



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Validación de un método analítico para la
cuantificación de ácido salicílico libre en
muestra de subsalicilato de bismuto mediante
electroforesis capilar**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA

PRESENTA:

Elizabeth Montserrat Zárate Naranjo

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DEL
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Validación de método analítico para la cuantificación de ácido salicílico libre en muestra de subalicato de bismuto por electroforesis capilar.

Que presenta la pasante: Elizabeth Montserrat Zárate Naranjo
Con número de cuenta: 307291895 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Química

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Septiembre de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Q.F.B. Ladislao Palomar Morales</u>	
VOCAL	<u>Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. María Gabriela Vargas Martínez</u>	
1er. SUPLENTE	<u>M. en C. Pablo Hernández Matamoros</u>	
2do. SUPLENTE	<u>M. en C. Martha Angélica Villegas González</u>	

NOTA: los señores suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/aga*

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A mis padres. Mario Zárate Grande y María de la Luz Naranjo Pineda. Este pequeño logro que tengo académicamente también es fruto de su apoyo ilimitado que me han brindado en cada etapa de mi vida. Ustedes han sido un gran ejemplo de fortaleza y perseverancia, porque no hay día que sin dudarlo aceptan sus deberes como padres sabiendo desde el primer hijo que es una enorme responsabilidad. Gran parte de su vida ha sido dedicada y entregada incondicionalmente a mí y mis hermanos y eso es de admirar y agradecer por siempre. Gracias por ese amor incondicional, por sus oraciones, por sus desvelos, preocupaciones y por sus consejos. Mis agradecimientos siempre serán pequeños a lado de todo lo que me han dado. Los amo con todo mí ser.

A mis abuelitas. Porque sé que en cada una de sus oraciones yo estaba presente y no hay momento del día que no muestren su cariño desinteresado a los demás. Las amo infinitamente.

A mis hermanos. Mario, Delia, Abraham, Manuel, Moisés y Melanie. Porque sin ustedes en mi vida, simplemente no sería lo que soy ahora. No importa que tan diferentes somos, sabemos que siempre nos tendremos unos a los otros. Los amo mucho.

A mis sobrinos. Zury, Matías y Sebastián. Por traerme alegría con el simple hecho de llegar a mi vida, trataré en la medida de lo posible ser uno de los mejores ejemplos que tengan en su vida. Nunca me priven de su sonrisa.

A mis pequeños peludos. Plata, Jack, Gin, Luna, Galia y Rufo. Gracias por cada enojo y risa que han provocado en mí, con ustedes experimento cada día lo que es el cariño sincero e incondicional y que nunca me falta después de un largo día de trabajo en la escuela. Gracias por llegar a mi vida a concientizarme de muchas cosas.

A mis amigas de años. Gabriela, Sandra y Marlen. Porque a pesar de que cada quien está formando su camino en esta vida, nunca ha sido pretexto para dejarnos. Juntas hemos formado hermosos recuerdos y tengo por seguro que no serán los únicos. Muchas gracias por siempre estar a mi lado. Las amo.

A mis “manas”. Miriam, Gabriela y Elizabeth. Gracias por permitirme ser parte de sus vidas y de estar en este grupo tan bonito. En este camino que lo veíamos eterno, crecimos juntas en todos los aspectos y simplemente no podía tener mejores amigas/colegas en mi vida. Gracias por todas las horas de estudio, de risas y de las mejores anécdotas durante esta etapa, y porque sé que siempre podré contar con ustedes. Las amo mucho.

A mis buenos amigos. Selene, Sergio, Armando y Marco. Con cada uno pase momentos tan bonitos durante la carrera y no hay duda que ocupan un lugar importante en mi corazón. Con ustedes siempre está garantizado un buen desmadre, pero también sé que son personas con las que siempre podré contar. ¡Los quiero mucho!

A J. Daniel Gutiérrez Gómez. Te agradezco por cada día que estuviste a mi lado, por cada palabra y detalle que tuviste conmigo. Sin que te dieras cuenta, gracias a tu esencia, hiciste que todo ese tiempo fuera simplemente la mejor experiencia que haya tenido. Aportaste en gran medida virtudes que me han sido esenciales y que siempre quedarán conmigo. Gracias por cada sentimiento que experimentamos juntos, gracias por la alegría que me das.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y a todos sus contribuyentes por darme una formación académica.

A mi asesora de tesis. A la Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez. Por permitirme ser parte de su grupo de trabajo durante todo este tiempo. Le agradezco por la confianza, libertad y paciencia que me dio; las cuales me han servido para desenvolverme y crecer dentro del laboratorio y fuera de él también.

A la Dra. María Gabriela Vargas Martínez. Por ser también mi asesora dentro del laboratorio y en la medida de lo posible ayudarme y orientarme a sacar el trabajo adelante. Agradezco cada llamada de atención ya que también de los errores se aprende.

Al Dr. José de Jesús Olmos Espejel. Gracias por llevarme de la mano cada vez que requería utilizar el equipo de HPLC y porque nunca olvidaré que en el congreso de Cancún me adoptó como si yo fuera también su alumna. ¡Muchísimas gracias!

A la profesora Brigida Camacho y al profesor Mario Morales. Aprecio mucho el que siempre me tomaran en cuenta como parte de su grupo de trabajo y darme la confianza para pasar horas muy amenas en su laboratorio. ¡Muchísimas gracias!

A los miembros del jurado. Por sus valiosas aportaciones durante la revisión de este trabajo.

Los autores agradecen el apoyo brindado por la U.N.A.M. D.G.A.P.A. al proyecto PAPIIME 205416.

ÍNDICE

	Pág.
1. Abreviaturas	1
2. Introducción	2
3. Marco teórico	3
3.1 Electroforesis capilar	3
3.1.0 Bases teóricas	5
3.1.1 Descripción general del equipo	10
3.1.2 Aplicaciones	11
3.1.3 Electroforesis capilar vs CLAR	12
3.2 Subsalicilato de bismuto	13
3.3 Ácido salicílico	15
3.4 Método de cuantificación reportado por la FEUM	17
3.5 Validación	19
4. Objetivos	22
4.1 Objetivo general	22
4.2 Objetivos específicos	22
5. Hipótesis	22
6. Parte experimental	23
6.1 Equipos	23
6.2 Reactivos	23
6.3 Preparación de soluciones	23
6.4 Diagrama de secuencia de trabajo	25
6.5 Características del capilar y condiciones del análisis por EC	26
6.6 Determinación cuantitativa de ácido salicílico	27
6.7 Parámetros seleccionados para la validación del método	27
7. Resultados y discusión	32
7.1 Desarrollo del método por electroforesis capilar	32
7.1.0 Condiciones reportadas	32
7.1.1 Modalidad electroforética	33
7.1.2 Características del capilar	33
7.1.3 Detección espectrofotométrica	34
7.1.4 Longitud de onda de absorción	34
7.1.5 Selección del electrolito soporte	34
7.1.6 Selección del pH del buffer de separación	36
7.1.7 Estudio de la influencia de la concentración del buffer	38
7.1.8 Aplicación de diferentes rutinas de lavado	40
8. Curva de calibración	41
9. Selección del estándar interno	43
10. Validación del método	47
10.1 Evaluación del sistema	48
10.2 Evaluación del método	54
11. Aplicabilidad del método desarrollado en la muestra de bismuto	62
12. Conclusiones	63
13. Referencias	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Número de figura	Título de figura	Número de página
1	Representación esquemática de una separación por electroforesis capilar	4
2	Representación esquemática de la migración de partículas iónicas y especies neutras por EC	4
3	Representación esquemática del Flujo Electroosmótico	8
4	Comportamiento de la movilidad del FEO en función del pH, en varios materiales de capilares	9
5	Migración aparente de cationes, aniones y moléculas neutras en el interior de un capilar bajo la acción de un campo eléctrico y un alto pH	9
6	Esquema de un equipo de electroforesis capilar	10
7	Estructura del Subsalicilato de bismuto	13
8	Estructura del Ácido salicílico	15
9	Diagrama de la metodología a seguir	25
10	Equipo de EC con condiciones electroforéticas óptimas para la cuantificación de AS	27
11	Diagrama lineal de zonas de predominio para AS en función de pH	33
12	Espectro de absorción de la solución stock de ácido salicílico	34
13	Ácido salicílico [0.2 mg/mL], empleando tres electrolitos soportes a 50 mM y pH 9.20	35
14	Influencia del pH en el tiempo de migración, forma y área del pico (AS 0.2 mg/mL), BGE: buffer de boratos a 50 mM	36
15	Efecto de la concentración del electrolito soporte, ácido salicílico [0.2 mg/mL], BGE: ácido bórico, pH 9.20	38
16	Resultados obtenidos para la curva de calibración realizada con micropipetas	41
17	Resultados obtenidos para la curva de calibración realizada con pipetas volumétricas	42
18	Electroferograma obtenido al analizar una mezcla de 1-Naftol (1.2639 mM) y ácido salicílico [0.04 mg/mL], BGE: buffer de boratos, pH a 9.20, 50 mM, detección a 205 nm	43
19	Electroferograma utilizando Acetaminofenol(3.59522 Mm) como estándar interno, ácido salicílico [0.04 mg/mL], BGE: ácido bórico, pH 9.20	44
20	Electroferograma de los sistemas que conforman la curva de calibración del estándar de AS y EI	51
21	Regresión lineal con tres réplicas de la curva de calibración del estándar de AS	51
22	Grafica de residuales para la curva de calibración por estándar interno de AS	52
23	Regresión lineal con tres réplicas de la curva de calibración del estándar de AS	55
24	Grafica de residuales para la curva de calibración por estándar interno de AS	56
25	Electroferograma de la muestra donde se observa el pico de AS y el AAF. Cromatograma de la muestra del pico del AS	62

ÍNDICE DE TABLAS

Número de tabla	Título de tabla	Número de página
1	Parámetros de desempeño a evaluar de acuerdo a diversos documentos normativos	20
2	Método de lavado al inicio del análisis	26
3	Método de lavado entre cada análisis	26
4	Preparación de los sistemas para evaluar la linealidad del sistema	28
5	Artículos científicos que reportan análisis del AS mediante EC	32
6	Resultados obtenidos para el pico del ácido salicílico [0.2 mg/mL] en los diferentes amortiguadores a pH 9.20	36
7	Resultados obtenidos para el pico del ácido salicílico [0.2 mg/mL] en ácido bórico 50 mM a diferentes pH	37
8	Resultados obtenidos para el pico del ácido salicílico [0.2 mg/mL], pH 9.20 en buffer de ácido bórico a diferentes concentraciones	39
9	Resultados obtenidos para el pico del ácido salicílico [0.2 mg/mL] empleando diferentes rutinas de lavado entre corridas. BGE: buffer de ácido bórico, 50 mM, pH 9.20 a una temperatura de 20°C	40
10	Coefficientes de variación para el tiempo de migración, área y altura del pico del AS [0.04 mg/mL] y 1-Naftol como estándar interno. BGE: buffer de ácido bórico,, pH 9.20, 50 mM	45
11	Coefficientes de variación para el tiempo de migración, área y altura del pico del AS [0.04 mg/mL] y Acetaminofenol como estándar interno. BGE: buffer de ácido bórico,, pH 9.20, 50 mM	45
12	Condiciones electroforéticas optimas del método	46
13	Validación del método analítico	47
14	Precisión CV para t_m , área y altura del AS/AAF	48
15	Datos de CV para t_m , área y altura	49
16	Datos de la curva de calibración estándar interno para el estándar de ácido salicílico	50
17	Parámetros y coeficientes de la regresión lineal de la curva de calibración de AS	52
18	Valores de los términos utilizando para el cálculo del intervalo de confianza para la pendiente	53
19	Valores de % de recobro para los parámetros estadísticas de exactitud y repetibilidad del método	54
20	Valores de los términos utilizados para el cálculo del intervalo de confianza del % de recobro	54
21	Parámetros y coeficientes de la regresión lineal de la curva de calibración de AS	56
22	Valores de los términos utilizados para el cálculo del intervalo de confianza para la pendiente y la ordenada al origen	57
23	Valores de los términos utilizados para el cálculo del intervalo de confianza del % de recobro	58
24	Contenido de AS en las muestra en mg AS/ g muestra para el parámetro estadístico de precisión del método	59
25	Valores de los términos utilizados para el cálculo de CV del contenido de la muestra	59

úmero de tabla	Título de tabla	Número de página
26	Contenido de AS en las muestras, en porcentaje, para el parámetro estadístico de robustez	60
27	Valores de los términos utilizados para el cálculo de diferencia absoluto de la media aritmética	60
28	Contenido de AS en las muestras en % para el parámetro estadístico de tolerancia	61
29	Valores de los términos utilizados para el cálculo de CV del contenido de la muestra	61
30	Resultados de la cuantificación de ácido salicílico libre en subsalicilato de bismuto por ECZ y CLAR	62

1. ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AAF	Acetaminofenol
ACN	Acetonitrilo
AS	Ácido Salicílico
H_{AS}	Altura del pico de ácido salicílico
H_{AAF}	Altura del pico de Acetaminofenol
ANOVA	Análisis de variancia
BGE	Background electrolyte
cm	Centímetros
r²	Coefficiente de determinación
CV	Coefficiente de variación
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
S	Desviación estándar
S_{bo}	Desviación estándar de la ordenada al origen
S_{b1}	Desviación estándar de la pendiente
S_{y/x}	Desviación estándar de la regresión lineal
Ec.	Ecuación
EC	Electroforesis capilar
ECZ	Electroforesis capilar de zona
EI	Estándar interno
F_{exp}	F calculada experimentalmente
F_{tablas}	F de tablas de la distribución de Fisher
FEO	Flujo electroosmótico
°C	Grados Celsius
g	Gramos
psi	Libra fuerza por pulgada cuadrada
μA	Microamperios
μm	Micrómetros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
min	Minutos
M	Molar
nm	Nanómetros
b_o	Ordenada al origen o intercepto
b₁	Pendiente
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SSB	Subsalicilato de Bismuto
t_m	Tiempo de migración

2. INTRODUCCIÓN

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) es el documento expedido por la Secretaría de Salud que consigna los métodos generales de análisis y los requisitos sobre identidad, pureza y calidad de los fármacos, aditivos, materias primas, medicamentos, productos biológicos y biotecnológicos. Dichos métodos analíticos oficiales tienen el objetivo de ayudar a los laboratorios de control de calidad a cumplir con las normativas vigentes [1].

Cualquier análisis en el laboratorio puede incluir diversas dificultades que influyen significativamente en los resultados: estos factores pueden ser desde la toma de muestra, el transporte, pérdida o ganancia de los analitos, interferencias o ruido instrumental, error humano, etc.; todas estas causas dificultan la labor del analista generando resultados no confiables al momento de identificar o cuantificar cualquier analito. La mejor opción de solucionar dichos problemas es un proceso de medición bien diseñado y ejecutado, así se certifica la calidad de los datos [2-3].

La validación de cualquier método analítico se realiza mediante estudios de laboratorio que comprueban la idoneidad del método y que sus características satisfacen los requisitos para su aplicación analítica. Cualquier validación involucra la evidencia de la determinación de las variables y el error sistemático de dicho procedimiento, y no solo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales [2-4].

En este sentido, la validación de un método de análisis se ha definido como: “El proceso de establecer las características de desempeño y limitaciones de un método de medición y la identificación de aquellas influencias que pueden modificar estas características y a qué grado lo afectan” [20].

En la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 11ª edición, se muestra la única técnica para la cuantificación de Ácido Salicílico (AS) libre en subsalicilato de bismuto (materia prima) por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR). Siendo el único método ahí reportado, los laboratorios se ven obligados a seguir dicha metodología para determinar esta impureza en los lotes de materia prima de subsalicilato de bismuto, material utilizado en diferentes formulaciones farmacéuticas como jarabe o tabletas, con el propósito de ayudar en el tratamiento de la acidez estomacal.

El objetivo de esta tesis fue evaluar la factibilidad de realizar la determinación de ácido salicílico empleando la técnica de Electroforesis Capilar (EC) para después proceder a desarrollar y validar un método a fin de presentarlo ante la FEUM, como un método alternativo, económico, pero sobretodo más amigable con el medio ambiente para el análisis referido.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Electroforesis capilar

Es una técnica relativamente nueva de separación y análisis de compuestos químicos dado que los equipos comerciales surgieron alrededor de 1996. Durante los últimos años se ha podido observar una mayor aceptación y uso de esta técnica que se ve reflejada en el aumento del número de artículos publicados [5].

El proceso electroforético se define como el movimiento de partículas o moléculas cargadas eléctricamente en un medio líquido conductor, usualmente acuoso, bajo la influencia de un campo eléctrico, cuya separación está en función de su distinta velocidad de migración [5-6]. En la electroforesis capilar (EC), se presenta un fenómeno denominado flujo electroosmótico, el cual se lleva a cabo dentro de un capilar, lo que hace que la técnica adquiera ciertas ventajas con respecto a otras técnicas de separación. La dirección y velocidad de las partículas es determinada por la suma de dos componentes: la migración (que tiene que ver con la relación carga/masa) y el flujo electroosmótico [7].

Hasta la aparición de la EC, las separaciones electroforéticas no eran realizadas en columnas sino en medio plano estabilizado como el papel o en un gel semisólido poroso [8]. La electroforesis convencional tiene una vasta aplicación dentro de la bioquímica, principalmente para la identificación y cuantificación de macromoléculas, pero dichas separaciones suelen ser laboriosas, tardadas y no se cuenta con la automatización [6]. El uso de capilares de sílice fundida de diámetro interno pequeño, entre 10-200 μm y de 25-100 cm de longitud, ha permitido tener grandes ventajas con respecto a la electroforesis convencional, principalmente en:

- La rápida disipación del calor en el capilar, debido a la mayor área superficial.
- Se pueden aplicar altos voltajes (hasta 30 kV) que reducen significativamente los tiempos de análisis y se obtienen picos más eficientes.
- La detección puede llevarse “en línea” [9].

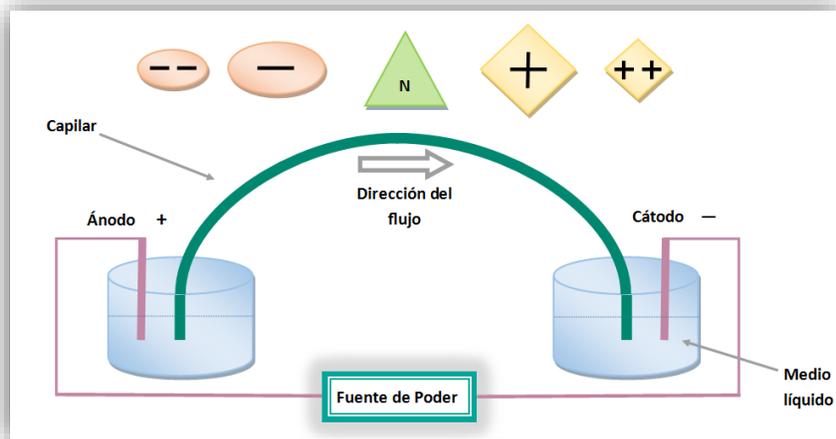


Figura 1. Representación esquemática de una separación por electroforesis capilar. Adaptado [24].

La modalidad más simple es la Electroforesis Capilar de Zona (ECZ), también denominada electroforesis capilar de zona libre, donde se produce la separación debido a las diferencias en la relación carga/masa de las diferentes moléculas que componen la muestra, la influencia de un campo eléctrico y la presencia del flujo electroosmótico [6-10]. Los iones positivos (cationes) son atraídos al electrodo negativo (cátodo), moviéndose más rápido que la solución buffer (flujo electroosmótico). Los iones negativos son atraídos al electrodo positivo, pero debido a la corriente general del buffer también se moverán hacia el cátodo, aunque a un ritmo más lento. Las moléculas neutras se moverán al mismo ritmo que el flujo del buffer (Figura 2).

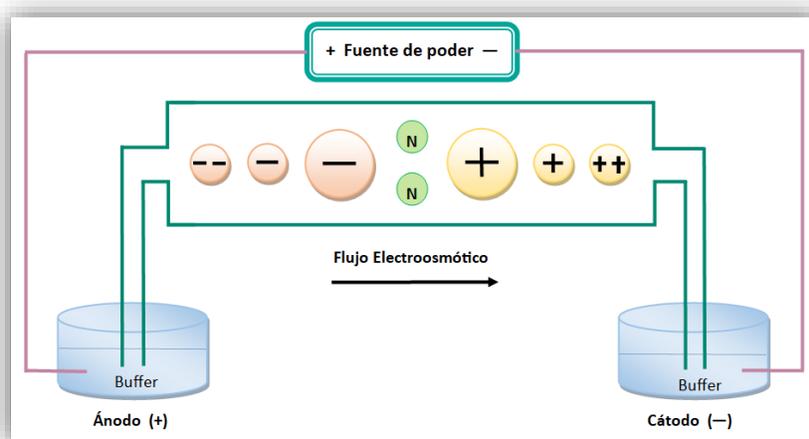


Figura 2. Representación esquemática de la migración de partículas iónicas y especies neutras por EC. Adaptado [11].

Hay numerosas aplicaciones de este modo de separación, destacando el análisis de cualquier compuesto iónico que sea soluble en el medio electroforético de separación, incluyendo aniones y cationes inorgánicos, moléculas contenidas en productos farmacéuticos o biomoléculas grandes en general [6].

3.1.0 Bases teóricas

- Movilidad Electroforética.

En la técnica de electroforesis capilar de zona, bajo la aplicación de un voltaje constante, los iones disueltos o suspendidos en un electrolito soporte migran hacia el electrodo de carga opuesta y estas se separan ya sea por su carga o porque sus velocidades de migración son diferentes [6-9].

Por lo tanto, la separación ocurre gracias a las diferencias en las velocidades de iones o solutos; así la velocidad de migración puede ser expresada como:

$$V_e = \mu_e E \quad (\text{Ec. 1})$$

donde v_e es la velocidad de migración de cada ion (m s^{-1}), μ_e es la movilidad electroforética ($\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) y E es el campo eléctrico aplicado (Vm^{-1}). La movilidad electroforética es un factor que indica que tan rápido se mueve un ion o soluto a través de la disolución de separación y este permanecerá constante para unas determinadas condiciones. Ésta es una expresión de balance de fuerzas que actúan sobre cada ion individual; la fuerza del campo eléctrico actúa a favor del movimiento y las fuerzas de fricción y rozamiento, en contra. La ecuación que describe la movilidad electroforética es:

$$\mu_e = \frac{q}{6 \pi \eta r} \quad (\text{Ec. 2})$$

donde q es la carga del ion, η es la viscosidad de la disolución y r es el radio del ion solvatado en disolución. Este es un factor que puede determinar las velocidades y los tiempos de migración lo que es de gran importancia para la separación de diferentes solutos en mezcla. Como se observa en la ecuación 2, la carga o el tamaño del analito o la viscosidad del electrolito soporte son factores que afectan la movilidad electroforética [6-9].

Factores que afectan la velocidad de migración del analito:

I. La muestra.

Carga: la velocidad de migración aumenta cuando hay un incremento de la carga del analito, generalmente, la magnitud de la carga suele depender del pH.

Tamaño: la velocidad de migración será menor en 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, exhiben distintas características migratorias a causa de los diferentes efectos de las fuerzas de fricción y electrostáticas [5-9].

II. El electrolito soporte.

pH: es una variable de gran repercusión en la selectividad de los métodos electroforéticos pues influye en la carga neta de especies ácidas o básicas débiles que migran electroforéticamente para su separación. La selección de una disolución de análisis depende del pH requerido para la separación de los analitos [6-9].

Capacidad reguladora y composición: la importancia de tener buena capacidad reguladora en una zona lo más amplia posible de pH por parte del búfer es para obtener buena reproducibilidad sin tener un aumento excesivo de la conductividad. La elección de la disolución reguladora para cada problema analítico es generalmente empírica y pueden formularse pocas generalizaciones. Puede recurrirse a los métodos previamente optimizados y publicados en la literatura de sustancias similares para conseguir una orientación [6].

Fuerza iónica: esta variable tiene un impacto importante en la eficacia, resolución y sensibilidad de la técnica, ya que tiene una influencia decisiva en las movilidades electroforéticas y electroosmóticas [6].

III. El campo eléctrico.

Intensidad de corriente: la corriente en la disolución es conducida completamente por los iones del buffer y de la muestra entre los electrodos; por lo que la velocidad de migración es proporcional a la intensidad de corriente. Para asegurar reproducibilidad en los resultados, la corriente debe mantenerse sin muchas fluctuaciones durante la separación electroforética [9].

Voltaje: la fuerza del campo eléctrico aplicada al capilar es el “motor” de la separación. Tanto la velocidad electroforética como la velocidad electroosmótica son directamente proporcionales al campo eléctrico, por lo que el aumento del voltaje aplicado proporcionará mayor rapidez [5-6].

Resistencia: la velocidad de migración es inversamente proporcional a la resistencia, la cual depende del tipo y tamaño del medio soporte y de la fuerza iónica del búfer [9].

IV. El medio soporte.

La composición específica de la columna del capilar ejerce varios efectos sobre la velocidad de migración de un compuesto, y la selección de un medio determinado, depende del tipo de muestra que hay que emplear. En la electroforesis capilar se ha usado capilares de pyrex y teflón, pero actualmente se utilizan capilares hechos con sílice fundida porque posee una excelente transparencia a la radiación UV, además de ser química y eléctricamente inertes, robustos y económicos [9].

Adsorción: es la acumulación de moléculas de la muestra en el medio de soporte. La adsorción es la causa de la formación de una “cola”, un frente o deformación del pico de la muestra, de suerte que ésta se traslada con la forma de un cometa en vez de una banda definida, con lo que reduce la resolución de la separación [9].

Electroósmosis: es un fenómeno básico en todos los procesos de separación electroforética y se puede definir como el movimiento relativo de un líquido (medio electroforético) con respecto a una superficie cargada (pared del capilar), bajo la acción de un campo eléctrico. Este movimiento es lo que se conoce como flujo electroosmótico (FEO) [11-12].

➤ Flujo Electroosmótico.

La pared del capilar de sílice fundida está compuesta por grupos silanol (SiOH), los cuales predominan con una carga negativa cuando el pH del medio sea mayor a su pka (se estima mayor a 4.0 – 5.0), conforme el pH aumente la carga negativa de la pared del capilar aumentará también, atrayendo a los cationes del búfer de corrida, (Figura 3). Cuando un potencial es aplicado a través del capilar, los cationes en solución migran hacia el cátodo, incluyendo las moléculas de solvatación de la solución buffer acuosa, creando el FEO [13].

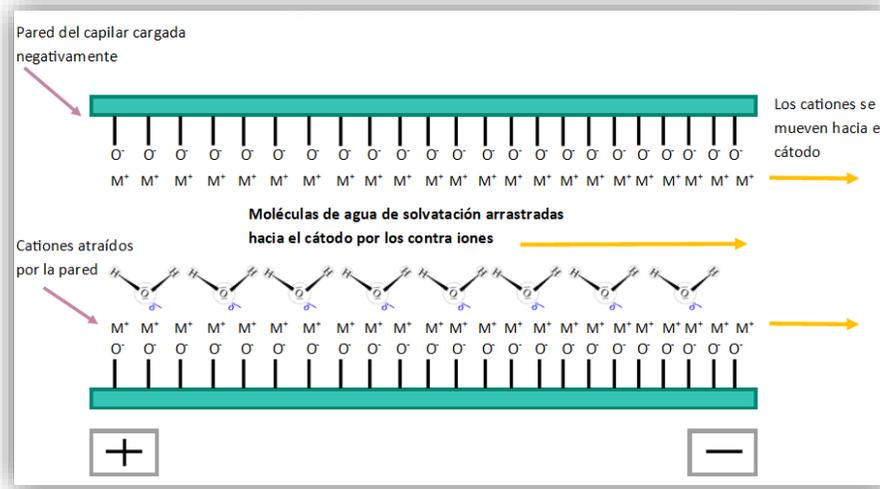


Figura 3. Representación esquemática del Flujo Electrosmótico. Adaptado [24].

En altos valores de pH, la dirección del FEO es hacia el cátodo y por lo general, la velocidad es mayor que las velocidades electroforéticas de migración de los iones individuales ocasionando bajo ciertas condiciones, que todos los iones migren más rápidamente y en dirección hacia el cátodo, logrando su detección [6-8].

El FEO tiene una cierta velocidad (v_{FEO}) que está dada por:

$$v_{FEO} = \left(\frac{\epsilon_0 \epsilon \xi}{4\pi\eta} \right) E \quad (\text{Ec. 3})$$

donde ϵ_0 es la constante dieléctrica del vacío, ϵ es la constante dieléctrica del electrolito, ξ es el potencial zeta, E es el campo eléctrico aplicado en V/cm y η es la viscosidad del búfer. Por lo tanto, los factores que afectan la movilidad electrosmótica son la constante dieléctrica, la viscosidad de la disolución de separación, la cual a su vez dependerá de la temperatura a la cual se lleve a cabo la separación y el valor del potencial zeta. Este último es determinado esencialmente por la carga de la superficie de la pared del capilar. Esta carga depende fuertemente del pH por lo que la magnitud del FEO varía con el pH (Figura 4). A valores altos de pH hay más grupos silanol ionizados y por consecuencia un potencial zeta más alto: a valores bajos de pH hay una menor superficie ionizada y un potencial zeta menor. También depende de la fuerza iónica del buffer. El incremento de la fuerza iónica comprime la doble capa, originando disminución del potencial zeta y del FEO [6].

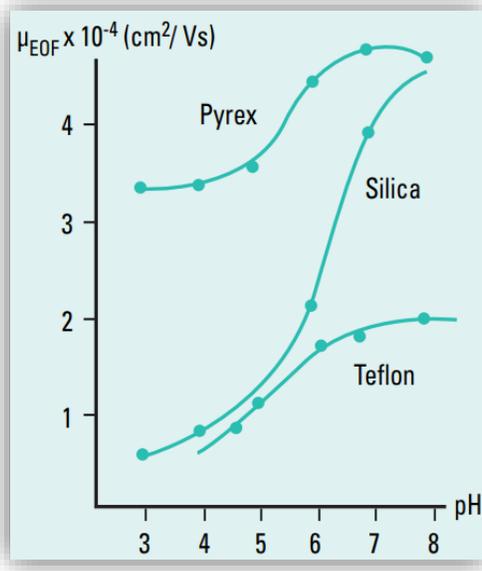


Figura 4. Comportamiento de la movilidad del FEO en función del pH, en varios materiales de capilares [25].

Es importante conocer las características del FEO para poder controlarlo, ya sea reduciéndolo, aumentándolo, eliminándolo o cambiándolo de sentido. La forma más simple de modificarlo, por ejemplo, es ajustando el pH y la fuerza iónica.

En la EC, además de la movilidad electroforética, hay que considerar el FEO, ya que el movimiento final de las moléculas es la suma de estos dos componentes (Figura 5).

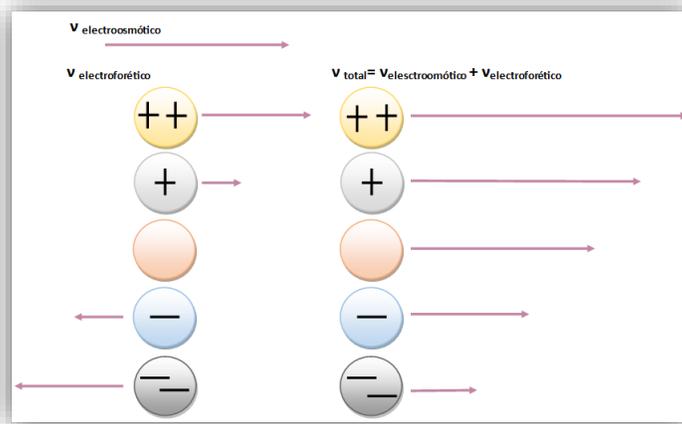


Figura 5. Migración aparente de cationes, aniones y moléculas neutras en el interior de un capilar bajo la acción de un campo eléctrico y a un alto pH. Adaptado [23].

3.1.1 Descripción general del equipo

Un sistema de EC está conformado por: 2 electrodos de platino (ánodo y cátodo), fuente de poder, capilar, viales (donde se coloca el electrolito soporte y la(s) muestra(s), agua, sosa, etc.), un detector, sistema de enfriamiento del capilar, sistema de introducción de la muestra (Figura 6).

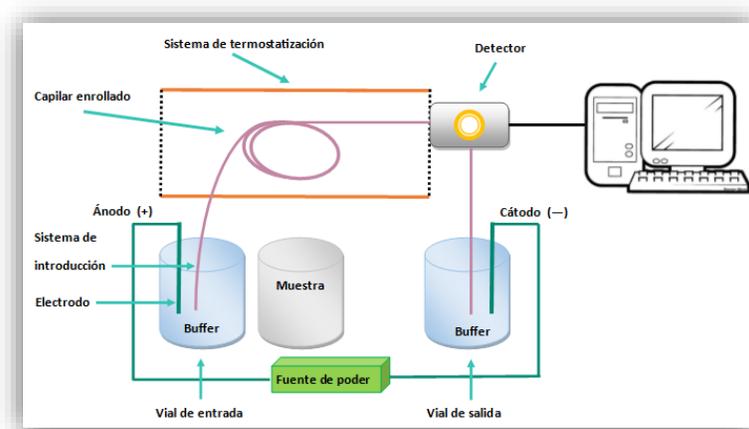


Figura 6. Esquema de un equipo de electroforesis capilar. Adaptado [11].

Los viales de entrada y salida contienen el buffer de separación donde se introducen los extremos del capilar para llenarlo mediante una diferencia de presión. Teniendo el capilar lleno del electrolito soporte se realiza la introducción de la muestra, esta puede ser a través de la aplicación de voltaje (electrocinética) o bien por una diferencia de presión o vacío (hidrodinámica). Una vez que la muestra se encuentra dentro del capilar, los extremos de éste junto con los electrodos, el electrodo positivo (ánodo) en la entrada del capilar y el electrodo negativo (cátodo) en la salida del capilar (trabajando con polaridad normal), deberán de estar dentro de los viales de separación para posteriormente aplicar una diferencia de potencial (o corriente) mediante una fuente de poder. Las partículas cargadas migran en dirección y velocidad determinada por su relación carga-masa, los analitos ya separados pasan por la ventana de detección que se encuentra en el capilar que permite que la señal transmitida llegue al detector. La sensibilidad del análisis mediante EC está establecida por el tipo de detector a utilizar, ya sea por técnicas ópticas o bien por técnicas electroquímicas. El sistema de detección más utilizado es el de absorción UV-Visible, gracias a su facilidad de manejo, bajo costo y a su posibilidad para detectar un gran número de compuestos [6].

3.1.2 Aplicaciones.

La EC es aplicable a la determinación de una amplia variedad de compuestos que van desde iones inorgánicos, iones metálicos, aminoácidos, fármacos, vitaminas, biomoléculas complejas, incluyendo oligosacáridos, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, polinucleótidos y muchas otras especies [6-8].

El explosivo avance de la EC se ha extendido al área biofarmacéutica, para el control de calidad de productos farmacéuticos y biotecnológicos, quimioterápicos y de estructura quiral [5-9].

En el área de alimentos, se aplica al fraccionamiento y cuantificación de aminoácidos, hidratos de carbono, ácidos orgánicos, aditivos y contaminantes [9].

En el área de control ambiental, permite la identificación de contaminantes y sus metabolitos, pesticidas, metales pesados e hidrocarburos [5-9].

En el área de medicina, para análisis de fármacos en fluidos biológicos ya que estos proveen las bases para realizar estudios de biodisponibilidad, farmacocinética y farmacodinamia, así como optimizar la farmacoterapia, para el control de adictos en tratamiento e investigación de intoxicaciones [5-9].

En el área de medicina legal, es de mucha utilidad para la identificación de materiales involucrados en un crimen gracias al análisis de residuos de explosivos, drogas y sus metabolitos [9].

En el área de investigaciones bioquímicas, para la determinación de proteínas biológicamente activas, péptidos, aminoácidos y sus derivados, bases nitrogenadas, oligonucleótidos, carbohidratos, fragmentos de DNA, etc. [9].

3.1.1 Electroforesis Capilar vs CLAR

Las técnicas más utilizadas para la separación de mezclas de compuestos químicos en compuestos individuales son las cromatografías y electroforesis. La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y la cromatografía de gases (CG) son similares a la electroforesis capilar, ya que la visualización de los datos, el manejo de los datos y la automatización son esencialmente los mismos en los tres casos. La CLAR y la electroforesis capilar son más competitivas entre sí, ya que son aplicables a diferentes tipos de muestras similares [11] aunque cabe resaltar que el fundamento de la separación es muy distinto.

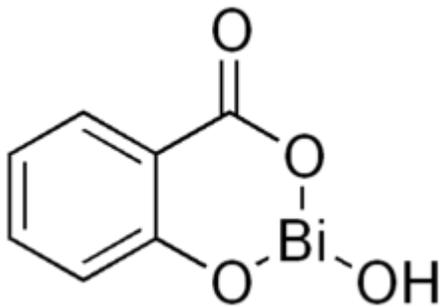
Muchos métodos de análisis que actualmente utilizan la cromatografía líquida de alta resolución o electroforesis en gel de placa probablemente se pueden modificar para utilizar la EC, ya que ofrece varias ventajas, incluyendo separaciones altamente eficientes y rápidas (ya que se lleva a cabo también una detección en línea), columnas capilares duraderas, relativamente baratas y pueden ser utilizadas para el análisis de diferentes compuestos, la cantidad de muestra requerida es pequeña y el consumo de reactivos es bajo. Las separaciones por EC son de alta resolución y aplicable a una amplia variedad de tipos de muestras. Se puede utilizar para análisis de partículas iónicas, neutras, así como biomoléculas de elevado peso molecular y compuestos quirales [5].

También elimina el problema de emplear disolventes (toxicidad, costo y manejo de residuos) que se utilizan en la técnica de CLAR, ya que en EC se emplean soluciones acuosas en su gran mayoría y solo en algunos casos se emplean cantidades mínimas de disolventes [5-9].

Se pueden utilizar una gran variedad de detectores tanto “en línea” disminuyendo los tiempos de análisis o “fuera de línea” o varios a la vez y actualmente es posible acoplar los equipos de EC a otros equipos analíticos y también automatizarlos permitiendo analizar varias muestras sin necesidad de atención en el equipo [5-9].

3.2 Subsalicilato de Bismuto.

El subsalicilato de bismuto, es un fármaco derivado de bismuto que es usado para tratar la diarrea, pirosis (acidez estomacal), coadyuvante en terapia combinada en úlcera péptica por *Helicobacter pylori* y malestar estomacal, en adultos y niños mayores de 12 años. Pertenece a una clase de medicamentos llamados agentes antidiarreicos. Funciona al disminuir el flujo de líquidos y electrolitos hacia las heces, reduce la inflamación dentro de los intestinos y puede matar a los microorganismos que causan la diarrea [14-15].



Fórmula empírica: $C_7H_5BiO_4$

Peso molecular: 362.11 g/mol

Sinónimos:

(2-hidroxibenzoato-o)-oxo bismuto

Sal básica de bismuto (3+) del ácido 2-hidroxibenzoico

Figura 7. Estructura del Subsalicilato de bismuto.

Descripción del principio activo

Polvo fino, blanco a casi blanco, micro cristalino, inodoro e insípido. Prácticamente insoluble en agua, alcohol y éter. Reacciona con álcalis y ácidos minerales [20].

Mecanismo de acción

El subsalicilato de bismuto es una sal insoluble en agua. Es hidrolizado en el estómago por acción del jugo gástrico, convirtiéndose en ácido salicílico y en oxiclóruo de bismuto, sal insoluble. El salicilato liberado se absorbe en un 90 % y este inhibe la síntesis de la prostaglandina responsable de la inflamación intestinal y es excretado por la orina. El ácido salicílico a través de mecanismos anti-prostaglandínicos, ejerce una acción anti-enterotóxica, anti-bacteriana, anti-secretora y anti-inflamatoria. El bismuto, en contraste, se absorbe en mínima cantidad, ligándose a la bacteria para luego ejercer una acción bactericida conjunta, impidiendo la adherencia a la mucosa del tracto gastrointestinal, donde ejercería su acción patógena [20-23].

Efectos adversos

La mayor parte del subsalicilato de bismuto ingerido se excreta por las heces en forma de sulfuro de bismuto. Sin embargo, se absorben cantidades pequeñas que son detectadas en el plasma. Con otras sales de bismuto se han comunicado casos de encefalopatía. No se recomienda su uso en los pacientes con insuficiencia renal. La toxicidad de la terapia a largo plazo es incierta. Debido a que este agente es un salicilato si se toma con aspirina puede provocar efectos sobre el sistema nervioso central como tinnitus y salicismo. El subsalicilato de bismuto puede causar oscurecimiento temporario de las heces y la lengua. El oscurecimiento de las heces simula una melena y puede sugerir erróneamente una hemorragia del tracto GI [15].

Consideraciones especiales

- Niños y adolescentes con síntomas gripales o varicela, no se debe usar el subsalicilato de bismuto en el tratamiento de náuseas o vómito por el riesgo de producir síndrome de Reye.
- Separar una hora de administración de tetraciclinas para evitar baja absorción.
- Debido a que es radiopaco puede interferir con exámenes radiológicos GI [14].

3.3 Ácido salicílico

El AS facilita la descamación al disolver el cemento intercelular que une las escamas en el estrato córneo, dejando que se desprenda la queratina. Este efecto queratolítico puede proporcionar una acción anti fúngica debido a que, al eliminar el estrato córneo se suprime el crecimiento de hongos y ayuda a la penetración de otros fármacos anti fúngicos. Tiene además una leve acción antiséptica. También actúa como regulador de la oleosidad de la piel y como antiinflamatorio potencial. Se lo considera un hidroxiaácido de fundamental importancia para el mejoramiento de la apariencia de la piel envejecida [22-28].

Fórmula empírica: $C_7H_6O_3$

Peso molecular: 138.10 g/mol

pKa: 2.93

Sinónimos:

2-hidroxibenzoico ácido

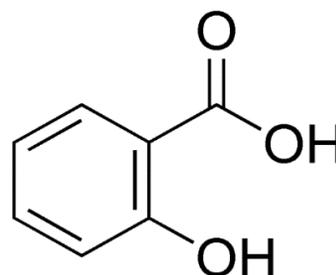


Figura 8. Estructura del Ácido salicílico.

Descripción del principio activo

Su forma física se encuentra en cristales blancos, generalmente como pequeñas agujas, o como polvo blanco y veloso. La forma sintética es blanca e inodora pero el preparado de salicilato natural de metilo puede tener un tinte ligeramente amarillo o rosa, y un débil olor mentolado [28].

Mecanismo de acción

Sus propiedades queratolíticas (exfoliante) y antimicrobianas están dadas por su capacidad de promover la descamación epidérmica a través de la ruptura de los puentes desmosómicos intercelulares y evitar la contaminación por bacterias y hongos. Se le ha atribuido efecto antiinflamatorio directo. El ácido salicílico es liposoluble, propiedad que le permite mezclarse con las grasas existentes en la epidermis y con el material sebáceo que se encuentre estancado en los folículos. Al introducirse en estas zonas lipídicas, provoca la exfoliación y descamación tanto de la

superficie de la piel como del interior del poro. Resulta así eficaz en el tratamiento del acné, gracias a su efecto sebo-regulador [28].

Efectos adversos

- Toxicidad por absorción sistémica del producto aplicado sobre la piel, en especial en niños (náuseas, vómitos).
- Antimitótico y teratogénico.
- Reacciones alérgicas infrecuentes.
- Disturbios psíquicos [28].

3.4 Método de cuantificación reportado por la FEUM

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 11^a edición, establece la cuantificación de Ácido salicílico libre en Subsalicilato de bismuto por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (MGA 0241) y establece que la cantidad de ácido salicílico en la muestra no debe ser mayor al 0.2 %

Fase móvil. Metanol:ácido acético 0.06 M (550:450). Filtrar y desgasificar antes de usar. Hacer los ajustes necesarios para cumplir con los requisitos de la verificación del sistema. *Disolvente.* Acetonitrilo:agua (1:1)

Preparación de referencia. Pesar 20 mg de SRef de ácido salicílico a un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 20 mL de disolvente y agitar hasta disolver. Llevar al volumen con el disolvente y mezclar. Transferir 5.0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 50 mL, llevar al volumen con el disolvente y mezclar. Esta solución contiene 0.02 mg/mL de SRef de ácido salicílico.

Preparación de la muestra. Pesar 260 mg de la muestra a un tubo de centrifuga, agregar 12 mL de acetonitrilo, agitar mecánicamente durante 20 min y centrifugar. Decantar el sobrenadante en un vaso de precipitados. Agregar nuevamente 12 mL de acetonitrilo, agitar, centrifugar y decantar, mezclar los líquidos decantados. Filtrar el líquido resultante a través de un filtro de porosidad de 0.5 µm o menor, recolectar el filtrado en un matraz volumétrico de 50 mL. Lavar el recipiente con 5 mL de acetonitrilo y filtrar colectando en el mismo matraz volumétrico. Diluir con agua, llevar al volumen y mezclar.

Condiciones del equipo. Cromatógrafo de líquidos equipado con detector UV a 300 nm; precolumna de 3.2 mm x 1.5 cm. Columna analítica de 4.6 mm x 30 cm, empacada con L1 (C₁₈). Velocidad de flujo de 1.0 mL/min.

Verificación del sistema. El factor de coe no debe ser mayor de 2.0 y el coeficiente de variación para inyecciones por duplicado no debe ser mayor de 2.0 %.

Procedimiento. Inyectar por separado 20 µL de la preparación de referencia y 20 µL de preparación de la muestra, obtener los cromatogramas correspondientes y calcular el área bajo los picos principales. Calcular el porcentaje de ácido salicílico libre en la muestra mediante la siguiente formula:

$$\%AS= 5000(C/M)(A_m/A_{ref}) \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde, C= Concentración, en miligramos por litro de la SRef de ácido salicílico en la preparación de referencia, M= Peso en miligramos de subsalicilato de bismuto para la preparación de la muestra.

A_m = Área bajo el pico obtenido en el cromatograma con la preparación de la muestra

A_{ref} = Área bajo el pico obtenido en el cromatograma con la preparación de referencia.

3.5 Validación

En los laboratorios de control de calidad en la industria o en instituciones donde se realizan análisis químicos en general, ya sea sobre materia prima, en control de un proceso, en el material terminado o en el almacenamiento, es necesario conocer si dichos materiales están dentro de las normas legales o los parámetros establecidos nacional o internacionalmente. Para esto se recomienda utilizar métodos de análisis rápidos, altamente eficientes, no contaminantes y de bajo costo; dichos métodos analíticos describen la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico (analito) de una muestra. Para ello es necesario validar cada uno de los métodos de análisis [4-16].

La validación es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada [4]. La validación de un sistema analítico, denominada también frecuentemente prueba de la conveniencia del sistema, se centra en controlar el funcionamiento combinado del método y el equipo en los procedimientos de análisis ordinarios [17]. El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que este es adecuado para el fin previsto, para eso es importante una buena planeación del método en todas sus etapas: plan de ejecución, muestreo, calibración, medición, aseguramiento de la calidad, procedimientos estadísticos y generación de documentos. Es importante que el laboratorio usuario de la metodología evalúe los diferentes métodos y seleccione aquel que mejor se adecue a las necesidades y recursos [20].

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 de una impureza se indican los siguientes parámetros de desempeño a estudiar que se muestran en la Tabla 1, de acuerdo a algunos documentos regulatorios.

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

PARÁMETRO DE DESEMPEÑO	Guía de Validación Colegio Nacional de QFB's	COFEPRIS	ICH Q2A
<i>Precisión / Adecuabilidad del sistema</i>	+	+	+
<i>Linealidad del sistema</i>	+	+	+
<i>Especificidad</i>	+	+	+
<i>Exactitud y Repetibilidad</i>	+	+	+
<i>Linealidad del método</i>	+	+	+
<i>Precisión del método o precisión intermedia</i>	+	+	+
<i>Estabilidad analítica de la muestra</i>	*	**	**
<i>Límite de detección</i>	-	+	-
<i>Límite de cuantificación</i>	+	+	+
<i>Robustez</i>	*	+	*
<i>Tolerancia</i>	*	+	*

(-) 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

Las definiciones de los términos usados en validación son:

- Adecuabilidad del sistema.-Verificación de que el sistema opera con base a criterios que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.
- Especificidad.-Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés.
- Exactitud.-Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia
- Estabilidad analítica de la muestra.-Propiedad de una muestra preparada, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse por un tiempo y condiciones determinadas.

- Límite de cuantificación.-Concentración mínima del analito que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables.
- Límite de detección.-Concentración mínima del analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada.
- Linealidad.-Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por una transformación matemática, son proporcionales a la concentración del analito.
- Precisión.-Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea.
- Precisión intermedia.-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.
- Proporcionalidad.-Relación establecida por una ecuación matemática entre los resultados obtenidos por dos métodos analíticos.
- Recobro.-Cantidad del analito determinada en el placebo adicionado, empleando el método analítico.
- Repetibilidad.-Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y métodos.
- Reproducibilidad.-Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios, en días diferentes y con diferentes analistas.
- Robustez.-Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método.
- Tolerancia.-Reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación. La robustez y la tolerancia son conceptos diferentes, ya que el primero se refiere a la influencia de factores internos del método, mientras que la tolerancia se refiere a factores externos del método.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Desarrollar y validar un método analítico para cuantificar ácido salicílico libre en subsalicilato de bismuto por la técnica de electroforesis capilar a fin de proponer una metodología alternativa a la reportada en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 11ª edición.

4.2 Objetivos Particulares

- 1) Seleccionar las condiciones óptimas que permitan la determinación de ácido salicílico libre en subsalicilato de bismuto (materia prima) empleando la técnica de electroforesis capilar.
- 2) Realizar la validación que compare el método desarrollado con el método reportado en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (11ª edición), donde se emplea la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).
- 3) Demostrar la aplicabilidad del método alternativo, cuantificando la cantidad de ácido salicílico libre en muestras reales por ambos métodos y comparar los resultados.

5. HIPÓTESIS

Si hay métodos reportados para la cuantificación de ácido salicílico por electroforesis capilar en diferentes muestras, entonces se puede establecer una metodología para la cuantificación de ácido salicílico libre en materia prima de subsalicilato de bismuto por ECZ, como un método alternativo a la reportada por la FEUM y que además cumpla con los parámetros de validación.

6. PARTE EXPERIMENTAL

La siguiente metodología fue realizada en el Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos L-401, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1.

6.1 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 (sensION™ + PH31 044008).
- Agitador Magnético (Thermolyne, MIRAKTM).
- Balanza Analítica (BOECO Germany, máx. 220 g / mín. 0.01g / d=0.0001 g / e=0.001 g).
- Centrifuga (Beckman Coulter, Allegra™ 21 Centrifuge)
- Balanza de dos platillos (OHAUS 2 Kg – 5 lb)
- Bomba con trampa

6.2 Reactivos

- Ácido salicílico, reactivo analítico (Técnica Química, S.A.)
- Ácido bórico, reactivo analítico (J.T. Baker ® CAS No: 10043-35-3)
- 4-acetaminofenol (SIGMA ®)
- Materia prima de subsalicilato de bismuto (FarmaQuimia S.A. de C.V. Lote No. 30211-SSM5)

6.3 Preparación de soluciones.

- Preparación de electrolitos soportes evaluados:
 - i. Solución buffer de boratos a partir de ácido bórico.

Pesar 0.1535 g de ácido bórico reactivo analítico en un vaso de precipitados de 30 mL, adicionar 30 mL de agua desionizada y agitar hasta que se disuelva por completo. Ajustar el pH a 9.20 con NaOH 0.1 N, transferir a un matraz volumétrico de 50 mL y aforar con agua desionizada. Concentración final 50 mM.

ii. Solución buffer de boratos a partir de ácido bórico/tetraborato de sodio

Pesar 0.0614 g de ácido bórico reactivo analítico en un vaso de precipitados de 30 mL, en otro vaso de precipitados pesar 0.3530 g de tetra borato de sodio deca hidratado. A ambos vasos agregar 15 mL de agua desionizada y agitar hasta que se disuelva por completo. Trasvasar ambas soluciones a un matraz de 50 mL y aforar con agua desionizada. Concentración final de boratos 50 mM, pH 9.20.

iii. Solución buffer de fosfatos

Medir 170 μ L de ácido fosfórico y colocarlo en un matraz de 50 mL conteniendo antes ya cierta cantidad de agua desionizada. Ajustar el pH a 9.20 con NaOH 0.1 N y aforarlo con agua desionizada. Concentración final 50 mM.

- Preparación de la solución stock de AS.

Pesar 0.0100 g de ácido salicílico reactivo analítico en un vaso de precipitados de 50 mL, añadir 30 mL de agua desionizada y agitar hasta que se disuelva y sea homogénea. Trasvasar a un matraz volumétrico de 50 mL y aforar con agua desionizada. Concentración final 0.2 mg/mL.

- Estándares internos

i. 1-Naftol

Se utilizó una solución a una concentración de 1.2639 mM

ii. Acetaminofenol

Se utilizó una solución a una concentración de 3.5952 mM

- Preparación de la muestra

Pesar 140 mg de materia prima en un vaso de precipitados de 50 mL, adicionar 8 mL de agua desionizada y llevar a agitación en un agitador magnético a 3000 rpm durante 20 min. Después centrifugar hasta que se haya formado la pastilla, apartar en un vaso de precipitados diferente el sobrenadante y con la pastilla repetir la adición del agua desionizada, agitación y centrifugar. El total de sobrenadante se filtra a través de una membrana de 0.50 μ m o de menor tamaño de poro, para posteriormente verter la disolución en un matraz volumétrico de 20 mL, añadir 3 mL de la solución de EI y aforarlo.

6.4 Diagrama de secuencia de trabajo.

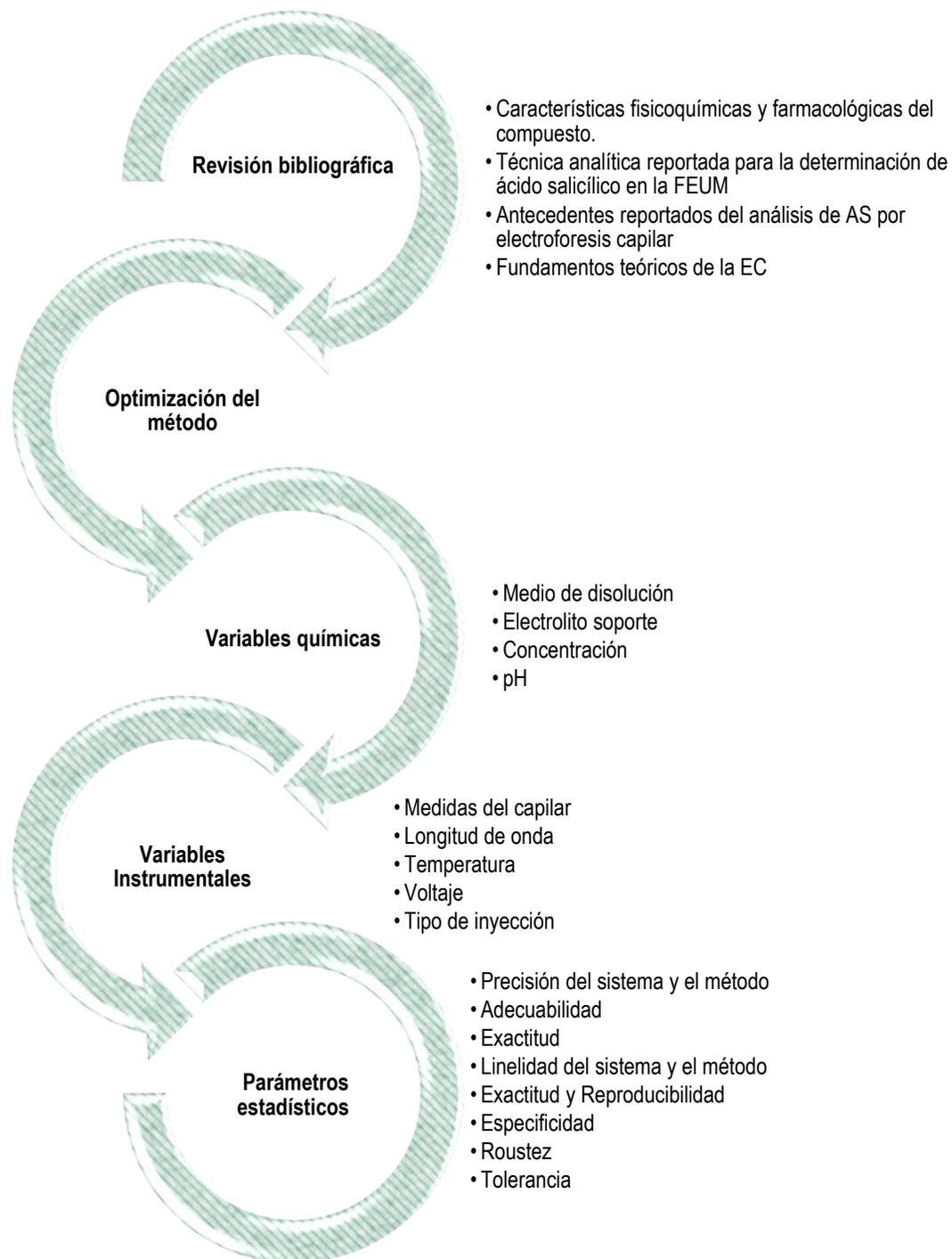


Figura 9. Diagrama de la metodología a seguir.

6.5 Características del capilar y condiciones de análisis por EC.

El capilar que se empleó para las mediciones del analito fue de sílice fundida con una longitud total de 40 cm, longitud efectiva 29.5 cm y 50 μm de diámetro interno. La detección se realizó a una longitud de onda de 205 nm y temperatura de 20 °C en el capilar y en las muestras.

Para eliminar cualquier impureza adsorbida en la superficie del capilar, se implementó la siguiente serie de lavados al inicio de la jornada de análisis:

Tabla 2. Método de lavado al inicio del análisis.

Evento	Operación	Medida	Valor	Tiempo	Solución
1	Enjuague	Presión	30 psi	5.00 min	Agua desionizada
2	Enjuague	Presión	30 psi	20.00 min	NaOH 0.1 N
3	Enjuague	Presión	30 psi	10.00 min	NaOH 0.01 N
4	Enjuague	Presión	30 psi	3.00 min	Agua desionizada
5	Enjuague	Presión	30 psi	15.00 min	Solución Buffer 100 mM

Durante el análisis de cada corrida se obtienen corrientes entre 68 y 70 μA con el siguiente método electroforético:

Tabla 3. Método de lavado entre cada análisis.

Evento	Operación	Medida	Valor	Tiempo	Solución
1	Enjuague	Presión	30 psi	5.0 min	Solución buffer 100 mM
2	Inyección	Presión	0.5 psi	5.00 s	Muestra
3	Espera	-	-	2.00 s	-
4	Detección	Voltaje	25 kV	5.50 min	Solución buffer 100 mM

Terminado el lapso de análisis se inyectó durante 60 min a 30 psi la solución de buffer a 10 mM, con el fin de mantener el pH de trabajo en el capilar para la siguiente jornada de trabajo.

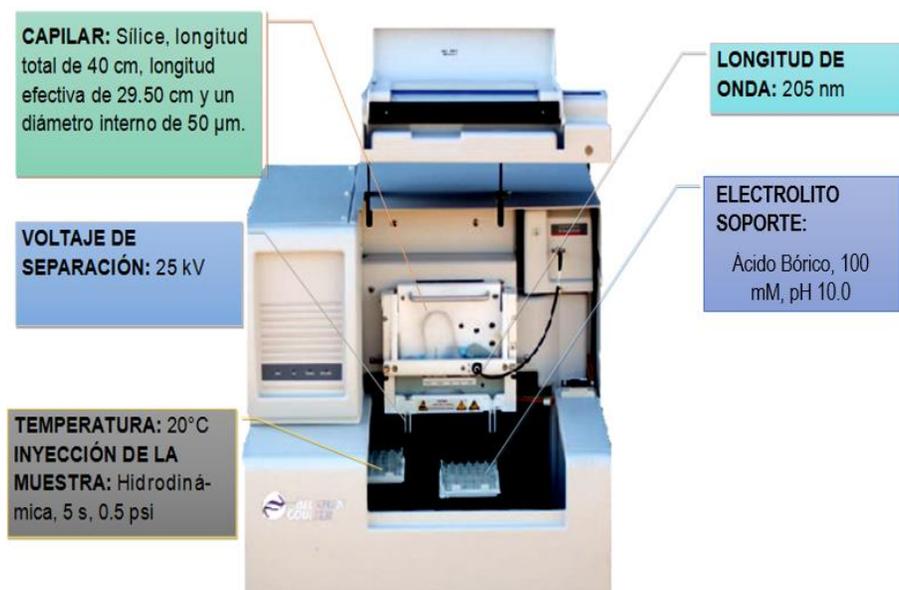


Figura 10. Equipo de EC con condiciones electroforéticas óptimas para la cuantificación de AS.

6.6 Determinación cuantitativa de ácido salicílico.

Para la cuantificación de AS se realizó una curva de calibración por estándar interno. Se empleó AAF como estándar interno para la cuantificación, a fin de minimizar cualquier error relacionado con la introducción de la muestra. Se evaluaron los siguientes parámetros con el fin de validar el método propuesto.

6.7 Parámetros seleccionados para la validación del método

Precisión del sistema

Se preparó un sextuplicado de soluciones de AS a una concentración de 0.02 mg/mL la cual representa la concentración de la solución de referencia por el método de CLAR reportado por la Farmacopea, esto a través de diluciones de la solución stock del analito [0.2 mg/mL] y llevando a un aforo de 20 mL. A cada sistema se le añadió 3 mL de AAF. El sextuplicado de diluciones se utilizó para evaluar la repetibilidad midiendo la respuesta analítica bajo las mismas condiciones. De los electroferogramas obtenidos se calculó S y CV de la respuesta analítica.

Criterio de aceptación:

$CV \leq 1.5 \%$ para métodos físico-químicos

Adecuabilidad del sistema

Se inyectó por quintuplicado la solución de AS a una concentración de 0.02 mg/mL, estas se prepararon por dilución a través de la solución stock del analito, añadiendo 3 mL de la solución del EI y llevando a un aforo de 20 mL. Se reportó la respuesta del analito en los electroferogramas correspondientes para posteriormente calcular el CV.

Criterios de aceptación:

$CV \leq 2\%$ para la respuesta analítica.

Linealidad del sistema

Se preparó por triplicado 6 niveles de concentración por dilución a partir la misma solución stock de AS, se ocuparon para cada dilución pipetas volumétricas de 1-6 mL para cada sistema respectivamente. Los niveles de linealidad se muestran en la Tabla 4 como su respectiva preparación. Se midió la respuesta analítica de cada sistema bajo las mismas condiciones y se reportó la relación concentración vs respuesta analítica. Con los datos obtenidos se calculó el valor de la pendiente (b_1), la ordenada en el origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente (IC (β_1)).

Criterios de aceptación:

$r^2 \geq 0.98$

IC (β_1), no debe incluir el cero

Tabla 4. Preparación de los sistemas para evaluar la linealidad del sistema

	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3	Sistema 4	Sistema 5	Sistema 6
Alicuota de AS (mL)	1	2	3	4	5	6
$[AS]_{sistema}$ (mg/mL)	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06
Alicuota de AAF	3	3	3	3	3	3
$[AAF]_{sistema}$ (mg/mL)	0.0898	0.0898	0.0898	0.0898	0.0898	0.0898
Aforo (mL)	20	20	20	20	20	20

Exactitud y Repetibilidad del método

Se preparó por sextuplicado la muestra, adicionándole 1 mL de la solución stock de AS al momento de disolver la muestra y antes de centrifugar. Las soluciones se analizaron bajo las mismas condiciones y el mismo analista y se determinó la cantidad recuperada del analito. Se calculó el porcentaje de recobro del estándar adicionado, al obtener el cociente de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada expresar en porcentaje. También se calculó el promedio aritmético, la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional IC (μ) del porcentaje de recobro.

Criterios de aceptación:

El IC (μ) debe incluir el 100 % o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo: 98 – 102 % si el método es cromatográfico

El CV del porcentaje del recobro:

No debe ser mayor de 2 % si el método es cromatográfico

Linealidad del método

Se seleccionó tres niveles de la cantidad de analito, uno superior y otro inferior al 100 % de este en la muestra y se prepararon por triplicado las muestras adicionándole 1, 2 y 3 mL de la solución stock de AS a cada una de estas respectivamente durante su preparación (al momento de disolver la muestra y antes de su centrifugación). Se analizaron cada uno de los sistemas bajo las mismas condiciones y se determinó la cantidad recuperada del analito a cada una de ellas. Se reportó la cantidad adicionada vs cantidad recuperada. Utilizando el método de estimación por mínimos cuadrados, se calculó el valor de la pendiente (b_1), la ordenada en el origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2), el intervalo de confianza para la pendiente (IC (β_1)), el intervalo de confianza para la ordenada al origen (IC (β_0)) y el coeficiente de variación de regresión ($CV_{y/x}$). También se calculó el porcentaje de recobro de cada muestra adicionada, su promedio aritmético, la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional IC (μ) del porcentaje de recobro.

Criterios de aceptación:

$$r^2 \geq 0.98$$

El IC (β_1) debe incluir la unidad

El IC (β_0) debe incluir el cero

El $CV_{y/x}$ del porcentaje de recobro, no debe ser menor de 2 % si el método es cromatográfico

Precisión del método

Se analizó por triplicado una muestra del producto cuyo contenido está incluido en el intervalo lineal de concentración de linealidad de método, en dos días diferentes y por dos analistas diferentes. Se utilizó la misma sustancia de referencia y el mismo equipo de EC. Se reportó el contenido del analito de todas las muestras, se calculó la media aritmética, desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV) del contenido, empleando todos los resultados obtenidos.

Criterios de aceptación:

$$CV \leq 2 \% \text{ para métodos cromatográficos}$$

Robustez

Se estableció un factor crítico, relacionado al propio método (ya sean instrumental o no) y se preparó la muestra por triplicado analizando cada una en condiciones normales y en condiciones distinta de operación. Se reportó el contenido del analito para la muestra en condición normal de operación y para la muestra de las otras condiciones de operación, expresadas como %. Con las cantidades de AS en las muestras obtenidas se calculó la media aritmética de la condición normal de operación (y_0) y de cada condición de operación diferente a la condición normal (y_i). Posteriormente se calculó la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto a la condición normal ($|d_i|$).

Criterios de aceptación:

$$|d_i| \leq 2 \% \text{ para métodos cromatográficos}$$

Tolerancia

Se estableció dos factores ajenos al método, que se puedan presentar al reproducir el método en otras condiciones de uso. Se analizó una muestra por triplicado a cada condición. Se reportó el contenido del analito de la muestra, posteriormente se calculó la media aritmética, desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV) del contenido.

Criterio de aceptación:

$CV \leq 2\%$ para métodos cromatográficos

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Desarrollo del método por electroforesis capilar

La selección de los parámetros electroforéticos se llevó a cabo empleando una solución estándar de ácido salicílico a una concentración de 0.2 mg/mL (solución stock). El criterio de evaluación para la elección de los parámetros finales se basó en el tiempo de análisis, la estabilidad de la línea base, la forma y altura del pico y en el coeficiente de variación para los tiempos de migración, área y altura del pico.

7.1.0 Condiciones reportadas

La siguiente tabla contiene artículos científicos que reportan el comportamiento del analito en estudio (ácido salicílico) mediante la técnica de ECZ. Se consultaron con el fin de establecer las condiciones instrumentales iniciales de trabajo, fijando así un voltaje de 25 kV, una temperatura de 20 °C en el capilar y muestras.

Tabla 5. Artículos científicos que reportan análisis del AS mediante EC.

Autor(es)	Año de publicación	Nombre del artículo
Annette Kunkel, Stefan Günter, Hermann Wätzing	1997	Quantitation of acetaminophen and salicylic acid in plasma using capillary electrophoresis without simple pretreatment Improvement of precision
Lynn Thompson, Hans Veening, Timothy G. Strein	1997	Capillary Electrophoresis in the Undergraduate Instrumental Analysis Laboratory: Determination of Common Analgesic Formulations
Frank Welder, Christina L. Colyer	2001	Using Capillary Electrophoresis to Determine the Purity of Acetylsalicylic Acid Synthesized in the Undergraduate Laboratory
Allan D. Shapiro, Annie Tang Gutsche	2003	Capillary electrophoresis-based profiling and quantitation of total salicylic acid and related phenolics for analysis of early signaling in <i>Arabidopsis</i> disease resistance
R. Sekar, P. Ravi Prasad, M. Vairamani	2003	Determination of acetylsalicylic acid and related substances in pharmaceutical preparations and bulk drugs capillary electrophoresis
Nancy S. Mills, John D. Spence, Michelle M. Bushey	2005	Capillary Electrophoresis Analysis of Substituted Benzoic Acid
Qingcui Chu, Lianmei Jiang, Xiuhui Tian, Jiannong Ye	2007	Rapid determination of acetaminophen and p-aminophenol in pharmaceutical formulations using miniaturized capillary electrophoresis with amperometric detection
Rafael R. Cunha, Sandro C. Chaves, Michelle M. A. C. Ribeiro, Lívia M. F. C. Torres, Rodrigo A. A. Muñoz, Wallans T.P.	2015	Simultaneous determination of caffeine, paracetamol, and ibuprofen in pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography with UV detection and by capillary electrophoresis with conductivity detection

7.1.1 Modalidad electroforética

Para la adecuada elección del modo electroforético se debe de tener en cuenta las propiedades fisicoquímicas del analito. En este caso, su constante de acidez (pK_a) es de 2.93, y como se observa en la Fig. 11, a valores de pH superiores a este se encontrará ionizado y cargado negativamente, por tanto, su determinación puede realizarse por la modalidad electroforética denominada ECZ.

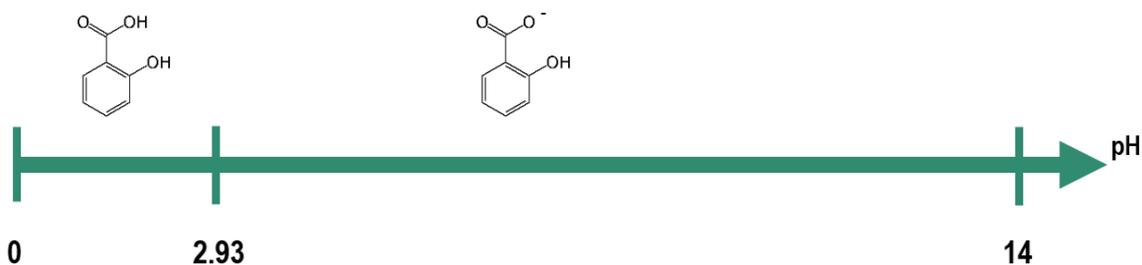


Figura 11. Diagrama lineal de zonas de predominio para AS en función del pH.

Bajo la influencia del campo eléctrico, el analito con carga negativa se empezará a mover hacia el electrodo de signo contrario (ánodo) -situado en el extremo del capilar donde se realiza la introducción de la muestra-, a una velocidad que va a depender de la viscosidad del medio, el campo eléctrico, la carga neta y el tamaño de la molécula. Ya que el ion salicilato se dirigirá hacia el lado opuesto del detector, debe de ser el FEO el que se encargará de desplazarlo hacia el otro extremo del capilar, donde se encuentra el detector, por lo que se requiere fijar un pH alcalino en el sistema a fin de tener la mayor movilidad del FEO, tal y como se apreció en la figura 4 (pág. 9).

7.1.2 Características del capilar

Los capilares más utilizados para el análisis en EC son de sílice fundida, ya que el manejo de éstos es fácil, debido a un recubrimiento de poliimida que los hace flexibles, además, son transparentes a la radiación UV-Vis y puede determinarse la absorbancia desde los 190 nm, empleando un espectrofotómetro como detector; por lo tanto, la elección de este tipo de capilar es idónea para el análisis a desarrollar. Las medidas del capilar serán 50 μm de diámetro interno, para evitar problemas de calentamiento y obtener una mejor disipación del calor que se genera durante el análisis y una longitud total de 40 cm para no alargar el tiempo de análisis.

7.1.3 Detección espectrofotométrica

Dada la estructura molecular que presenta el ácido salicílico, es decir, tiene un anillo aromático, el cual le permite ser detectado por espectrofotometría UV, en este caso, se utilizará un detector de arreglo de diodos (DAD).

7.1.4 Longitud de onda de absorción

Se midió el espectro de absorción de una solución stock de AS (0.2 mg/mL) para determinar la longitud de onda a la cual trabajar durante el desarrollo del método. Se seleccionó 205 nm ya que a esta longitud de onda se presenta la máxima absorción (Figura 12).

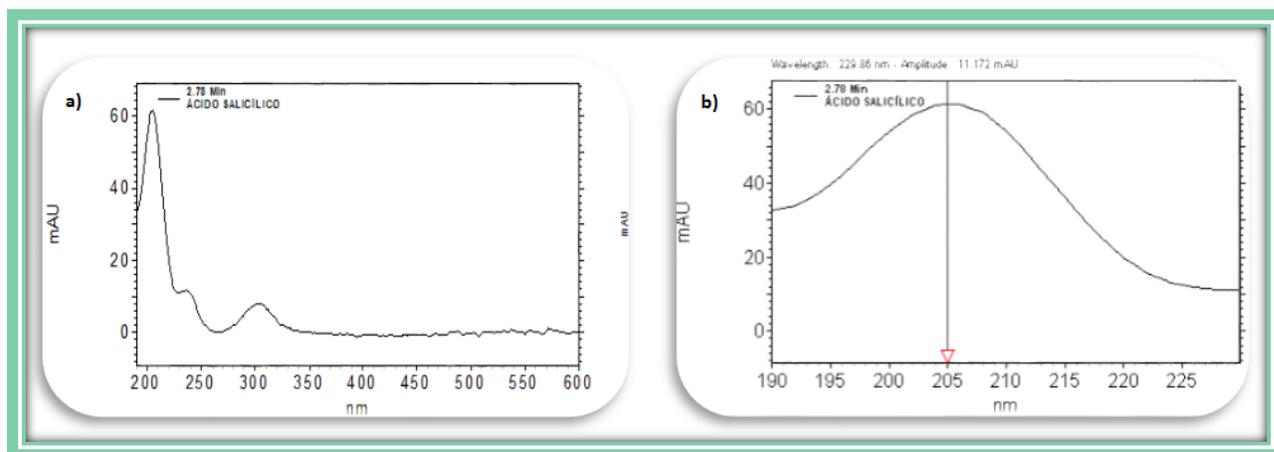


Figura 12. (a) Espectro de absorción de la solución stock de ácido salicílico, (b) Acercamiento del espectro en la longitud de onda de máxima de absorción.

7.1.5 Selección del electrolito soporte

El medio electroforético actúa simultáneamente como conductor de la corriente eléctrica y sistema amortiguador del pH, lo que hace que la carga eléctrica del ácido salicílico sea negativa. Por lo tanto, para la selección apropiada del electrolito soporte, se tuvo en cuenta que el AS se mantendrá con una carga neta negativa. Sabiendo que la migración del analito se dirigirá hacia el lado opuesto del detector, forzosamente el electrolito soporte deberá tener un pH alcalino para aumentar la velocidad del FEO y que esta sea mayor que la velocidad de migración de los iones de la muestra, asegurando que el AS llegue hacia el detector en un tiempo corto.

Se seleccionaron tres posibles sistemas amortiguadores, los cuales no presentan absorción en la región ultravioleta, preparados a partir de: ácido bórico (a), ácido fosfórico, ácido bórico y borato de sodio (b). En la figura 13 se presentan los resultados obtenidos; por cada disolución se realizaron 6 repeticiones, con la finalidad de obtener el coeficiente de variación del tiempo de migración, área y altura de pico (Tabla 6).

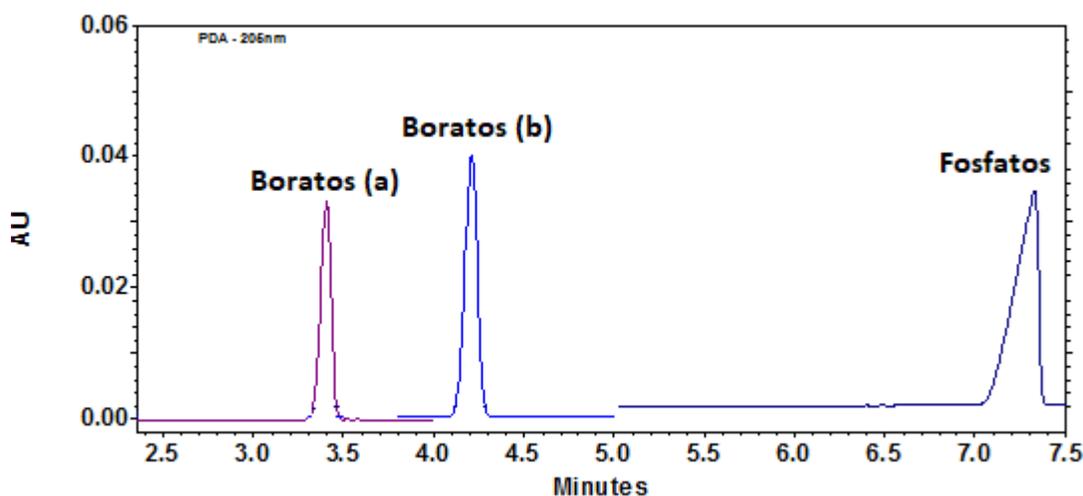


Figura 13. Ácido salicílico [0.2 mg/mL], empleando tres electrolitos soportes a 50 mM y pH 9.20.

El empleo del búfer de fosfatos tiene como resultado un pico asimétrico y un tiempo de migración mayor con respecto a los dos electrolitos soportes evaluados, además, al momento del análisis se obtuvo una corriente entre 116 y 118 μA , la cual se considera alta y favorece el calentamiento del capilar, lo cual en futuros experimentos podría afectar la repetibilidad de la respuesta, tal y como se observa en la Tabla 6, el CV con respecto al área y altura es el mayor para este buffer.

Por otro lado, los electroferogramas empleando buffer de boratos preparado a partir de ácido bórico (a) y ácido bórico y tetraborato de sodio (b) presentan un pico con buena simetría, sin embargo, empleando solamente ácido bórico se puede apreciar un pico más eficiente, con un tiempo de migración menor que los demás y con un CV cercano al 2 % para el área de pico, y menor para altura y tiempo de migración, siendo el que se selecciona para continuar con el desarrollo del método.

Tabla 6. Resultados obtenidos para el pico del ácido salicílico [0.2 mg/mL] en los diferentes amortiguadores a pH 9.20.

Electrolito soporte	Boratos (a)			Fosfatos			Boratos (b)		
# Corrida	Tiempo	Área	Altura	Tiempo	Área	Altura	Tiempo	Área	Altura
1	3.458	143617	3458	7.400	295699	32799	4.158	228310	46189
2	3.429	138858	3429	7.308	284886	32101	4.258	192072	37803
3	3.404	136259	3404	7.313	282796	31950	4.250	196401	38634
4	3.408	136461	33026	7.263	386077	32622	4.208	197549	39845
5	3.413	136071	32672	7.246	306153	33794	4.208	198642	39959
6	3.413	137220	33139	7.325	299656	32754	4.233	199315	39789
Promedio	3.421	118355	32907	7.309	309211	32670	4.219	202048	40369.8
S	0.020	2897.46	403.64	0.054	38680.91	652.92	0.036	13118.02	2974.76
CV	0.587	2.448	1.227	0.740	12.510	1.999	0.864	6.493	7.369

7.1.6 Selección del pH del búfer de separación

El pH del electrolito soporte es uno de los parámetros fundamentales a establecer. Usualmente el pH del electrolito soporte sirve tanto para imponer el pH dentro del capilar y asegurar que predomine solo la especie química del analito de interés que favorezca la determinación, como para establecer la movilidad del FEO. En este caso se optó por emplear un pH alcalino, para así tener una mayor velocidad del flujo electroosmótico, se evaluaron 4 valores de pH (8.6, 9.2, 9.6 y 10), y observar la influencia en la forma y ancho del pico (Figura 14, Tabla 7).

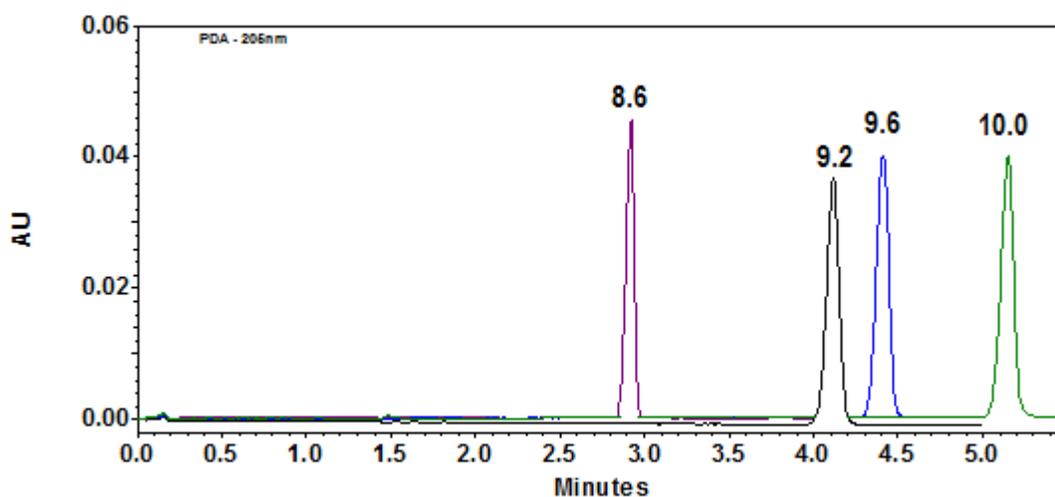


Figura 14. Influencia del pH en el tiempo de migración, forma y área del pico (AS 0.2 mg/mL), BGE: buffer de boratos a 50 mM.

Tabla 7. Resultados obtenidos para el pico del ácido salicílico [0.2 mg/mL] en ácido bórico 50 mM a diferentes pH.

pH del búfer	8.6			9.20		
	# Corrida	Tiempo	Área	Altura	Tiempo	Área
1	2.862	140127	43556	4.117	197355	37441
2	2.900	123597	38039	4.058	195768	38176
3	3.038	140314	39867	4.067	194077	37494
4	2.837	128545	40280	4.121	194753	37035
5	2.921	153568	45364	4.117	211716	39723
Promedio	2.912	137230.2	41421.2	4.096	198733.8	37973.8
S	0.078	11684.62	2969.02	0.03	7361.51	1060.19
CV	2.673	8.515	7.168	0.752	3.704	2.792

pH del búfer	9.6			10.0		
	# Corrida	Tiempo	Área	Altura	Tiempo	Área
1	4.375	191578	38713	4.842	198051	40504
2	4.342	201554	41104	4.925	196075	39038
3	4.321	189714	39087	5.121	226028	41898
4	4.408	203032	39787	5.196	218750	40636
5	4.808	213034	37011	5.167	222669	41162
Promedio	4.45	199782.4	39140.4	5.050	212314.6	40647.6
S	0.202	9460.29	1499.47	0.157	14176.21	1053.53
CV	4.547	4.735	3.831	3.114	6.677	2.592

Como se observa en la Tabla 7, el pH impuesto tiene una influencia notoria en el tiempo de migración del ácido salicílico. En el electroferograma (Figura 14) se puede observar que conforme va aumentando el pH del buffer, va también aumentando el tiempo de migración (aumentando el tiempo de análisis) y en consecuencia un notable ensanchamiento de los picos. Aunque la tendencia que se observó entre el t_m y el pH no fueron los esperados (ya que teóricamente al aumentar el valor de pH del búfer aumenta la velocidad del FEO y por lo tanto los t_m del analito disminuyen) esto se debió ya que al aumentar el pH en cada solución de buffer también se aumentó la viscosidad de dichas soluciones y el FEO es inversamente proporcional a la viscosidad del buffer lo cual tuvo como resultado mayor tiempo de análisis. Aunque notablemente a un pH de 8.6 tuvo un menor tiempo de migración, se seleccionó el de un valor de pH 9.2 para continuar con el diseño del método, ya que éste

reflejó menor porcentaje en el coeficiente de variación para el tiempo de migración, área y altura del pico. Cabe mencionar que dicho pH es muy cercano al pKa del par ácido bórico/boratos, por lo que el sistema presenta el mejor amortiguamiento del pH a dicho valor.

7.1.7 Estudio de la influencia de la concentración del búfer (fuerza iónica)

La fuerza iónica también es un factor de gran importancia ya que tiene una influencia notable en las movilidades electroforéticas. No se recomienda utilizar concentraciones elevadas de iones, ya que se produce mayor calentamiento del capilar, lo que puede afectar la reproducibilidad tanto del tiempo de migración como del área de los picos; se evaluaron cuatro concentraciones: 25, 50, 75 y 100 mM de un buffer de boratos preparado a partir de ác. bórico.

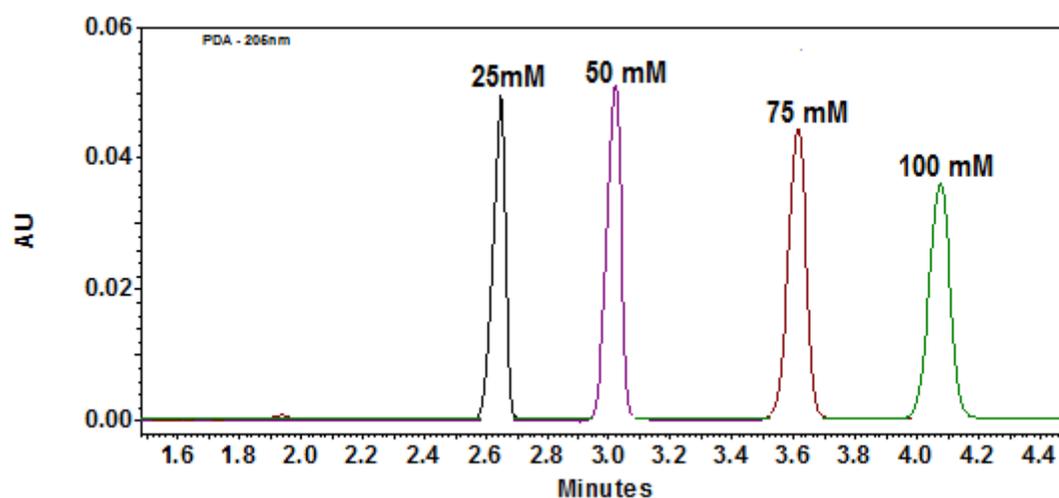


Figura 15. Efecto de la concentración del electrolito soporte, ácido salicílico [0.2 mg/mL], BGE: ácido bórico, pH 9.20.

Como se muestra en la Figura 15, en las cuatro concentraciones de buffer que se emplearon, los picos del estándar de AS se observan simétricos y el ancho de éstos aumenta conforme la concentración de buffer va incrementando. En cuanto al tiempo de migración, también se observa una tendencia, ya que a mayor concentración del búfer disminuye el potencial zeta y el FEO, teniendo como consecuencia un mayor tiempo de migración del analito, tal y como se refleja en el electroferograma.

Tabla 8. Resultados obtenidos para el pico del ácido salicílico [0.2 mg/mL], pH 9.20 en buffer de boratos a diferentes concentraciones.

Concentración del búfer	[25 mM]			[50 mM]		
# Corrida	Tiempo	Área	Altura	Tiempo	Área	Altura
1	2.617	138587	49454	3.046	168142	50891
2	2.654	151201	51497	3.017	167336	51200
3	2.638	145093	50476	3.028	164261	50436
4	2.65	141625	49330	3.05	182012	54177
5	2.646	126584	45245	3.033	151667	46529
6	2.663	148258	50396	3.021	167563	51180
Promedio	2.645	141891.33	49399.67	3.033	166830.17	50735.50
S	0.016	8749.39	2182.62	0.013	9690.45	2452.17
CV	0.601	6.166	4.418	0.438	5.809	4.833

Concentración del búfer	[75 mM]			[100 mM]		
# Corrida	Tiempo	Área	Altura	Tiempo	Área	Altura
1	3.612	187972	46404	4.037	175874	38020
2	3.612	184270	45589	4.033	183708	39553
3	3.604	170364	42468	4.050	188506	40315
4	3.612	178869	44112	4.075	168093	35663
5	3.625	169639	41923	4.042	198950	42486
6	3.587	208891	51449	4.046	192401	41210
Promedio	3.609	183334.17	45324.17	4.047	184588.67	39541.17
S	0.013	14500.05	3462.51	0.015	11237.92	2425.29
CV	0.349	7.909	7.639	0.369	6.088	6.134

En cuanto al CV con respecto al área de pico (Tabla 8), en todos los casos estuvieron por arriba del 2%, sin embargo, el de menor valor se obtuvo a una concentración de 50 mM y el pico de respuesta fue más simétrico. Por lo tanto, las condiciones para el electrolito soporte que se utilizarán a partir del siguiente estudio serán las siguientes: Buffer de boratos / 50 mM / pH 9.20.

7.1.8 Aplicación de diferentes rutinas de lavado

Las lecturas anteriores se realizaron con un lavado entre corridas solamente con electrolito soporte durante 1.5 min aplicando 30 psi de presión. Se prueban dos diferentes rutinas de lavado entre cada corrida para evaluar si es adecuada o si se puede favorecer la repetibilidad en el área del pico.

El buffer de separación empleado es de boratos, 50 mM, pH 9.2, temperatura de análisis: 20 °C, el estándar de ácido salicílico que se utilizó se manejó a una concentración de 0.02 mg/mL (punto medio de la curva propuesta).

Tabla 9. Resultados obtenidos para el pico del ácido salicílico [0.2 mg/mL] empleando diferentes rutinas de lavado entre corridas. BGE: buffer de boratos (a partir de ác. bórico), 50 mM, pH 9.20, a una temperatura de 20 °C.

Condiciones	0.5 min H ₂ O, 1.5 min búfer.			1.5 min NaOH 0.01M, 0.5 min H ₂ O, 1.5 min búfer		
	# Corrida	Tiempo	Área	Altura	Tiempo	Área
1	3.846	23103	5511	3.692	28201	6997
2	3.854	21594	5124	3.683	25314	6298
3	3.854	21371	5013	3.667	28469	7098
4	3.833	21252	5095	3.704	23572	5830
5	3.833	20958	5031	3.679	27927	6976
6	3.846	21293	5074	3.671	26421	6000
Promedio	3.844	21595.17	5141.33	3.682	26650.66	6533.17
S	0.009	766.66	185.62	0.013	1931.66	559.34
CV	0.246	3.550	3.610	0.371	7.248	8.561

El optimizar el ciclo de lavado es muy importante para obtener resultados reproducibles. Como se puede observar en la Tabla 5 en ambos tipos de lavados los CV con respecto al t_m son menores al 2 % establecido, sin embargo, en los dos casos presentados se notó un incremento del coeficiente de variación con respecto al área y altura de los picos esto posiblemente debido al cambio de pH que se maneja en las rutinas de lavado provocando desestabilizar el capilar y en consecuencia no se obtienen resultados reproducibles. Ya que no se notó ninguna mejora con respecto a la reproducibilidad de las áreas y alturas se decidió continuar con el mismo lavado solamente con la solución buffer entre cada análisis como se estuvo manejando desde el principio del método.

8. CURVA DE CALIBRACIÓN

Una vez establecido el modo electroforético con el cual se estarán realizando los análisis para la cuantificación del AS, las características físicas del capilar, la longitud de onda de detección y la composición del buffer, su concentración y pH, se realizaron dos curvas de calibración, la primera utilizando micropipetas y la segunda utilizando pipetas volumétricas (para la preparación de los sistemas), ambas por triplicado. Esto para determinar con cuales se obtiene menor error en cuanto a la repetibilidad de los resultados y que tanto afecta esto al ajuste del modelo de regresión lineal.

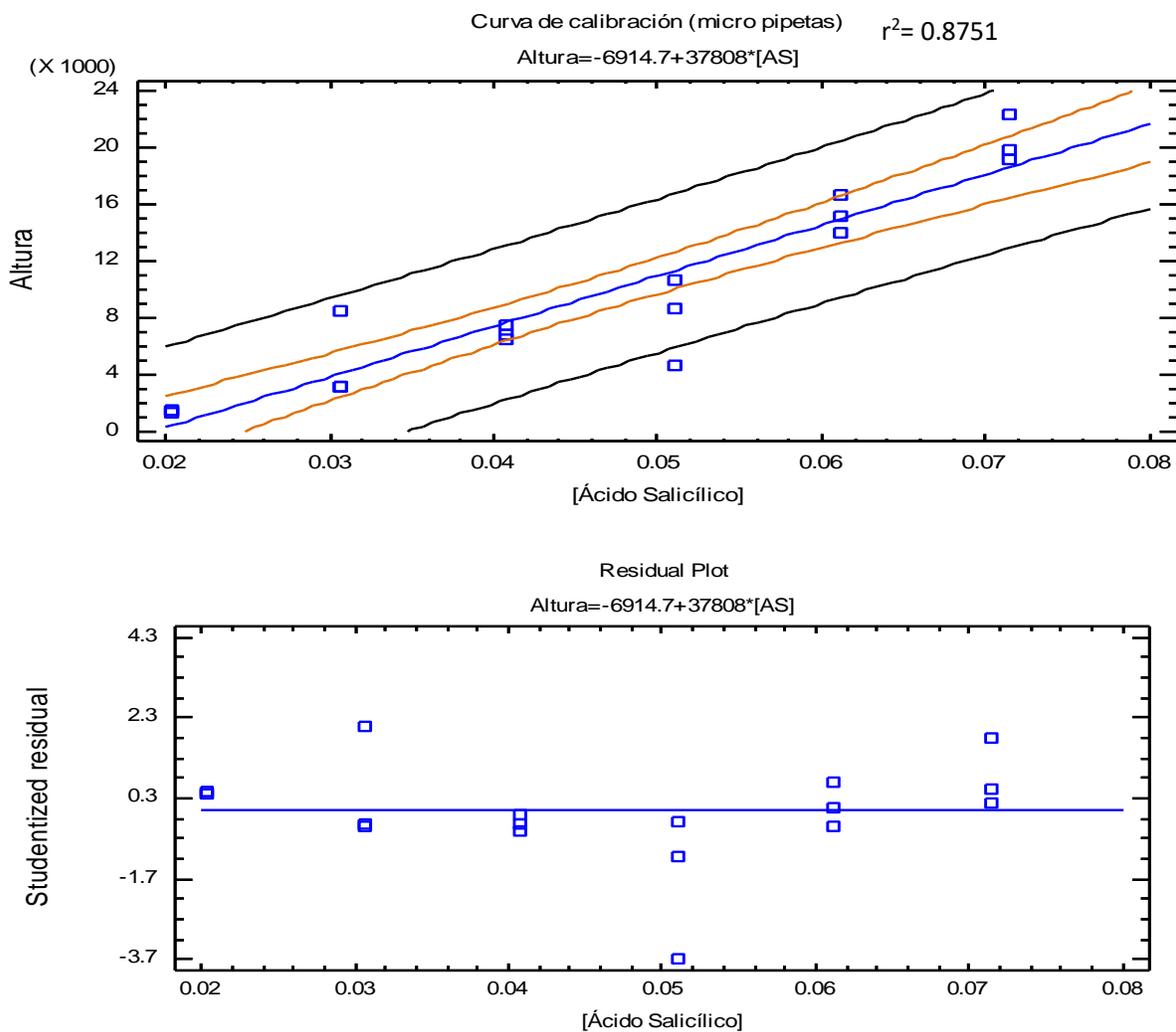


Figura 16. Resultados obtenidos para la curva de calibración realizada con micropipeta: A) Regresión lineal e intervalo de confianza y B) Residuales

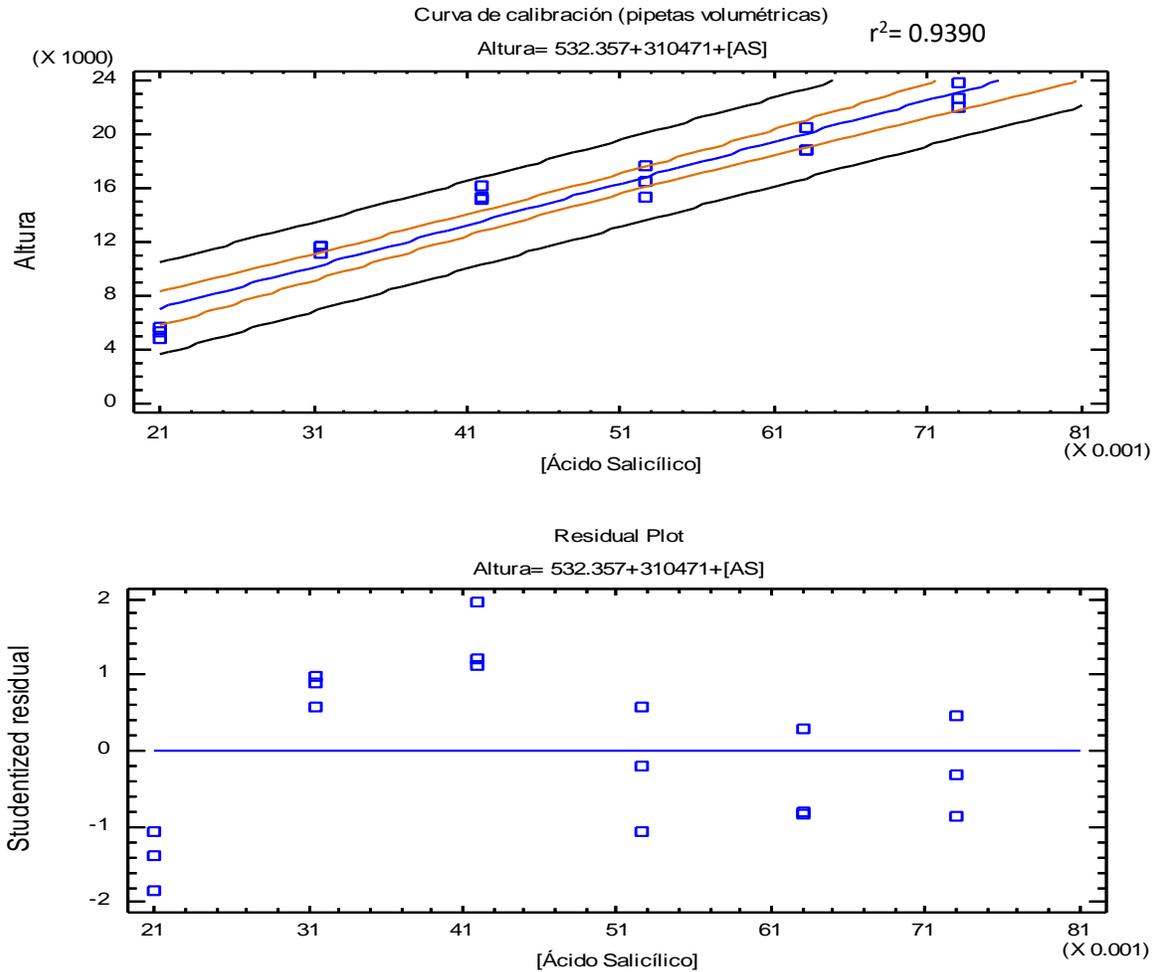


Figura 17. Resultados obtenidos para la curva de calibración realizada con pipetas volumétricas: A) Regresión lineal e intervalo de confianza y B) Residuales

Como se observa en las Figuras 16 y 17, el empleo de las pipetas volumétricas genera resultados más precisos en cuanto a las áreas obtenidas entre las réplicas y el mismo comportamiento se refleja en la gráfica de residuales, por lo que se decide el emplear pipetas volumétricas para la preparación de las soluciones para la curva de calibración.

9. SELECCIÓN DEL ESTÁNDAR INTERNO

Es bien sabido que los mayores problemas de la electroforesis capilar tienen que ver con las diferencias de densidad entre las soluciones estándar y las muestras, debido a su diferente composición, originando fluctuaciones en la cantidad introducida al capilar por la aplicación de una diferencia de presión, por tanto, se optó por llevar a cabo la cuantificación del AS mediante una curva de calibración con estándar interno (EI), ya que la adición del estándar interno tiene como finalidad minimizar los errores reflejado en las áreas y alturas de los picos, mejorando la precisión de los resultados obtenidos en el análisis.

La elección del estándar interno consiste en seleccionar un compuesto similar en su estructura química al del analito, que sea de alta pureza, que su señal no se vea traslapada con otra, que la forma del pico sea gaussiana (simétrica) y que no esté presente en la muestra a analizar. Se evaluaron 2 posibles compuestos como estándar interno: 1-Naftol y Acetaminofenol.

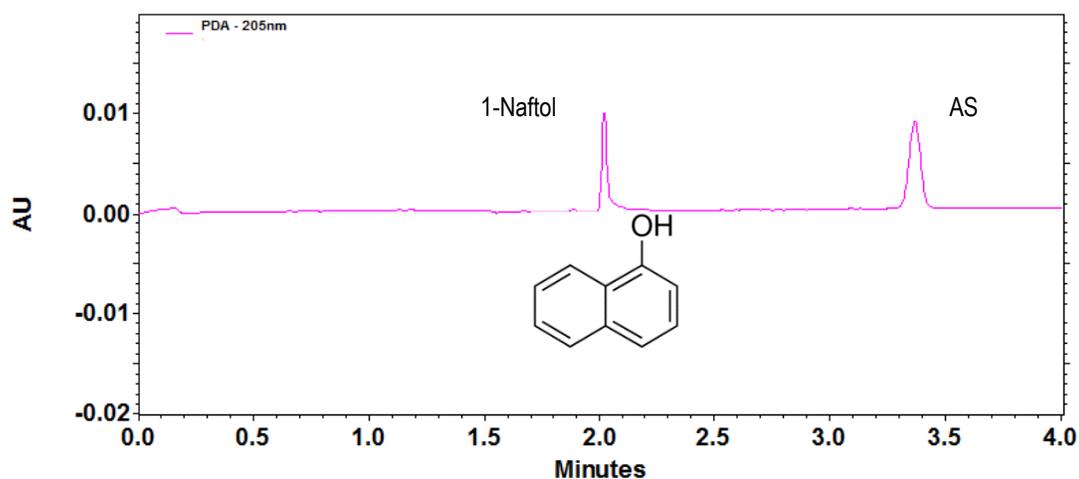


Figura 18. Electroferograma obtenido al analizar una mezcla de 1-Naftol (1.2639 mM) y ácido salicílico [0.04 mg/mL]

BGE: buffer de boratos, pH 9.20, 50 Mm, detección a 205 nm.

En los dos casos se observó que los picos correspondientes al 1-naftol (figura 16) y acetaminofenol (figura 17) presentan un tiempo de migración (t_m) mucho menor al del estándar de AS, lo que es favorable pues no aumenta el tiempo de análisis. Sin embargo, el pico correspondiente al Acetaminofenol es mucho más simétrico y eficiente en comparación al del 1-naftol, el cual además tiende a presentar coleo y dificulta la integración del pico, lo cual impactaría en la cuantificación.

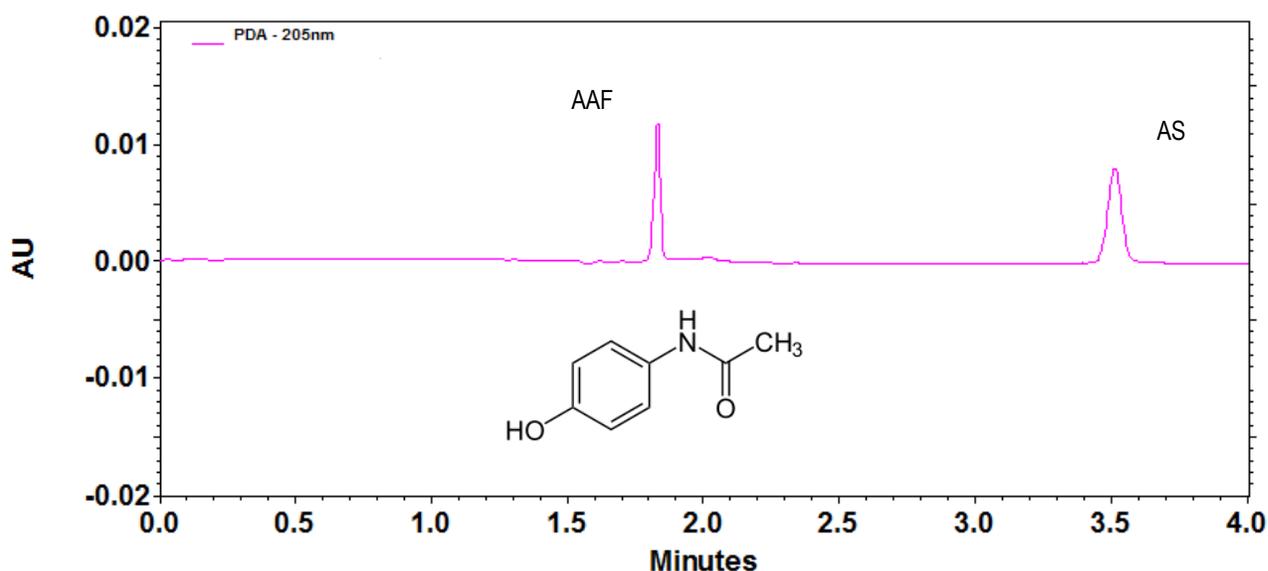


Figura 19. Electroferograma utilizando Acetaminofenol (3.5952 mM) como estándar interno, ácido salicílico [0.04 mg/mL], BGE: ácido bórico, pH 9.20.

En las tablas 10 y 11, se resumen los resultados para evaluar los coeficientes de variación en relación a tiempo de migración, área y altura de pico al realizar 6 corridas bajo las mismas condiciones. Como se observa, el coeficiente de variación obtenido para la altura de pico cuando se relacionan los resultados de acetaminofenol con ácido salicílico es cercano al 2 %, y aunado a la mejor simetría del pico, llevan a que se elija como estándar interno al acetaminofenol y la relación de altura de picos como la propiedad a emplear para la cuantificación, y así continuar con la validación del método

Tabla 10. Coeficientes de variación para tiempo de migración, área y altura del pico del AS [0.04 mg/mL] y 1-Naftol como estándar interno. BGE: buffer de boratos, pH 9.20, 50 mM.

# Corrida	Ácido salicílico			1-Naftol			Relación de Variables		
	Tiempo	Área	Altura	Tiempo	Área	Altura	Tiempo	Área	Altura
1	3.429	27920	7912	2.042	14307	9120	1.679	1.951	0.868
2	3.396	25802	7521	2.033	14444	8931	1.670	1.786	0.842
3	3.404	25875	7502	2.029	14225	8931	1.678	1.819	0.840
4	3.383	26608	7765	2.025	14588	9139	1.671	1.824	0.850
5	3.367	29661	8634	2.021	16341	9711	1.666	1.815	0.889
6	3.392	26462	7696	2.025	13542	8859	1.675	1.954	0.869
Promedio	3.395	27054.67	7838.33	2.029	14574.50	9115.17	1.673	1.858	0.860
S	0.021	1486.83	419.04	0.007	937.82	312.75	0.005	0.074	0.019
CV	0.614	5.496	5.346	0.369	6.435	3.431	0.300	4.000	2.210

Tabla 11. Coeficientes de variación para tiempo de migración, área y altura del pico del AS [0.04 mg/mL] y Acetaminofenol como estándar interno. BGE: buffer de boratos, pH 9.20, 50 mM.

# Corrida	Ácido salicílico			Acetaminofenol			Relación de Variables		
	Tiempo	Área	Altura	Tiempo	Área	Altura	Tiempo	Área	Altura
1	3.475	28525	7792	1.825	20231	11513	1.904	1.410	0.677
2	3.525	29071	7839	1.833	20550	11967	1.923	1.415	0.655
3	3.483	28406	7946	1.825	20491	12072	1.908	1.386	0.658
4	3.663	31032	7944	1.858	19137	11796	1.971	1.622	0.673
5	3.513	29969	8168	1.833	20053	11762	1.917	1.494	0.694
6	3.5	29716	8041	1.825	20551	11936	1.918	1.446	0.674
Promedio	3.527	29453.167	7955.000	1.833	20168.83	11841.00	1.924	1.462	0.672
S	0.069	993.175	136.376	0.013	543.524	197.034	0.024	0.087	0.014
CV	1.967	3.372	1.714	0.697	2.695	1.664	1.270	5.920	2.114

Ya que el AAF tiene un pKa de 9.5 se consideró modificar nuevamente el pH al igual que la concentración en el electrolito soporte para así evitar los dobletes de picos en la señal del EI y asegurar que dicho estándar al momento del análisis se encontrará ionizado y con una carga neta negativa.

Las condiciones electroforéticas óptimas finales del método son las siguientes:

Tabla 12. Condiciones electroforéticas óptimas del método.

Condiciones electroforéticas	Especificaciones
Capilar	Sílice fundida, longitud total 40 cm, longitud efectiva 29.50 cm, diámetro interno de 50 μ m.
Longitud de onda	205 nm
Temperatura	20 °C
Electrolito soporte	Boratos a partir de ác. bórico, 100 mM, pH 10.0
Introducción de la muestra	Hidrodinámica, 5 s, 0.5 psi
Voltaje de separación	25 kV
Pre-acondicionamiento	<p>⚡ Al inicio de la jornada de trabajo: Agua desionizada, 30 psi, 5 min NaOH 0.01 N, 30 psi, 5 min Agua desionizada, 30 psi, 3 min Electrolito soporte, 30 psi, 5.0 min</p> <p>⚡ Al final de la jornada de trabajo: Buffer de boratos 10 mM, 30 psi, 60 min</p>
Lavado	Electrolito soporte, 30 psi, 5.0 min

Una vez desarrollado el método analítico para cuantificar AS libre, este se evaluó con el propósito de asegurar que produce resultados válidos acuerdos a la finalidad prevista. La validación del método se realizó a través de un conjunto de pruebas estandarizadas que producen datos relativos a la exactitud, precisión, etc. tanto del sistema como del método.

10. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Resumen del resultado de los parámetros evaluados en la validación del método analítico.

Tabla 13. Validación del método analítico.

Parámetro	Especificaciones	Resultados
Adecuabilidad	$CV \leq 2 \%$	CV = 1.502 %
Precisión del sistema	$CV \leq 1.5 \%$	CV = 1.454 %
Linealidad del sistema	$r^2 \geq 0.98$ IC de m: no debe incluir el 0	$r^2 = 0.9966$ Lim Sup: 1.381 Lim Inf: 1.255
Exactitud y Repetibilidad del método	IC (μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético se incluya en el intervalo: 98-102% CV % recobro $\leq 2 \%$	IC (μ)= 99.217, 102.639 CV = 1.615 %
Precisión del método	$CV \leq 2 \%$	CV = 1.784 %
Linealidad del método	$r^2 \geq 0.98$ El IC (β_1) debe incluir la unidad El IC (β_0) debe incluir el cero El CV $_{y/x}$ % de recobro $\leq 2 \%$	$r^2 = 0.999699$ IC (β_1)= 0.997,1.030 IC (β_0)= -1.77E-04, 5.85E-04 CV = 0.8915 %
Robustez	$ d_i \leq 2\%$	$d_1 = 0.0093$ $d_2 = 0.0566$
Tolerancia	$CV \leq 2\%$	CV = 0.652 %

10.1 Evaluación del sistema

Precisión del sistema

La precisión es una medida de la cercanía de los resultados analíticos obtenidos a través de una serie de mediciones bajo las mismas condiciones del método. La precisión refleja los errores aleatorios que ocurren en un método y puede ser dividido en repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

Se evaluó la repetibilidad del sistema, analizando consecutivamente 6 soluciones de estándar de AS (0.02 mg/mL) preparadas por dilución. Se reportó el CV para la relación de t_m y de alturas (H_{AS} / H_{AAF}) para cada solución de estándar.

Como se observa en la Tabla 14, tanto en la relación de los tiempos de migración y sus respectivas alturas se obtiene un CV < 1.5 % y de acuerdo con los criterios de aceptación el sistema es preciso.

Tabla 14. Precisión CV para t_m , área y altura del AS/AAF.

Relación:	Tiempo de migración	Área	Altura	Ancho
	2.057	0.735	0.248	1.471
	2.093	0.773	0.250	1.733
	2.069	0.758	0.254	1.533
	2.080	0.716	0.258	1.471
	2.049	0.736	0.251	1.471
	2.083	0.785	0.255	1.667
Promedio	2.072	0.750	0.253	1.558
S	0.017	0.026	0.004	0.115
CV	0.807	3.469	1.454	7.381

Adecuabilidad del sistema

La adecuabilidad del sistema es una parte general del método analítico. La prueba se basa en verificar la funcionalidad global del sistema y que los resultados que dé sean confiables del método utilizado.

Se analizaron 5 soluciones de estándar de AS (0.02 mg/mL), reportando el CV para la relación de t_m y de alturas (H_{as} / H_{AAF}) para cada solución de estándar (Tabla 15). Como se observa en ambas relaciones se obtuvo un porcentaje en el CV $< 2\%$ por lo tanto cumple con el criterio de aceptación.

Tabla 15. Datos de CV para t_m , área y altura.

Relación:	T_m	Área	Altura	Ancho
	1.867	0.643	0.265	1.235
	1.867	0.668	0.270	1.471
	1.872	0.672	0.273	1.500
	1.880	0.642	0.272	1.200
	1.883	0.671	0.264	1.438
Promedio	1.874	0.659	0.269	1.369
S	0.007	0.015	0.004	0.140
CV	0.375	2.343	1.502	10.243

Linealidad del sistema

La linealidad da la relación directamente proporcional que hay entre la concentración de algún compuesto y la respuesta analítica que este tiene mediante el método aplicado. La evaluación de la señal del analito en función de su concentración es mediante cálculos estadísticos (regresión lineal). Se realizó una curva de calibración por estándar interno por triplicado, con un rango de concentración que va desde 0.003-0.06 mg/mL de AS y una concentración constante de 0.0898 mg/mL de AAF.

En la Tabla 16 se muestra los datos obtenidos en el análisis de la curva de calibración por estándar interno y en la Figura 21 se presenta la gráfica de la regresión lineal de dichos datos que se obtuvo con ayuda del software statgraphics centurion XVI, donde se observa que tiene una tendencia lineal.

Tabla 16. Datos de la curva de calibración por estándar interno para el estándar de ácido salicílico.

n	Sistema	[AS]	[AAF]	H _{AS}	H _{AAF}	[AS]/[AAF]	H _{AS} /H _{AAF}
1	1	0.003	0.090	476	18655	0.033	0.026
2	1	0.003	0.090	447	18205	0.033	0.025
3	1	0.003	0.090	459	18576	0.033	0.025
4	2	0.005	0.090	1017	18273	0.056	0.056
5	2	0.005	0.090	1060	18734	0.056	0.057
6	2	0.005	0.090	1055	18293	0.056	0.058
7	3	0.010	0.090	650	4827	0.112	0.135
8	3	0.010	0.090	539	4099	0.112	0.131
9	3	0.010	0.090	523	3894	0.112	0.134
10	4	0.020	0.090	1073	4033	0.224	0.266
11	4	0.020	0.090	1104	4019	0.224	0.275
12	4	0.020	0.090	1159	4125	0.224	0.281
13	5	0.030	0.090	1452	3728	0.336	0.389
14	5	0.030	0.090	1397	3670	0.336	0.381
15	5	0.030	0.090	1459	3777	0.336	0.386
16	6	0.040	0.090	2103	3758	0.448	0.560
17	6	0.040	0.090	2303	4162	0.448	0.553
18	6	0.040	0.090	2612	4564	0.448	0.572
19	7	0.050	0.090	2927	4058	0.559	0.721
21	7	0.050	0.090	2735	3695	0.559	0.740
22	7	0.050	0.090	3025	4063	0.559	0.745
23	8	0.060	0.090	4195	4722	0.671	0.888
24	8	0.060	0.090	3714	4350	0.671	0.854
25	8	0.060	0.090	3397	3918	0.671	0.867

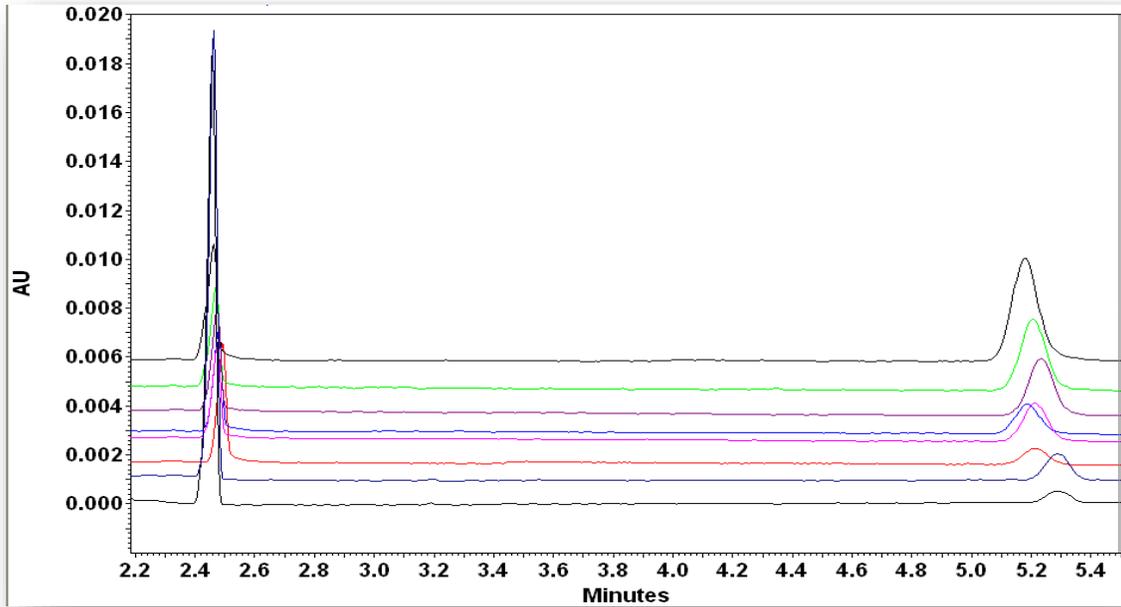


Figura 20. Electroferograma de los sistemas que conforman la curva de calibración del estándar de AS y el EI..

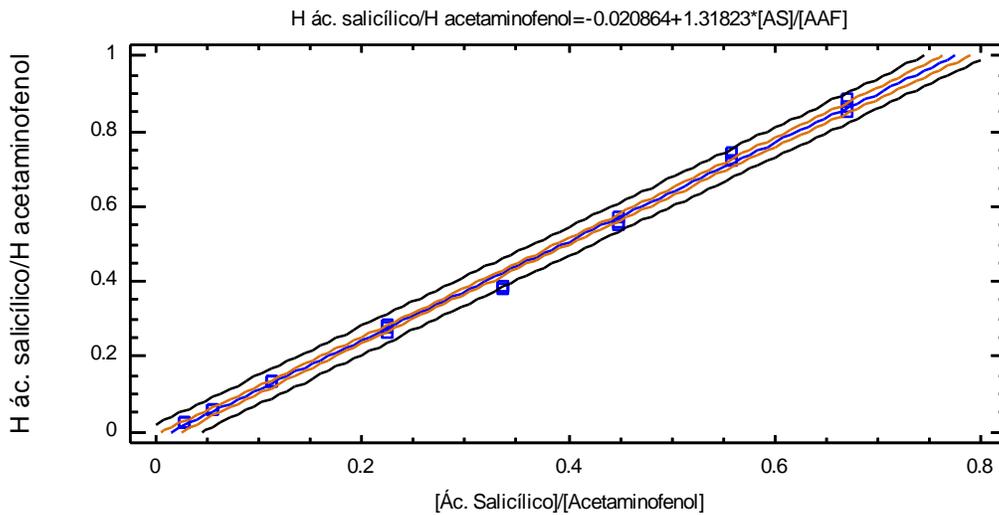


Figura 21. Regresión lineal con tres réplicas de la curva de calibración del estándar de AS.

En la Figura 22 se muestra la gráfica de residuales, donde se puede observar que los datos son homocedásticos lo que nos indica que sus varianzas pueden considerarse homogéneas y que no existen residuos atípicos, por lo tanto se ajustan al modelo lineal.

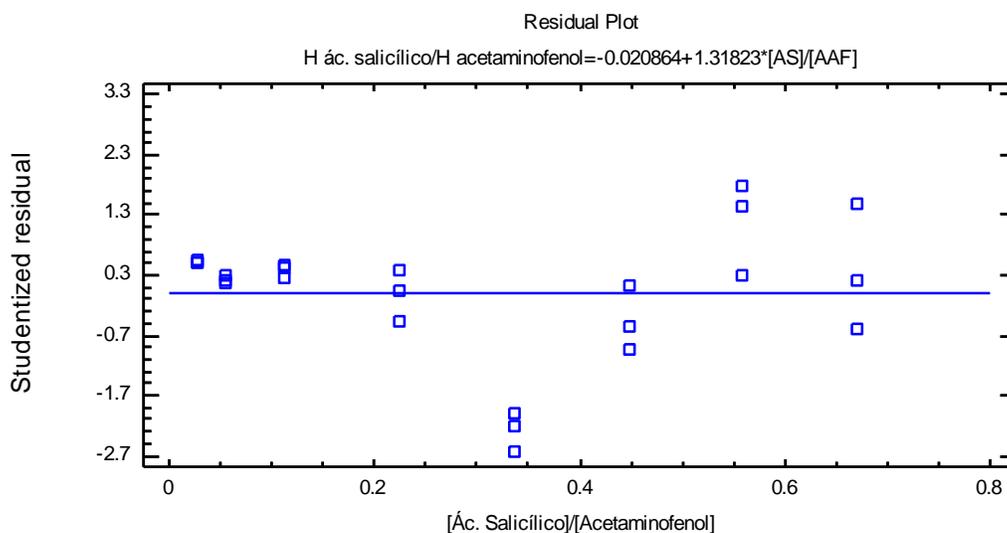


Figura 22. Gráfica de residuales para la curva de calibración por estándar interno de AS.

En la Tabla 16 se muestra los parámetros con su respectivo error y los coeficientes de la regresión lineal. El coeficiente de determinación es mayor al 98% establecido, por lo que los datos se ajustan al modelo lineal.

Tabla 17. Parámetros y coeficientes de la regresión lineal de la curva de calibración de AS.

Parámetro	Valor estimado	Parámetro	Valor estimado	Coficiente	Valor
Intercepto b_0	-0.020864	Sb_0	0.00620434	Correlación (r)	0.998299
Pendiente b_1	1.31823	Sb_1	0.0164144	Determinación (r^2)	0.9966

Por último se determinó el intervalo de confianza para la pendiente el cual resultó ser 1.255,1.381, este no incluye el cero, de esta forma se aceptó el intervalo y de nuevo se ve un ajuste al modelo lineal.

Tabla 18. Valores de los términos utilizados para el cálculo del intervalo de confianza para la pendiente.

Termino	Valor
Σx	7.300
Σy	9.124
Σx^2	3.430
Σy^2	5.575
Σxy	4.369
$S_{y/x}$	0.021
S_{b1}	0.030
T_{tablas}	2.074
IC	1.255,1.381

10.2 Evaluación del método

Exactitud y repetibilidad del método

La exactitud de un método analítico nos da como información la cercanía entre el resultado obtenido y el valor real. En este caso en particular la proximidad entre la cantidad de AS recuperada y la cantidad adicionada durante la preparación de la muestra.

Se analizó la muestra por sextuplicado adicionándole a cada una 1 mL de AS de la solución stock del mismo. Como se observa en la Tabla 19 el promedio del porcentaje de recobro del analito se incluye en el intervalo de confianza y el CV de recobro es menor al 2 % establecido, por lo tanto el método cumple con los criterios de aceptación.

Tabla 19. Valores de % de recobro para los parámetros estadísticos de exactitud y repetibilidad del método.

Muestra	Cantidad Recuperada (mg)	Cantidad Adicionada (mg)	% de Recobro
1	0.099	0.1	98.966
2	0.102	0.1	102.308
3	0.099	0.1	99.024
4	0.101	0.1	100.997
5	0.101	0.1	101.438
6	0.103	0.1	102.836

Tabla 20. Valores de los términos utilizados para el cálculo del intervalo de confianza del % de recobro.

Término	Valor
Σy	605.568
Σy^2	61132.089
n	6
Promedio	100.928
S	1.630
CV	1.615
$t_{0.975, 5}$	2.571
IC(μ)	99.217, 102.639

Linealidad del método

Como se mencionó, la linealidad de un método define su capacidad para obtener resultados proporcionales a la concentración del analito mediante el método aplicado. La evaluación de la señal del analito en función de su concentración es mediante cálculos estadísticos (regresión lineal). Este parámetro se evaluó preparando las muestras con 3 concentraciones crecientes de AS, las cuales se analizaron por triplicado. Se construyó la curva de calibración correspondiente al rango de concentraciones y se obtuvo su respectiva regresión.

En el Figura 23 se presenta la gráfica de la regresión lineal de la curva de calibración por estándar interno para el AS y se observa que tiene una tendencia lineal.

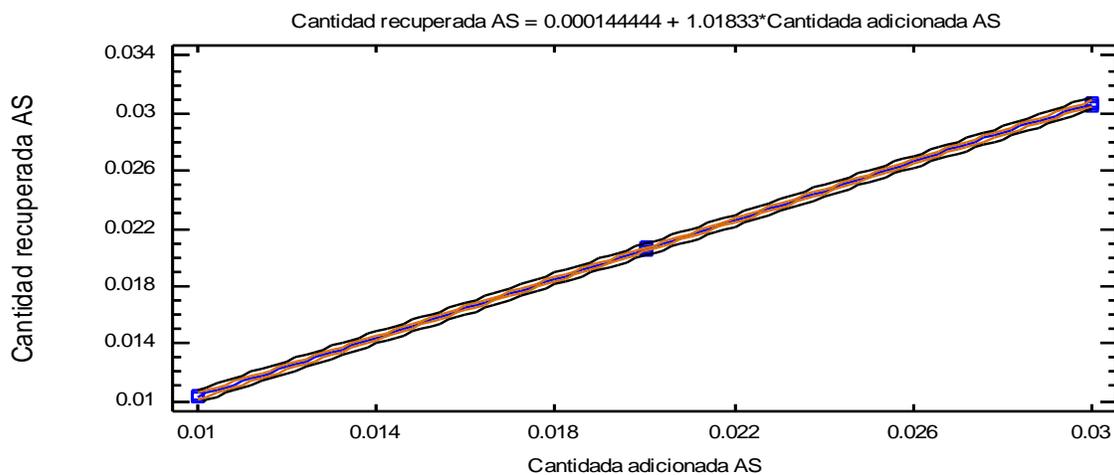


Figura 23. Regresión lineal con tres réplicas de la curva de calibración del estándar de AS.

En la Figura 24 se muestra la gráfica de residuales, donde se puede observar que los datos no muestran tendencia y estos son homocedásticos lo que nos indica que sus varianzas son homogéneas y que no existen residuos atípicos, por lo tanto se ajustan al modelo lineal.

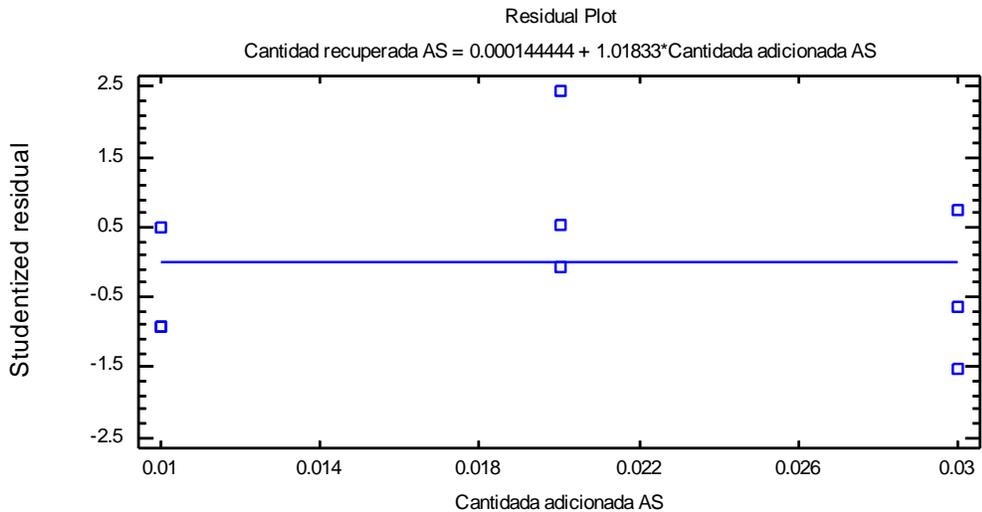


Figura 24. Gráfica de residuales para la curva de calibración por estándar interno de AS.

En la Tabla 21 se muestra los parámetros con su respectivo error y los coeficientes de la regresión lineal. El coeficiente de determinación es mayor al 98% establecido, por lo que los datos se ajustan al modelo lineal.

Tabla 21. Parámetros y coeficientes de la regresión lineal de la curva de calibración de AS.

Parámetro	Valor estimado	Error	Coficiente	Valor
Intercepto b_0	0.00014444	0.000144231	Correlación (r)	0.99985
Pendiente b_1	1.0833	0.00667658	Determinación (r^2)	99.9699

Se determinó el intervalo de confianza para la pendiente y la ordenada al origen el cual resultó ser 0.997, 1.03 y $-1.77E-04$, $5.85E-04$ respectivamente, de acuerdo a los criterios de aceptación el primer intervalo debe de incluir la unidad y el segundo debe de incluir el cero, por lo tanto los intervalos cumplen y de nuevo se ve un ajuste al modelo lineal.

Tabla 22. Valores de los términos utilizados para el cálculo del intervalo de confianza para la pendiente y la ordenada al origen.

Termino	Valor
Σx	0.180
Σy	0.185
Σx^2	0.004
Σy^2	0.004
Σxy	0.004
n	9
Intervalo de confianza para la pendiente	
$S_{y/x}$	1.83E-04
S_{b1}	7.46E-03
T_{tablas}	2.37
IC	0.997, 1.03
Intervalo de confianza para la ordenada al origen	
S_{bo}	1.61E-04
IC	-1.77E-04, 5.85E-04
Coefficiente de variación de regresión	
Promedio	0.0205
CV	0.8915

PORCENTAJE DE RECOBRO

Por último se calculó el porcentaje de recobro de las muestras y a partir de eso se determinó el intervalo de confianza y el promedio aritmético del porcentaje, este último entra en el IC como se indica en los criterios de aceptación.

Tabla 23. Valores de los términos utilizados para el cálculo del intervalo de confianza del % de recobro.

Cantidad adicionada (mg/mL)	Cantidad recuperada (mg/mL)	% Recobro
0.01	0.0102	101.9731
0.01	0.0104	104.2665
0.01	0.0102	102.2873
0.02	0.0205	102.4113
0.02	0.0208	104.2307
0.02	0.0206	103.0708
0.03	0.0306	101.8420
0.03	0.0305	101.5202
0.03	0.0308	102.5021
	Termino	Valor
	Σy	924.104
	Σy^2	94893.268
	n	9
	Promedio	102.67824
	S	0.99242749
	CV	0.9665412
	t	2.306
	IC	101.91, 103.44

Precisión del método

Se evaluó la precisión del método, analizando consecutivamente 3 soluciones de la muestra de SSB preparadas por pesadas independientes. Se reportó la media aritmética, la desviación estándar (S) y el CV del contenido para cada muestra.

Como se observa en la Tabla 31, el CV del contenido de AS en las muestras analizadas en diferentes días y por diferentes analistas obtuvo un valor menor al 2 % establecido cumpliendo el criterio de aceptación. Por lo tanto el método es preciso.

Tabla 24. Contenido de AS en las muestras en mg AS/g muestra para el parámetro estadístico de precisión del método.

		Analista	
		1	2
Día	1	3.279	3.365
		3.450	3.428
		3.357	3.358
	2	3.381	3.296
		3.310	3.461
		3.398	3.314

Tabla 25. Valores de los términos utilizados para el cálculo de CV del contenido de la muestra.

Término	Valor
Σy	40.397
Σy^2	136.029
n	12
Promedio	3.366
S	0.060
CV	1.784

Robustez

La prueba de robustez examina el efecto que tiene los parámetros operacionales en los resultados del análisis y que dicha variación deliberada no afecte los resultados y la confiabilidad del método. Para evaluar este parámetro estadístico se varió un factor interno del método que fue el valor de pH en el búfer, esto para observar la influencia de esta variable y si los resultados obtenidos en el análisis entran en un rango de tolerancia. Los valores de pH que se manejaron en el búfer fueron: 9.80, 10.0 y 10.20.

Como se observa en la Tablas 32 y 33, se muestra el porcentaje de AS en las muestras analizadas a cada condición de operación y el valor de la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición modificada con respecto a la normal. El valor de $|d_i|$ es menor al 2% en cada modificación, por lo tanto cumple con el criterio de aceptación.

Tabla 26. Contenido de AS en las muestras, en porcentaje, para el parámetro estadístico de robustez.

MUESTRA	pH 9.8	pH 10	pH 10.2
1	0.2891	0.2731	0.2195
2	0.2862	0.2750	0.2202
3	0.2808	0.2802	0.2186

Tabla 27. Valores de los términos utilizados para el cálculo de diferencia absoluta de la media aritmética.

Término	Valor
Σy_0	0.8282
Σy_1	0.8561
Σy_2	0.6583
n	3
y_0	0.2761
y_1	0.2854
y_2	0.2194
d_1	0.0093
d_2	0.0566

Tolerancia

La prueba de tolerancia nos muestra la reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos de las muestras analizadas bajo diferentes condiciones de operación enfocándose a factores externos del método.

Se seleccionó como factores externos el cambio de equipo de EC y el cambio de marca del reactivo analítico para la preparación del ác. bórico (buffer). Se analizó la muestra por triplicado a cada condición y se reportó el contenido en la muestra (Tabla 34). Como se observa el CV (Tabla 35) del contenido de la muestra no es mayor al 2 % ya establecido, por lo tanto cumple con el criterio de aceptación.

Tabla 28. Contenido de AS en las muestras en % para el parámetro estadístico de tolerancia.

		MUESTRA	[AS] mg/mL	mg AS	%AS
Factor Ajeno	Cambio de equipo	1	0.0142	0.285	0.274
		2	0.0143	0.287	0.276
		3	0.0144	0.288	0.277
	Marca de reactivo	1	0.0143	0.286	0.275
		2	0.0143	0.286	0.275
		3	0.0141	0.283	0.272

Tabla 29. Valores de los términos utilizados para el cálculo de CV del contenido de la muestra.

Término	Valor
Σy	1.714
Σy^2	0.48982438
n	6
Promedio	0.286
S	0.002
CV	0.652

11. APLICABILIDAD DEL MÉTODO DESARROLLADO

Se realizó la cuantificación de ácido salicílico en la muestra comercial de subsalicilato de bismuto materia prima, empleando ambas técnicas analíticas (EC y CLAR) cuantificando mediante el factor respuesta.

Como se observa en la Tabla 30, los resultados obtenidos, de un análisis por triplicado de la muestra, donde el tratamiento de estas solamente varía en el disolvente empleado, se observa que aquellas que se llevó su tratamiento utilizando como disolvente agua desionizada se obtiene mayor porcentaje de AS coincidiendo su cuantificación mediante ambas técnicas. Mientras que aquellas muestras donde el disolvente fue acetonitrilo (como está marcado en la Farmacopea) se obtiene un porcentaje de AS menor. Esta diferencia de porcentaje de AS en la materia prima de subsalicilato de bismuto nos indica que efectivamente el tratamiento de la muestra influye en la cuantificación, esta diferencia puede ser debida ya que al utilizar solamente agua desionizada favorezca la disolución del analito en la muestra o bien el agua desionizada propicie la hidrolisis del SSB.

Tabla 30. Resultados de la cuantificación de ácido salicílico libre en subsalicilato de bismuto por ECZ y CLAR.

Materia prima (mg)	Aforo de la muestra (mL)	Método de cuantificación	Ácido salicílico libre (%) Fórmula
260	50/ACN	CLAR	0.09 ± 0.0017
260	50/ACN	ECZ	0.12 ± 0.0021
104	20/Agua	CLAR	0.31 ± 0.0057
104	20/Agua	ECZ	0.31 ± 0.0017

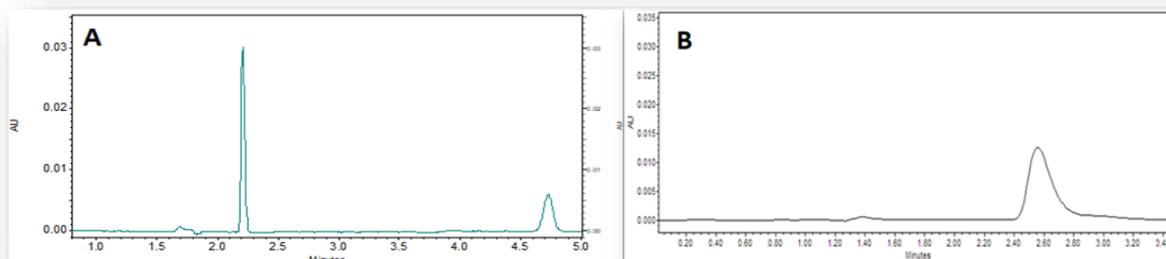


Figura 25. A) Electroferograma de la muestra donde se observa el pico del AS y el AAF. B) Cromatograma de la muestra que muestra el pico del AS.

12. CONCLUSIONES

Se logró desarrollar un método analítico para la cuantificación de ácido salicílico en materia prima de subsalicilato de bismuto, utilizando la técnica de electroforesis capilar mediante la detección por arreglo de diodos, se seleccionaron los parámetros electroforéticos en base a su tiempo de migración, línea base del electroferograma, área, altura y simetría del pico de respuesta.

Se seleccionó como estándar interno acetaminofenol para cuantificar, siendo que este compuesto cumple con las características de un estándar interno ya que no se encuentra en la muestra, es estable, se comportó como el analito durante el análisis y su señal de respuesta no interfirió con la del compuesto en estudio.

El tiempo de detección del AS fue de 3.5 min, con lavados entre inyecciones de 5 min con la solución búfer. La validación analítica del método fue satisfactoria ya que cumplió con los parámetros estadísticos planteados (precisión del sistema, adecuabilidad del sistema, linealidad del sistema, precisión del método, linealidad del método, robustez y tolerancia).

La cuantificación de la muestra comercial analizada de la sal de bismuto muestra que el tratamiento de esta influye en su determinación y por lo tanto es de vital importancia realizar más análisis con diferentes muestras y lotes y determinar cuál es la indicada para el estudio, ya que la determinación del AS en SSB es de vital importancia en la industria farmacéutica ya que se encuentra regulada por la FEUM.

Por último la Electroforesis Capilar resulta ser un método alternativo a la de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, que es la que viene reportada en la Farmacopea y es utilizada en los laboratorios de control de calidad.

13. REFERENCIAS

1. **Comisión Permanente de la FEUM.** *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.* [ed.] Secretaría de Salud. 11. 2014.
2. **Sierra Alonso, Isabel, et al.** *Análisis instrumental.* España : NETBIBLO, 2010. Vol. 1.
3. **Longo, Dann L. and Fauci, Anthony S.** *Harrison: Principios de Medicina Interna.* 18. China : MC GRALL HILL, 2021.
4. **Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.** *Guía de Validación de Métodos Analíticos.* [ed.] A.C. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México. 2002.
5. **Deyl, Zdenk.** *Capillary Electrochromatography.* Netherlands : ELSEVIER, 2001.
6. **Fernández G., Alberto and Segura C., Antonio.** *Electroforesis capilar. Aproximación según la técnica de detección.* España : GRANADA, 2005.
7. **H., Neubert, Rüttinger y Hans-Hermann.** *Affinity Capillary Electrophoresis in Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* USA : MACEL DEKKER, INC, 2003.
8. **Skoog, D.A.** *Fundamentos de Química Analítica.* 9. México : CENGAGE Learning, 2015.
9. **Castillo R., Miriam, et al.** *Fundamentos de electroforesis capilar.* México : UNAM, 2005.
10. **Currel, Graham.** *Analytical Instrumentation. Performance Characteristics and Quality.* Great Britain : WILEY, 2000.
11. **Baker and R.Dale.** *Capillary Electrophoresis.* USA : WYLE INTERSCIENCE, 1995.
12. **Kellner, R and Widmer, H. M.** *Analytical Chemistry.* 2. Republica Federal de Alemania : WILEY-VCH, 2004.
13. **Clavijo Díaz, Alfonso.** *Fundamentos de química analítica. Equilibrio iónico y análisis químico.* Colombia : UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA, 2002.
14. **Harris, Daniel C.** *Análisis químico cuantitativo.* 3. Barcelona : REVERTÉ, 2007.
15. **Lunn, George.** *Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis.* USA : WYLE-INTERSCIENCE, 2000.
16. **Watson, David G.** *Pharmaceutical ANALYSIS A textbook for Pharmacy Students an Pharmaceutical Chemists.* 2. USA : ELSEVIER CHURCHILL LIVINGSTONE, 2005.

17. **Rodriguez Palomares, C.** *Fichero farmacológico*. México : MC GRAW HILL, 2013.
18. **Gennaro, Alfonso R.** *Remington Farmacia*. 20. Argentina : PANAMERICANA, 2003.
19. **International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use.** ICH Harmonisation for better health. [Online] 2005. [Cited: Junio 15, 2016.]
http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf.
20. **Rodriguez, Guillermo Vega.** [Online] Febreo 16, 2011. [Cited: Junio 15, 2016.]
<http://www.cofepris.gob.mx/TyS/Documents/TercerosAutorizados/cvfq032011.pdf>.
21. **Center for Drugs Evaluation and Research (CDER).** [Online] Noviembre 1994. [Cited: Junio 16, 2016.] <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/UCM134409.pdf>.
22. **UNODC.** [Online] 2010. [Cited: Junio 19, 2016.]
https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf.
23. **Skoog, D.A.** *Principios de Análisis Instrumental*. 7. México : NUEVA EDITORIAL INTERAMERICANA, 2001.
24. **Sogorb S., Miguel A., Vilano23]va G., Eugenio.** *TÉCNICAS ANALÍTICAS DE CONTAMINANTES QUÍMICOS. Aplicaciones toxicológicas, medioambientales y alimentarias*. DIAZ DE SANTOS, 2015.
25. **High Performance Capillary Electrophoresis.** [Online] 2014. [Cited: Junio 20,2016]
http://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990_3777EN.pdf