psi, 5seg
Presión de lavado	20psi

En comparación con las condiciones electroforéticas iniciales, los parámetros que se modificaron fueron el Electrolito de Soporte ya que el buffer de Fosfatos resulto ser menos optimo que el de buffer de citratos, en cuanto al pH se probó con varios valores y este resulto ser igual a pH de 3, otro parámetro que cambio fue el capilar ya que paso de ser de sílice fundida de 50 µm de diámetro interno a 75 µm, con la misma longitud efectiva.

Las condiciones electroforéticas establecidas a partir de la optimización del método y bajo las cuales se trabajó durante toda la validación del método, se encuentran reportadas a continuación.

5.7 Condiciones Óptimos del método

Buffer de Citratos 30 mM pH=3

Longitud de Onda de detección de 223 nm

Cambio de buffer cada corrida

Tiempo de análisis de la muestra: Los datos reportados en el método dicen que a 1.4 min sale la sibutramina.

Acondicionamiento del capilar:

5 min con agua desionizada

5 min con Buffer citratos 30 mM a pH=3

a 20 psi, 25°C

6.- VALIDACIÓN

6.1 Adecuabilidad

Tabla 14. Datos para evaluar Adecuabilidad del sistema para sibutramina (5×10^{-5} M).

Sibutramina		
Sistema	t_m (min)	área
1	1.433	6484
2	1.433	6497
3	1.433	6432
4	1.429	6404
5	1.425	6451
6	1.429	6343
Promedio	1.4303	6435
S	0.0033	56.5
CV(%)	0.2283	0.877

El coeficiente de variación para las Áreas y para el tiempo de migración son menores del 2% por lo que se considera que el sistema electroforético funciona correctamente independientemente de las condiciones ambientales.

6.2 Especificidad

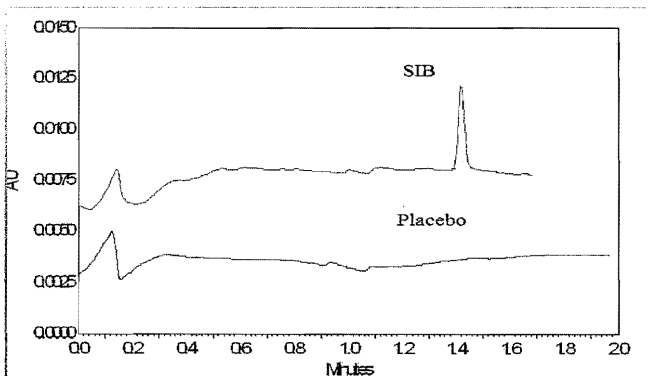


Figura 16. Electroferograma de la muestra analítica y placebo.

No existe respuesta analítica al tiempo de migración del analito por lo tanto los excipientes de la formulación no interfieren en el análisis y el método es específico para Sibutramina.

6.3 Precisión del Sistema

En la tabla 15 se presentan los datos para evaluar la Precisión del sistema para sibutramina.

Tabla 15. Área y tiempo para evaluar la precisión del sistema de Sibutramina ($5 \times 10^{-5} M$).

Sibutramina		
Muestra	t_m (min)	área
1	1.413	7150
2	1.433	7098
3	1.438	7172
4	1.438	7066
5	1.438	7036
6	1.438	7015
Promedio	1.4330	7090
S	0.0100	62.5
CV(%)	0.6978	0.881

Ya que la precisión del sistema indica el grado de dispersión entre una serie de mediciones bajo condiciones establecidas, y de acuerdo con los criterios de aceptación, en la tabla 15 se observa que el coeficiente de variación de las áreas se encuentra dentro de lo establecido, por lo que se considera que el método es preciso.

6.4 Linealidad del Sistema

Cuando la relación entre la concentración y la respuesta del analito (o sus transformaciones matemáticas) no es lineal dentro del intervalo de trabajo, dará lugar a inexactitud del método analítico, por lo que, es conveniente verificar la linealidad³³.

Tabla 16. Área en función de la concentración de Sibutramina.

Nivel (%)	Sistema	Concentración (mol/ml)	t_m (min)	área
60	1	3.02E-05	1.438	4297
	1	3.02E-05	1.429	4302
	1	3.02E-05	1.433	4283
80	2	4.03E-05	1.433	5713
	2	4.03E-05	1.438	5706
	2	4.03E-05	1.429	5716
100	3	5.04E-05	1.413	7150
	3	5.04E-05	1.433	7098
	3	5.04E-05	1.438	7172
120	4	6.05E-05	1.442	8400
	4	6.05E-05	1.438	8575
	4	6.05E-05	1.438	8486
140	5	7.06E-05	1.433	10169
	5	7.06E-05	1.433	10014
	5	7.06E-05	1.438	10053
PROMEDIO			1.434	
S			0.007	
CV (%)			0.477	

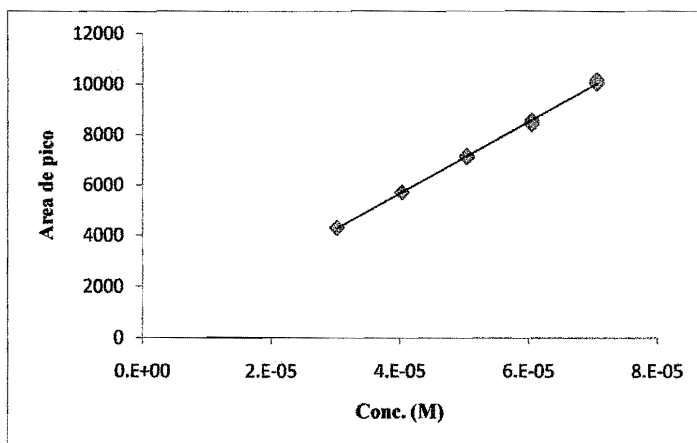


Gráfico 1. Linealidad del Sistema para Sibutramina.

En el gráfico 1, se puede observar que existe un comportamiento lineal entre la concentración de Sibutramina y el Área (respuesta analítica), es decir, que el Área es proporcional a la concentración. Una forma adicional de demostrar que la respuesta es debida a la concentración del analito, es a través de un análisis de variancia.

Se realizo un análisis de variancia para determinar que se ajustan a un modelo lineal.

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

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

H_a = Los datos se ajustan a un modelo lineal.

Tabla 17. Análisis de variancia realizado para determinar la linealidad del sistema Sibutramina con un nivel de significancia del 95% de confianza.

ANÁLISIS DE VARIANCIA					
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	61730838.5	61730838.5	11366.4819	1,622E-13
Residuos	13	70602.4	5430.95		
Total	14	61660236.1			

El análisis de variancia (tabla 17), muestra que el valor de critico de F es menor que el valor de F calculada, por lo que se rechaza hipótesis cero. Por lo que los datos de concentración de Sibutramina en función del Área de pico se ajustan a un modelo lineal. En resumen los parámetros estadísticos más importantes de la regresión para Sibutramina, se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Parámetros obtenidos de la regresión lineal del sistema de Sibutramina.

PARÁMETRO	RESULTADO
R²	0.9989
Pendiente (m)	1E+08
Intercepto (b)	-30.067
IC (B₁)	139443522-145211637

El intervalo de confianza para la pendiente no incluye el 0, además el coeficiente de determinación es de 0.9989, por lo tanto la Sibutramina cumple con los criterios de aceptación de linealidad del sistema.

6.5 Exactitud y Repetitividad del método

Tabla 19. Resultados del porcentaje de recobro de Sibutramina.

Nivel (%)	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	Porcentaje de recobro
80	0.012	0.0121	99.95
	0.012	0.0121	99.49
	0.012	0.0121	99.97
	0.012	0.0121	99.77
	0.012	0.0121	99.81
	0.012	0.0119	100.24
100	0.015	0.0152	101.33
	0.015	0.0151	100.95
	0.015	0.0151	100.91
	0.015	0.0152	101.13
	0.015	0.0149	99.22
	0.015	0.0151	100.77
120	0.018	0.018	100.96
	0.018	0.0179	100.93
	0.018	0.018	100.76
	0.018	0.018	101.01
	0.018	0.018	101.16
	0.018	0.018	99.16
Promedio			100.494
S			0.816
CV (%)			0.812
IC (μ) 100.09-100.9			

En la tabla 19 se observa que el Promedio aritmético para el porcentaje de recobro para Sibutramina se encuentra dentro del intervalo establecido (98% - 102 %), además que el coeficiente de variación del porcentaje de recobro es menor de 2.0 %. Por lo que cumple con los criterios de aceptación, por lo tanto es un método exacto y repetible.

6.6 Linealidad del método

Tabla 20. Resultados de la cantidad adicionada contra cantidad recuperada para Linealidad del método de Sibutramina.

Sistemas	t_m (min)	area	Conc. (mol/ml)	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	% recobro
60	1.458	4564	3.2E-05	0.00906	0.00903	99.68
	1.45	4562	3.2E-05	0.00906	0.00903	99.63
	1.442	4416	3.1E-05	0.00906	0.00874	96.47
80	1.442	6133	4.3E-05	0.01208	0.01212	100.29
	1.446	6131	4.3E-05	0.01208	0.01211	100.26
	1.446	6121	4.3E-05	0.01208	0.01209	100.10
100	1.471	7702	5.4E-05	0.01510	0.01520	100.66
	1.467	7673	5.4E-05	0.01510	0.01514	100.28
	1.458	7670	5.4E-05	0.01510	0.01514	100.24
120	1.442	9122	6.4E-05	0.01812	0.01799	99.29
	1.425	9080	6.4E-05	0.01812	0.01791	98.83
	1.417	9124	6.4E-05	0.01812	0.01799	99.31
140	1.492	10789	7.6E-05	0.02114	0.02127	100.60
	1.438	10792	7.6E-05	0.02114	0.02127	100.63
	1.438	10747	7.6E-05	0.02114	0.02119	100.21
PROMEDIO	1.450					99.66
S	0.019					1.09
CV (%)	1.281					1.10

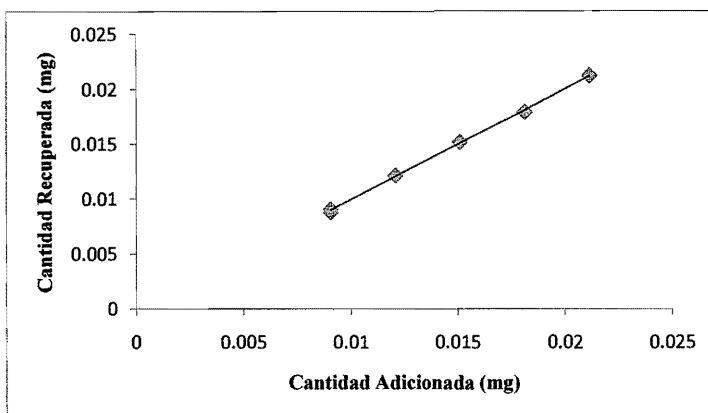


Gráfico 2. Linealidad del Método para Sibutramina.

Tabla 21. Parámetros obtenidos de la regresión lineal del sistema del Método para Sibutramina.

PARAMETRO	RESULTADO
R²	0.9993
Pendiente (m)	1.0092
Intercepto (b)	-0.0002
C.V. y/x (%)	1.09
IC (B₁)	0.9928-1.0256
IC (B₀)	-0.0004-9.9126E-05
C.V. (%)	0.9993
IC (μ)	99.059-100.269

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

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

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

H_a = Los datos se ajustan a un modelo lineal.

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

Tabla 22. Análisis de variancia realizado para determinar la linealidad del Método para Sibutramina con un nivel de significancia del 95% de confianza.

ANÁLISIS DE VARIANCIA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	0.00028	0.00028	17707.6	9.2E-09
Residuos	13	2.0E-08	1.6E-09		
Total	14	0.00028			

De acuerdo con los resultados de las tablas de ANADEVA se rechaza H_0 , por lo tanto la relación entre estas dos variables es lineal con un nivel de confianza del 95% y el coeficiente de determinación indica que el 99.93 % de la variabilidad de la concentración recuperada esta en función de la cantidad adicionada.

6.7 Reproducibilidad del Método

Tabla 23. Porcentaje de recobro de Sibutramina por 2 analistas en dos diferentes días.

	Analista 1 %Recobro	Analista 2 %Recobro	CV (%)
Día 1	101.33	102.55	0.605
	100.95	101.83	
	100.91	101.51	
Día 2	100.10	102.55	0.876
	100.66	101.83	
	100.28	101.51	
CV (%)	0.454	0.466	CV global = 0.60%

En la tabla 23. Se observa que el día y el analista no son fuentes de variación en la reproducibilidad del método, ya que en ambos casos los coeficientes de variación del porcentaje de recobro de Sibutramina obtenidos en diferentes días por diferentes analistas es menor a 2%.

7.- Homogeneidad del Parche

La validación del Método analítico se realizó con Parches dermatológicos elaborados en la FES Cuautitlán Campo-1, los cuales consisten en un reservorio con principio activo (sibutramina), y previamente a la validación se realizó un estudio de Homogeneización con el objeto de asegurar que el proceso por el que se hace la mezcla presente las mismas propiedades en toda la sustancia.

De un parche de 9x11 cm se tomaron 6 cuadros de 1 cm², se diluyeron en 20 ml, después se tomó 1 ml y se lleva a la marca de aforo a 10 ml, los resultados obtenidos de esta prueba fueron favorables ya que se obtuvo un coeficiente menor del 2%, lo que asegura que el parche es homogéneo y por lo tanto el Método el aplicable.

Tabla 24. Homogeneidad del parche dermatológico de Sibutramina.

	t_r (min)	area
1	1.429	5464
2	1.417	5468
3	1.417	5362
4	1.417	5443
5	1.42	5536
6	1.421	5468
promedio	1.420	5456.833
S	0.005	56.130
CV(%)	0.329	1.029

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

Tabla 24. Parámetros de validación del método analítico para la cuantificación de Sibutramina.

Parámetro	Niveles	Especificaciones	Resultados	Conclusiones
Adecuabilidad del sistema	1 solución que representa el 100% corrida 6 veces	$CV \leq 2\%$	$CV = 0.887\%$	Conforme
Especificidad	Someter al método a un placebo analítico	La respuesta debe ser debida al analito	No hay respuesta analítica	Conforme
Precisión del sistema	6 soluciones a la concentración que representa el 100 %	$CV \leq 1.5\%$	$CV = 0.881\%$	Conforme
Linealidad del sistema	5 soluciones a una concentración del 60, 80, 100, 120 140 % de Sibutramina respectivamente	$r^2 \geq 0.98$ IC de m: no debe incluir el 0	$r^2 = 0.9989$ Lim Sup: 145211637 Lim Inf: 139443522	Conforme
Exactitud y repetibilidad	6 muestras de un placebo cargado	CV de % de recobro < 2 % y el IC para la media de % de recobro debe incluir el 100 % o estar dentro del intervalo 98-102 %	$CV = 0.812\%$ Prom % recobro = 100.494 Lim sup = 100.9 Lim Inf = 100.09	Conforme
Linealidad del método	5 soluciones de un placebo cargado a una concentración de 60, 80, 100, 120 y 140 % de Bromhexina respectivamente	$r^2 \geq 0.98$ IC para m: debe incluir el 1 IC para b: debe incluir el 0 Para % recuperado: $CV < 2\%$ IC debe incluir el 100% o estar dentro del intervalo de 98-102%	$r^2 = 0.9993$ IC de m : LS = 1.0256 LI = 0.9928 IC de b: LS = 0.00009 LI = -0.00041 Para % de recobro : CV = 1.10% IC de media poblacional : LS = 100.269 LI = 99.0596	Conforme
Reproducibilidad (Día, analista)	2 analistas diferentes analizando la misma muestra por triplicado en 2 días diferentes	CV global del % de recobro < 2%	CV global = 0.6 %	Conforme

8.- CONCLUSIONES

Se desarrollo un método analítico para la cuantificación de Sibutramina en parches dermatológicos por electroforesis capilar. Las condiciones óptimas para el análisis son; buffer Citratos 30 mM pH3, detección a una longitud de onda a 223 nm, longitud total del capilar 31 cm, D.I 75 μ m, temperatura de 25 C, una inyección hidrodinámica (5 psi por 5 seg), voltaje de separación 30 kV, tiempo de lavado entre corridas 3 min con búfer.

Se realizo la validación del método analítico para la cuantificación de sibutramina en parches dermatológicos, evaluándose los parámetros de: adecuabilidad, precisión, linealidad del sistema y del método, especificidad, exactitud y repetibilidad, precisión intermedia. Al cumplir con todos los parámetros de aceptación en cada uno de los parámetros evaluados de un método analítico que establece la guía de validación del colegio nacional de QFB's, se puede concluir que este método cumple adecuadamente con la validación para llevar a cabo la cuantificación de sibutramina en parches dermatológicos. Se obtuvo el método específico de análisis validado para ser aplicado en el laboratorio de control de calidad.

9.- REFERENCIAS

Artículos de revistas.

1. Radhakrishna. T., Lakshmi Narayana. Ch. "LC method for the determination of assay and of sibutramine hydrochloride and its enantiomers by chiral chromatography". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis* 22(2000):627-639.
2. Jun Chen. Wei Lu. "Determination of the active metabolite of sibutramine by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography B*, 785(2003):197-203.
3. Stanley D. Glick. Renee E. Haskew. "Enantioselective behavioral effects of sibutramine metabolites". *Journal of Pharmacology*, 397(2000):93-102.
4. Li Ding. Xinyu Hao. "Simultaneous determination of sibutramine and its N-desmethyl metabolites in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry Method and clinical applications". *Analytica Chimica Acta*, 492 (2003):241-248.
5. Gokcel, Y. Gumurdulu, H. Karakose, E. Melek Ertorer, N. Tanaci, N. Bascil Tutuncu and N. Guvene. Evaluation of the safety and efficacy of sibutramine, orlistat and metformin in the treatment of obesity. *Diabetes, Obesity and Metabolism* (2002), Volume 4, Issue 1: 49-55.

Libros.

6. SKOOG, A., DOUGLAS, (2000). "QUÍMICA ANALÍTICA". 7ª EDICIÓN. MC GRAW – HILL. MÉXICO.
7. FERNANDEZ, A. G.; SEGURA A. C. (2005). ELECTROFORESIS CAPILAR: APROXIMACIÓN SEGÚN LA TÉCNICA DE DETECCIÓN. EUG. GRANADA.
8. Camillery, P. Capillary electrophoresis: theory and practice. 2da. Ed. CRC Press, Boca Ratón. Fl. 1997. 1-576.

9. CASTILLO, R.M.A., Revilla, V. A. L, López, A. R. (2005). Fundamentos sobre electroforesis capilar. UNAM. Mexico.
10. Abrego Reyes Víctor Hugo. Aplicaciones de la electroforesis capilar para la determinación de compuestos químicos a partir de diferentes matrices. Tesis licenciatura. Cuautitlán Izcalli, México: UNAM, Año 2006.
11. Righetti, P. G., William, H. Capillary electrophoresis in analytical biotechnology. CRC Press, Boca Raton. 1996. pp. 1-576.
12. Remington Alfonso G. (2000), Farmacia, 20^a Edición. Tomo2, Ed. Panamericana. México. Pág 1753.
13. Daniel Wayne W.(2008), Bioestadística, 4^a Edición. Ed. Limusa. México.
14. H.Rang, (2000), Farmacología, 4^a Edición, Elsevier Science, Madrid. Pág 434-436
15. Szepesi, Gabor. HPLC in pharmaceutical análisis. Vol 1. Editorial CRC Press, USA, 1990, pp. 1-4, 191-193
16. ROSS, G. A. (1997). Instrumental validation in capillary electrophoresis and checkpoints for method validation. General paper. Accred Qual Assur 2: 275-284.
17. Castagnino Juan Miguel, Electroforesis capilar, Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana Vol. XXXIII, No. 3, 297-324, Argentina 1999.
18. CARSTENSEN, J. T.; Rhodes, C. T. (2000). "Drug stability. Principles and practices". Tercera Edición. Editorial Marcel Dekker, USA. Vol. 107.
19. ADAMOVIĆ, J. A. (1997). "Chromatographic analysis of pharmaceuticals. Chromatographic science series". Segunda Edición, Ed. Marcel Dekker, USA. Vol. 74.
20. The Merk, Index. Fourteen. Pág. 1465.
21. PLM. Diccionario de especialidades farmacéuticas. Ed. 54. Thomson PLM, S.A. de C.V. México 2008. Pág 667.
22. CHOW, C., Lam, H., Lee, Y. C., Zhang, X. M. (2004). Analytical method validation and instrument performance verification. Editorial Wiley-Interscience. USA.

Guías y normas.

23. Guía de validación de métodos analíticos. Colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos. Edición 2002.
24. NOM-059; Guideline on General Principles of Process Validation.
25. FDAQ2A ICH, 1995
26. FDA Guidance Validation of chromatographic methods, 1994
27. Q2B ICH, 1996.

Páginas web.

28. <http://www.san.gran.es/does/medicamentos/fl6.pdf> (enero 2010)
29. <http://es.wikipedia.org/wiki/sibutramina>.(marzo 2009)
30. http://en.wikipedia.org/wiki/Capillary_electrophoresis (octubre 2008)