

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE ROBUSTEZ PARA LA VALORACIÓN DE CLORHIDRATO DE
FENILEFRINA Y MALEATO DE CLORFENIRAMINA POR CROMATOGRFÍA
DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) USANDO DISEÑO DE
EXPERIMENTOS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

TORRES SERRANO MARCO ANTONIO



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.

JURADO ASIGNADO:

| | |
|-----------------|--|
| Presidente: | Prof. Isaura Luisa Carrera García |
| Vocal: | Prof. María Teresa Buentello Rodríguez |
| Secretario: | Prof. Juan Manuel Rodríguez |
| 1er. Suplente.: | Prof. María De Lourdes Cervantes Ayala |
| 2do. Suplente.: | Prof. Natividad García Escamilla |

Sitio donde se desarrolló el tema:

Lab. 113, Depto. de Biofarmacia.
Conjunto E, Facultad de Química.
U.N.A.M.

Asesor:

M. en C. Juan Manuel Rodríguez

Sustentante:

Marco Antonio Torres Serrano

A

LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MI ALMA MATER

FACULTAD DE QUÍMICA
MIS PRINCIPIOS

A MI PADRE †
POR SU ESFUERZO PARA ABRIRNOS CAMINO

A MI MADRE
POR SU PACIENCIA Y COMPRENSIÓN.
POR SU CUIDADO Y POR SU TEZON PARA ENFRENTAR LA VIDA

A MIS HERMANOS
POR SU APOYO

A ADRIANA
POR COMPLETAR MI VIDA

Al Profesor Juan Manuel Rodríguez
Por la oportunidad brindada para realizar este trabajo,
por su apoyo y enseñanzas

Al Profesor José Manuel Morales
Por su valiosa orientación

A todas mis amistades que de un modo u otro, me apoyaron para la culminación de este trabajo.

“Dirigir el espíritu de manera que forme juicios sólidos
y verdaderos de todo lo que se le presenta:
tal debe ser el fin de los estudios”.

“El método es necesario para la investigación de la verdad”

RENE DESCARTES.



CONTENIDO.

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | i |
| 2. ANTECEDENTES. CONCEPTOS BÁSICOS | 1 |
| 2.1. PARÁMETROS DE CALIDAD | 1 |
| 2.1.1. Linealidad | 1 |
| 2.1.2. Precisión | 2 |
| a) <u>Repetibilidad</u> | 2 |
| b) <u>Reproducibilidad</u> | 2 |
| c) <u>Precisión intermedia (tolerancia)</u> | 2 |
| d) <u>Precisión del equipo</u> | 3 |
| e) <u>Precisión del método</u> | 3 |
| 2.1.3. Exactitud | 3 |
| 2.1.4. Especificidad (recuperación) | 4 |
| 2.1.5. Selectividad | 5 |
| 2.1.6. Robustez | 5 |
| 2.1.7. Estabilidad | 5 |
| 2.1.8. Sensibilidad | 5 |
| 2.1.9. Límite de detección | 6 |
| 2.1.10. Límite de cuantificación | 7 |
| 2.2. PRUEBAS DE ADECUABILIDAD DEL SISTEMA | 7 |
| 2.2.1. Tiempo de retención | 8 |
| a) <u>Factor de capacidad (k')</u> | 8 |
| b) <u>Retención relativa (α)</u> | 8 |
| 2.2.2. Resolución (Res) | 9 |
| 2.2.3. Número de platos teóricos (N) | 10 |
| 2.2.4. Simetría (Sim) | 11 |
| a) <u>Difusión longitudinal</u> | 11 |
| b) <u>Difusión aparente</u> | 11 |
| c) <u>Factor de coleo (T)</u> | 12 |
| 2.3. ROBUSTEZ | 12 |
| 2.3.1. Definición | 12 |
| 2.3.2. Robustez del diseño | 13 |
| 2.3.3. Objetivos de la evaluación de la robustez | 13 |
| 2.3.4. Pasos de una prueba de robustez | 13 |
| a) <u>Identificación y selección de factores</u> | 14 |
| b) <u>Definición de niveles</u> | 15 |
| c) <u>Selección del diseño experimental</u> | 15 |
| d) <u>Definición del protocolo experimental</u> | 15 |
| e) <u>Definición de respuestas</u> | 16 |
| f) <u>Ejecución de experimentos</u> | 16 |
| g) <u>Cálculo de efectos</u> | 16 |
| h) <u>Análisis estadístico y gráfico de efectos</u> | 17 |
| i) <u>Conclusiones</u> | 17 |



| | |
|---|-----------|
| 2.4. DISEÑO DE EXPERIMENTOS | 17 |
| 2.4.1. Aplicaciones del diseño experimental | 19 |
| a) <u>Caracterización de procesos</u> | 19 |
| b) <u>Optimización de procesos</u> | 19 |
| c) <u>Diseño de procesos</u> | 19 |
| 2.4.2. Principios básicos del diseño experimental | 20 |
| 2.4.3. Algunos tipos de diseños | 20 |
| a) <u>Diseños factoriales simétricos</u> | 21 |
| b) <u>Diseños factoriales asimétricos</u> | 21 |
| c) <u>Diseños factoriales completos</u> | 21 |
| d) <u>Diseños de Plackett-Burman</u> | 22 |
| e) <u>Diseños cruzados de Taguchi (diseños factoriales fraccionados)</u> | 22 |
| 2.4.4. Cómo elegir el tipo de diseño | 23 |
| 2.5. DESARROLLO DEL MÉTODO | 23 |
| 2.5.1. Definición del problema | 23 |
| 2.5.2. Características del Funcionamiento de Instrumentos. Parámetros de calidad | 24 |
| 2.5.3. Desarrollo de métodos cromatográficos | 24 |
| a) <u>Modelaje</u> | 25 |
| b) <u>Optimización</u> | 25 |
| c) <u>Criterios elementales</u> | 25 |
| 2.6. PROPIEDADES DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS | 26 |
| 2.6.1. Clorhidrato de fenilefrina | 26 |
| 2.6.2. Maleato de clorfeniramina | 27 |
| 2.6.3. Mezcla de los principios activos | 28 |
| | |
| 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL | 30 |
| 3.1. REACTIVOS | 30 |
| 3.2. EQUIPO | 31 |
| 3.3. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS | 32 |
| 3.4. DESARROLLO EXPERIMENTAL | 32 |
| 3.4.1. Definición de factores | 32 |
| 3.4.2. Diseño experimental | 33 |
| 3.4.3. Registro y Análisis de Resultados | 34 |
| | |
| 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS | 35 |
| 4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS | 35 |
| 4.2. TIEMPOS DE RETENCIÓN (T_r) | 38 |
| 4.2.1. Efectos estimados sobre T_r | 38 |
| a) Diagramas de Pareto | 38 |
| b) Gráficos de efectos estimados | 38 |
| c) Análisis de varianza | 39 |
| 4.2.2. Comprobación de la idoneidad del modelo | 40 |
| a) Gráficos de probabilidad normal | 40 |



| | |
|--|----|
| b) Gráficos de residuos vs. valor ajustado | 41 |
| 4.2.3. Robustez | 42 |
| a) Ecuación del modelo | 42 |
| b) Predicción de resultados | 42 |
| c) Optimización de resultados | 43 |
| d) Superficies de respuesta | 44 |
| 4.3. RESOLUCIÓN (Res) | 45 |
| 4.3.1. Efectos estimados sobre Res | 45 |
| a) Diagramas de Pareto | 45 |
| b) Gráficos de efectos estimados | 45 |
| c) Análisis de varianza | 46 |
| 4.3.2. Comprobación de la idoneidad del modelo | 46 |
| a) Gráficos de probabilidad normal | 46 |
| b) Gráficos de residuos vs. valor ajustado | 47 |
| 4.3.3. Robustez | 47 |
| a) Ecuación del modelo | 47 |
| b) Predicción de resultados | 48 |
| c) Optimización de resultados | 48 |
| d) Superficies de respuesta | 49 |
| 4.4. PREDICCIÓN DE RESPUESTAS (Tiempo de retención 2 – Resolución) | 50 |
| | |
| 5. CONCLUSIONES | 54 |
| | |
| ANEXO 1 | 55 |
| | |
| A1.1. CROMATOGRAMAS TÍPICOS DE CADA CORRIDA | 55 |
| | |
| ANEXO 2 | 61 |
| | |
| A2.1. NÚMERO DE PLATOS TEÓRICOS (N) | 61 |
| A2.1.1. Efectos estimados sobre N | 61 |
| a) Diagramas de Pareto | 61 |
| b) Gráficos de efectos estimados | 61 |
| c) Análisis de varianza | 62 |
| A2.1.2. Comprobación de la idoneidad del modelo | 63 |
| a) Gráficos de probabilidad normal | 63 |
| b) Gráficos de residuos vs. valor ajustado | 63 |
| A2.1.3. Robustez | 64 |
| a) Ecuación del modelo | 64 |
| b) Predicción de resultados | 64 |
| c) Optimización de resultados | 65 |
| d) Superficies de respuesta | 66 |
| A2.2. SIMETRÍA (Sim) | 67 |
| A2.2.1. Efectos estimados sobre Sim | 67 |
| a) Diagramas de Pareto | 67 |
| b) Gráficos de efectos estimados | 67 |
| c) Análisis de varianza | 68 |



| | |
|--|----|
| A2.2.2. Comprobación de la idoneidad del modelo | 69 |
| a) Gráficos de probabilidad normal | 69 |
| b) Gráficos de residuos vs. valor ajustado | 69 |
| A2.2.3. Robustez | 70 |
| a) Ecuación del modelo | 70 |
| b) Predicción de resultados | 70 |
| c) Optimización de resultados | 71 |
| d) Superficies de respuesta | 72 |
| | |
| ANEXO 3 | 73 |
| | |
| A3.1. CONSTRUCCIÓN DE DIAGRAMAS DE CONTORNOS SOBREPUESTOS | 73 |
| | |
| BIBLIOGRAFÍA | 75 |
| | |
| TABLA DE CONTENIDO | 78 |



1. INTRODUCCIÓN.

Una parte esencial de las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) en la industria farmacéutica es la validación de los métodos analíticos.

“El proceso de validación es la evidencia documental de que el proceso operado dentro de parámetros establecidos, puede desempeñarse de manera efectiva y reproducible, llenando las especificaciones predeterminadas y atributos de calidad de la aplicación deseada.”^[1]

“La validación de un método analítico es el proceso para establecer, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método, expresadas en términos de parámetros analíticos, satisfacen los requerimientos para las aplicaciones analíticas propuestas.”^[2]

Los métodos cromatográficos juegan un papel muy importante en el campo farmacéutico y por lo tanto, necesitan ser validados cuando se desarrollan y se intenta que sean de uso rutinario. Los procedimientos y parámetros usados para la validación de un método cromatográfico están descritos en la USP 24^[3] y en las Guías ICH.^[1]

Los lineamientos tanto de la *Farmacopea de los Estados Unidos (USP)*, como de la *Conferencia Internacional sobre Armonización de Requerimientos Técnicos para el Registro de Fármacos para Uso Humano (ICH)* perfilan las pruebas requeridas para la validación de métodos con base en el tipo de material que se va a probar (producto terminado, ingrediente activo a granel o alguna sustancia de concentración baja). La *Administración Federal de Fármacos* de los Estados Unidos (**FDA**) acepta el régimen de la **USP** y además, demanda una indicación de estabilidad.^[3]

En México, la obligación de contar con métodos analíticos validados se establece en la Norma Oficial Mexicana **NOM-059-SSA1-1993**, “*Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos*”^[36] y los parámetros para la validación se establecen en la *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM, 8ª ed.)*^[42].

Aunque los lineamientos de las pruebas requeridas están bien documentados, hay poca orientación para establecer criterios de aceptación razonables en algunas pruebas específicas. Sin un conjunto de límites bien concebidos, pueden ocurrir dos resultados perjudiciales: si los límites son demasiado laxos, podrían dejar pasar un método subestándar; por el contrario, si son demasiado estrictos, podría rechazarse un buen método. La validación de procesos también puede verse afectada cuando un método analítico no es bien comprendido a causa de que la variabilidad observada en el proceso puede en realidad ser provocada por la variabilidad en el método analítico.^[27]

Durante el diseño de un nuevo producto o bien si se realizan cambios en su formulación, es necesario demostrar que la metodología utilizada para su análisis está validada; pero además, si el procedimiento analítico original sufre pequeñas alteraciones, se debe asegurar que su validez se mantiene, por lo que debe generarse el respaldo documental que demuestre esta condición.

Resulta evidente entonces la necesidad de establecer, como parte de la validación del procedimiento analítico, la metodología para realizar un estudio de robustez que demuestre que tal procedimiento no se ve afectado por pequeñas variaciones en los parámetros que lo definen; aclarando siempre que este estudio se lleva a cabo al final de la etapa de desarrollo.

El presente trabajo consiste en realizar un estudio de robustez, como parte de la validación del método, para la valoración por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución de una mezcla de Clorhidrato de Fenilefrina y Maleato de Clorfeniramina, usando un diseño de experimentos.

Como objetivos de este estudio, se evaluará la influencia de los factores más relevantes del sistema –la velocidad de flujo de la fase móvil, el pH de la misma, la longitud de la columna de separación y el tamaño de partícula de la fase estacionaria contenida en la columna; así como de las interacciones hasta un segundo nivel entre estos factores– sobre algunas de las respuestas características del método: el tiempo de retención (Tr 1 y Tr 2), la resolución (Res), el número de platos teóricos (N 1 y N 2) y la simetría (Sim 1 y Sim 2). Se hará la predicción simultánea de los valores de Res y Tr 2, por cada combinación de los niveles de flujo y pH establecidos, manteniendo constantes los niveles de longitud de la columna y tamaño de partícula.

Finalmente, se propondrán las condiciones cromatográficas que permitan obtener las respuestas de mayor calidad analítica.



2. ANTECEDENTES. CONCEPTOS BÁSICOS.

La validación de un método es el proceso por el cual el método es probado por quien lo desarrolla o quien lo usa, en su confiabilidad, exactitud y precisión respecto al propósito propuesto. La validación de los métodos no debe ser una situación de una sola vez para llenar los requerimientos de alguna Agencia, sino que los métodos deben ser diseñados y validados por quien los desarrolla y por el usuario para asegurar su robustez. Los métodos deben ser reproducibles cuando se usan por otros analistas, en otro equipo equivalente o en otros días o lugares y a lo largo de la vida del producto farmacéutico. Los datos generados para su aceptación, liberación, estabilidad o farmacocinética, sólo serán dignos de confianza si los métodos usados para generarlos son confiables. El proceso de validación y diseño del método deberá establecerse tempranamente en el ciclo de desarrollo antes de generar datos importantes. La validación deberá estar actualizada en forma de re-validación cuando el método cambie.^[50]

Los métodos cromatográficos se utilizan comúnmente para el análisis cuantitativo y cualitativo de materia prima, fármacos, productos farmacéuticos y compuestos presentes en fluidos biológicos. Los componentes monitoreados incluyen fármacos quirales o aquirales, impurezas de proceso, residuos de solventes, excipientes, productos de degradación, productos extraídos o lixiviados del contenedor y durante el proceso de manufactura o cierre, pesticidas en productos farmacéuticos de origen vegetal y metabolitos.^[50]

Aunque hay muchos tipos de técnicas HPLC disponibles, el método más comúnmente suscrito, HPLC de fase reversa con detección UV, se ha seleccionado para ilustrar un estudio de robustez. Los criterios para determinar la robustez de esta técnica pueden ser extrapolados a otras técnicas cromatográficas y métodos de detección. Para pruebas de aprobación, liberación o estabilidad, deberán realizarse pruebas adicionales para demostrar la validez del método.

2.1. PARÁMETROS DE CALIDAD.

2.1.1. Linealidad.

“La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad (dentro de un intervalo dado) para obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en la muestra.”^[1]

Para establecer la linealidad, debe realizarse un mínimo de cinco preparaciones de solución estándar con concentraciones a intervalos iguales a lo largo del intervalo de interés. Cada solución debe analizarse (usando inyecciones duplicadas) contra un estándar común recién preparado. Luego debe repetirse el procedimiento completo usando un conjunto de soluciones nuevamente preparado y un estándar, para un total mínimo de veinte determinaciones para la prueba completa. Veinte lecturas proporcionarán estimaciones de variabilidad dentro del 30% de la desviación estándar (*s*) real. Cada incidencia de probar un conjunto dado de soluciones contra un estándar dado se conoce como corrida. Por ejemplo, si el intervalo es de 80 – 120 % de la potencia etiquetada (LS), se prepararían un estándar y cinco soluciones de muestra, con las concentraciones de solución a la misma distancia a lo largo del rango: 80, 90, 100, 110 y 120 % LS. Las soluciones se analizarían por duplicado, para un total de diez puntos de datos. Luego se llevaría a cabo una corrida separada, usando un conjunto de estándar y soluciones recién preparados, para un total de 20 puntos.^[27]

La desviación estándar relativa (DER o RSD) para los valores de las respuestas debe estar en el rango de 0 – 5 % para considerarse adecuada para verificar la linealidad de la regresión. *El coeficiente de correlación (*r*) debe ser cercano a la unidad.*^[11]

En algunos casos, para obtener la linealidad entre la respuesta de un analito y su concentración, los datos experimentales deben someterse a una transformación matemática. Los datos de la línea de regresión en sí mismos pueden ser útiles para proveer estimados matemáticos del grado de linealidad. Se deben reportar el coeficiente de correlación (*r*), la ordenada al origen (*y*), la pendiente de la línea de regresión (*m*) y la suma de cuadrados residual.^[32]



2.1.2. Precisión.

“La precisión de un procedimiento analítico expresa la cercanía de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea, bajo las condiciones establecidas.”^[1]

La precisión mide el error aleatorio o indeterminado, de un análisis. Los parámetros de calidad de la precisión son la desviación estándar absoluta, la desviación estándar relativa, la desviación estándar relativa de la media, el coeficiente de variación y la varianza. Estos términos se definen en la **Tabla 1**.^[28]

| TÉRMINOS | DEFINICIÓN |
|--|--|
| Desviación Estándar Absoluta, s | $s = [\sum (x_i - \xi)^2 / n - 1]^{1/2}$ |
| Desviación Estándar relativa (RSL) | $RSD = s / \xi$ |
| Desviación Estándar de la Media, s_m | $s_m = s / (n)^{1/2}$ |
| Coficiente de Variación, CV | $CV = (s/\xi) \times 100\%$ |
| Varianza, s^2 | S^2 |

Tabla 1. Parámetros de calidad para la precisión de los métodos analíticos.^[28]
 x_i : valor numérico de la i ésima medida
 ξ : media de n medidas

La precisión deberá ser determinada usando muestras homogéneas auténticas. Sin embargo, si no es posible obtener muestras homogéneas, puede determinarse usando muestras preparadas artificialmente o una solución de muestra.^[1]

La precisión puede considerarse en tres niveles: *repetibilidad*, *reproducibilidad* y *precisión intermedia*, pero también debe tomarse en cuenta la *precisión del equipo* y la *precisión del método*:

a) Repetibilidad.

“La repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación durante un intervalo corto de tiempo. La repetibilidad también se conoce como precisión intra-ensayo”.^[1]

La repetibilidad de un método analítico se refiere entonces al uso del procedimiento dentro de un laboratorio en un periodo corto de tiempo, empleado por el mismo analista con el mismo equipo. Los documentos ICH recomiendan que la repetibilidad debe asegurarse usando un mínimo de nueve determinaciones cubriendo un rango específico (i.e., tres concentraciones y tres réplicas para cada concentración) o un mínimo de seis determinaciones del 100% de la concentración de prueba.^[11]

b) Reproducibilidad.

“La reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios” (por ejemplo, durante estudios de colaboración.)^[1]

La reproducibilidad deberá considerarse en caso de la estandarización de un procedimiento analítico, por ejemplo, para la inclusión de procedimientos en farmacopeas. Estos datos no son parte del expediente de autorización de fabricación.^[29]

c) Precisión intermedia (Tolerancia).

“La precisión intermedia indica variaciones dentro del laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferente equipo.”^[1]

Usando un análisis de diseño anidado, dos analistas podrían preparar y probar (por duplicado) una solución estándar y dos preparaciones de muestra de la misma fuente de muestras homogéneas. Este proceso se repetiría entonces con los mismos analistas pero con nuevos estándares y preparaciones de muestra (esto puede llevarse a cabo en un día separado). El único criterio de aceptación para la prueba de tolerancia es que la desviación estándar global no iguale o exceda el error permisible de adecuación del sistema. La desviación estándar global puede calcularse usando el siguiente método: los datos (32 puntos) se analizan empleando un análisis de varianza cruzado (ANOVA) y un análisis de componentes de varianza (VCA).

El ANOVA determina si un factor es significativo cuando se le compara con el error de prueba. Sin embargo, el propio término de error no siempre es obvio. En muchos casos el error inyección a inyección es



tan pequeño que todo aquello con lo que se le compare mostrará significación. Si el error en la preparación de la muestra es significativo cuando se le compara con el error en la inyección, entonces todos los términos por encima del término de preparación de la muestra deben probarse contra el error en dicha preparación. Esto asegura que cada término se pruebe contra un error que permita cierta evaluación razonable del significado de ese término. El ANOVA solamente puede revelar un significado relativo a otro error.^[27]

Para la mayoría de los propósitos, la repetibilidad es el criterio de importancia en procedimientos analíticos USP, aunque la reproducibilidad entre laboratorios o la precisión intermedia pueden considerarse durante la estandarización de un procedimiento.^[32]

d) Precisión del equipo.

Siguiendo el método recomendado para establecer la linealidad, puede estimarse la precisión del equipo calculando el valor de s de las diferencias entre las inyecciones duplicadas. *La precisión del equipo no debe exceder el 90 % de s .* Por ejemplo, a 2 % RSD, la estimación de la desviación estándar de la precisión del equipo no debe exceder el 0.9 s o 1.8 %.^[27] (Cabe recordar que un equipo se vuelve más preciso cuando su medida, la precisión, disminuye).^[81]

e) Precisión del método.

Siguiendo el método recomendado para establecer la linealidad, deben promediarse las inyecciones duplicadas y las diferencias entre los promedios de corrida deben calcularse para cada concentración. La desviación estándar de la precisión del método puede calcularse sobre estas diferencias. *La precisión del método tampoco debe exceder el 90% de s .*^[27]

Los documentos ICH recomiendan evaluar la *repetibilidad* usando un mínimo de nueve determinaciones cubriendo el rango específico del procedimiento (i.e., tres concentraciones y tres réplicas de cada concentración o usar un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración experimental).^[11]

2.1.3. Exactitud.

“La exactitud de un procedimiento analítico expresa la cercanía de concordancia entre el valor aceptado ya sea como valor convencional verdadero o un valor de referencia aceptado y el valor encontrado”.^[1]

La exactitud es entonces la cercanía de los resultados de prueba obtenidos por el método con el valor verdadero. La exactitud también se calcula como el porcentaje de recuperación en la cuantificación de cantidades conocidas de analito adicionadas a la muestra.^[32]

La exactitud mide el error sistemático o determinado, de un método analítico. La exactitud se define por la **Ecuación 1**:

$$\text{Exactitud} = \mu - x_i \quad (1)$$

Donde μ es la media de la población para la concentración de un analito de una muestra cuya concentración verdadera es x_i . Para determinar la exactitud hay que analizar uno o varios materiales de referencia cuyas concentraciones de analito se conozcan. Sin embargo, los resultados de dichos análisis tendrán tantos errores aleatorios como errores sistemáticos, a menos que se realicen suficientes análisis para que el error aleatorio se reduzca a un valor próximo a cero. La media de 20 ó 30 análisis repetidos puede suponerse, normalmente, que está libre de errores aleatorios y en consecuencia, ser una buena estimación de la media de la población μ en la **Ecuación 1**. Cualquier diferencia entre esta media y la concentración conocida de analito del material de referencia puede atribuirse a un error.

En general, al desarrollar un método analítico, todos los esfuerzos se dirigen hacia la identificación de la fuente de error y a su eliminación o corrección mediante el uso de blancos y la calibración del instrumento.^[28]

Los documentos ICH recomiendan asegurar la exactitud usando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración, cubriendo un rango específico (i.e., tres concentraciones y tres réplicas de cada concentración.)^[11]

En el caso de la valoración de un fármaco, la exactitud puede determinarse por la aplicación del método analítico a un analito de pureza conocida (Sustancia de Referencia) o por comparación de los



resultados del método con los de un segundo método bien caracterizado, para el cual la exactitud ha sido definida.^[32]

En caso de la valoración de un fármaco en un producto farmacéutico, la exactitud puede determinarse por la aplicación del método analítico a mezclas sintéticas de los componentes del producto farmacéutico, a las cuales se han agregado cantidades conocidas de analito dentro del rango del método. Si no es posible obtener muestras de todos los componentes del producto, puede ser aceptable adicionar cantidades conocidas de analito al producto farmacéutico o comparar los resultados con los de un segundo método bien caracterizado, para el cual la exactitud ha sido definida.^[32]

Para un producto farmacéutico, esto se realiza frecuentemente por la adición de cantidades conocidas del fármaco en peso o volumen (disuelto en diluyente) a la formulación placebo, trabajando en el rango lineal de detección del analito.^[50]

La RSD de las réplicas provee de un análisis de variación o qué tan preciso es el método. La media de las réplicas, expresada como % del título etiquetado, indica que tan exacto es el método.^[50]

La exactitud se calcula como el *porcentaje de recuperación por la valoración de cantidades adicionadas conocidas de analito en la muestra o como la diferencia entre la media y el valor verdadero aceptado, junto con intervalos de confianza.*^[32]

2.1.4. Especificidad (Recuperación).

Los documentos de ICH definen a la especificidad como “... *la capacidad de evaluar inequívocamente al analito en presencia de componentes que puedan estar presentes, tales como impurezas, productos de degradación, componentes de la matriz, etc.*”^[1]

La falta de especificidad de un procedimiento analítico puede compensarse por otros procedimientos analíticos de soporte.^[1] Otras autoridades internacionales renombradas han preferido el término **selectividad**, reservando especificidad para aquellos procedimientos que son *completamente selectivos.*^[11]

De acuerdo con *Persson*^[33], “un error serio y común es el referirse a un método como específico cuando sólo es selectivo. Esto es especialmente cierto cuando se trata de métodos cromatográficos que no son métodos de análisis absolutos, sino relativos”.

La demostración de especificidad requiere la capacidad del método para mostrar que en el procedimiento no interfiere la presencia de impurezas o excipientes que puedan estar en la matriz de la muestra. En la práctica, esto puede hacerse al colocar el fármaco o producto con niveles apropiados de impurezas/excipientes y demostrar que el ensayo resulta inafectado por la presencia de esas interferencias potenciales.^[11] La definición anterior implica:

- *Identificación*: para asegurar la identidad de un analito.
- *Pureza*: para asegurar que todos los procedimientos analíticos realizados permiten un reporte exacto del contenido de impurezas de un analito, esto es, sustancias relacionadas, metales pesados, contenido de residuos de solvente, etc.
- *Valoración* (contenido o potencia): para proveer un resultado exacto que permita un reporte sobre el contenido o potencia del analito en una muestra.^[32]

Si los estándares de las impurezas o de los productos de degradación no están disponibles, la especificidad puede demostrarse al comparar los resultados de prueba de las muestras conteniendo impurezas o productos de degradación con un segundo método bien caracterizado. Estas comparaciones deben incluir muestras almacenadas bajo condiciones de estrés relevantes (luz, calor, humedad, hidrólisis ácido-base oxidación, etc.). En el caso de la valoración, los resultados deben compararse.^[32]

El procedimiento para la especificidad es igual que el esbozado para la linealidad, excepto que la determinación ahora es realizada con el producto matriz. Los placebos se preparan con los constituyentes determinados en concentraciones correspondientes a las de la prueba de linealidad. Debe elaborarse un mínimo de cinco preparaciones de muestra, con concentraciones ubicadas a la misma distancia a lo largo del intervalo de interés. Cada preparación de muestra debe analizarse (usando inyecciones duplicadas) contra un estándar común recién preparado. El procedimiento debe entonces repetirse usando un conjunto de estándares y preparaciones de muestra nuevamente preparados, para un mínimo total de 20 determinaciones. *Todos los análisis y criterios de aceptación son iguales a los de linealidad.*^[27]



2.1.5. Selectividad.

“La selectividad de un método analítico denota el grado de ausencia de interferencias debidas a otras especies contenidas en la matriz de la muestra”.

Desafortunadamente, ningún método analítico está totalmente inafectado por otras especies y con frecuencia, se deben realizar diversos pasos para minimizar los efectos de estas interferencias.^[28] Los documentos ICH establecen que cuando se use un procedimiento cromatográfico, se deben presentar cromatogramas representativos para demostrar el grado de selectividad y los picos deberán estar apropiadamente etiquetados.^[32]

2.1.6. Robustez.

“La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad de permanecer inafectado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante el uso normal”^[11]

Diferentes tipos de diseños de experimentos se utilizan para los estudios de robustez y la Guía ICH recomienda su evaluación durante la fase de desarrollo del método y no al final, como ocurre en muchos estudios.^[11]

La evaluación de la robustez deberá entonces considerarse durante la fase del desarrollo y dependerá del tipo de procedimiento en estudio. Deberá mostrar la confianza de un análisis con respecto a variaciones deliberadas en los parámetros del método. Si las mediciones son susceptibles a las variaciones en las condiciones analíticas, tales condiciones deberán ser controladas apropiadamente o deberá incluirse en el procedimiento una advertencia precautoria. Una consecuencia de la evaluación de la robustez deberá ser que se establezca una serie de parámetros de sistema que aseguren que la validez del procedimiento analítico se mantenga cuando quiera que se use.^[29]

A diferencia de la prueba de precisión intermedia, que incluye factores externos al procedimiento (por ejemplo preparaciones estándar y de muestra, error de inyección, analistas o laboratorios), la robustez comprende los factores internos de un procedimiento (por ejemplo, esquemas de dilución, vida de la columna o concentraciones del solvente). Debido a su similitud, para estudios de robustez puede usarse el mismo modelo que el empleado para la prueba de precisión intermedia, simplemente sustituyendo factores internos por aquellos que son externos al método.^[27]

2.1.7. Estabilidad.

La estabilidad de las soluciones se demuestra al analizar la concentración prueba al 100 % y la misma cargada de placebo, recién preparadas y después de seis días de refrigeración. Las soluciones no deben tener ninguna descomposición.^[11]

2.1.8. Sensibilidad.

La definición cuantitativa más sencilla de sensibilidad, es la que acepta la *International Union of Pure and Applied Chemist (IUPAC)*, como la *sensibilidad de calibración*, y que se define como: **“... la pendiente de la curva de calibración a la concentración de interés.”**^[28]

La mayoría de los químicos están de acuerdo en que la sensibilidad de un instrumento o de un método mide su capacidad de discriminar entre pequeñas diferencias en la concentración del analito. Dos factores limitan la sensibilidad: la pendiente de la curva de calibración y la reproducibilidad o precisión del sistema de medida. Para dos métodos que tengan igual precisión, el que tenga mayor pendiente de la curva de calibración será el más sensible. Un corolario a esta afirmación es que si dos métodos tienen curvas de calibración con igual pendiente, el más sensible será el que presente la mejor precisión.

La mayoría de las curvas de calibración que se usan en química analítica son lineales y pueden describirse por la **Ecuación 2**:

$$S = mc + S_{bl} \quad (2)$$

En la que S es la señal medida, c es la concentración del analito, S_{bl} es la señal instrumental para un blanco y m es la pendiente de la línea recta. En dichas curvas de calibración, la sensibilidad de calibración es independiente de la concentración c y simplemente igual a m . La sensibilidad de calibración como parámetro



de calidad tiene el inconveniente de no tener en cuenta uno de los dos factores que determinan la sensibilidad, esto es, la precisión.

Mandel y Stiehler^[80] reconocen la necesidad de incluir la precisión en una exposición matemática coherente y proponen para la **sensibilidad analítica** γ la siguiente definición (**Ecuación 3**):

$$\gamma = m / s_S \quad (3)$$

Aquí, m es de nuevo la pendiente de la curva de calibración y s_S es la desviación estándar de las señales.

La sensibilidad analítica posee la ventaja de ser relativamente insensible a los factores de amplificación. Por ejemplo, al aumentar la ganancia del instrumento por un factor de cinco, el valor de m se incrementará en cinco veces. Sin embargo, este aumento vendrá acompañado, en general, por el correspondiente aumento en s_S y por tanto la sensibilidad analítica se mantendrá prácticamente constante. La segunda ventaja de la sensibilidad analítica radica en su independencia de las unidades en que se mide S . Una desventaja de la sensibilidad analítica es que a menudo depende de la concentración ya que s_S con frecuencia varía con ella.^[28]

2.1.9. Límite de detección.

“El límite de detección de un procedimiento analítico individual es la más pequeña cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto.”^[1]

La definición cualitativa más aceptada del límite de detección viene dada por la concentración o el peso mínimos de analito que pueden detectarse para un nivel de confianza dado.

Este límite depende de la relación entre la magnitud de la señal analítica y el valor de las fluctuaciones estadísticas de la señal del blanco. Esto es, a menos que la señal analítica sea mayor que la del blanco en un múltiplo k de las variaciones del blanco debidas a errores aleatorios, no será posible detectar con certeza la señal analítica. Así, cuando nos aproximamos al límite de detección, la señal analítica se aproxima a la señal media del blanco S_{bl} . La mínima señal analítica distinguible S_m se toma por tanto como la suma de la señal media del blanco S_{bl} más un múltiplo k de la desviación estándar del mismo. Lo anterior se ilustra por la **Ecuación 4**:

$$S_m = S_{bl} + k s_{bl} \quad (4)$$

Experimentalmente, puede determinarse realizando 20 ó 30 medidas del blanco, preferiblemente a lo largo de un periodo de tiempo extenso. A continuación, los datos se tratan estadísticamente para obtener S_{bl} y s_{bl} . Al final, se sustituye S_m de la **Ecuación 4** en la **Ecuación 2** y la expresión resultante se reordena para dar la **Ecuación 5**, en la que c_m es por definición el límite de detección:

$$c_m = (S_m - S_{bl}) / m \quad (5)$$

Para determinar el valor de k en la **Ecuación 4** se han usado numerosas alternativas, basadas correcta o incorrectamente en los estadísticos t y z . Kaiser^[20] arguye que *un valor razonable para la constante es $k = 3$* . Considera que es incorrecto suponer una distribución estrictamente normal de los resultados a partir de las medidas del blanco y que cuando $k = 3$, el nivel de confianza de la detección es como mínimo del 89% en todos los casos. Así mismo argumenta que se gana muy poco si se usa un valor mayor de k y por tanto un mayor nivel de confianza.^[28]

Los límites de detección son estimados de concentraciones a las cuales podemos estar completamente seguros que el compuesto está presente. Las concentraciones por debajo de ese límite son poco seguras de detectar en el análisis. Usando estadística, la certidumbre de detección puede ser cuantificada como de 99%. Sin embargo, No Detectado (ND) indica que el analito puede estar presente debajo del límite de detección (LD). Algunos laboratorios reportan LD's sin medirlos realmente, los LD's se determinan usualmente sobre muestras “limpias”. En realidad, cada muestra debe tener su propio LD, que está determinado por la matriz de la muestra.^[30]

Un límite de detección del instrumento (LDI) es el límite más pequeño que el instrumento puede detectar. Se determina sobre muestras sobre las cuales no se ha realizado ningún paso de preparación de muestra. Un límite de detección del método (LDM) es similar al LDI, pero se basa en muestras que han



seguido el esquema completo de preparación de muestras previo al análisis. Un límite de cuantificación práctica (LCP) es normalmente 3-10 veces el LDM y es considerada la menor concentración que puede medirse con exactitud, lo cual no es lo mismo que sólo detectarla. Los límites de detección se determinan actualmente por el análisis de réplicas de muestras de bajo nivel o blancos. Esta información nos da la variación en la respuesta instrumental a niveles cercanos al límite de detección, para la cual el límite de confianza de 99% se calcula de la desviación estándar.^[30]

2.1.10. Límite de cuantificación.

“El límite de cuantificación de un procedimiento analítico individual es la cantidad más pequeña de analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con precisión y exactitud aceptables”.^[1]

El límite de cuantificación es un parámetro de valoraciones cuantitativas para compuestos presentes en las matrices de muestra en bajos niveles y se usa particularmente para la determinación de impurezas y/o productos de degradación.^[1]

La **Figura 1** ilustra la definición del intervalo útil de un método analítico, que va desde la concentración más pequeña con la que pueden realizarse medidas cuantitativas (límite de cuantificación, **LC**) hasta la concentración a la que la curva de calibración se desvía de la linealidad (límite de linealidad, **LL**). Como límite inferior de las medidas cuantitativas se toma, en general, aquel que es igual a diez veces la desviación estándar cuando la concentración del analito es cero ($10 \times S_{bl}$). En este punto, la desviación estándar relativa es del orden de un 10% y disminuye con rapidez cuando las concentraciones aumentan.

Para que un método analítico sea aplicable, debería tener un intervalo de al menos dos órdenes de magnitud. Algunos métodos pueden utilizarse en intervalos de concentración de cinco a seis órdenes de magnitud.^[28]

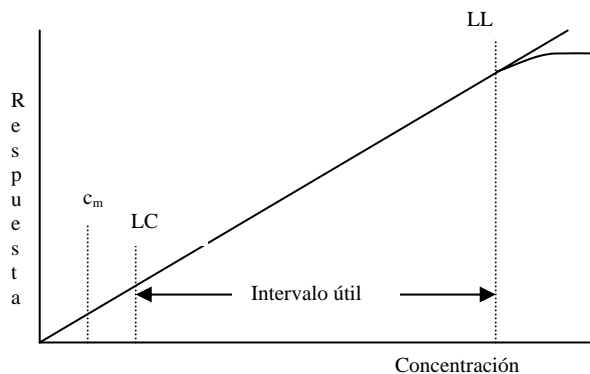


Figura 1. Intervalo útil de un método analítico^[28]

El límite de cuantificación se determina generalmente por el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito y estableciendo el nivel mínimo al que el analito puede ser determinado con exactitud y precisión aceptables. *Un radio aceptable entre señal:ruido es de 10:1.*^[32]

2.2. PRUEBAS DE ADECUABILIDAD DEL SISTEMA.

La exactitud y precisión de los datos recolectados comienzan con un buen comportamiento del sistema cromatográfico. Las pruebas y especificaciones de adecuabilidad del sistema son parámetros que proporcionan asistencia para lograr este propósito.^[50]

Las pruebas de adecuabilidad del sistema son esenciales para el aseguramiento de la calidad del desempeño del sistema cromatográfico. La cantidad de pruebas requeridas dependerá del propósito del método probado. Para pruebas de disolución o perfiles de liberación (disolución) usando un método estándar externo, k' , T y RSD son las pruebas de adecuabilidad del sistema mínimas recomendadas. Para métodos de aprobación, liberación, estabilidad o impurezas/productos de degradación, usando estándares internos o



externos, k' , T, Res y RSD se recomiendan como parámetros mínimos de las pruebas de adecuabilidad del sistema.

En la práctica, cada método sujeto a validación deberá incluir un número apropiado de pruebas de adecuabilidad del sistema definiendo las características necesarias de tal sistema. Pruebas adicionales pueden seleccionarse a discreción de quien aplica o revisa el sistema.^[50]

Las variaciones debidas al proceso de fabricación del producto farmacéutico, la preparación de la muestra en el laboratorio y el desempeño de los instrumentos, contribuyen a la exactitud de los datos obtenidos del análisis. Con una validación apropiada y criterios estrictos sobre el rendimiento cromatográfico (satisfacción del sistema), se puede obtener una mejora en la confiabilidad de los datos. Las variaciones, excepto las provenientes del proceso de fabricación, pueden ser minimizadas. Sólo con métodos confiables bien validados los datos generados pueden ser dignos de confianza.^[50]

2.2.1. Tiempo de retención (Tr).

a) Factor de capacidad (k').^[50]

El factor de capacidad k' es una medida de donde se localiza el pico de interés en un tiempo específico (Tr) con respecto al tiempo muerto (T_0), es decir, el tiempo de elusión de los componentes no retenidos y se define por la **Ecuación 6**.

El pico deberá estar bien resuelto de otros picos y del volumen muerto. *Generalmente el valor de k' es mayor a 2.*

$$k' = (T_r - T_0) / T_0 \quad (6)$$

b) Retención relativa (α).

La retención relativa α es una medida de la localización relativa de dos picos (**Ecuación 7**). Este no es un parámetro esencial, siempre y cuando esté expresada la resolución.^[50]

$$\alpha = k'_1 / k'_2 \quad (7)$$

En general, la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) es un proceso de absorción dinámico. Las moléculas de analito, que se mueven a través de un lecho poroso empacado, tienden a interactuar con los sitios de absorción superficiales. Dependiendo del tipo de HPLC, se incluyen diferentes tipos de fuerzas de absorción en el proceso de retención.

En la cromatografía de fase reversa (RP) se emplea un empaque enlazado hidrofóbico como fase estacionaria y una fase móvil polar constituida por mezclas de agua con algún disolvente orgánico y que puede también contener amortiguadores o sales. La retención de los solutos en este tipo de sistemas puede explicarse con el modelo de *Horváth*, según el cual la superficie hidrocarbonada de la molécula de soluto, así como las moléculas hidrocarbonadas de la fase estacionaria, experimentan un efecto de repulsión hacia el eluyente polar, de modo que para disminuir la superficie hidrocarbonada en contacto con la fase móvil, se produce una asociación entre el soluto y las cadenas de la fase estacionaria. De esta manera, la retención no es debida a una atracción entre el soluto y la fase estacionaria, sino a una repulsión que ambas experimentan hacia el eluyente y que las conduce a asociarse. Se tiene entonces que la retención depende fundamentalmente de la concentración y longitud de las cadenas hidrocarbonadas en la fase estacionaria; la superficie hidrocarbonada del soluto y la polaridad de la mezcla que constituye la fase móvil.^[82]

Las interacciones hidrofóbicas (no específicas) son las principales en las separaciones de fase reversa. Estas interacciones son competitivas. Las moléculas de analito compiten con las moléculas de eluyente por los sitios de absorción. Así, las moléculas de analito que interaccionen más fuerte con la superficie serán retenidas más tiempo.^[83]

Consideremos una separación de una mezcla de dos componentes (A y B) disueltos en un eluyente. Asumimos que el componente A tiene la misma interacción con la superficie del absorbente que con el eluyente y que el componente B tiene una interacción excesivamente fuerte con el primero (o mayor repulsión por el segundo). Las moléculas de A interaccionan con la superficie absorbente y se retardan en ellas tanto como las moléculas del eluyente, moviéndose en promedio con la misma velocidad. Las moléculas de B, permanecerán allí durante más tiempo, moviéndose más despacio que las moléculas de eluyente. De tal



forma, el Tr de un analito, depende de su estereoquímica, es decir, de sus grupos funcionales expuestos que puedan interactuar con la superficie absorbente.^[83]

La retención es reflejo de las interacciones superficiales moleculares y depende de la superficie absorbente total, por lo que a mayor longitud de la columna, mayor será el tiempo en que el analito permanezca retenido.^[83]

El área de la superficie absorbente es el factor que directamente afecta la retención del analito. La interacción molecular ocurre principalmente en la superficie interna de la partícula. En consecuencia, mientras menor sea el tamaño de partícula, mayor será la superficie absorbente y por lo tanto, mayor el Tr.

El Tr es inversamente proporcional al flujo del eluyente. Las moléculas de eluyente compiten con las de analito por los sitios de absorción, por lo que al aumentar la cantidad de eluyente en un tiempo determinado, fuerzan a las moléculas de analito a abandonar el lecho poroso más rápidamente.

El comportamiento cromatográfico de los iones y las moléculas neutras es diferente. Debemos asumir que las moléculas neutras serán retenidas al exponer la parte hidrofóbica (orgánica) de la molécula a la superficie de interacción, así que durante la corrida los iones se moverán más rápido. Entonces, dependiendo del pKa del analito, se verá más o menos afectado por el pH predominante, impuesto por la fase móvil, teniendo un mayor Tr a medida que se encuentre menos ionizado.

2.2.2. Resolución (Res).

La resolución es una medida de qué tan bien están separados dos picos. Tener picos bien separados es esencial para una cuantificación confiable. Este es un parámetro muy útil si pueden estar involucrados picos de interferencia potencial. Para definirla, debe seleccionarse el pico que potencialmente eluya más cerca al analito.^[50]

La resolución está mínimamente influenciada por el radio de dos compuestos que están siendo medidos. *Es deseable una Res mayor que 2 entre el pico de interés y el pico que interfiera potencialmente más cercano (impureza, excipiente, producto de degradación, estándar interno, etc.)*^[50] La resolución se expresa como la distancia entre dos picos dividida entre el promedio del ancho de los picos medido en la línea basal **W (Ecuación 8)**:

$$\text{Res} = 2 (\text{Tr } 2 - \text{Tr } 1) / (\text{W } 1 + \text{W } 2) \quad (8)$$

| | |
|------|--------------------------------------|
| Tr 1 | Tiempo de retención del componente 1 |
| Tr 2 | Tiempo de retención del componente 2 |
| W 1 | Ancho del pico 1 |
| W 2 | Ancho del pico 2 |

La resolución es el parámetro que describe la fuerza de separación del sistema cromatográfico completo en relación a los componentes particulares de la muestra.

Cualquier criterio para la resolución sería de algún modo arbitrario. Para una exactitud razonable los máximos de los picos deben estar separados al menos 4σ (**4s**). Si es así, entonces Res = 1.0, que corresponde aproximadamente a un 3% de sobreposición de las áreas de los picos. Un valor de Res = 1.5 (para 6σ) representa esencialmente una resolución completa, con sólo 0.2% de sobreposición de las áreas de los picos.^[28]

Aproximando los picos a triángulos simétricos, si Res es igual o mayor que uno, entonces los componentes están completamente separados. Si Res es menor que uno, entonces los componentes están traslapados.^[83]

La resolución se puede expresar también como en la **Ecuación 9**:

$$\text{Res} = (\text{Tr } 2 - \text{Tr } 1) / 4\sigma \quad (9)$$

Es deseable una resolución mayor que 2 entre el pico de interés y el pico que interfiera potencialmente más cercano.

La resolución es una función de al menos dos factores: la velocidad de la migración (retención) y la eficiencia.^[82]



La eficiencia es un concepto ligado a la granulometría (tamaño de partícula, longitud de la columna) y al flujo; y la retención está ligada a los coeficientes de distribución que dependen de las propiedades fisicoquímicas y termodinámicas del soluto en las dos fases.^[82]

De tal manera, a mayor longitud de columna y a menor tamaño de partícula, mayor eficiencia de la columna (N) y por tanto debe esperarse una mayor separación de los picos cromatográficos, es decir, una mayor resolución.

Por otra parte, un flujo a su nivel bajo también genera un aumento en la eficiencia de la columna, por lo que deberá observarse una mayor resolución.

La retención de un analito depende de su esteoquímica, es decir, de sus grupos funcionales expuestos que puedan interactuar con la superficie hidrofóbica absorbente. Así, las moléculas de analito que interaccionen más fuerte con la superficie serán retenidas más tiempo. El pH de la fase móvil, al imponer el grado de ionización de las moléculas de los analitos en solución, tiene un efecto marcado sobre la distribución de las moléculas entre las dos fases, observándose una mayor resolución a medida en que los equilibrios iónicos de cada molécula sean diferentes. En otras palabras, si el analito 1 está más ionizado que el analito 2 o viceversa, entonces obtendremos una mejor separación de los picos. Sin embargo, en el intervalo de pH estudiado y dadas las constantes de disociación (pKa's) de cada analito estudiado, se puede considerar que ambos están prácticamente ionizados en su totalidad (**Tabla 2**), por lo que el efecto del pH sobre la variación de la resolución será despreciable.

| | Ecuación de Henderson $\text{pH} = \text{pKa} - \log \left(\frac{[\text{base conjugada}]}{[\text{ácido conjugado}]} \right)$ | pKa | [ácido conjugado] / [base conjugada] | |
|-----------|--|---------------------|--------------------------------------|------------|
| | | | pH 3 | pH 4 |
| CF | $\text{pH} = \text{pKa} - \log \frac{[\text{CF}]}{[\text{CF}^{\text{H}}]}$ | 8,9 ^[15] | $10^{5.9}$ | $10^{4.9}$ |
| MC | $\text{pH} = \text{pKa} - \log \frac{[\text{MC}]}{[\text{MC}^{\text{H}}]}$ | 9,2 ^[15] | $10^{6.2}$ | $10^{5.2}$ |

Tabla 2 Cálculo de la relación [ácido conjugado] / [base conjugada] de cada analito a diferentes valores de pH.
 CF: Clorhidrato de fenilefrina; MC: Maleato de clorfeniramina

2.2.3. Número de Platos Teóricos (N).

El número de platos teóricos (N) es una medida de la eficiencia de la columna, esto es, cuantos picos pueden localizarse por unidad de corrida-tiempo del cromatograma,^[50] y se define por la **Ecuación 10**.

N es casi constante para cada pico en un cromatograma con un conjunto de condiciones de operación fijo. H, la altura equivalente a un plato teórico, mide la eficiencia de la columna por unidad de longitud de la columna (L). Los parámetros que pueden afectar a N o H incluyen la posición del pico, el tamaño de partícula en la columna, la velocidad de flujo de la fase móvil, la temperatura de la columna, la viscosidad de la fase móvil y el peso molecular del analito.^[50] En términos generales, al aumentar el tiempo de retención, también aumenta N, así como k'.

El número de platos teóricos depende del tiempo de elusión, pero en general debe ser mayor a 2,000.^[50]

$$N = 16 \left(\frac{T_r}{W} \right)^2 = L / H \quad (10)$$

El número de platos teóricos es una contribución cinética y corresponde a la medida de cómo está empacada una columna. A mayor número de platos, mayor eficiencia. Esa eficiencia está vinculada entonces al número de platos teóricos que contiene la columna, es decir, el número de ocasiones en que la fase móvil y los solutos se ponen en equilibrio con la fase estacionaria contenida en el plato. Por esta razón se considera al movimiento de la fase móvil como una serie de pasos sucesivos y no como un desplazamiento continuo.^[83]

El número de platos teóricos sufrirá entonces un cambio directamente proporcional al aumento de fase estacionaria contenida en la columna, así entonces, a mayor longitud de la columna, mayor número de platos teóricos; mientras que la relación será inversa entre el tamaño de partícula y el número de platos teóricos, aumentando éstos cuando el tamaño de partícula sea menor.



Por otra parte, generalmente se obtiene un mayor número de platos teóricos a menor velocidad de flujo ya que hay mayor “contacto” entre la fase móvil y los solutos con la fase estacionaria.

De lo anterior es evidente que la longitud de la columna, el tamaño de partícula y la velocidad de flujo tienen gran importancia sobre la eficiencia de la columna.

El pH de la fase móvil (que además es usada como disolvente de los solutos básicos) desplaza el equilibrio de las formas iónica / no iónica de las bases, aumentando el carácter no iónico de manera proporcional al pH. Puede pensarse que a medida de que las bases estén menos ionizadas, tendrán una menor afinidad con la fase móvil, quedando por lo tanto más retenidas en la columna. Sin embargo, este efecto no tiene influencia en la eficiencia de la columna dada por N.

2.2.4. Simetría (Sim.).

Una partícula individual del analito experimenta durante su migración miles de transferencias entre las fases estacionaria y móvil. El tiempo que pasa en cada fase es muy irregular, por eso el tiempo de residencia en una fase dada puede ser transitorio en unos casos, mientras que en otros puede ser relativamente largo. Algunas partículas se desplazan más rápido en virtud de su inclusión accidental en la fase móvil durante la mayor parte del tiempo. Otras por el contrario, pueden retrasarse debido a que casualmente se han incorporado a la fase estacionaria durante un mayor tiempo que la mayoría. La consecuencia de estos procesos individuales aleatorios, es una dispersión simétrica de las velocidades alrededor del valor medio.^[28]

La calidad de una columna se juzga por el bajo grado de ensanchamiento de los picos, pues esto es un índice de la posibilidad de lograr una buena separación; mientras más pequeño sea el ensanchamiento la columna es más eficiente. Un pico tiene un valor de asimetría de uno, cuando sus dos mitades separadas por un eje longitudinal son iguales.^[82]

Algunos picos presentan deformación hacia la cola o hacia el frente. Una causa frecuente de estas asimetrías es un coeficiente de distribución no lineal. La asimetría frontal también se da cuando se ha introducido demasiada muestra en la columna. Las distorsiones de este tipo no son deseables debido a que conducen a malas separaciones y a tiempos de elusión menos reproducibles.^[28]

Durante la corrida, la muestra cromatográfica original se dispersará debido a innumerables flujos alrededor y dentro de las partículas porosas, cinética de absorción lenta, difusión longitudinal y otros factores. Estos procesos juntos producen el llamado ensanchamiento de banda (pico) de la zona cromatográfica. En general, mientras más sea retenido un componente dentro de la columna, será más ancho el pico del cromatograma.

a) Difusión longitudinal.

Los analitos difunden desde la zona más concentrada en el centro de la banda hacia las regiones más diluidas por delante y por detrás del centro de la banda, es decir, en el mismo sentido y en el opuesto a la dirección del flujo de la fase móvil.

Cuanto más alto es el flujo, más breve es el periodo que el analito reside en la columna. Así, la difusión desde el centro de la banda hacia los extremos tiene menos tiempo para poder producirse, generando picos más simétricos.^[83]

A flujo moderado, el analito tiende hacia el equilibrio de distribución entre las fases, produciendo picos más anchos y simétricos ya que las moléculas pueden seguir infinidad de caminos; (a flujos muy lentos la gran mayoría de las moléculas seguirán numerosos caminos y no se notará un efecto de dispersión). De manera similar, un aumento en la longitud de la columna o una disminución en el tamaño de la partícula de la fase estacionaria, generan el mismo tipo de respuesta.^[83]

b) Difusión aparente. A bajas velocidades, las moléculas de analito no se dispersan significativamente debido a la existencia de múltiples caminos en el relleno. A moderadas o altas velocidades sin embargo, no hay suficiente tiempo para que tenga lugar la difusión ordinaria.

Los poros del sólido de la fase estacionaria se llenan con volúmenes estáticos de fase móvil, por lo que las moléculas de analito han de difundir a través de esos líquidos estancados antes que pueda producirse la transferencia entre la fase móvil *en movimiento* y la fase estacionaria. La presencia de estas lagunas de fase móvil estancada hace más lento el proceso de intercambio, el cual es directamente proporcional a la velocidad de la fase móvil. Un aumento en el diámetro de partícula también repercute de manera similar, debido al aumento de volumen interno que ocurre.^[83]



Dado que el coeficiente de distribución de una especie depende de su afinidad con la fase móvil y/o estacionaria, es evidente que éste se ve afectado por su equilibrio iónico, teniendo más afinidad por la fase móvil polar mientras más ionizado se encuentre. Para las moléculas analizadas en este trabajo, mientras más bajo es el pH de la fase móvil, el equilibrio iónico se ve desplazado hacia una mayor concentración de especies iónicas, por lo que éstas eluyen más rápido, produciendo picos menos simétricos.

El ancho del pico es entonces un parámetro cinético, dependiente del tamaño de partícula, porosidad y tamaño del poro del absorbente, la longitud de la columna, la forma y la efectividad del empaque.

c) Factor de coleo (T).

El factor de coleo es una medida de la simetría del pico. Para picos perfectamente simétricos su valor es igual a la unidad, incrementándose si la cola se vuelve más pronunciada.^[32] La exactitud de cuantificación decrece con un incremento en el coleo del pico debido a las dificultades encontradas por el integrador en determinar donde (cuando) termina el pico y por lo tanto el cálculo del área bajo el pico. Si el integrador es incapaz de determinar exactamente cuando ocurre un cambio de pendiente, la exactitud disminuye. *Se recomienda una T menor o igual a 2.*^[50]

$$T = W_{0.05} / 2f \quad (11)$$

En la **Ecuación 11**, $W_{0.05}$ representa al ancho del pico al 5 % de altura y f la distancia existente entre el frente del pico y el pico máximo medida a 5 % de altura.

2.3. ROBUSTEZ.

2.3.1. Definición.

“La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad de permanecer inalterado por pequeñas, pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y provee una indicación de su confiabilidad durante su uso normal”.^[1]

La robustez puede describirse como la habilidad para reproducir el método analítico en diferentes laboratorios o bajo diferentes circunstancias, sin la aparición de diferencias inesperadas en los resultados obtenidos y una prueba de robustez como el diseño experimental para evaluar la robustez del método.^[2]

La prueba de robustez fue originalmente introducida para resolver problemas en estudios inter laboratorio e identificar los factores potencialmente responsables. Esto significa que las pruebas de robustez se realizaban en un estado tardío de la validación del método ya que estos estudios inter laboratorio se realizaban en ese estadio final. Entonces el estudio de robustez se consideraba parte del método de validación relacionado a la determinación de la precisión (reproducibilidad) del método.^[2]

Sin embargo, esto involucraba el riesgo de que cuando un método no se consideraba robusto, debía ser nuevamente desarrollado y optimizado. En este punto, se había gastado mucho esfuerzo y dinero en su optimización y validación, por lo que se quería evitar esto. De aquí que la realización de la prueba de robustez se haya cambiado a puntos tempranos en el desarrollo del método. Por lo tanto, **la prueba de robustez debe ser vista como una parte del método de validación que se realiza al final del desarrollo del método o al comienzo del procedimiento de validación.**^[2]

Tanto la guía **ICH** como la **FDA**, no consideran la prueba de robustez dentro de las características del método a ser evaluadas durante su validación, pero indican claramente que esta prueba deberá ser considerada en un estado apropiado del desarrollo del procedimiento analítico.^[1,31]

El término *ruggedness* es frecuentemente utilizado como sinónimo de *robustness*, — en español ambos términos significan robustez —. Actualmente sólo la USP 24 define el término *ruggedness* como “... el grado de reproducibilidad de los resultados de prueba obtenidos por el análisis de las mismas



muestras bajo una serie de condiciones, tales como diferentes laboratorios, diferentes analistas, diferentes instrumentos, diferentes lotes de reactivos, diferentes tiempos de ensayo, diferentes temperaturas de ensayo, diferentes días^[32], por lo que comúnmente se identifica con la reproducibilidad.

La robustez de un proceso tiene dos aspectos: uno más activo, que hace a un proceso robusto a los llamados factores de ruido; y otro más pasivo, que demuestra que un proceso existente es robusto al ruido. La primera situación es conocida como *robustez del diseño de procesos*, la segunda como *validación de procesos (ruggedness)*. En ambos casos, el diseño experimental estadístico es el método de elección para obtener una máxima cantidad de información con el mínimo esfuerzo experimental posible. ^[6]

2.3.2. Robustez del diseño.

La idea principal de robustez del diseño de procesos se debe a *Taguchi*. Se asume que los factores con influencia en las respuestas de un proceso se pueden separar en dos clases:

- Factores fáciles de controlar o factores de diseño.
- Factores difíciles de controlar o factores de ruido.

Una manera ingenua de asegurar la calidad de un proceso podría ser el fijar todos los factores de tal forma que la calidad sea buena. Sin embargo, fijar los factores de ruido es difícil o costoso. Frecuentemente es posible encontrar un grupo de factores de diseño en los que la calidad sea buena aún sin fijar los factores de ruido; esto significa que para este grupo de factores de diseño la calidad del proceso no depende realmente de los factores de ruido. Esto es lo que se conoce por “robustez del diseño de procesos”. ^[6]

2.3.3. Objetivos de la evaluación de la robustez.

La prueba de robustez se lleva a cabo como parte de un estudio de precisión y la meta es establecer el efecto de pequeños cambios en las condiciones del método (tales como temperatura o condiciones instrumentales) sobre las capacidades cualitativas y cuantitativas del método. ^[7]

La precisión es una medida de la tendencia aleatoria del método. Esta tiene contribuciones desde la repetibilidad de varios pasos en el método analítico, tales como la preparación de la muestra y la inyección de la muestra por HPLC, hasta la reproducibilidad de todo el método analítico de analista a analista, de instrumento a instrumento y de laboratorio a laboratorio. Algunos autores recomiendan realizar por esta razón la prueba de robustez antes que la de reproducibilidad. ^[7]

La información obtenida de la prueba de robustez puede ser usada para definir los límites de las pruebas de adecuabilidad del sistema, basados en evidencia experimental y no de manera arbitraria sobre la experiencia del analista. ^[2] Esto da una idea de los problemas potenciales que pueden ocurrir cuando el método se repite bajo diferentes condiciones o es transferido, por ejemplo, a otro laboratorio. Estos problemas pueden entonces ser anticipados al controlar los factores significantes, por ejemplo al incluir un “informe precautorio” en la descripción del método. ^[5]

Otro objetivo de una prueba de robustez puede ser el predecir la reproducibilidad o estimar la precisión intermedia. ^[2]

2.3.4. Pasos de una prueba de robustez.

Esquemáticamente pueden identificarse los siguientes pasos ^[2]:

- (a) Identificación de los factores a ser probados;
- (b) Definición de los diferentes niveles para los factores;
- (c) Selección del diseño experimental;
- (d) Definición del protocolo experimental (procedimiento experimental completo);
- (e) Definición de las respuestas a ser determinadas;
- (f) Ejecución de los experimentos y determinación de las respuestas del método;
- (g) Cálculo de los efectos;
- (h) Análisis estadístico y gráfico de los efectos;
- (i) Conclusiones.



a) Identificación y selección de factores.

El estudio de robustez comienza con la selección de los factores que pueden influir en el desempeño del método. Los factores pueden dividirse en dos grupos: factores relacionados con el procedimiento y factores no relacionados con el procedimiento.

Los factores relacionados con el procedimiento son específicos para un ensayo dado, usualmente prescritos en el protocolo y en general comprenden factores cuantitativos, *e.g.*, el pH de un eluyente, la columna o la temperatura de reacción, la concentración de un reactivo o la fracción de un solvente en una mezcla. Los factores no relacionados con el procedimiento son frecuentemente factores cualitativos, *e.g.*, un lote de reactivos o el fabricante de un instrumento o columna. Para este último tipo de factores, el protocolo frecuentemente permite usar, por ejemplo, una columna o instrumento con características similares a las descritas.^[8]

Los factores investigados en una prueba de robustez están relacionados al procedimiento analítico (factores operacionales) y a las condiciones del medio (factores ambientales). Los factores operacionales se seleccionan de la descripción del método analítico, mientras que los factores ambientales no están necesariamente explícitos en el procedimiento. Los factores seleccionados pueden ser cuantitativos (continuos), cualitativos (discretos) o una mezcla de ambos. La **Tabla 3** indica una lista de factores que pueden considerarse durante la prueba de robustez de métodos HPLC. Si se requiere de un procedimiento de preparación de la muestra antes del análisis, también los factores de este procedimiento se considerarían en la prueba de robustez. El número de factores a examinar aumenta cuando el procedimiento analítico requiere un paso de derivatización pre o post columna.^[2]

| Método | Factores |
|--------|--|
| HPLC | pH de la fase móvil |
| | Cantidad de modificador orgánico |
| | Concentración de buffer, concentración de sales o fuerza iónica |
| | Concentración de aditivos (agentes par-iónicos, aminas competidoras) |
| | Velocidad de flujo |
| | Temperatura de la columna |
| | Elusión por gradiente Composición inicial de la fase móvil Composición final de la fase móvil Pendiente del gradiente |
| | Factores de columna Lote de fase estacionaria Fabricante Edad de la columna |
| | Factores de detección Longitud de onda (detección UV o fluorimetría) Voltaje (detección electroquímica) |
| | Factores de integración Sensibilidad |

Tabla 3. Factores potenciales para ser examinados en la prueba de robustez de métodos HPLC.^[2]



b) Definición de niveles.

En un estudio de robustez se espera ninguno ó un pequeño número de efectos principales significativos, al menos sobre la determinación de contenido de la muestra. Pueden usarse diseños de dos niveles (alto / bajo) debido a que las funciones de respuesta de la mayoría de los factores están monótonamente aumentando o disminuyendo en los pequeños intervalos estudiados.^[8]

Los niveles de los factores usualmente se definen simétricamente alrededor del nivel nominal prescrito en el procedimiento de operación. El intervalo elegido entre los extremos de los niveles representa los límites entre los que se espera que los factores varíen cuando el método sea transferido. En la mayoría de los casos el analista define los niveles de acuerdo a su opinión personal. Sin embargo la selección de los niveles también puede basarse en la precisión o en la incertidumbre con la cual un factor puede estar establecido o re establecido.^[2]

Para algunos factores, la selección de un intervalo asimétrico puede representar más la realidad. Sin embargo, la probabilidad o factibilidad para la selección de intervalos asimétricos necesita evaluarse separadamente para cada factor y esto dentro del contexto de una prueba dada de robustez.^[2]

Para factores cualitativos, los resultados obtenidos no son representativos de la población total del factor al cual pertenecen los niveles seleccionados, sino que sólo permiten una comparación inmediata entre los dos niveles discretos seleccionados.^[2]

c) Selección del diseño experimental.

Diferentes tipos de diseño pueden ser utilizados en una prueba de robustez. La elección de un diseño depende del propósito de la prueba y del número de factores que han de ser examinados.^[5]

La correcta elección de un diseño experimental es de fundamental importancia en la experimentación científica. Si en el estado de planeación, el diseño de experimentos es cuidadosa y correctamente pensado, entonces el análisis usualmente será directo y se habrá decidido con referencia a los objetivos.^[14]

En los diseños de robustez de procedimientos, los efectos principales de los factores del diseño y las interacciones entre los factores del diseño y del entorno son los más importantes para su estudio. Si ciertas interacciones —como las interacciones entre los factores del diseño— no son insignificantes, el diseño experimental debe, por lo tanto, elegirse de tal forma que los efectos principales de los factores del diseño así como las interacciones entre los factores del diseño y los del medio puedan estimarse sin ser confundidos con interacciones entre factores del diseño.^[13] Es decir, el diseño experimental debe permitir diferenciar entre los efectos debidos únicamente a los factores principales, entre los debidos a la interacción entre ellos y a los debidos a la interacción entre los factores principales con los factores del medio.

El diseño experimental se selecciona de acuerdo al número de factores a investigar. Algunos diseños aplicados son los llamados diseños de screening de dos niveles, que permiten proyectar un número relativamente grande de factores en un número relativamente pequeño de experimentos. Entre los diseños están también los llamados Plackett-Burman o los diseños factoriales fraccionados.^[2]

En los diseños Plackett-Burman, los efectos de interacción entre dos factores y los efectos de interacción entre factores de orden superior, se confunden con los efectos principales. La confusión entre efectos significa que en un diseño dado, estos efectos no pueden ser estimados separadamente. Las interacciones entre dos factores pueden, sin embargo, considerarse como despreciables.^[2]

Para métodos cromatográficos, la consideración de efectos no relacionados con el procedimiento (cualitativos), tales como el fabricante de la columna cromatográfica, en el estudio de robustez parece interesante. Más de dos niveles deberían considerarse preferentemente para estos factores dado que un examen de dos niveles no es representativo de su población. Esto, sin embargo, no es posible con los diseños de screening tipo Plackett-Burman o factoriales fraccionados. Como una alternativa, pueden aplicarse los diseños factoriales asimétricos propuestos por *Addelman*.^[37] Estos diseños permiten un rápido examen de factores a diferente número de niveles.^[8]

d) Definición del protocolo experimental.

Los diseños experimentales se realizan preferentemente en una secuencia aleatoria. Por razones prácticas, los experimentos pueden estar separados (en bloques) por uno o más factores. Esto significa que, para el factor separado, primero se realizan todos los experimentos donde tiene un nivel y posteriormente, los experimentos donde tiene el otro. Dentro de los bloques, los experimentos son aleatorios.^[2]

Pueden adicionarse varios experimentos al diseño experimental, usualmente a valores nominales, para completar el conjunto experimental. Estos experimentos replicados se realizan antes, entre —a



intervalos de tiempo regulares— y después de los experimentos del diseño para la prueba de robustez. La posibilidad más simple es realizar dos experimentos replicados, uno antes y otro después del diseño experimental. Estos experimentos permiten: comprobar si el experimento se desempeña bien al comienzo y al final de los experimentos; obtener un primer estimado de posible amontonamiento de señales; corregir los resultados medidos afectados por posibles efectos de tiempo (amontonamiento); y ocasionalmente, normalizar los efectos.^[2]

e) Definición de respuestas.

La prueba de robustez examina las fuentes potenciales de variabilidad en una o varias respuestas del método. En primera instancia, se evalúan los aspectos cuantitativos del método (determinación de contenido, % de recuperación). Pero además, también deben evaluarse las respuestas para las *pruebas de adecuabilidad del sistema* (System Suitability Test o SST) definidas, tales como resolución, factores de capacidad, eficiencia de la columna, factores de coleo, etc.^[2]

Es posible evaluar los efectos de los factores examinados sobre diferentes respuestas. Los parámetros evaluados en las SST, pueden considerarse también como respuestas en una prueba de robustez. Las SST son una parte integral de muchos métodos analíticos y determinan la satisfactoriedad y efectividad del sistema operativo. Los límites de las SST para los diferentes parámetros usualmente se establecen basados en los resultados experimentales obtenidos durante la optimización del método y sobre la experiencia del analista.^[5]

La guía **ICH** recomienda que “... una consecuencia de la evaluación de la robustez debería ser que una serie de parámetros de satisfactoriedad del sistema quede establecida para asegurar que la validez del procedimiento analítico se mantenga cuando quiera que se utilice”.^[1]

Al examinar las fuentes potenciales de variabilidad, se selecciona un cierto número de factores del procedimiento de operación y se examinan dentro de un intervalo que ligeramente excede las variaciones que pueden esperarse cuando un método es transferido de un instrumento a otro o de un laboratorio a otro. Estos factores son examinados entonces mediante un diseño experimental, evaluando el efecto de los factores sobre la(s) respuesta(s) del método. De esta forma se descubren los factores que pueden desvirtuar al método. El analista sabe entonces que tales factores deben ser más estrictamente controlados.^[2]

f) Ejecución de los experimentos.

Se prueban alícuotas de la misma muestra problema y el mismo estándar en las diferentes condiciones experimentales. En caso de que se vaya a determinar un amplio rango de concentraciones (un factor de 100 o más), se deben examinar varias concentraciones.

g) Cálculo de efectos.

En una prueba de robustez se aplica un *diseño experimental estadístico* para examinar simultáneamente el efecto de la variación en diferentes variables del método (factores), e.g., el flujo de la fase móvil, la temperatura, el tipo de columna, la pendiente del gradiente, el pH del buffer, la concentración de sales en la fase móvil, la longitud de onda del detector, la concentración de aditivos (excipientes), etc., sobre las respuestas del mismo. Los factores se investigan a diferentes niveles, usualmente dos, llamados uno bajo (-1) y otro alto (+1) los cuales se sitúan alrededor del valor nominal (0). Los niveles nominales son las condiciones establecidas en el procedimiento de valoración.^[5]

El efecto de un factor examinado sobre la respuesta considerada es estadísticamente no significativo si su valor absoluto no excede un efecto crítico, el cual se deriva de un error estimado. Los efectos que de antemano se consideren como despreciables, por ejemplo de “factores falsos” (efectos que no se asignan a modificaciones químicas o físicas, i.e., variables imaginarias) o de interacciones de dos factores, pueden ser usados para estimar el error experimental para los cálculos de los efectos críticos. Además la distribución de los efectos estimados por sí mismos pueden usarse también para decidir cuales efectos deben ser considerados despreciables y por tanto permiten otro error estimado.^[8] Si se dispone de un estimado del error experimental de los efectos, con un número apropiado de grados de libertad, se recomienda realizar una prueba estadística.^[2]



h) Análisis estadístico y gráfico de los efectos.

Pueden aplicarse como herramienta gráfica curvas normales y semi-normales para decidir visualmente sobre la significancia de los efectos. La curva semi-normal genera una línea recta para los efectos no significativos, i.e., efectos con una distribución normal cercana a cero. Por lo tanto, una desviación de esta línea recta indica que el efecto correspondiente pertenece a otra distribución y puede considerarse significativo. Más aún, la pendiente de la línea recta de los efectos no significativos es una medida de la desviación estándar de su distribución.^[8]

Para crear una curva semi-normal, los n efectos se organizan de acuerdo al incremento de su tamaño absoluto. El valor r -avo de esta secuencia se grafica contra una escala definida al partir la mitad derecha de la distribución normal en n partes de igual área y tomando la media de la r -ava “rebanada”. Este valor es llamado “rankit”.^[2]

La interpretación estadística provee un valor numérico límite que puede ser graficado y que permite definir, de una forma menos subjetiva que la visual, qué es significativo y qué no lo es. Este valor límite para identificar efectos estadísticamente significativos usualmente se deriva de la prueba estadística de t . (**Ecuación 12**).

$$t = \frac{|E_x|}{(SE)_e} \Leftrightarrow t \text{ crítica} \quad (12)$$

Donde $(SE)_e$ es el error estándar de un efecto, lo cual representa la variabilidad experimental dentro del diseño. Para experimentos de robustez, este $(SE)_e$ puede estimarse de diferentes formas. La ecuación anterior puede escribirse como (**Ecuación 13**):

$$|E_x| \Leftrightarrow E_{\text{crítico}} = t_{\text{crítica}} (SE)_e \quad (13)$$

El efecto crítico ($E_{\text{crítico}}$) se calcula normalmente a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ (ocasionalmente 0.01 ó 0.1). Un efecto es considerado significativo a un nivel α dado, si $|E_x| > E_{\text{crítico}}$.

i) Conclusiones.

Delineación de las conclusiones relevantes del análisis estadístico y si es necesario, tomar medidas para mejorar el desempeño del método.

2.4. DISEÑO DE EXPERIMENTOS.

Los investigadores realizan experimentos virtualmente en todos los campos del saber, por lo general para descubrir algo acerca de un proceso o sistema en particular. Literalmente, un experimento es una prueba o ensayo. *Un diseño de experimentos es una prueba o serie de pruebas en las cuales se inducen cambios deliberados en las variables de entrada de un proceso o sistema, de manera que sea posible observar e identificar las causas de los cambios en las respuestas de salida.*^[4]

Los métodos de diseño experimental tienen un cometido importante en el desarrollo de procesos y en la depuración de procesos para mejorar el rendimiento. En muchos casos, el objetivo puede ser desarrollar un proceso consistente o robusto; esto es, un proceso mínimamente afectado por fuentes de variabilidad externas.^[4]

El diseño paramétrico es una metodología de ingeniería estadística, iniciada por *G. Taguchi* (1986), cuya meta es reducir la variación de un producto o proceso al elegir las condiciones de los factores de control, por lo que la respuesta es insensible a las variaciones del ruido. Una aproximación comúnmente usada para modelar datos de diseños experimentales paramétricos es ajustar un modelo de la respuesta y como una función de los factores control denotados como x y de los factores de ruido denotados como z .

Puesto que z no es controlable o difícil de controlar (excepto durante el experimento), el modelo ajustado \hat{y} para y hereda variaciones provenientes de z . Por lo tanto, la variación de la respuesta y puede estimarse al calcular la varianza de \hat{y} con respecto a z . De este modelo uno puede elegir los valores de x para minimizar la varianza transmitida. Estos valores son llamados *robustos*.^[22]



En el diseño de experimentos paramétrico, es común ajustar un modelo de regresión lineal a la respuesta original y usar entonces el modelo de varianza inducido por la variación de ruido para determinar los valores de robustez de los factores control. Obtenemos algunas caracterizaciones generales de los valores de robustez en términos de pendientes absolutas en las gráficas de interacción control- ruido.^[22]

Debido al amplio uso de las gráficas de interacción control-ruido, es de interés intrínseco saber cuándo su uso nos llevará a la identificación de las condiciones de robustez, los cuales se definen en términos de minimizar la varianza heredada para cada valor control.^[22]

El proceso o sistema bajo estudio puede representarse por medio de la **Figura 2**. Suele ser posible visualizar el proceso como una combinación de máquinas, métodos, personas y otros recursos que transforman una entrada (a menudo un material) en una salida que tiene una o más respuestas observables. Algunas de las variables del proceso x_1, x_2, \dots, x_p , son controlables, mientras que otras z_1, z_2, \dots, z_q son incontrolables (aunque pueden ser controlables para los fines de la prueba.)

Entre los objetivos del experimento pueden incluirse:

- Determinar cuales variables tienen mayor influencia en la respuesta y .
- Determinar el mejor valor de las x que influyen en y , de modo que y tenga casi siempre un valor cercano al valor nominal deseado.
- Determinar el mejor valor de las x que influyen en y , de modo que la variabilidad de y sea pequeña.
- Determinar el mejor valor de las x que influyen en y , de modo que se minimicen los efectos de las variables no controlables z .

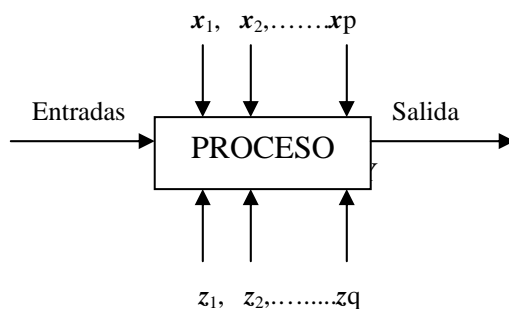


Figura 2. Modelo general de un proceso o sistema^[4]

Los diseños de experimentos se utilizan para identificar o buscar factores importantes que afectan al proceso y para desarrollar modelos empíricos de un proceso. Las técnicas de diseño de experimentos permiten aprender acerca del comportamiento del proceso al correr una serie de experimentos, donde una máxima cantidad de información será obtenida con un mínimo de corridas.^[3]

Un diseño de experimentos permite la determinación de efectos de los factores y sus interacciones. A menudo la predicción del comportamiento de un modelo no es intuitivamente obvia, debido a la presencia de las interacciones.^[3]

Usualmente, cuando se corre un diseño de experimentos, se toman mediciones de tantas respuestas como sea posible. Algunas veces el mejorar una respuesta tiene como resultado tener otra respuesta como no deseable. Sin embargo existe software para diseño de experimentos (como STATISTICA[®], DESIGN EXPERT[®], STATGRAPHICS[®], etc.) que permite el modelaje de varias respuestas, conjuntando objetivos deseables para cada respuesta y prediciendo entonces la mejor combinación de los factores experimentales al optimizar simultáneamente cada respuesta.^[3]

Otro resultado del diseño de experimentos es la separación de los factores “muchos triviales” de los factores “pocos vitales” los cuales son críticos al optimizar el proceso. Una vez que los factores críticos han



sido identificados, estos pueden monitorearse, lo cual le permite al operador distinguir entre variaciones por “causas comunes” y por “causas especiales”.^[3]

En cualquier experimento, los resultados y conclusiones que pueden obtenerse dependen, en gran parte, de la forma en que los datos fueron recopilados.^[4]

2.4.1. Aplicaciones del diseño experimental.

El diseño experimental es un medio de importancia crítica para mejorar el rendimiento de un proceso. También se emplea extensamente en el desarrollo de nuevos procesos. La aplicación de técnicas de diseño experimental en una fase temprana del desarrollo de un proceso puede dar como resultado:

- Mejora en el rendimiento del proceso.
- Menor variabilidad y mayor apego a los requerimientos nominales u objetivo.
- Menor tiempo de desarrollo.
- Menores costos globales.

Los métodos de diseño experimental también tienen un cometido importante en las actividades de diseño técnico (o diseño de ingeniería), en las cuales se desarrollan nuevos productos y se mejoran otros ya existentes. Algunas aplicaciones en este son:

- Evaluación y comparación de configuraciones de diseño básicas.
- Evaluación de materiales alternativos.
- Selección de parámetros de diseño de modo que el producto funcione bien en una amplia variedad de condiciones de campo (de uso real); esto es, de modo que el producto sea consistente (robusto).

El uso del diseño experimental en estas áreas puede dar por resultado productos con mayor confiabilidad y mejor funcionamiento en el campo, menores costos y menor tiempo de diseño y desarrollo del producto.^[4]

El diseño experimental tiene aplicaciones concretas en la caracterización optimización y diseño del proceso:

a) Caracterización del proceso.

En un experimento de caracterización, normalmente nos interesa determinar cuáles variables del proceso influyen en la respuesta. Para lograrlo, se puede desarrollar un experimento que permita estimar la magnitud y dirección de los efectos del factor; esto es, cuánto cambia la variable de respuesta cuando se modifica cada factor y si cambiar los factores simultáneamente produce resultados distintos de los que se obtienen con ajustes de factores individuales. Algunas veces esto se denomina experimento de escrutinio (*screening*).^[4]

La información que se obtiene de este experimento de escrutinio o caracterización se utiliza entonces para identificar los factores críticos del proceso y determinar la dirección de ajuste de estos factores a fin de obtener mejores respuestas. De este modo, un resultado del experimento podría ser la aplicación de técnicas tales como los diagramas de control a una o más variables del proceso, así como a su salida. Con el tiempo, si el proceso mejora lo suficiente, **suele ser posible basar la mayor parte del plan de control del proceso en la regulación de sus variables de entrada en vez de hacerlo en el análisis de diagramas de control de la salida.**^[4]

b) Optimización de procesos.

Después de determinar cuales variables del proceso influyen en la respuesta, un siguiente paso lógico es optimizar; esto es, determinar en que región los procesos importantes conducen a la mejor respuesta posible. Por ejemplo, si la respuesta es rendimiento, buscaríamos una región en que éste fuera máximo, mientras que si la respuesta es variabilidad en una dimensión crítica de un producto, buscaríamos una región de variabilidad mínima. Para localizar el intervalo de condiciones que generan la respuesta óptima, es necesario generar un experimento en el que se hagan variar simultáneamente los valores de las variables con mayor influencia en el proceso. Esto se denomina *diseño experimental factorial*.^[4]

c) Diseño de procesos.

Una vez que se han identificado niveles apropiados para los factores que se consideren de mayor importancia para el buen funcionamiento de un proceso, es posible diseñar un experimento que consista en



diversas combinaciones de niveles de los factores y probar el proceso prototipo a estas combinaciones. Ello proporcionará información acerca de qué factores influyen más en el proceso y mediante el análisis de esta información es posible mejorar el diseño de este último.^[4]

2.4.2. Principios básicos del diseño experimental.

El diseño estadístico de experimentos es el proceso de planear un experimento para obtener datos apropiados, que puedan ser analizados mediante métodos estadísticos, con objeto de producir conclusiones válidas y objetivas. Se requiere de un enfoque estadístico del diseño de experimentos para obtener conclusiones significativas a partir de los datos. La metodología estadística es el único enfoque objetivo para analizar un problema que involucre datos sujetos a errores experimentales. Así que hay dos aspectos en cualquier problema experimental: el diseño del experimento y el análisis estadístico de los datos.^[4]

Los tres principios básicos en el diseño de experimentos son los de obtención de réplicas, aleatorización y análisis por bloques:

La réplica se refiere a una repetición del experimento básico. Este concepto tiene dos propiedades importantes: en primer lugar permite al experimentador obtener una estimación del error experimental —tal estimación se convierte en la unidad básica para determinar si las diferencias observadas en los datos son estadísticamente significativas— y en segundo lugar, el uso de réplicas permite al experimentador calcular una estimación más precisa del efecto de un factor en el experimento si se usa la media de la muestra como una estimación de dicho efecto.^[4]

Los métodos estadísticos requieren que las observaciones (o los errores) sean variables aleatorias independientes. Se entiende por aleatorización al hecho de que tanto la asignación del material experimental como el orden en que se realizan las pruebas individuales se determinan aleatoriamente.^[4]

El análisis por bloques es una técnica que se utiliza para incrementar la precisión del experimento. Un bloque es una porción del material experimental que sea más homogénea que el total del material. Al realizarse un análisis por bloques se hacen las comparaciones entre las condiciones de interés del experimento dentro de cada bloque.^[4]

Durante todo este proceso es necesario tener presente que la experimentación es parte importante del proceso de aprendizaje, en la cual formulamos tentativamente hipótesis acerca de un sistema, realizamos experimentos para investigar dichas hipótesis y con base en los resultados, formulamos nuevas hipótesis. Esto significa que la experimentación es *iterativa* (reiterativa).^[4]

Suele ser un grave error diseñar un único experimento grande y amplio al inicio de un estudio. Para que un experimento sea exitoso es necesario conocer los factores importantes, los intervalos en los cuales deben hacerse variar estos factores, la cantidad adecuada de niveles por usar y las unidades de medida adecuadas para estas variables. Por lo general no se conocen a la perfección las respuestas a estas preguntas, sino que se aprende acerca de ellas a medida que se avanza. Conforme progresa un programa experimental, con frecuencia se eliminan algunas variables de entrada, se agregan otras, se modifica la región de exploración de algunos factores o se añaden nuevas variables de respuesta. En consecuencia, se suele experimentar secuencialmente, asegurándonos de no invertir todos los recursos disponibles en un primer diseño experimental. A menudo, estos esfuerzos iniciales constituyen solo experiencias de aprendizaje y parte de los recursos deben quedar disponibles para lograr los objetivos finales del experimento.^[4]

2.4.3. Algunos tipos de diseños.

Los diseños factoriales saturados, frecuentemente son utilizados en las pruebas de robustez de métodos de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), sin embargo, éstos se basan en varias suposiciones. Un diseño factorial completo recae en menos suposiciones y por tanto puede ser utilizado para evaluar la efectividad del diseño saturado.^[7]

Por muchos años, los diseños recomendados para la prueba de robustez fueron los diseños factoriales fraccionales saturados. Sin embargo otros diseños —completos, factoriales fraccionados y factoriales saturados, junto con los de compuesto central, Box-Behnken y diseños estrella —, pueden proveer soluciones más detalladas para algunas aplicaciones.^[7]



a) Diseños factoriales simétricos.

Un diseño de experimentos típico tiene 3 factores, cada uno con dos niveles (normalmente los valores máximo y mínimo para cada uno de los factores). Un experimento con 3 factores y 2 niveles cada uno, es llamado un **experimento factorial** 2^3 (o experimento de *Taguchi* L_8) y requiere 8 corridas:

| No. De corrida | Factor A | Factor B | Factor C |
|----------------|----------|----------|----------|
| 1 | - | - | - |
| 2 | + | - | - |
| 3 | - | + | - |
| 4 | + | + | - |
| 5 | - | - | + |
| 6 | + | - | + |
| 7 | - | + | + |
| 8 | + | + | + |

Tabla 4. Experimento de Taguchi L_8 ^[3] (+) Valor máximo; (-) Valor mínimo

En la **Tabla 4**, cada renglón representa una corrida experimental —un conjunto de condiciones de los tres factores—. Después de completar las 8 corridas anteriores y registrar la respuesta medida para cada corrida, se puede construir un modelo empírico para predecir el comportamiento del proceso, basado en el arreglo de estos factores.^[3]

Los diseños factoriales utilizados usualmente son **simétricos** ya que contienen sólo factores con el mismo número de niveles.^[8]

b) Diseños factoriales asimétricos.

Un diseño asimétrico, el cual es un diseño donde los factores tienen diferente número de niveles, puede obtenerse de la combinación de dos o más planos simétricos. Sin embargo, la mayoría de los diseños experimentales obtenidos de esta forma requieren de un gran número de experimentos. Los diseños asimétricos que requieren del mínimo número de experimentos pueden usarse empleando el principio del colapso de *Addelman*.^[37] Sin embargo para facilitar la construcción de diseños asimétricos, *Addelman* propone siete planos de efectos principales ortogonales básicos. Estos planos básicos consisten en diferentes diseños.^[8]

Según *Hund*^[8], para algunos factores los efectos críticos son muy diferentes en los distintos diseños. En general, los límites son superiores en un diseño asimétrico que en un diseño factorial fraccionado. Estas diferencias no son ilógicas puesto que las variaciones introducidas en los diseños asimétricos son más diversas que aquellas en el diseño factorial fraccionado. Al examinar varias columnas e instrumentos, se tiene una situación que apenas simula alguna reproducibilidad. Superpuestas a estas condiciones, se introducen las variaciones a los factores relacionados con el procedimiento. En contraste, en los diseños factoriales fraccionados, sólo ocurre lo último. Por lo tanto, puede esperarse un error experimental mayor en los diseños asimétricos.^[8]

c) Diseños factoriales completos.

Un diseño factorial completo puede estimar todas las interacciones de los efectos de orden superior. El número de experimentos requeridos para realizar un diseño factorial completo aumenta dramáticamente con el número de factores. Por ejemplo, un diseño de dos niveles para siete factores (2^7) requiere de 128 experimentos de los cuales 128 estadísticos pueden ser medidos al estimar los efectos que se muestran en la **Tabla 5**.^[7]



| Promedio | Efectos principales | Efectos de interacción | | | | | |
|----------|---------------------|------------------------|---------------|-----------------|----------------|---------------|----------------|
| | | Dos factores | Tres factores | Cuatro factores | Cinco factores | Seis factores | Siete factores |
| 1 | 7 | 21 | 35 | 35 | 21 | 7 | 1 |

Tabla 5. Número de efectos calculados de un diseño factorial completo de siete factores. ^[7]

En términos de magnitud absoluta, los efectos principales tienden a ser mayores que las interacciones entre dos factores, las cuales a su vez, son mayores que las interacciones trifactoriales y así sucesivamente. En algún punto es correcto decir que después de cierto orden los efectos de interacción se vuelven despreciables y pueden entonces ser omitidos en el diseño experimental. Para hacer esto, los diseños factoriales completos son fraccionados para permitir la estimación de sólo un cierto nivel de interacción entre los efectos. ^[7]

La prueba de robustez más detallada deberá involucrar la aplicación de un diseño factorial completo que pruebe todos los efectos principales y la interacción entre ellos. ^[7]

Los diseños factoriales completos pueden fraccionarse por la exclusión de experimentos diseñados para identificar efectos de orden superior y tales diseños reducidos se conocen como **diseños factoriales fraccionados**. Los diseños saturados se construyen sobre la premisa de que todos los efectos de las interacciones pueden asumirse como insignificantes y el número de experimentos se reduce ahora a $k+1$ factores. ^[7]

d) Diseños tipo Plackett-Burman.

Los diseños tipo Plackett-Burman para siete factores son los diseños más utilizados para pruebas de robustez de métodos HPLC. Para una prueba de robustez es esencial determinar si un método es robusto a muchos cambios más que determinar los valores de cada efecto. Aunque los diseños saturados asumen la interacción de los efectos como despreciable y sólo estiman los efectos principales, tienen una característica conocida como “confusión” (confounding) donde los efectos de mayor orden pueden sobrescribir los efectos principales. Entonces, si un método no es robusto a efectos de orden superior, éste deberá ser observado en los valores de los efectos principales. ^[7]

e) Diseños cruzados de Taguchi (Diseños Factoriales Fraccionados).

Taguchi recomienda el uso de arreglos ortogonales internos y externos para encontrar factores de diseño insensibles a la variación causada por fuentes incontroladas del medio. Para cada corrida experimental en el arreglo interno donde los factores primarios de diseño han variado en un cierto rango, se realiza otro arreglo de corridas externo, variando los factores del medio que puedan afectar el desempeño del producto. La mayoría de los arreglos internos y externos de Taguchi son **diseños factoriales fraccionados** clásicos de dos, tres, o multiniveles. En algunos de los diseños de Taguchi, los arreglos ortogonales internos son diseños altamente fraccionados, aunque los efectos principales de los factores del diseño se confunden con interacciones de dos factores. Si las interacciones entre los factores del diseño en efecto existen, el análisis de resultados es además confuso y engañoso. Unas pocas corridas de confirmación experimental posterior se recomiendan en la práctica cuando se utilizan diseños altamente fraccionados. Pero el experimento de confirmación no puede detectar factores de diseño significativos que no alcancen a estar en el primer lugar. Con el fin de estimar los efectos principales de los factores de diseño libres de interacciones entre dos factores, se requiere un diseño con resolución IV o superior en el arreglo interno. Debido a la configuración de arreglos-cruzados, el número total de corridas experimentales es el producto del tamaño de los arreglos externo e interno. Aún en el análisis de screening, para un sistema con muchos factores de diseño y ambientales, la configuración de arreglos-cruzados involucra también una gran cantidad de trabajo experimental. ^[13]

Algunos investigadores sugieren el uso de un arreglo simple en lugar de los arreglos cruzados de Taguchi. El uso de un arreglo simple ortogonal puede en ocasiones reducir las corridas experimentales y simplificar la confusa estructura, especialmente al liberar a los efectos principales de los factores de diseño de las interacciones entre dos factores. El arreglo sencillo se basa en diseños factoriales fraccionados tradicionales con el tamaño de corridas como potencia de dos (2^n). Este se construye ya sea al elegir los generadores de diseño cuidadosamente, de tal forma que los efectos deseados no se confundan o al asumir que



algunas interacciones entre dos factores son despreciables. Puesto que el plan experimental del arreglo simple se basa en el análisis detallado de la estructura confusa de diseños factoriales fraccionados con baja resolución, puede obtenerse un diseño eficiente para sólo ciertas combinaciones de los números de factores de diseño y ambientales.^[13]

2.4.4. Cómo elegir el tipo de diseño.

La principal limitación alrededor de la cual se diseña una prueba de robustez, es principalmente el número de factores y niveles que requieren probarse y en segundo lugar, el número de experimentos necesarios para un diseño experimental particular. Existe claramente un compromiso que necesita hacerse entre el estudio detallado provisto por diseños tales como factoriales completos y la eficiencia de los diseños reducidos tales como los diseños factoriales saturados. Es improbable que cualquier prueba de robustez pueda justificar los gastos de más de treinta experimentos, de hecho, es raro que se corran más de 20 experimentos.^[7]

Si un método de análisis es rápido o puede automatizarse totalmente y requiere que se prueben pocos factores (tres o menos), entonces pueden considerarse los diseños más largos. Una buena elección son los diseños de compuesto central o si se espera una respuesta lineal de un factor, un factorial completo a dos niveles. Estos largos diseños tienen la ventaja de permitir un estudio completo donde se estiman todos los efectos de las interacciones. Sin embargo, para la mayoría de las aplicaciones, el gran número de experimentos requeridos desalienta su uso. Cuando se necesita probar un gran número de factores entonces es más eficiente seleccionar uno de los factoriales saturados, teniendo en mente las limitaciones de estos diseños.^[7]

El hecho de que haya más cambios multivariados ocurriendo durante todo el diseño saturado resulta en mayores errores estándar para cada característica de HPLC. Este es un resultado importante ya que la variación de múltiples condiciones es más probable que se refleje en el uso diario del método de HPLC.^[7]

Ragonese^[7] ha demostrado que los resultados para los efectos principales calculados usando diferentes diseños son comparables. Sin embargo, el diseño saturado mostró mayores errores estándar, probablemente debido a los efectos de cambiar varios factores más. Un efecto de interacción se indicó como un efecto de “confusión” en el diseño saturado y esto se confirmó por el cálculo del mismo efecto de interacción usando el diseño completo.^[7]

2.5. DESARROLLO DEL MÉTODO.

2.5.1. Definición del problema.^[28]

Para poder seleccionar de un modo inteligente un método analítico, es esencial definir con claridad la naturaleza del problema analítico. Dicha definición requiere la respuesta de las siguientes cuestiones:

1. ¿Qué exactitud y precisión se requieren?
2. ¿De cuánta muestra se dispone?
3. ¿Cuál es el intervalo de concentración del analito?
4. ¿Qué componentes de la muestra interferirán?
5. ¿Cuáles son las propiedades físicas y químicas de la matriz de la muestra?
6. ¿Cuántas muestras deben analizarse?

La respuesta a la primera pregunta es de vital importancia ya que determina cuánto tiempo se precisará para el análisis. Las respuestas a las preguntas dos y tres determinan cuán sensible debe ser el método y a qué intervalo de concentraciones debe adaptarse. La respuesta a la pregunta cuatro determina la selectividad que requiere el método. Las respuestas a la pregunta cinco son importantes porque algunos de los métodos analíticos se aplican a disoluciones (normalmente acuosas) del analito. Otros se aplican con mayor facilidad a muestras gaseosas, mientras que unos terceros son adecuados para el análisis directo de sólidos.^[28] Desde un punto de vista económico, una consideración importante es el número de muestras que se tienen que analizar (pregunta seis). Si este número es elevado, se puede invertir una cantidad considerable de tiempo y dinero en la instrumentación, en el desarrollo del método y en la calibración. Además, si el número fuera muy elevado, debería elegirse un método que precisara del mínimo tiempo de operador por muestra.



Por otro lado, si sólo se tienen que analizar unas pocas muestras, la elección prudente suele ser la de un método más sencillo aunque sea más largo pero que requiera poco o ningún trabajo preliminar.^[28]

Teniendo en cuenta las respuestas a las cuestiones anteriores, puede escogerse un método, siempre que se conozcan las características de funcionamiento de los distintos métodos instrumentales de análisis.^[28]

2.5.2. Características de Funcionamiento de los Instrumentos.

Parámetros de Calidad.

En la **Tabla 6**^[28] se enumeran los criterios cuantitativos de funcionamiento de los instrumentos, criterios que pueden usarse para decidir si un determinado método instrumental es o no adecuado para resolver un problema analítico.

Estas características se expresan en términos numéricos que se denominan *parámetros de calidad*. Para un problema analítico dado, los parámetros de calidad permiten al químico reducir la elección de los instrumentos a tan sólo unos pocos. La selección entre éstos puede entonces basarse en los criterios cualitativos de funcionamiento señalados en la **Tabla 7**^[28]

| CRITERIO | PARÁMETRO DE CALIDAD |
|----------------------------|---|
| Precisión | Desviación Estándar Absoluta; Desviación Estándar Relativa; Coeficiente de variación; Varianza. |
| Exactitud | Error Absoluto Sistemático; Error Relativo Sistemático. |
| Sensibilidad | Sensibilidad de Calibración; Sensibilidad analítica. |
| Límite de detección | Blanco más tres veces la desviación Estándar del Blanco. |
| Intervalo de concentración | Concentración entre el límite de cuantificación (LOQ) y el límite de linealidad (LOL). |
| Selectividad | Coeficiente de Selectividad. |

Tabla 6. Criterios numéricos de los instrumentos para seleccionar métodos analíticos.^[28]

| |
|------------------------------------|
| Velocidad. |
| Facilidad y comodidad. |
| Habilidad del operador. |
| Costo y disponibilidad del equipo. |
| Costo por muestra. |

Tabla 7 Criterios cualitativos de los instrumentos para seleccionar métodos analíticos.^[28]

2.5.3. Desarrollo de métodos cromatográficos.

Los métodos cromatográficos utilizados para la cuantificación de principios activos y productos de degradación juegan un papel muy importante en el desarrollo de nuevos fármacos. Es de suma importancia que estos métodos analíticos sean robustos, con la finalidad de obtener resultados de la calidad más alta posible. Previamente se han usado diseños experimentales para optimizar separaciones cromatográficas, así como para estudios de robustez de métodos analíticos.^[9]

El desarrollo de un método cromatográfico incluye tres etapas. La primera de ellas involucra la selección de un espacio paramétrico satisfactorio, representado por los parámetros (factores) que tienen un efecto significativo sobre la calidad de la separación y sus valores relacionados.^[10]



La segunda etapa consiste en optimizar las condiciones analíticas. Se han desarrollado diferentes procedimientos de optimización y algunos de ellos están incorporados en paquetes de software comerciales. Hoy sin embargo, a pesar de su conveniencia, estas herramientas no tienen aún un gran éxito comercial.^[10]

La tercera etapa involucra el proceso de validación del método. Ésta involucra diferentes pruebas para asegurar la calidad del método analítico. Una de éstas es la prueba de robustez. Diferentes procedimientos pueden usarse para probar la robustez durante la validación del método. El método analítico generalmente es robusto cuando pequeños cambios deliberados en sus parámetros analíticos críticos producen consistentemente el mismo desempeño del método. Sin embargo, si se encuentra que el método analítico no es robusto, el desarrollo del método tiene que comenzar de nuevo desde la segunda etapa. Esta aproximación puede consumir mucho tiempo. Es posible evitar una gran cantidad de trabajo al evaluar la robustez durante la segunda etapa ya descrita.^[10]

La mayoría de los procedimientos de optimización para cromatografía de líquidos pertenecen a métodos interpretativos e incluyen dos pasos: modelaje y optimización.^[10]

a) Modelaje.

El primer paso consiste en modelar el comportamiento cromatográfico de los factores usando un mínimo de experimentos preliminares. Las condiciones óptimas consideradas por el procedimiento óptimo dependen en gran medida de la exactitud de los modelos matemáticos aplicados para describir el comportamiento de los factores. Numerosos trabajos tratan sobre la elección de modelos y la estrategia experimental para calcularlos. Estas elecciones obviamente están relacionadas con el tipo de factores que serán optimizados, pero también están generalmente relacionados con la extensión del espacio paramétrico.^[10]

b) Optimización.

El modelar el comportamiento de los solutos permite el cálculo de cromatogramas para cualquier valor del espacio paramétrico. El objetivo de este segundo paso (optimización) es la evaluación y comparación de la calidad de los cromatogramas simulados computarizados. Esto se realiza al usar una función de respuesta de buena calidad a fin de satisfacer los objetivos del operador.^[10]

c) Criterios elementales.

Dos criterios elementales, la calidad de separación y el tiempo de análisis, son usualmente de primer interés. El primero está relacionado con el desempeño del análisis, el segundo trata sobre el costo del análisis.^[10]

La resolución (Res) es un buen criterio para evaluar la calidad de la separación que permite tomar en cuenta un valor de umbral para el par de picos menos separados. El tiempo de análisis puede estar relacionado con el tiempo de retención (Tr) del último soluto eluido.^[10]

En adición a estos dos criterios elementales, es de gran interés la estimación de la robustez del método. La robustez puede caracterizarse por la capacidad del método para mantener su desempeño a pesar de las variaciones que pueden ocurrir cuando el método es implementado.

De acuerdo con esta definición, la robustez no puede ser rápidamente cuantificada. La robustez sólo puede ser cuantificada durante el procedimiento de validación. Un método robusto mantiene su desempeño al cambiar un parámetro operacional en una cantidad conocida, lo cual no es el caso para un método no robusto. La robustez, evaluada durante el proceso de validación, se comporta como una cantidad booleana (el método es robusto o no lo es). Sin embargo, es obvio que mientras mayor sea la posible variación en los valores paramétricos, el método será más robusto.

De acuerdo con lo anterior, la robustez puede incorporarse fácilmente a un procedimiento de optimización. La función correspondiente a la robustez será mucho mejor si puede variar con los valores de los factores de la misma forma en que lo hacen la resolución y el tiempo de análisis. En tal caso, es posible una relación estrecha entre estos tres diferentes criterios.^[10]



2.6. PROPIEDADES DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS.

Los medicamentos para la tos y el resfriado han estado disponibles para el consumidor como *over the counter* (OTC, sin receta) por varias décadas. Puesto que la completa prevención de infecciones inducidas por virus de la gripa no existe todavía, hay una abrumadora demanda de medicamentos OTC para el alivio de los síntomas del resfriado.^[25]

Estos medicamentos son usualmente combinaciones de analgésicos (e.g. *acetaminofén*), antitusivos (e.g. *bromhidrato de dextrometorfano*, *guaifenesina*), un antihistamínico (e.g. *maleato de clorfeniramina*, *clorhidrato de difenhidramina*, *succinato de doxilamina*) y un descongestivo nasal (e.g. *bitartrato o clorhidrato de fenilefrina*, *clorhidrato o sulfato de pseudoefedrina*, *clorhidrato de fenilpropanolamina*). Las formulaciones comunes de estos productos son soluciones o suspensiones y por lo tanto requieren de la adición de preservativos (e.g. *ácido benzoico*, *butilparabeno*).^[25]

Se han descrito en la literatura varios métodos analíticos para determinar estos compuestos en diferentes preparaciones farmacéuticas y muestras biológicas, ya sean monofármacos o mezclas de ellos. Sin embargo, la determinación simultánea de los ingredientes activos en un preparado farmacéutico multicomponente normalmente requiere el uso de técnicas de separación, tales como GC o HPLC, seguidas por la cuantificación.^[12]

2.6.1. Clorhidrato de fenilefrina.

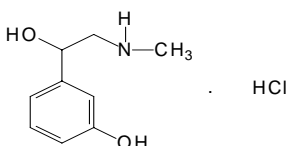


Figura 3. Clorhidrato de (R)-3-hidroxi- α -[(metilamino)metil]metanolbenceno^[21]
 $C_9H_{14}ClNO_2$ (MM 203.67)

La fenilefrina es un simpaticomimético, con efectos directos principalmente sobre receptores adrenérgicos.

El clorhidrato de fenilefrina (**Figura 3**) tiene actividad predominantemente α -adrenérgica y no tiene efectos estimulantes significativos sobre el SNC. Su actividad depresora es más débil que la de la noradrenalina, pero de mayor duración. Se utiliza como un descongestionante nasal en rinitis y sinusitis, una solución de 0.25 a 0.5 % a una dosis de 2-3 gotas en cada fosa nasal cada 3-4 horas; o de manera oral en dosis de 10 mg. 3-4 veces al día.^[60]

Como con muchos otros medicamentos, el reto es extraer cuantitativamente los analitos de matrices difíciles y analizarlos específicamente en presencia de varios excipientes y saborizantes. Históricamente, se han usado diferentes métodos analíticos para cada clase de analito (compuestos ácidos, básicos y neutros).

Sin embargo, se ha desarrollado ya un método simple, altamente selectivo de cromatografía líquida de fase reversa de par iónico de alto poder (RP-HPLC), para la determinación de aminas y preservativos en un amplio rango de productos Tylenol® líquido y suspensión líquida.

En este método, una fase móvil que consiste en un agente par-iónico amortiguado con acetonitrilo, metanol y tetrahydrofurano, se utilizó para separar las aminas cargadas de los compuestos ácidos y neutros sobre una columna analítica. Los analitos incluyen ácidos (ácido benzoico), bases (pseudoefedrina, clorfeniramina, dextrometorfano, doxilamina y difenhidramina) y compuestos neutros (butilparabeno). Se discuten los efectos del pH, la longitud de la cadena del reactivo par-iónico, la fuerza iónica y los modificadores orgánicos sobre la separación. El método es lineal de 15-150% de la cantidad marcada. El método optimizado probó ser específico, robusto y exacto para el análisis de los compuestos.^[25]



2.6.2. Maleato de Clorfeniramina.

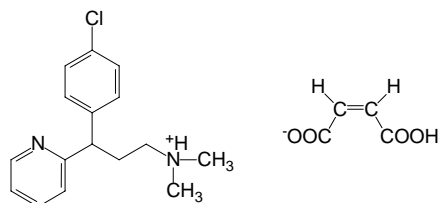


Figura 4. Maleato de γ - (4-Clorofenil)-N,N-dimetil-2-piridinpropanamina ^[21]
 $C_{16}H_{19}ClN_2 \cdot C_4H_4O_4$ (MM 390.86)

La clorfeniramina es uno de los más poderosos antagonistas de receptores H_1 (anti-histamina), ampliamente usado para alivio sintomático de resfriado común y rinitis alérgica, con propiedades sedantes débiles. ^[24]

La clorfeniramina es un racemato que contiene los enantiómeros (*R*) y (*S*). La actividad de la (*R*)-clorfeniramina es dos veces mayor que la de la (*S*)-clorfeniramina. La clorfeniramina (y la dexclorfeniramina) se utilizan en el tratamiento de alergias y cuando se administran oralmente proveen de alivio sintomático de la rinorrea, estornudos, irritación faríngea, lagrimeo y ardor de ojos asociados con la respuesta temprana a la histamina. ^[17]

Las moléculas quirales bioactivas pueden exhibir grandes diferencias en la actividad fisiológica de los dos enantiómeros, por lo tanto, la resolución de estos compuestos quirales es muy importante. La (*S*)-clorfeniramina provee de la actividad antihistamínica benéfica, mientras que (*R*)-clorfeniramina es en gran parte responsable de los efectos sedativos de este fármaco. ^[55] Las cada vez mayores restricciones de la *US Food and Drug Administration (FDA)* sobre el uso de fármacos racémicos ha impulsado la búsqueda de métodos más eficientes y menos costosos para resolver mezclas enantioméricas. ^[18]

Ciertos antihistamínicos siguen *auto-resolución*, esto es, las mezclas no racémicas son parcialmente resueltas simultáneamente usando fases móviles y estacionarias quirales. La auto-resolución también ha sido referida como reconocimiento quiral auto-inducido ^[56], auto-amplificación de la actividad óptica ^[57] o diferenciación enantiomérica inducida por enriquecimiento enantiomérico. ^[58]

A pesar de su amplio uso durante un largo periodo, relativamente pocos datos farmacocinéticos, muchas veces contradictorios, están disponibles para la clorfeniramina. ^[24] Para su análisis se han empleado varios métodos analíticos, incluyendo HPLC con detección UV ^[69,70] o fluorescencia ^[71], radioinmunoensayo ^[72] o cromatografía gas-líquido ^[73,74], pero, como una principal desventaja, muchos de estos métodos requieren derivatización y/o varios pasos de extracción, lo cual los hace tediosos y tardados. ^[24]

Un método analítico para la determinación de paracetamol y clorfeniramina en plasma humano se ha desarrollado, validado y aplicado al análisis de muestras de una prueba clínica fase I. El método analítico consiste en la extracción de paracetamol y clorfeniramina con éter dietílico, seguida por la determinación de ambos fármacos por un método LC-MS-MS (cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem), usando 2-acetamidofenol como estándar interno. ^[24]

El uso de LC-MS-MS permite la medición simultánea, exacta, precisa y confiable, de la concentración de paracetamol y clorfeniramina en plasma humano después de su administración oral a voluntarios sanos. La valoración probó ser rápida y robusta, con cada muestra requiriendo menos de 4.5 min de tiempo de corrida. El método de valoración es específico debido a la inherente selectividad de la espectrometría de masas.

Las principales ventajas de éste método son la preparación simple y la rapidez de la separación. ^[24]

El maleato de clorfeniramina, –CPM– (**Figura 4**), es un derivado alquilamina con las acciones y usos de las antihistaminas. Se utiliza solo o con **clorhidrato de fenilefrina** y guaifenesina para el tratamiento sintomático del resfriado debido a bronquitis aguda o crónica y condiciones alérgicas bronquiales. ^[23]

Se han reportado varios métodos para el análisis de CPM. En la Farmacopea de Japón (XII ed.) ^[34], se utiliza un método colorimétrico, la medición del rango de fusión y el análisis por espectroscopía de absorción infrarroja (IR) para la prueba de identificación y TLC para la prueba de pureza. Para la



determinación cuantitativa de CPM se utilizan métodos de titulación no acuosa y espectrofotometría UV; algunos de estos métodos fueron también adoptados por la Farmacopea de los Estados Unidos ^[32] y por la Farmacopea Británica ^[35].

Se ha desarrollado un tipo de HPLC de fase reversa de par iónico, usando ácido heptanosulfónico como reactivo par-iónico para el análisis de CPM.^[52] Un contra-ión aniónico como el ácido 1-octanosulfónico o lauril sulfato se ha utilizado también para el control de calidad del CPM fabricado para la industria farmacéutica.^[16] Estos métodos están en cualquier caso enfocados sólo al análisis de clorfeniramina, la mitad básica débil del CPM. ^[16] Yamato ^[53], ha examinado cuidadosamente el comportamiento de elusión de ácidos dicarboxílicos como el málico oxálico, malónico, succínico, glutárico, adípico, fumárico y *maléico*, basándose en HPLC de fase reversa de par-iónico, usando varias fases móviles conteniendo fosfato de tetra-n-butilamonio (TBAP) como un reactivo par-iónico. Es muy interesante el resultado de que el ácido maléico (MA) se retiene fuertemente en el lecho de la columna. ^[16]

El análisis propuesto es simple, rápido y conveniente y ofrece no sólo un análisis cuantitativo sino también la identificación y prueba de pureza de un producto del CPM. ^[16]

El Maleato de Clorfeniramina ha sido determinado por titulación complejométrica en cápsulas (*Qin et al* ^[38]) y por espectrofotometría UV (*USP 23 ed* ^[39]).

2.6.3. Mezcla de los principios activos.

Según *Erk* ^[23], **la mezcla de maleato de clorfeniramina y clorhidrato de fenilefrina no es oficial todavía en ninguna farmacopea** y no hay métodos analíticos que puedan seguirse para el análisis de la combinación de ambos fármacos en forma farmacéutica, por lo que es necesario desarrollar un método rápido y confiable para la valoración simultánea de éstos en la mezcla.

Se han reportado varios métodos en la literatura proponiendo técnicas rápidas y confiables para separar los ingredientes de productos OTC para el resfriado. ^[75-78] Sin embargo, varios de estos métodos son sólo para unas cuantas aminas activas y no incluyen a los preservativos en la separación. ^[19,79]

La presencia de diferentes clases de activos (neutros, aminas y ácidos carboxílicos) y la disparidad en concentración y matriz, supone todo un reto analítico. Típicamente, varios métodos se utilizan para analizar una mezcla: la cromatografía de intercambio iónico o de fase reversa de par-iónico separa las aminas, mientras que para los otros activos se usan diferentes métodos de fase reversa, lo cual es normalmente largo y costoso. ^[25] Tratando de evitar esto, se han realizado análisis por HPLC de formas farmacéuticas que contienen analgésicos y compuestos relacionados (ácido acetilsalicílico, paracetamol, propifenazona, cafeína y **clorfeniramina**), con columnas ciano y C₁₈ bajo condiciones de fase reversa.

El uso de detección con arreglo de diodos (DAD) en análisis por HPLC ha ganado gran popularidad en los últimos años. Además, el desempeño de los métodos aumentó al introducir una derivatización fotoquímica de post-columna en línea, en combinación con la DAD. La rápida adquisición de los espectros (en los modos de absorción y derivada) permite el trabajo cualitativo en pruebas de control de calidad y estabilidad. ^[26]

En esta técnica, el efluente de la columna se sujeta a irradiación UV (254 nm) con un tubo capilar PTFE (fotorreactor) colocado en línea entre la columna y el detector. Por la radiación UV, la mayoría de los analitos examinados sufre modificaciones estructurales selectivas, resultando en propiedades espectrales alteradas. En particular, la propifenazona y la **clorfeniramina** muestran ser altamente fotosensibles, dando espectros UV significativamente diferentes antes y después de la irradiación UV. Como consecuencia, los cromatogramas obtenidos a 275 nm con el reactor encendido y apagado, muestran cambios significativos en la intensidad de los picos. La conocida eficacia de la DAD en confirmar la identidad del pico se ve aumentada al ser posible la obtención de dos espectros UV para cada analito. Las modificaciones espectrales fotoinducidas características son útiles en la identificación sin ambigüedad de los compuestos analgésicos. ^[26]

Típicamente los compuestos básicos como la fenilefrina ($pK_{a1} = 8.9$; $pK_{a2} = 10.1$) ^[15] y la clorfeniramina ($pK_a = 9.2$) ^[15], exhiben un severo coelution en el pico, bandas anchas y número de platos teóricos pequeño. Además, la retención a menudo varía de columna a columna y suelen observarse cambios dramáticos en la separación con la edad de la columna. Estos cambios varían con la estructura de los compuestos básicos a ser separados y son comúnmente adscritos como “*efectos silanol*”. Estos efectos se deben principalmente a la interacción del fármaco básico con los silanoles libres y/o metales pesados. ^[44] Por éstas razones, en el desarrollo de métodos HPLC se incluye un estudio de la retención de estos compuestos usando diferentes fases móviles que contienen distintos modificadores orgánicos y hexilamina. Este estudio



debe incluir también un método de pre tratamiento de muestra para enfrentarse a la formulación farmacéutica.^[12] Así pues, se han desarrollado muchos métodos para reducir (o eliminar) manifestaciones desfavorables debidas a la retención silanofílica de varios solutos básicos en RP-HPLC al adicionar surfactantes^[45] y aminas^[46-48] al eluyente.

En un estudio sobre la separación por HPLC de fármacos básicos, *Gasco-López*^[49] adicionó hexilamina (7.5 mM) como modificador a una fase móvil conteniendo acetonitrilo—ácido fosfórico (el pH se ajustó a 3.2) y encontró que es un excelente aditivo para enmascarar los silanoles cuando se usa una columna Spherisorb C₁₈. Bajo tales condiciones, una efectividad relativa de 100% se le asignó a la hexilamina cuando se comparó con otras aminas de diferente estructura y concentración, debido a que proporciona los tiempos de retención más bajos. Sobre esta base, con el fin de prevenir la retención silanofílica, se han probado diferentes fases móviles conteniendo ácido fosfórico—hexilamina 4.5mM (pH 3) y metanol, tetrahidrofurano o acetonitrilo, como modificadores orgánicos.^[12]

Se han propuesto así varios procedimientos de cromatografía de líquidos de fase reversa (RP-HPLC) para el análisis de la combinación de **clorfeniramina** y fenetilaminas^[17], los cuales utilizan columnas ciano o C₁₈ y fases móviles que contienen de 1-3 solventes orgánicos y agua (v/v), como por ejemplo:

- Clorfeniramina / fenilefrina (60:2:38 acetonitrilo:metanol:agua)^[43] ó (70:30 acetonitrilo-agua).^[51]
- Clorfeniramina / fenilpropanolamina (37:30:30:3 acetonitrilo:metanol:tetrahidrofurano:agua)^[54], (75:10:15 acetonitrilo:metanol:agua)^[59], (71:5:24 metanol:tetrahidrofurano:agua)^[68] ó (55:25:20 acetonitrilo:metanol:agua).^[76]
- Clorfeniramina / pseudoefedrina (12:88 acetonitrilo:hexilamina 4.5 mM).^[12]

Simultáneamente, se ha estudiado el comportamiento cromatográfico de estas mismas mezclas de activos, utilizando columnas C₁₈, fases móviles micelares de dodecil sulfato de sodio (SDS) y pentanol; con detección UV.^[17] La cromatografía de líquidos micelar (MLC) ha demostrado ser una útil técnica en el control de diversos grupos de fármacos tales como sulfonamidas, esteroides, diuréticos, β-bloqueadores y benzodiazepinas. En la MLC, el comportamiento de retención de los compuestos puede predecirse con gran exactitud, lo cual simplifica la optimización de la composición de la fase móvil. El modificador orgánico más común es el propanol, pero el uso de otros alcoholes tales como el butanol y pentanol puede ser más conveniente para disminuir los tiempos de retención.^[17]

La clorfeniramina es un compuesto poco polar ($\log P_{o/w} = 2.73$), mientras que las fenetilaminas son polares ($\log P_{o/w} = -0.09 - 1.19$). Sin embargo, a pesar de la gran diferencia de hidrofobicidad, la fuerza de elusión de la fase móvil micelar es similar para ambos tipos de fármacos, debido a la fuerte asociación de las fenetilaminas con los monómeros de surfactante adsorbidos sobre la fase estacionaria, lo cual incrementa su retención. Para este tipo de compuestos, los tiempos de retención son muy altos con fases móviles micelares puras (sin modificadores orgánicos) o fases móviles micelares sin propanol o butanol como modificadores. Por esta razón, es conveniente seleccionar un solvente fuerte, como el pentanol, para disminuir la retención de los fármacos. El tiempo de análisis, tomado como el tiempo necesario para que eluya completamente el último compuesto retenido en las mezclas de clorfeniramina y fenetilamina es de al rededor de 28 min para la fase móvil más débil (SDS 0.05M - pentanol 2%) y de 7 min para la fase móvil más fuerte (SDS 0.15M - pentanol 6%). En este estudio, no se observa interferencia por parte de otros fármacos que pudieran estar presentes en los medicamentos tales como el ácido acetil salicílico, ácido ascórbico, betametasona, cafeína, fosfato de codeína, difenhidramina, lactosa, paracetamol y prednisolona.^[17]

Las combinaciones de fármacos estudiadas requieren de una gran cantidad de metanol para ser eluidas de la columna en el RP-HPLC convencional. En contraste, el procedimiento propuesto usa una mucho menor cantidad de solvente orgánico (pentanol), el cual es altamente retenido en la solución de SDS, siendo también menos tóxico que el metanol.^[17]

La espectrofotometría derivada es un útil medio para resolver dos espectros que se traslapan y eliminar interferencias de matriz en la valoración de mezclas de dos componentes^[61]. Por su parte, la espectrofotometría diferencial ha probado ser una técnica poderosa para la determinación de fármacos^[62-64], así como en la detección y determinación de productos de degradación.^[65]

La espectrofotometría derivada-diferencial ofrecerá ventajas adicionales al cancelar interferencias espectrales en el análisis de fármacos.^[66,67] El método tiene suficiente exactitud y precisión y permite una valoración simple y rápida de maleato de clorfeniramina y clorhidrato de fenilefrina en una mezcla.^[23]



3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

Se evaluaron los cambios controlados de algunos de los factores con influencia potencialmente más significativa en la eficiencia de la técnica: la velocidad de flujo (A), el pH de la fase móvil (B), la longitud de la columna cromatográfica (C) y el tamaño de partícula de la fase estacionaria dentro de la columna (D); sobre algunas de las respuestas características del método: el tiempo de retención (T_r), la resolución (Res), el número de platos teóricos (N) y la simetría (Sim).

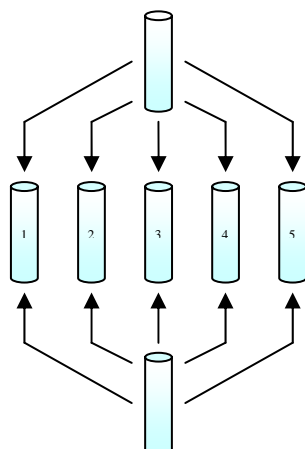
El procedimiento analítico empleado para la valoración simultánea de Clorhidrato de Fenilefrina y Maleato de Clorfeniramina, se detalla a continuación:

3.1. REACTIVOS.

- *Solución de hidróxido de sodio (NaOH) 2N.*
Pesar 8.0 g de hidróxido de sodio, disolver con aproximadamente 50 mL de agua desionizada y dejar enfriar a temperatura ambiente. Transferir a un matraz volumétrico de 100 mL y aforar.
- *Solución amortiguadora de fosfatos (H_3PO_4/NaH_2PO_4) 0.05M.*
Pesar aproximadamente con exactitud 3.91 g de fosfato monobásico de sodio monohidratado ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$), transferir a un matraz volumétrico de 1000 mL y disolver con aproximadamente 500 mL de agua desionizada. Adicionar lentamente 1.4 mL de ácido orto – fosfórico concentrado ($\sigma - H_3PO_4$), ajustar al pH de trabajo (3 ó 4 según corresponda de acuerdo a el diseño experimental) con la solución de NaOH 2N y llevar a volumen con agua desionizada. Filtrar la solución con vacío a través de una membrana para solventes acuosos de 0.45 μm o equivalente.
- *Solución “stock” de clorhidrato de fenilefrina.*
Pesar aproximadamente con exactitud el equivalente a 25 mg de clorhidrato de fenilefrina S de Ref, transferir a un matraz volumétrico de 25 mL y disolver con 5-10 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.05M ajustada al pH de trabajo, con agitación en vortex durante 30 s. Llevar a volumen con la misma solución amortiguadora de fosfatos 0.05M. La concentración de esta solución es de 1 mg/mL.
- *Solución “stock” de maleato de clorfeniramina.*
Pesar aproximadamente con exactitud el equivalente a 20 mg de maleato de clorfeniramina S de Ref, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL y disolver con aproximadamente 50 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.05M ajustada al pH de trabajo, con agitación en vortex durante 30 s. Llevar a volumen con la misma solución amortiguadora de fosfatos 0.05M. Esta solución tiene una concentración de 0.2 mg/mL.
- *Curva estándar.*
A partir de las soluciones “stock” anteriores, se prepara una curva estándar según el siguiente esquema de diluciones (**Figura 5** y **Tabla 8**).



Solución "Stock" de Clorhidrato de fenilefrina



Solución "Stock" de Maleato de clorfeniramina

Figura 5. Esquema de diluciones.

| Matraz | Volumen de solución "Stock" de Clorhidrato de fenilefrina (1.0 mg/mL) | Volumen de solución "Stock" de Maleato de clorfeniramina (0.2 mg/mL) | Volumen de Solución amortiguadora de fosfatos 0.05M (pH 3 ó 4) | Volumen final (Aforo) | Concentración final de Clorhidrato de fenilefrina (µg/mL) | Concentración final de Maleato de clorfeniramina (µg/mL) |
|--------|---|--|--|-----------------------|---|--|
| Blanco | 0 | 0 | 10 mL | 10 mL | 0 | 0 |
| 1 | 1 mL | 1 mL | 98 mL | 100 mL | 10 | 2 |
| 2 | 1 mL | 1 mL | 48 mL | 50 mL | 20 | 4 |
| 3 | 1 mL | 1 mL | 23 mL | 25 mL | 40 | 8 |
| 4 | 2 mL | 2 mL | 21 mL | 25 mL | 80 | 16 |
| 5 | 3 mL | 3 mL | 19 mL | 25 mL | 120 | 24 |

Tabla 8. Esquema de diluciones.

3.2. EQUIPO.

El cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución utilizado, *Agilent Technologies Modelo HP S-1100*, (Foto 1), está equipado con:

- Bomba cuaternaria G1311A
- Desgasificador en línea G1322A
- Inyector automático de 100 posiciones G1313A
- Termostato para columna G1316A
- Detector de longitud de onda variable G1314A
- Centro de trabajo: Computadora HP vectra con tarjeta 82341C HP 1-B con software de control HPChem



Foto 1. HPLC HP S-1100



Las columnas cromatográficas utilizadas se muestran en la **Tabla 9**:

| | 1. WATERS Nova-Pack® C18 (Cartucho)^[40] | 2. WATERS Spherisorb® S30DS2 (C18)^[40] | 3. AGILENT Zorbax® Eclipse XDB-C18^[41] | 4. AGILENT Zorbax® Extend-C18^[41] |
|-----------------------|---|--|--|--|
| Tamaño de partícula | 4 µm | 3 µm | 3.5 µm | 5 µm |
| Dimensiones | 3.9 mm × 150 mm | 4.6 mm × 50 mm | 4.6 mm × 150 mm | 4.6 mm × 50 mm |
| Catálogo (Part.No) | WAT 36975 | PSS 832911 | 963967-902 | 746450-902 |
| Forma de la partícula | Esférica | Esférica | — | — |
| Tamaño de poro | 60 Å | 80 Å | 80 Å | 80 Å |
| Carga de carbono | 7 % | 11.5 % | 10 % | 12.5 % |
| Encapuchado | Si | Si | Doble | Triple |
| Rango de pH | — | — | 2 – 9 (recomendado 3-8) | 2-11.5 (rec. 8-11.5) |
| Límite de temperatura | — | — | 40°C (60°C máx.) | 60 °C |
| Descripción | — | — | Rápida resolución | Analítica |
| Aplicaciones | — — — — — | — — — — — | Fármacos (ácidos, básicos, neutros) separados por pH | Compuestos básicos a altos pH; separaciones de péptidos con MS limpio; compuestos solubles o estables sólo a estos pH. |

Tabla 9. Columnas cromatográficas^[40,41]

Otro equipo empleado fue:

- Balanza analítica: Sartorius A210P
- Fuente de agua desionizada: Milli- Q Water System
- Potenciómetro: Orion Research
- Membranas (filtros): Millipore 5 micras
- Ultrasonido: Branson 5210
- Vortex Thermolyne, Sybron

3.3. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

- Fase móvil: Solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, ajustada al pH de trabajo (3 ó 4 según corresponda), desgasificada al mantenerse bajo ultrasonido durante 10 minutos por litro, después de su preparación.
- Muestra: Curva estándar
- Volumen de inyección: 20 µL
- Longitud de onda de detección (λ): 223 nm.
- Temperatura: ambiente (22° C – 28° C)

3.4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

3.4.1. Definición de factores.

El estudio se realizó considerando dos niveles para cada factor, denominando a estos como valor mínimo y valor máximo, siendo estos seleccionados sobre la base de las recomendaciones de los tutores, así como de la comprensión de la técnica analítica. **Por disponibilidad, la columna 1 se consideró como si fuera de 15 cm de longitud, 5 µm de tamaño de partícula y 4.6 mm de diámetro interno. Así mismo la columna 3 fue considerada como de 15 cm, 3 µm y 4.6 mm.** (Ver Tabla 9).

En la **Tabla 10** se muestran los factores seleccionados para este estudio y sus respectivos niveles:



| | (A) Flujo (mL/min) | (B) pH | (C) Longitud de columna (cm) | (D) Tamaño de partícula (µm) |
|--------------|--------------------|--------|------------------------------|------------------------------|
| Valor mínimo | 0.6 | 3 | 5 | 3 |
| Valor máximo | 1.0 | 4 | 15 | 5 |

Tabla 10. Definición de factores y sus niveles.

Cabe recordar aquí que un método es más robusto mientras más amplio sea el rango comprendido entre sus niveles, pero si éste es demasiado grande, el método puede no ser lineal en todo el rango. Debe entonces comenzarse con un rango corto e incrementar paulatinamente la distancia entre los niveles, comprobando cada vez la linealidad. Sin embargo, esto último está fuera del alcance de este trabajo.

3.4.2. Diseño experimental.

Por medio del software STATGRAPHICS® se aleatorizó un diseño experimental factorial 2^4 ó de Taguchi L_{16} ; donde el 4 representa el número de factores que se controlan durante los experimentos y el 2 el número de niveles que tiene cada uno de esos factores.

El diseño consta entonces de 16 experimentos o corridas experimentales aleatorias, en cada una de las cuales se establece un conjunto único de condiciones de los cuatro factores. (**Tabla 11**).

| Bloque | Corrida | (A) Flujo (mL/min) | (B) pH | (C) Long. de col. (cm) | (D) Tam. Part. (µm) |
|--------|---------|--------------------|--------|------------------------|---------------------|
| 1 | 1 | 0.6 | 4 | 15 | 3 |
| 1 | 2 | 1.0 | 4 | 5 | 3 |
| 1 | 3 | 1.0 | 4 | 15 | 5 |
| 1 | 4 | 0.6 | 3 | 5 | 5 |
| 1 | 5 | 1.0 | 3 | 15 | 5 |
| 1 | 6 | 0.6 | 3 | 15 | 5 |
| 1 | 7 | 1.0 | 4 | 5 | 5 |
| 1 | 8 | 1.0 | 3 | 15 | 3 |
| 1 | 9 | 1.0 | 3 | 5 | 5 |
| 1 | 10 | 1.0 | 4 | 15 | 3 |
| 1 | 11 | 0.6 | 4 | 15 | 5 |
| 1 | 12 | 1.0 | 3 | 5 | 3 |
| 1 | 13 | 0.6 | 4 | 5 | 3 |
| 1 | 14 | 0.6 | 3 | 15 | 3 |
| 1 | 15 | 0.6 | 4 | 5 | 5 |
| 1 | 16 | 0.6 | 3 | 5 | 3 |
| 2 | 17 | 0.6 | 4 | 15 | 3 |
| 2 | 18 | 1.0 | 4 | 5 | 3 |
| 2 | 19 | 1.0 | 4 | 15 | 5 |
| 2 | 20 | 0.6 | 3 | 5 | 5 |
| 2 | 21 | 1.0 | 3 | 15 | 5 |
| 2 | 22 | 0.6 | 3 | 15 | 5 |
| 2 | 23 | 1.0 | 4 | 5 | 5 |
| 2 | 24 | 1.0 | 3 | 15 | 3 |
| 2 | 25 | 1.0 | 3 | 5 | 5 |
| 2 | 26 | 1.0 | 4 | 15 | 3 |
| 2 | 27 | 0.6 | 4 | 15 | 5 |
| 2 | 28 | 1.0 | 3 | 5 | 3 |
| 2 | 29 | 0.6 | 4 | 5 | 3 |
| 2 | 30 | 0.6 | 3 | 15 | 3 |
| 2 | 31 | 0.6 | 4 | 5 | 5 |
| 2 | 32 | 0.6 | 3 | 5 | 3 |

Tabla 11. Diseño experimental.



El diseño se reproduce a su vez en un segundo bloque, en donde a cada corrida en el primero corresponde una réplica en el segundo, entendiendo que tales réplicas son también aleatorias.

Durante la realización de cada corrida, bajo las condiciones cromatográficas establecidas en (3.3.), se inyecta por duplicado la curva estándar, —consistente en un blanco de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M ajustada al pH de trabajo y las cinco concentraciones estándar diferentes—, dejando un periodo de estabilización de 10-15 min. (o más si es necesario) tanto al inicio de la corrida como antes de la inyección de la segunda curva.

3.4.3. Registro y Análisis de Resultados.

Se registraron las siguientes respuestas para cada corrida: tiempos de retención (Tr1 y Tr2), número de platos teóricos (N1 y N2), simetría (Sim1 y Sim2) y resolución (Res). Se definió como (1) a aquel pico que eluyó más rápido (Maleato de Clorfeniramina) y como (2) al que eluyó al final (Clorhidrato de fenilefrina).

Para cada una de las respuestas mencionadas, mediante el uso del software STATGRAPHICS®:

- Se evaluó el efecto de los factores principales, así como de las interacciones entre ellos hasta un segundo nivel; resaltando los efectos estadísticamente significativos.
- Se comprobó la idoneidad del modelo matemático que la describe, lo que justifica la validez de los resultados obtenidos.
- Se analizó la Robustez del método, presentando la ecuación del modelo y detallando su utilidad para efectos prácticos, como la predicción de los valores de cada respuesta al ajustar el diseño de experimentos a la ecuación del modelo y la optimización de resultados, al calcular los niveles óptimos de cada factor que permiten mejorar la calidad analítica.

Para ejemplificar la utilidad práctica del diseño de experimentos, mediante el software STATGRAPHICS® se combinaron las respuestas más importantes del sistema (Res y Tr 2) para predecir los niveles de los factores que nos permitirán generar de manera simultánea los valores más adecuados para estas respuestas.

Finalmente, se proponen las condiciones más adecuadas para reproducir el método dependiendo de la calidad de la muestra analizada.



4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS.

| Bloque | Corrida | (A) Flujo (mL/min) | (B) pH | (C) Long. de col. (cm) | (D) Tamaño de Partícula (µm) | Archivos | Tr 1 | Tr 2 | Sim 1 | Sim 2 | N 1 | N 2 | Resol |
|--------|---------|--------------------|--------|------------------------|------------------------------|--------------|------|------|-------|-------|------|------|-------|
| 1 | 1 | 0.6 | 4 | 15 | 3 | 160701 08-19 | 2.3 | 3.3 | 0.64 | 0.46 | 4940 | 4537 | 5.52 |
| 1 | 2 | 1 | 4 | 5 | 3 | 200601 07-18 | 1.2 | 3.2 | 0.75 | 0.57 | 1589 | 2034 | 9.76 |
| 1 | 3 | 1 | 4 | 15 | 5 | 110701 07-18 | 1.8 | 3.5 | 0.72 | 0.51 | 3799 | 3377 | 9.60 |
| 1 | 4 | 0.6 | 3 | 5 | 5 | 170701 86-97 | 0.9 | 1.1 | 0.61 | 0.62 | 665 | 814 | 1.60 |
| 1 | 5 | 1 | 3 | 15 | 5 | 060701 07-18 | 1.8 | 3.4 | 0.63 | 0.54 | 3223 | 3479 | 8.81 |
| 1 | 6 | 0.6 | 3 | 15 | 5 | 060701 19-30 | 3.0 | 5.7 | 0.57 | 0.49 | 3559 | 3894 | 9.34 |
| 1 | 7 | 1 | 4 | 5 | 5 | 170701 47-58 | 0.5 | 0.7 | 0.82 | 0.72 | 574 | 729 | 1.57 |
| 1 | 8 | 1 | 3 | 15 | 3 | 160701 41-52 | 1.4 | 2.0 | 0.72 | 0.55 | 3909 | 4336 | 4.93 |
| 1 | 9 | 1 | 3 | 5 | 5 | 130701 27-38 | 0.5 | 0.7 | 0.85 | 0.94 | 609 | 724 | 1.34 |
| 1 | 10 | 1 | 4 | 15 | 3 | 120701 25-36 | 1.4 | 1.9 | 0.75 | 0.57 | 3835 | 4048 | 4.68 |
| 1 | 11 | 0.6 | 4 | 15 | 5 | 110701 19-30 | 3.0 | 5.8 | 0.64 | 0.45 | 4519 | 3814 | 10.38 |
| 1 | 12 | 1 | 3 | 5 | 3 | 050701 01-12 | 1.2 | 3.0 | 0.68 | 0.59 | 1726 | 2239 | 9.60 |
| 1 | 13 | 0.6 | 4 | 5 | 3 | 070601 01-12 | 1.9 | 4.8 | 0.73 | 0.55 | 1870 | 2236 | 10.11 |
| 1 | 14 | 0.6 | 3 | 15 | 3 | 160701 66-77 | 2.3 | 3.2 | 0.62 | 0.47 | 4757 | 4605 | 5.14 |
| 1 | 15 | 0.6 | 4 | 5 | 5 | 170701 22-33 | 0.9 | 1.2 | 0.69 | 0.59 | 682 | 848 | 1.92 |
| 1 | 16 | 0.6 | 3 | 5 | 3 | 080601 01-12 | 1.9 | 4.7 | 0.64 | 0.56 | 1897 | 2432 | 9.93 |
| 2 | 17 | 0.6 | 4 | 15 | 3 | 180701 07-18 | 2.6 | 4.1 | 0.67 | 0.44 | 5799 | 5249 | 8.14 |
| 2 | 18 | 1 | 4 | 5 | 3 | 190601 01-12 | 1.2 | 3.1 | 0.78 | 0.62 | 1783 | 2333 | 10.14 |
| 2 | 19 | 1 | 4 | 15 | 5 | 250601 07-18 | 1.7 | 3.4 | 0.77 | 0.53 | 3666 | 3270 | 9.32 |
| 2 | 20 | 0.6 | 3 | 5 | 5 | 190701 45-56 | 0.9 | 1.1 | 0.70 | 0.62 | 676 | 862 | 1.63 |
| 2 | 21 | 1 | 3 | 15 | 5 | 040701 01-12 | 1.8 | 3.4 | 0.68 | 0.55 | 3220 | 3389 | 8.73 |
| 2 | 22 | 0.6 | 3 | 15 | 5 | 040701 19-30 | 3.0 | 5.7 | 0.57 | 0.50 | 3361 | 3685 | 9.08 |
| 2 | 23 | 1 | 4 | 5 | 5 | 190701 20-31 | 0.6 | 0.7 | 0.82 | 0.71 | 584 | 766 | 1.61 |
| 2 | 24 | 1 | 3 | 15 | 3 | 180701 20-31 | 1.6 | 2.5 | 0.72 | 0.52 | 4519 | 4783 | 7.24 |
| 2 | 25 | 1 | 3 | 5 | 5 | 170701 67-78 | 0.6 | 0.7 | 0.83 | 0.73 | 568 | 730 | 1.49 |
| 2 | 26 | 1 | 4 | 15 | 3 | 160701 27-38 | 1.4 | 2.0 | 0.74 | 0.55 | 4081 | 4276 | 5.20 |
| 2 | 27 | 0.6 | 4 | 15 | 5 | 120701 01-12 | 2.9 | 5.8 | 0.63 | 0.49 | 3630 | 3464 | 9.70 |
| 2 | 28 | 1 | 3 | 5 | 3 | 170701 01-12 | 1.2 | 3.0 | 0.64 | 0.55 | 1747 | 2363 | 9.73 |
| 2 | 29 | 0.6 | 4 | 5 | 3 | 100701 20-31 | 1.9 | 5.1 | 0.62 | 0.48 | 1874 | 2311 | 10.50 |
| 2 | 30 | 0.6 | 3 | 15 | 3 | 180701 39-50 | 2.6 | 4.1 | 0.64 | 0.45 | 5520 | 5211 | 7.64 |
| 2 | 31 | 0.6 | 4 | 5 | 5 | 190701 07-18 | 0.9 | 1.2 | 0.70 | 0.59 | 695 | 882 | 1.88 |
| 2 | 32 | 0.6 | 3 | 5 | 3 | 050701 20-31 | 2.0 | 5.1 | 0.65 | 0.55 | 1914 | 2291 | 9.99 |

Tabla 12. Resultados obtenidos para cada respuesta.

| 1 : Maleato de Clorfeniramina | | 2 : Clorhidrato de Fenilefrina | |
|-----------------------------------|------------------------|--|---|
| Tr : Tiempo de retención promedio | Sim: Simetría promedio | N : Número de platos teóricos promedio | Resol: Resolución promedio (2 respecto a 1) |



En la **Tabla 12** se muestran los resultados calculados por respuesta en cada una de las corridas del diseño. Estos resultados son el promedio de los resultados obtenidos en las diez inyecciones realizadas durante cada corrida (dos repeticiones de la curva estándar).

Las **Figuras 6 y 7**, son una muestra de los cromatogramas obtenidos durante la realización de este estudio. Los cromatogramas típicos para cada corrida se pueden revisar en el **ANEXO 1**.

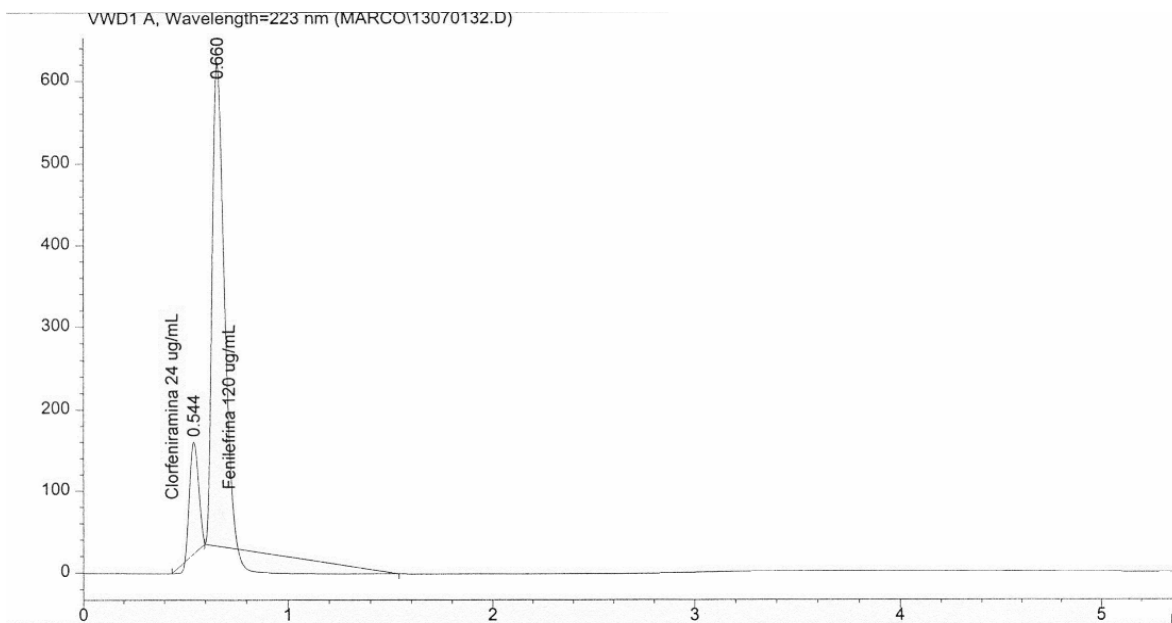


Figura 6. Cromatograma típico corrida 9.

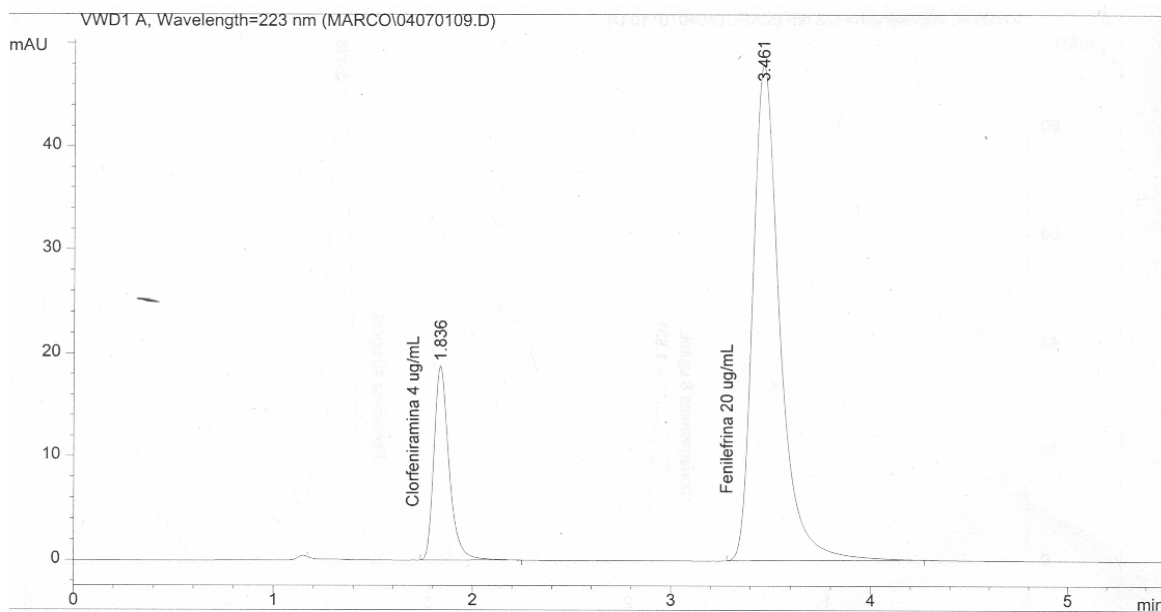


Figura 7. Cromatograma típico corrida 21.



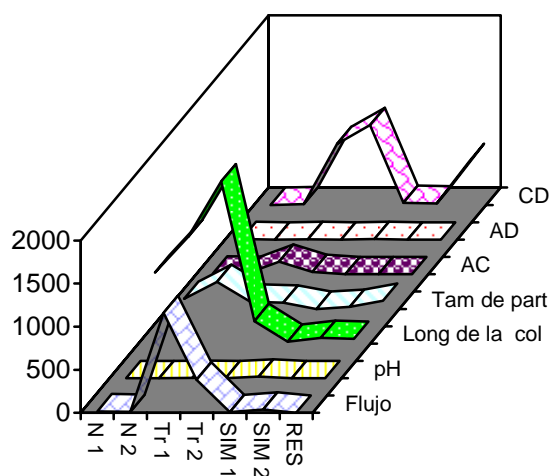
A continuación se presenta un resumen de los efectos (variación de la respuesta **F**), de cada uno de los factores principales, así como de sus interacciones hasta el segundo nivel, sobre las respuestas analizadas en este estudio. (**Tabla 13**).

Se muestran con **negritas** los valores de **F** mayores a 4.54, lo que indica que el efecto es estadísticamente significativo a un 95 % de certidumbre con 1 y 15 grados de libertad.

| | N 1 | N 2 | Tr 1 | Tr 2 | SIM 1 | SIM 2 | RES |
|-------------------|--------|---------|---------|--------|-------|-------|--------|
| A: Flujo | 17.97 | 13.45 | 1158.83 | 385.84 | 7.66 | 38.42 | 4.49 |
| B: pH | 1.57 | 2.05 | 4.81 | 0.01 | 19.03 | 3.68 | 0.85 |
| C: Long de la col | 823.19 | 1237.86 | 1881.04 | 261.02 | 20.80 | 67.34 | 55.35 |
| D: Tam de part | 117.72 | 313.88 | 84.81 | 72.76 | 1.67 | 22.58 | 95.42 |
| AB | 0.60 | 0.43 | 0.00 | 0.39 | 0.31 | 0.00 | 0.85 |
| AC | 8.41 | 5.59 | 144.69 | 25.69 | 0.38 | 1.77 | 0.99 |
| AD | 5.52 | 0.33 | 4.85 | 4.33 | 6.25 | 1.77 | 0.41 |
| BC | 2.07 | 0.79 | 1.34 | 0.37 | 0.27 | 1.10 | 0.02 |
| BD | 2.32 | 0.49 | 0.14 | 0.17 | 0.02 | 3.12 | 1.00 |
| CD | 0.35 | 7.66 | 708.45 | 926.15 | 23.67 | 17.99 | 511.54 |

Tabla 13. Resumen de efectos de los factores y sus interacciones hasta un segundo nivel sobre las respuestas analizadas. Valores de F tomados de las tablas de ANOVA para cada respuesta.

La **Gráfica 1** nos muestra cuales son los factores y las interacciones con efectos estadísticamente significativos sobre cada una de las respuestas medidas. Con ésta, podemos establecer de manera más rápida la importancia real de cada efecto sobre las respuestas.



Gráfica 1. Efectos estadísticamente significativos.

El análisis sistemático de cada una de las respuestas analizadas, nos permite encontrar los niveles óptimos de cada factor principal que generan los resultados de mayor calidad analítica en cada respuesta. Sin embargo, tanto el mayor tiempo de retención (Tr 2) como la resolución (Res), son dos de las respuestas de mayor importancia a la hora de diseñar un método ya que la primera es un indicador del tiempo total de análisis, mientras que la segunda, muestra el grado de separación de los analitos en el problema.

Dado lo anterior, en esta sección únicamente se presenta el análisis individual para estas dos respuestas, así como la predicción de los niveles de cada factor con los que se obtiene la mejor resolución en el tiempo más breve posible.

El análisis de las respuestas restantes se puede revisar en el **ANEXO 2**.



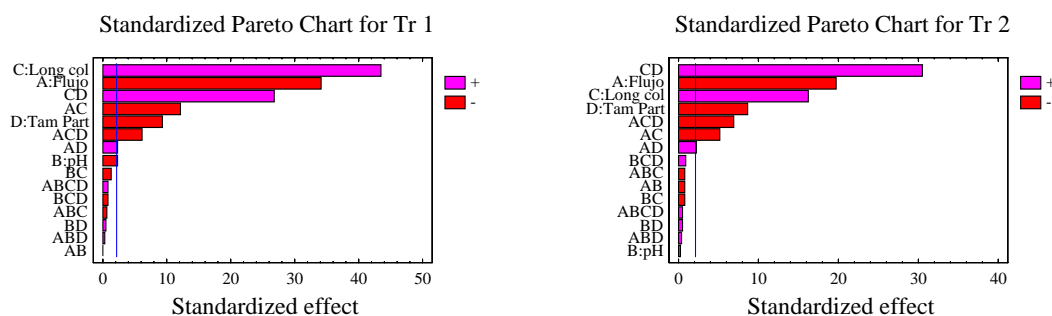
4.2. TIEMPOS DE RETENCIÓN (Tr).

4.2.1 Efectos estimados sobre Tr.

a) Diagramas de Pareto.

Los diagramas de Pareto nos ayudan a determinar qué problemas resolver y en qué orden; nos ayudan a dirigir nuestra atención y esfuerzos a los problemas realmente importantes. Muestran la importancia relativa de todos los problemas o condiciones, a fin de seleccionar el punto de inicio para la solución de problemas o para la *identificación de la causa fundamental de un efecto*.

En este caso, estos diagramas nos indican cuales de los factores o sus interacciones tienen una mayor influencia sobre la respuesta Tr, además del sentido en que se da tal influencia. Los valores que sobrepasan la línea vertical (cercana a cero) son aquellos estadísticamente significativos al 95% de certidumbre.



En los diagramas de Pareto para Tr 1 y Tr 2, se observa la importancia del efecto generado por tres de los factores principales (A, C y D), así como por sus interacciones (AC, CD y ACD). Aparentemente, el pH (B) no tiene efecto estadísticamente significativo sobre ningunas de las respuestas, aunque esto habrá que determinarlo formalmente.

Las interacciones se consideran negativas cuando un aumento en los niveles de alguno de los factores genera una disminución de la respuesta, mientras que una interacción es positiva cuando un aumento en los niveles de alguno de los factores, genera un aumento en la respuesta.

Así pues, se observa cómo la longitud de la columna tiene un efecto positivo sobre el Tr, esto es que a mayor longitud, mayor será el tiempo de retención de cada analito. Por otra parte, a mayor flujo, menor Tr; y a mayor tamaño de partícula, menor Tr.

Para Tr 2 el factor de mayor influencia es la interacción C-D, lo que indica no sólo el efecto tan fuerte que tienen ambos factores en lo individual, sino que además éste se ve potenciado cuando la longitud de la columna está en su nivel alto y el tamaño de partícula en su nivel bajo, generándose un efecto positivo sobre la respuesta (mayor Tr).

Otra observación importante es que a diferencia de Tr 1, en Tr 2 el flujo es el factor principal con mayor efecto, lo cual es evidencia de que ambas moléculas interaccionan de distinta forma con la fase estacionaria.

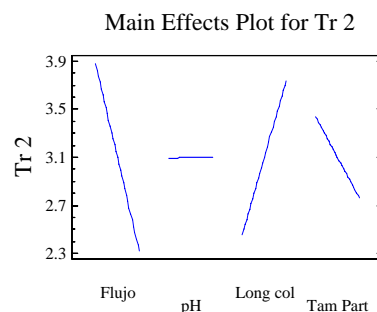
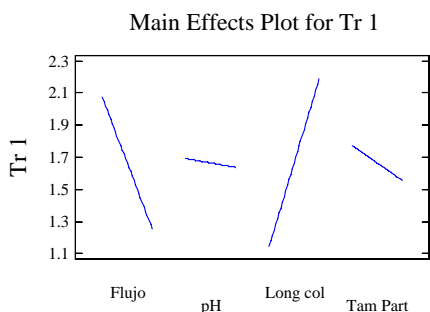
b) Gráficos de Efectos Estimados.

Sabemos ya cuales son los factores con mayor influencia sobre Tr, pero resulta importante conocer con mayor detalle la magnitud de esa influencia, es decir, cómo cambia la respuesta por efecto de cada uno de esos factores y sus interacciones. Para ello, los efectos estimados se pueden mostrar en forma tabular o gráfica, proporcionando esta última una idea más clara de lo que está sucediendo.



| Estimated effects for Tr 1 | | | Estimated effects for Tr 2 | | |
|----------------------------|--------------|---------------|----------------------------|--------------|---------------|
| average | = 1.66477 | +/- 0.0120211 | average | = 3.09747 | +/- 0.0396222 |
| A:Flujo | = -0.818438 | +/- 0.0240423 | A:Flujo | = -1.55659 | +/- 0.0792444 |
| B:pH | = -0.0527375 | +/- 0.0240423 | B:pH | = 0.0084625 | +/- 0.0792444 |
| C:Long col | = 1.04274 | +/- 0.0240423 | C:Long col | = 1.28028 | +/- 0.0792444 |
| D:Tam Part | = -0.221413 | +/- 0.0240423 | D:Tam Part | = -0.675962 | +/- 0.0792444 |
| AB | = 0.0012 | +/- 0.0240423 | AB | = -0.0493625 | +/- 0.0792444 |
| AC | = -0.2892 | +/- 0.0240423 | AC | = -0.40165 | +/- 0.0792444 |
| AD | = 0.05295 | +/- 0.0240423 | AD | = 0.164938 | +/- 0.0792444 |
| BC | = -0.0278 | +/- 0.0240423 | BC | = -0.048425 | +/- 0.0792444 |
| BD | = 0.0089 | +/- 0.0240423 | BD | = 0.0328625 | +/- 0.0792444 |
| CD | = 0.639925 | +/- 0.0240423 | CD | = 2.41163 | +/- 0.0792444 |
| ABC | = -0.0110125 | +/- 0.0240423 | ABC | = -0.051 | +/- 0.0792444 |
| ABD | = 0.0052375 | +/- 0.0240423 | ABD | = 0.0187125 | +/- 0.0792444 |
| ACD | = -0.142262 | +/- 0.0240423 | ACD | = -0.543875 | +/- 0.0792444 |
| BCD | = -0.0161625 | +/- 0.0240423 | BCD | = 0.058325 | +/- 0.0792444 |
| ABCD | = 0.017825 | +/- 0.0240423 | ABCD | = 0.033725 | +/- 0.0792444 |
| block | = 0.0502625 | +/- 0.0240423 | block | = 0.167412 | +/- 0.0792444 |

Standard errors are based on total error with 15 d.f.



Analizando la tabla y las gráficas de efectos principales para Tr1 y Tr 2, se confirman las observaciones realizadas con los diagramas de Pareto. Se nota sólo un pequeño efecto debido al pH, dado que al ser éste impuesto por un buffer ácido (fase móvil), las moléculas de los analitos se encuentran en un equilibrio desplazado hacia la formación de partículas ionizadas, las cuales no cambian significativamente su velocidad de elusión, al cambiar el pH. El sentido de este efecto se debe a la naturaleza de cada analito. Para efectos prácticos, es importante estimar los efectos para Tr 2, dado que éste nos indicará el tiempo de análisis. En este caso, se observa un ligero aumento en el Tr 2 al trabajar con el nivel alto de pH.

Si se consideran sólo los efectos principales, podemos correr un experimento usando los niveles bajos de los factores A y D; manteniendo B y C en su nivel alto, para maximizar el Tr de cada analito.

c) Análisis de Varianza.

El problema básico para el cual se aplica un análisis de varianza es determinar que parte de la variación en una población se debe a razones sistemáticas (factores) y cual se debe al azar. Se define al ANOVA (ó ANADEVA —Análisis de Varianza—) como una técnica estadística para el análisis de mediciones que dependen de varias clases de efectos operando simultáneamente, estimar tales efectos y decidir cuales son importantes. El análisis de varianza compara errores sistemáticos y aleatorios con el propósito de decidir si los factores controlados tienen o no un efecto significativo.^[81]

La tabla de ANOVA fracciona la variabilidad de la respuesta en secciones separadas para cada uno de los efectos. Prueba entonces el significado estadístico de cada efecto al comparar su media de cuadrados (o suma de cuadrados medios) contra un estimado del error experimental.

En la tabla de distribución F a un 95% de nivel de significancia, con 1 y 15 grados de libertad, $F = 4.54$. Los valores de F mayores a este valor indican que los factores correspondientes tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la variación en las observaciones de Tr. (En estas tablas se resaltan los efectos estadísticamente significativos con negritas).



Analysis of Variance for Tr 1

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|-----------------------------|----------------|----|-------------|----------------|---------|
| A:Flujo | 5.35872 | 1 | 5.35872 | 1158.83 | 0.0000 |
| B:pH | 0.02225 | 1 | 0.02225 | 4.81 | 0.0444 |
| C:Long col | 8.69841 | 1 | 8.69841 | 1881.04 | 0.0000 |
| D:Tam Part | 0.392188 | 1 | 0.392188 | 84.81 | 0.0000 |
| AB | 0.00001152 | 1 | 0.00001152 | 0.00 | 0.9609 |
| AC | 0.669093 | 1 | 0.669093 | 144.69 | 0.0000 |
| AD | 0.0224296 | 1 | 0.0224296 | 4.85 | 0.0437 |
| BC | 0.00618272 | 1 | 0.00618272 | 1.34 | 0.2656 |
| BD | 0.00063368 | 1 | 0.00063368 | 0.14 | 0.7164 |
| CD | 3.27603 | 1 | 3.27603 | 708.45 | 0.0000 |
| ABC | 0.000970201 | 1 | 0.000970201 | 0.21 | 0.6535 |
| ABD | 0.000219451 | 1 | 0.000219451 | 0.05 | 0.8305 |
| ACD | 0.161909 | 1 | 0.161909 | 35.01 | 0.0000 |
| BCD | 0.00208981 | 1 | 0.00208981 | 0.45 | 0.5116 |
| ABCD | 0.00254185 | 1 | 0.00254185 | 0.55 | 0.4699 |
| blocks | 0.0202106 | 1 | 0.0202106 | 4.37 | 0.0540 |
| Total error | 0.0693637 | 15 | 0.00462425 | | |
| ----- | | | | | |
| Total (corr.) | 18.7033 | 31 | | | |
| R-squared = 99.6291 percent | | | | | |

Analysis of Variance for Tr 2

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|-----------------------------|----------------|----|-------------|---------------|---------|
| A:Flujo | 19.3837 | 1 | 19.3837 | 385.84 | 0.0000 |
| B:pH | 0.000572911 | 1 | 0.000572911 | 0.01 | 0.9164 |
| C:Long col | 13.1128 | 1 | 13.1128 | 261.02 | 0.0000 |
| D:Tam Part | 3.6554 | 1 | 3.6554 | 72.76 | 0.0000 |
| AB | 0.0194933 | 1 | 0.0194933 | 0.39 | 0.5427 |
| AC | 1.29058 | 1 | 1.29058 | 25.69 | 0.0001 |
| AD | 0.217635 | 1 | 0.217635 | 4.33 | 0.0549 |
| BC | 0.0187598 | 1 | 0.0187598 | 0.37 | 0.5503 |
| BD | 0.00863955 | 1 | 0.00863955 | 0.17 | 0.6842 |
| CD | 46.5275 | 1 | 46.5275 | 926.15 | 0.0000 |
| ABC | 0.020808 | 1 | 0.020808 | 0.41 | 0.5296 |
| ABD | 0.00280126 | 1 | 0.00280126 | 0.06 | 0.8165 |
| ACD | 2.3664 | 1 | 2.3664 | 47.10 | 0.0000 |
| BCD | 0.0272144 | 1 | 0.0272144 | 0.54 | 0.4731 |
| ABCD | 0.00909901 | 1 | 0.00909901 | 0.18 | 0.6765 |
| blocks | 0.224216 | 1 | 0.224216 | 4.46 | 0.0518 |
| Total error | 0.75356 | 15 | 0.0502373 | | |
| ----- | | | | | |
| Total (corr.) | 87.6392 | 31 | | | |
| R-squared = 99.1402 percent | | | | | |

Según las tablas de análisis de varianza para Tr 1 y Tr 2 observamos que todos los factores principales tienen influencia estadísticamente significativa sobre el Tr 1, aunque el pH tiene una influencia mínima.

Sólo el pH no tiene influencia estadísticamente significativa sobre Tr 2.

Por otro lado, la influencia de la interacción C-D, tiene un efecto muy grande para ambos analitos, siendo incluso el más importante para Tr 2. La interacción A-C también presenta influencia significativa sobre ambos analitos, pero en menor grado.

En conclusión, los efectos principales A, C y D, así como sus interacciones, son los que generan un mayor efecto sobre la respuesta medida, por lo que deben de considerarse para optimizar la misma.

4.2.2. Comprobación de la idoneidad del modelo.

Antes de poder adoptar las conclusiones del análisis de varianza, debe probarse la adecuación del modelo supuesto; la herramienta principal es el análisis de residuos. El análisis de varianza se fundamenta en que los errores sean independientes y que estén *normalmente distribuidos*, con media cero y varianza constante σ^2 .

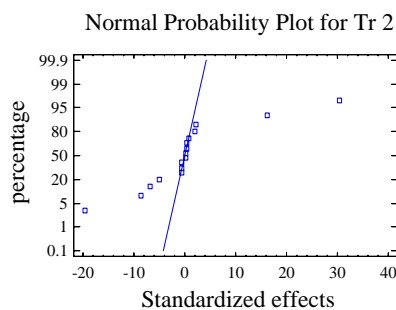
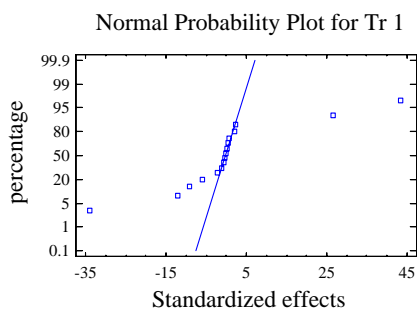
a) Gráficos de Probabilidad Normal.

El análisis de Varianza es una manera formal de determinar cuáles efectos de un factor son distintos de cero. Sin embargo existen otros dos métodos útiles. En el primero de ellos se calcula el error estándar de los efectos y se compara la magnitud de tales efectos con la de sus errores estándares, siendo importantes aquellos factores con efectos cuyo intervalo no incluya el cero. En el segundo método, se utilizan gráficos de probabilidad normal para evaluar la importancia de los efectos.



En este último método, se grafican las estimaciones de los efectos en papel probabilidad normal. Los efectos que son despreciables se distribuyen normalmente, con media cero y varianza σ^2 y tienden a ubicarse a lo largo de una línea recta en esta gráfica, mientras que los efectos significativos tendrán medias distintas de cero y no se ubicarán en la línea recta.

En las gráficas de probabilidad normal para Tr 1 y Tr 2, los efectos más importantes sobre las respuestas, se muestran como errores fuera de la normalidad y están representados por los puntos que se alejan de la línea recta. Para Tr 1 los más lejanos son los generados por A y C, apareciendo este último a la derecha de la gráfica. Para Tr 2, son los puntos que representan a A y A-C, los que ocupan los extremos de la gráfica. Estos datos coinciden con los observados anteriormente en los diagramas de Pareto.



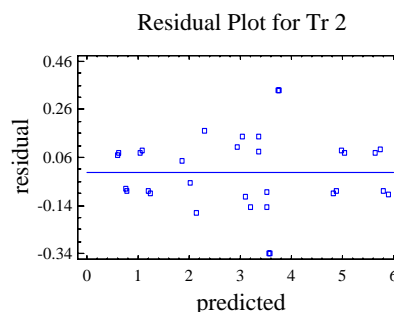
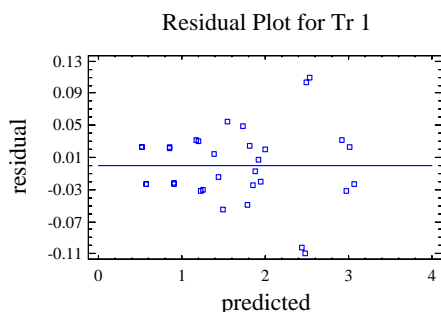
Los errores insignificantes están normalmente distribuidos sobre la línea. **No existe alguna fuerte indicación de no-normalidad, ni evidencia que sugiera posibles residuos inusitados**

b) Gráficos de Residuos contra el Valor Ajustado.

Si el modelo es correcto y las suposiciones se satisfacen, los residuos no deben tener algún patrón, ni deben estar relacionados con alguna otra variable, incluyendo la respuesta. Una comprobación sencilla consiste en graficar los residuos contra los valores ajustados. En esta gráfica no debe revelarse ningún patrón obvio.

Sin embargo, un defecto que en ocasiones revela la gráfica es el de una *varianza variable*, esto es que algunas veces la varianza de las observaciones aumenta a medida que la magnitud de las observaciones lo hace.

Esto resulta cuando el error es proporcional a la magnitud de la observación (comúnmente esto sucede en muchos instrumentos de medición —el error es proporcional a la escala de la lectura—.) Si este es el caso, los residuos aumentan a medida que la respuesta lo hace y la gráfica de los residuos parecerá un embudo que se ensancha.



Las gráficas de residuos para Tr 1 y Tr 2 no revelan un patrón evidente de los residuos con respecto a los valores ajustados mediante la ecuación que describe al modelo y aunque hay una pequeña variación en la varianza de las observaciones, no es tan importante como para considerar que exista relación de los residuos con alguna variable, es decir, que los residuos no sean independientes.

De lo anterior se concluye entonces que el modelo explica adecuadamente los datos obtenidos y que los errores son independientes, por lo que podemos aceptar entonces las conclusiones derivadas del análisis de varianza.



4.2.3. Robustez.

Una vez aceptada la idoneidad del modelo, podemos establecer su utilidad para efectos prácticos.

a) Ecuación del Modelo.

| Regression coeffs. for Tr 1 | | Regression coeffs. for Tr 2 | |
|-----------------------------|--------------|-----------------------------|-------------|
| constant | = 9.39982 | constant | = 26.2683 |
| A:Flujo | = -6.51016 | A:Flujo | = -18.7429 |
| B:pH | = -0.741537 | B:pH | = -0.549887 |
| C:Long col | = -0.519906 | C:Long col | = -1.86947 |
| D:Tam Part | = -1.99564 | D:Tam Part | = -5.64405 |
| AB | = 0.724375 | AB | = 1.23794 |
| AC | = 0.428019 | AC | = 1.53757 |
| AD | = 1.37591 | AD | = 3.98463 |
| BC | = 0.07322 | BC | = 0.092375 |
| BD | = 0.162875 | BD | = 0.111162 |
| CD | = 0.182121 | CD | = 0.512315 |
| ABC | = -0.0823125 | ABC | = -0.1859 |
| ABD | = -0.152063 | ABD | = -0.243688 |
| ACD | = -0.133519 | ACD | = -0.389975 |
| BCD | = -0.0174925 | BCD | = -0.015315 |
| ABCD | = 0.017825 | ABCD | = 0.033725 |

Los valores de las variables se especifican en sus unidades originales

La tabla coeficientes de regresión para Tr 1 y Tr 2, nos muestra los valores de los coeficientes para la ecuación que se ajusta mejor a los datos de cada respuesta, quedando las ecuaciones entonces como:

$$\text{Tr 1} = 9.39982 - 6.51016 \cdot \text{Flujo} - 0.741537 \cdot \text{pH} - 0.519906 \cdot \text{Long col} - 1.99564 \cdot \text{Tam Part} + 0.724375 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{pH} + 0.428019 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{Long col} + 1.37591 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{Tam Part} + 0.07322 \cdot \text{pH} \cdot \text{Long col} + 0.162875 \cdot \text{pH} \cdot \text{Tam Part} + 0.182121 \cdot \text{Long col} \cdot \text{Tam Part} - 0.0823125 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{pH} \cdot \text{Long col} - 0.152063 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{pH} \cdot \text{Tam Part} - 0.133519 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{Long col} \cdot \text{Tam Part} - 0.0174925 \cdot \text{pH} \cdot \text{Long col} \cdot \text{Tam Part} + 0.017825 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{pH} \cdot \text{Long col} \cdot \text{Tam Part}$$

$$\text{Tr 2} = 26.2683 - 18.7429 \cdot \text{Flujo} - 0.549887 \cdot \text{pH} - 1.86947 \cdot \text{Long col} - 5.64405 \cdot \text{Tam Part} + 1.23794 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{pH} + 1.53757 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{Long col} + 3.98463 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{Tam Part} + 0.092375 \cdot \text{pH} \cdot \text{Long col} + 0.111162 \cdot \text{pH} \cdot \text{Tam Part} + 0.512315 \cdot \text{Long col} \cdot \text{Tam Part} - 0.1859 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{pH} \cdot \text{Long col} - 0.243688 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{pH} \cdot \text{Tam Part} - 0.389975 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{Long col} \cdot \text{Tam Part} - 0.015315 \cdot \text{pH} \cdot \text{Long col} \cdot \text{Tam Part} + 0.033725 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{pH} \cdot \text{Long col} \cdot \text{Tam Part}$$

b) Predicción de Resultados.

Con ayuda de estos modelos, se puede calcular el tiempo de retención que se obtendría al trabajar bajo ciertas condiciones específicas (tablas de estimación de resultados para Tr 1 y Tr 2):

| Estimation Results for Tr 1 | | | | |
|-----------------------------|----------------|--------------|-------------------------|-------------------------|
| Row | Observed Value | Fitted Value | Lower 95.0% CL for Mean | Upper 95.0% CL for Mean |
| 1 | 2.3377 | 2.44072 | 2.33507 | 2.54636 |
| 2 | 1.2058 | 1.17412 | 1.06847 | 1.27976 |
| 3 | 1.783 | 1.73452 | 1.62887 | 1.84016 |
| 4 | 0.8757 | 0.854369 | 0.748724 | 0.960013 |
| 5 | 1.8339 | 1.80907 | 1.70342 | 1.91471 |
| 6 | 3.0426 | 3.01927 | 2.91362 | 3.12491 |
| 7 | 0.5434 | 0.520469 | 0.414824 | 0.626113 |
| 8 | 1.4412 | 1.49567 | 1.39002 | 1.60131 |
| 9 | 0.5438 | 0.520719 | 0.415074 | 0.626363 |
| 10 | 1.4039 | 1.38952 | 1.28387 | 1.49516 |
| 11 | 2.9497 | 2.91822 | 2.81257 | 3.02386 |
| 12 | 1.2293 | 1.19932 | 1.09367 | 1.30496 |
| 13 | 1.8664 | 1.87377 | 1.76812 | 1.97941 |
| 14 | 2.3717 | 2.48112 | 2.37547 | 2.58676 |
| 15 | 0.878 | 0.854869 | 0.749224 | 0.960513 |
| 16 | 1.9282 | 1.94857 | 1.84292 | 2.05421 |
| 17 | 2.594 | 2.49098 | 2.38534 | 2.59663 |
| 18 | 1.1927 | 1.22438 | 1.11874 | 1.33003 |
| 19 | 1.7363 | 1.78478 | 1.67914 | 1.89043 |
| 20 | 0.8833 | 0.904631 | 0.798987 | 1.01028 |
| 21 | 1.8345 | 1.85933 | 1.75369 | 1.96498 |
| 22 | 3.0462 | 3.06953 | 2.96389 | 3.17518 |
| 23 | 0.5478 | 0.570731 | 0.465087 | 0.676376 |
| 24 | 1.6004 | 1.54593 | 1.44029 | 1.65158 |
| 25 | 0.5479 | 0.570981 | 0.465337 | 0.676626 |
| 26 | 1.4254 | 1.43978 | 1.33414 | 1.54543 |
| 27 | 2.937 | 2.96848 | 2.86284 | 3.07413 |
| 28 | 1.2196 | 1.24958 | 1.14394 | 1.35523 |
| 29 | 1.9314 | 1.92403 | 1.81839 | 2.02968 |
| 30 | 2.6408 | 2.53138 | 2.42574 | 2.63703 |
| 31 | 0.882 | 0.905131 | 0.799487 | 1.01078 |
| 32 | 2.0192 | 1.99883 | 1.89319 | 2.10448 |



Estimation Results for Tr 2

| Row | Observed Value | Fitted Value | Lower 95.0% CL for Mean | Upper 95.0% CL for Mean |
|-----|----------------|--------------|-------------------------|-------------------------|
| 1 | 3.247 | 3.58654 | 3.23834 | 3.93475 |
| 2 | 3.1802 | 3.03504 | 2.68684 | 3.38325 |
| 3 | 3.5005 | 3.35479 | 3.00659 | 3.703 |
| 4 | 1.1102 | 1.03049 | 0.682286 | 1.3787 |
| 5 | 3.4356 | 3.35149 | 3.00329 | 3.6997 |
| 6 | 5.7217 | 5.64074 | 5.29254 | 5.98895 |
| 7 | 0.6956 | 0.615794 | 0.267586 | 0.964002 |
| 8 | 1.9678 | 2.13839 | 1.79019 | 2.4866 |
| 9 | 0.6694 | 0.597744 | 0.249536 | 0.945952 |
| 10 | 1.899 | 1.85444 | 1.50624 | 2.20265 |
| 11 | 5.8348 | 5.73989 | 5.39169 | 6.0881 |
| 12 | 3.0401 | 2.93604 | 2.58784 | 3.28425 |
| 13 | 4.8053 | 4.88214 | 4.53394 | 5.23035 |
| 14 | 3.2257 | 3.56489 | 3.21669 | 3.9131 |
| 15 | 1.162 | 1.07529 | 0.727086 | 1.4235 |
| 16 | 4.7253 | 4.81644 | 4.46824 | 5.16465 |
| 17 | 4.0935 | 3.75396 | 3.40575 | 4.10216 |
| 18 | 3.0573 | 3.20246 | 2.85425 | 3.55066 |
| 19 | 3.3765 | 3.52221 | 3.174 | 3.87041 |
| 20 | 1.1182 | 1.19791 | 0.849698 | 1.54611 |
| 21 | 3.4348 | 3.51891 | 3.1707 | 3.86711 |
| 22 | 5.7272 | 5.80816 | 5.45995 | 6.15636 |
| 23 | 0.7034 | 0.783206 | 0.434998 | 1.13141 |
| 24 | 2.4764 | 2.30581 | 1.9576 | 2.65401 |
| 25 | 0.6935 | 0.765156 | 0.416948 | 1.11336 |
| 26 | 1.9773 | 2.02186 | 1.67365 | 2.37006 |
| 27 | 5.8124 | 5.90731 | 5.5591 | 6.25551 |
| 28 | 2.9994 | 3.10346 | 2.75525 | 3.45166 |
| 29 | 5.1264 | 5.04956 | 4.70135 | 5.39776 |
| 30 | 4.0715 | 3.73231 | 3.3841 | 4.08051 |
| 31 | 1.156 | 1.24271 | 0.894498 | 1.59091 |
| 32 | 5.075 | 4.98386 | 4.63565 | 5.33206 |

Estas tablas contienen información acerca de los valores de Tr 1 y Tr 2 generados al usar los modelos ajustados. Las tablas incluyen:

- (1) El valor observado de Tr.
- (2) La predicción del valor de Tr usando el modelo ajustado.
- (3) Los límites de confianza (CL) al 95% para la respuesta media ajustada.

c) Optimización de Resultados.

El modelo nos permite hacer predicciones sobre las condiciones óptimas para obtener los valores de Tr 1 ó Tr 2 más adecuados. Podemos además predecir, por ejemplo, el valor de Tr 2 al establecer las condiciones óptimas para Tr 1.

```
Optimize Response
-----
Goal: maximize Tr 1

Optimum value of Tr 1 = 3.0444
Calculated value of Tr 2 = 5.72445
```

| Factor | Low | High | Optimum |
|----------|-----|------|---------|
| Flujo | 0.6 | 1.0 | 0.6 |
| pH | 3.0 | 4.0 | 3.0 |
| Long col | 5.0 | 15.0 | 15.0 |
| Tam Part | 3.0 | 5.0 | 3.0 |

De igual manera, podemos calcular primero las condiciones óptimas para Tr 2 y predecir el valor de la respuesta Tr 1.

```
Optimize Response
-----
Goal: maximize Tr 2

Optimum value of Tr 2 = 5.8236
Calculated value of Tr 1 = 2.94335
```

| Factor | Low | High | Optimum |
|----------|-----|------|---------|
| Flujo | 0.6 | 1.0 | 0.6 |
| pH | 3.0 | 4.0 | 4.0 |
| Long col | 5.0 | 15.0 | 15.0 |
| Tam Part | 3.0 | 5.0 | 3.0 |

Para Tr 1 y Tr 2 las condiciones óptimas no son las mismas (cambia el valor de pH). Sin embargo, la variación observada en una de ellas al optimizar la otra es prácticamente insignificante.



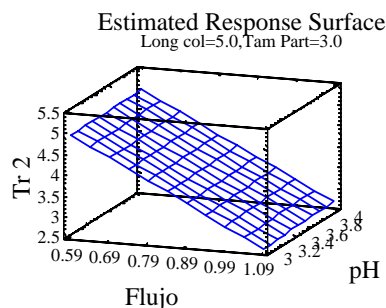
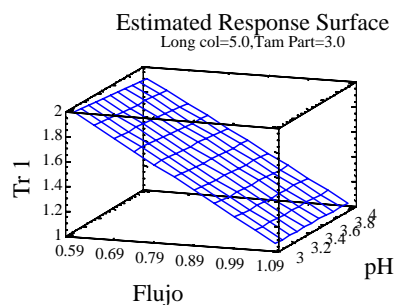
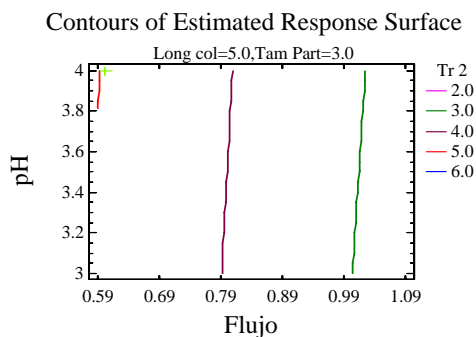
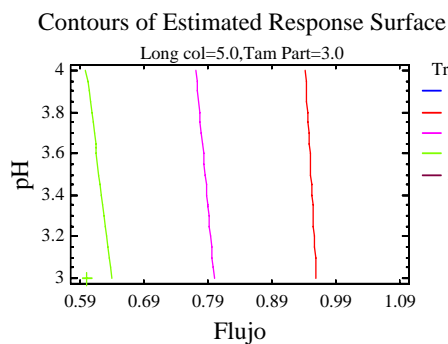
Como vemos, los datos generados concuerdan plenamente con la teoría establecida antes obteniendo mayores tiempos de retención cuando se tiene un flujo lento, mayor longitud de la columna y menor tamaño de partícula. En cuanto al pH, es evidente que los valores que generan un mayor tiempo de retención están en función de la molécula analizada, siendo ligeramente mayor la separación obtenida cuando el pH está en su nivel alto, aunque esto no es significativo.

d) Superficies de Respuesta.

Los diagramas de contornos bidimensionales nos muestran cómo es la respuesta en una parte delimitada del universo. Se observa la relación existente entre los factores y cómo cambia uno de ellos cuando se modifica el otro, para mantener una respuesta determinada; o bien, desde otro ángulo, cuál sería la respuesta al modificar los niveles de los factores.

La forma plana, con mínima curvatura, de la superficie de respuesta tridimensional se debe a que está generada por un modelo lineal, esto es, que las respuestas se describen adecuadamente por una función lineal de los factores. Esto tiene por ventaja que se puede localizar fácilmente cualquier punto sobre la superficie, encontrando eficazmente las condiciones ajustadas que generan tal punto, lo cual no es tan sencillo con superficies curvas o irregulares.

Por conveniencia, en las gráficas de contornos bi y tridimensionales se han mantenido constantes los valores de los factores C y D (estableciéndolos en sus niveles bajos a manera de ejemplo) ya que al ser comúnmente los más difíciles de modificar, nos permite examinar con más detalle cuál es la relación del tiempo de retención con el flujo y en que medida es posible optimizar al máximo las condiciones de la corrida de una manera más inmediata y económica.



En las gráficas de contornos para Tr 1 y Tr 2, se puede observar que al aumentar el pH prácticamente no es necesario modificar el flujo para mantener un tiempo de retención determinado; o bien, si se desea modificar el Tr de cada analito, es suficiente con modificar el flujo, –ya que el pH no tiene efecto significativo– obteniendo mayores tiempos de retención a medida que el flujo disminuye.

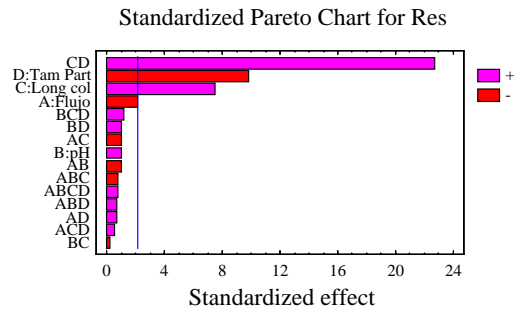
Es muy claro cómo el factor A genera tiempos de retención mayores a medida que es más lento. Por su parte, el factor B no genera cambios significativos en la respuesta en el intervalo examinado.



4.3. RESOLUCIÓN (Res).

4.3.1. Efectos estimados sobre Res.

a) Diagramas de Pareto.



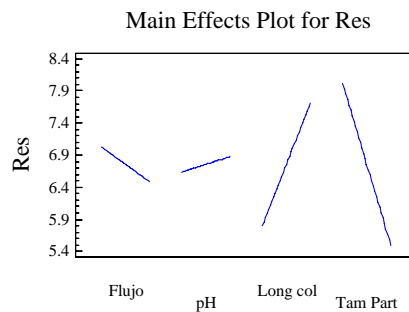
En el diagrama de Pareto para la resolución, se observa la importancia del efecto generado por la interacción C-D (longitud de la columna – tamaño de partícula), así como por estos mismos factores de manera individual. Los factores principales flujo y pH, así como sus interacciones, tienen efectos menores, los cuales tendrán que ser evaluados para determinar si son estadísticamente significativos.

b) Gráficos de Efectos Estimados.

Estimated effects for Res

| | | |
|------------|--------------|--------------|
| average | = 6.75741 | +/- 0.128733 |
| A:Flujo | = -0.545688 | +/- 0.257466 |
| B:pH | = 0.237812 | +/- 0.257466 |
| C:Long col | = 1.91556 | +/- 0.257466 |
| D:Tam Part | = -2.51506 | +/- 0.257466 |
| AB | = -0.236938 | +/- 0.257466 |
| AC | = -0.256188 | +/- 0.257466 |
| AD | = 0.164688 | +/- 0.257466 |
| BC | = -0.0359375 | +/- 0.257466 |
| BD | = 0.257188 | +/- 0.257466 |
| CD | = 5.82319 | +/- 0.257466 |
| ABC | = -0.194437 | +/- 0.257466 |
| ABD | = 0.174188 | +/- 0.257466 |
| ACD | = 0.130688 | +/- 0.257466 |
| BCD | = 0.298438 | +/- 0.257466 |
| ABCD | = 0.186688 | +/- 0.257466 |
| block | = 0.486937 | +/- 0.257466 |

Standard errors are based on total error with 15 d.f.





En la tabla y en la gráfica de efectos principales para la resolución se observa el efecto positivo de la longitud de la columna, que confirma que a mayor longitud, mayor será Res. Por su parte, el efecto negativo del tamaño de partícula indica que a menor tamaño de ésta, mayor será Res. Este es el factor principal con mayor influencia.

Para esta respuesta, el efecto del flujo es poco importante, aunque cuando se ve aumentado, disminuye ligeramente Res, tal como se estableció antes.

Finalmente se observa sólo un pequeño efecto positivo debido al pH, confirmando que en el intervalo estudiado, ambos analitos están prácticamente ionizados en igual magnitud, por lo que las moléculas de cada uno compiten por las moléculas de eluyente, permaneciendo poco tiempo en los sitios de absorción; determinándose la retención más por la concentración de cada analito o por sus propiedades fisicoquímicas y termodinámicas, que por el pH.

Tanto el flujo como el pH, parecen tener una respuesta mínima, pero debemos establecer primero de manera formal si es estadísticamente significativa.

Si se consideran sólo los efectos principales, podemos correr un experimento usando A en su nivel bajo, B en su nivel alto, C en su nivel alto y D en su nivel bajo, para maximizar la resolución de los analitos.

Cabe recordar la gran importancia que tiene la interacción C-D sobre la respuesta, siendo incluso más importante que los factores principales, demostrando que la resolución no depende de un solo factor.

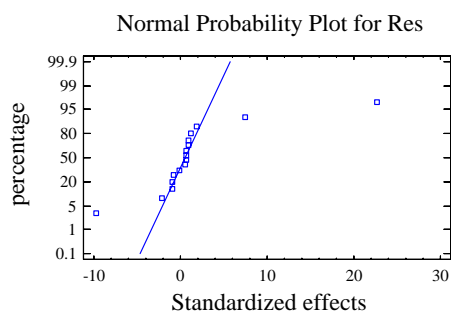
c) Análisis de Varianza.

Según la tabla de análisis de varianza para la resolución, sólo los factores principales C y D, así como su interacción (C-D), tienen influencia estadísticamente significativa sobre Res. Es notoria la influencia de C-D sobre la variación de la respuesta, teniendo el efecto más importante.

| Analysis of Variance for Res | | | | | |
|------------------------------|----------------|----------|----------------|---------------|---------------|
| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
| A:Flujo | 2.3822 | 1 | 2.3822 | 4.49 | 0.0511 |
| B:pH | 0.452438 | 1 | 0.452438 | 0.85 | 0.3703 |
| C:Long col | 29.355 | 1 | 29.355 | 55.35 | 0.0000 |
| D:Tam Part | 50.6043 | 1 | 50.6043 | 95.42 | 0.0000 |
| AB | 0.449115 | 1 | 0.449115 | 0.85 | 0.3720 |
| AC | 0.525056 | 1 | 0.525056 | 0.99 | 0.3355 |
| AD | 0.216976 | 1 | 0.216976 | 0.41 | 0.5321 |
| BC | 0.010332 | 1 | 0.010332 | 0.02 | 0.8908 |
| BD | 0.529163 | 1 | 0.529163 | 1.00 | 0.3337 |
| CD | 271.276 | 1 | 271.276 | 511.54 | 0.0000 |
| ABC | 0.302448 | 1 | 0.302448 | 0.57 | 0.4618 |
| ABD | 0.24273 | 1 | 0.24273 | 0.46 | 0.5090 |
| ACD | 0.136634 | 1 | 0.136634 | 0.26 | 0.6191 |
| BCD | 0.71252 | 1 | 0.71252 | 1.34 | 0.2645 |
| ABCD | 0.278818 | 1 | 0.278818 | 0.53 | 0.4796 |
| blocks | 1.89687 | 1 | 1.89687 | 3.58 | 0.0781 |
| Total error | 7.95464 | 15 | 0.530309 | | |
| ----- | | | | | |
| Total (corr.) | 367.325 | 31 | | | |
| R-squared = 97.8344 percent | | | | | |

4.3.2. Comprobación de la idoneidad del modelo.

a) Gráficos de Probabilidad Normal.

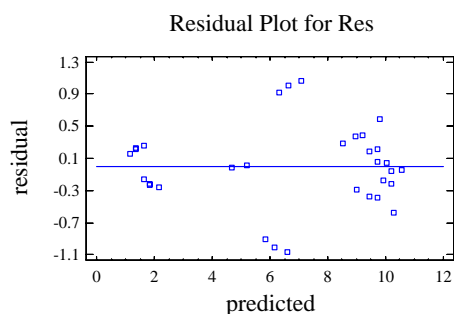




En la gráfica de probabilidad normal de la resolución, los efectos más importantes se muestran como errores fuera de la normalidad y están representados por los puntos que se alejan de la línea recta, siendo el más lejano el generado por C-D, apareciendo a la derecha de la misma. Estos datos coinciden con los observados anteriormente en el Diagrama de Pareto.

Los errores insignificantes están normalmente distribuidos sobre la línea. **No existe alguna fuerte indicación de no-normalidad, ni evidencia que sugiera posibles residuos inusitados.**

b) Gráficos de Residuos contra el Valor Ajustado.



La gráfica de residuos para Res no revela un patrón evidente de los residuos con respecto a los valores ajustados mediante la ecuación que describe al modelo y aunque hay una pequeña variación en la varianza de las observaciones, no es tan importante como para considerar que exista relación de los residuos con alguna variable, es decir, que los residuos no sean independientes.

De lo anterior se concluye entonces que el modelo explica adecuadamente los datos obtenidos y que los errores son independientes, por lo que podemos aceptar entonces las conclusiones derivadas del análisis de varianza.

4.3.3. Robustez.

Una vez aceptada la idoneidad del modelo, podemos establecer su utilidad para efectos prácticos.

a) Ecuación del Modelo.

```

Regression coeffs. for Res
-----
constant      = 39.8999
A:Flujo       = -15.7184
B:pH          = -2.12631
C:Long col   = -3.60069
D:Tam Part    = -8.48706
AB            = 4.74344
AC            = 2.90469
AD            = 3.24406
BC            = 0.507013
BD            = 0.457062
CD            = 0.843862
ABC           = -0.941187
ABD           = -0.995937
ACD           = -0.588062
BCD           = -0.0896625
ABCD          = 0.186687
-----
    
```

Los valores de las variables se especifican en sus unidades originales.

$$\begin{aligned}
 \text{Res} = & 39.8999 - 15.7184 \cdot \text{Flujo} - 2.12631 \cdot \text{pH} - 3.60069 \cdot \text{Long col} - 8.48706 \cdot \text{Tam Part} + 4.74344 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{pH} \\
 & + 2.90469 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{Long col} + 3.24406 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{Tam Part} + 0.507013 \cdot \text{pH} \cdot \text{Long col} + 0.457062 \cdot \text{pH} \cdot \text{Tam Part} \\
 & + 0.843862 \cdot \text{Long col} \cdot \text{Tam Part} - 0.941187 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{pH} \cdot \text{Long col} - 0.995937 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{pH} \cdot \text{Tam Part} \\
 & - 0.588062 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{Long col} \cdot \text{Tam Part} - 0.0896625 \cdot \text{pH} \cdot \text{Long col} \cdot \text{Tam Part} \\
 & + 0.186687 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{pH} \cdot \text{Long col} \cdot \text{Tam Part}
 \end{aligned}$$



b) Predicción de Resultados.

Con ayuda del modelo anterior, se puede calcular la resolución que se obtendría al trabajar bajo ciertas condiciones específicas (tabla de estimación de resultados para Res):

| Estimation Results for Res | | | | |
|----------------------------|----------------|--------------|-------------------------|-------------------------|
| Row | Observed Value | Fitted Value | Lower 95.0% CL for Mean | Upper 95.0% CL for Mean |
| 1 | 5.517 | 6.58553 | 5.4542 | 7.71686 |
| 2 | 9.761 | 9.70603 | 8.5747 | 10.8374 |
| 3 | 9.6 | 9.21603 | 8.0847 | 10.3474 |
| 4 | 1.604 | 1.37103 | 0.239699 | 2.50236 |
| 5 | 8.813 | 8.52903 | 7.3977 | 9.66036 |
| 6 | 9.337 | 8.96503 | 7.8337 | 10.0964 |
| 7 | 1.569 | 1.34803 | 0.216699 | 2.47936 |
| 8 | 4.927 | 5.84203 | 4.7107 | 6.97336 |
| 9 | 1.335 | 1.17053 | 0.0391991 | 2.30186 |
| 10 | 4.68 | 4.69603 | 3.5647 | 5.82736 |
| 11 | 10.376 | 9.79303 | 8.6617 | 10.9244 |
| 12 | 9.601 | 9.42103 | 8.2897 | 10.5524 |
| 13 | 10.108 | 10.0595 | 8.9282 | 11.1909 |
| 14 | 5.143 | 6.14703 | 5.0157 | 7.27836 |
| 15 | 1.921 | 1.65853 | 0.527199 | 2.78986 |
| 16 | 9.931 | 9.71453 | 8.5832 | 10.8459 |
| 17 | 8.141 | 7.07247 | 5.94114 | 8.2038 |
| 18 | 10.138 | 10.193 | 9.06164 | 11.3243 |
| 19 | 9.319 | 9.70297 | 8.57164 | 10.8343 |
| 20 | 1.625 | 1.85797 | 0.726637 | 2.9893 |
| 21 | 8.732 | 9.01597 | 7.88464 | 10.1473 |
| 22 | 9.08 | 9.45197 | 8.32064 | 10.5833 |
| 23 | 1.614 | 1.83497 | 0.703637 | 2.9663 |
| 24 | 7.244 | 6.32897 | 5.19764 | 7.4603 |
| 25 | 1.493 | 1.65747 | 0.526137 | 2.7888 |
| 26 | 5.199 | 5.18297 | 4.05164 | 6.3143 |
| 27 | 9.697 | 10.28 | 9.14864 | 11.4113 |
| 28 | 9.728 | 9.90797 | 8.77664 | 11.0393 |
| 29 | 10.498 | 10.5465 | 9.41514 | 11.6778 |
| 30 | 7.638 | 6.63397 | 5.50264 | 7.7653 |
| 31 | 1.883 | 2.14547 | 1.01414 | 3.2768 |
| 32 | 9.985 | 10.2015 | 9.07014 | 11.3328 |

Estas tablas contienen información acerca de los valores de Res generados al usar los modelos ajustados. Las tablas incluyen: (1) El valor observado de Res. (2) La predicción del valor de Res usando el modelo ajustado. (3) Los límites de confianza (CL) al 95% para la respuesta media ajustada.

c) Optimización de Resultados.

El modelo nos permite hacer predicciones sobre las condiciones óptimas para obtener valores de Res más altos, mejorando la separación de los analitos:

```

Optimize Response
-----
Goal: maximize Res

Optimum value = 10.303

Factor      Low      High      Optimum
-----
Flujo       0.6     1.0     0.6
pH          3.0     4.0     4.0
Long col    5.0     15.0    5.0
Tam Part    3.0     5.0     3.0
    
```

Es evidente que la longitud de la columna, de manera individual, tiene un efecto positivo sobre la resolución, por lo que se esperaría que el nivel óptimo de la longitud de la columna fuera el alto. Sin embargo vemos que *aparentemente* esto no es así.

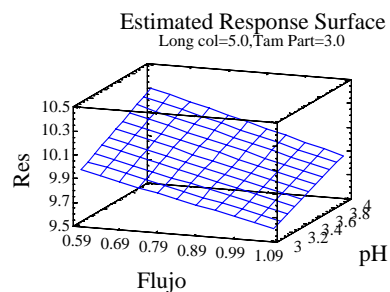
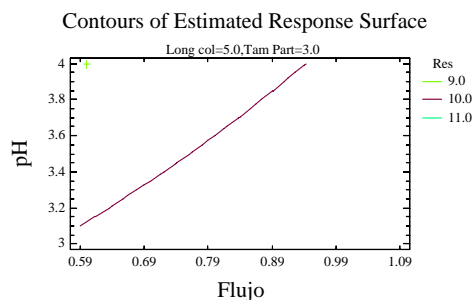
Lo anterior puede explicarse si recordamos que las características de las columnas utilizadas no corresponden de manera exacta con los valores establecidos para los niveles de tamaño de partícula, (Ver **Tablas 9 y 10**). Entonces, al comparar los resultados para Res obtenidos con la columna 2 (5 cm – 3 µm), contra los resultados obtenidos con la columna 3 (15 cm – 3.5 µm), se observa que se obtiene una menor resolución con esta última, pero no por el hecho que la longitud haya aumentado (lo cual no es lógico), sino por el aumento en el tamaño de partícula, el cual tiene un efecto negativo sobre Res, como ya se indicó antes. Otra evidencia de lo anterior nos la proporcionan los resultados obtenidos con la columna 4 (5 cm – 5µm) comparados con los resultados obtenidos con la columna 1 (15 cm - 4 µm). En este caso, la columna 1



genera resultados de Res mucho mayores que la columna 4, lo cual se explica si se observa que no sólo aumentó la longitud de la columna, sino que además disminuyó el tamaño de partícula, siendo ambas condiciones generadoras de un aumento en la resolución. (Una característica adicional de la columna 1 es que tiene el tamaño de poro más pequeño -60 \AA , lo cual la hace tener todavía mayor eficiencia y por tanto mayor resolución).

Como vemos, los datos generados concuerdan plenamente con la teoría propuesta arriba. Así, se observa una mayor resolución cuando A está en su nivel bajo, B en su nivel alto, C en su nivel alto y D en su nivel bajo.

d) Superficies de Respuesta.



En las gráficas de contornos para Res, se observa que el factor A (flujo) genera una mayor Res a medida que es más lento. Por su parte, el pH genera un ligero aumento en la respuesta cuando está en su nivel alto obteniendo entonces la mayor Res cuando el pH está en su nivel alto y el flujo en su nivel bajo, manteniendo constantes los valores de C y D.



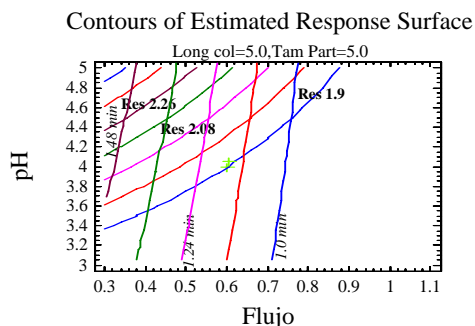
4.4. PREDICCIÓN DE RESPUESTAS (Tiempo de retención 2 – Resolución).

Como se ha establecido, al momento de diseñar un método, es muy importante determinar el tiempo de análisis, así como asegurar la separación de los componentes en la muestra. El tiempo de retención más alto (Tr 2), así como la resolución, son excelentes indicadores de las características anteriores. Cabe señalar que las mejores condiciones cromatográficas no sólo están determinadas por estos indicadores, sino que además se debe tener siempre en mente la factibilidad de reproducir el método en el laboratorio, así como las características económicas del mismo. Sin embargo, al encontrar los niveles de los factores bajo los cuales se obtenga la mejor resolución en el menor tiempo posible, se tendrá un gran avance en el proceso del diseño del método analítico.

Considerando lo anterior y buscando alcanzar los mejores beneficios del sistema, se ha considerado conveniente acotar los factores y las respuestas a los siguientes valores:

- Flujo: 0.4 – 1.0 mL/min.
- pH: entre 3.0 – 5.0
- Longitud de la columna: 5 cm.
- Tamaño de partícula: 5 µm.
- Resolución: entre 2 – 4
- Tiempo de retención 2: 1.2 – 5.0min.

Al sobreponer las gráficas de contornos de superficie de respuesta correspondientes al Tr 2 y la resolución, se pueden predecir las condiciones bajo las cuales se obtendrán las respuestas más cercanas a los valores establecidos. Con ayuda de la **Gráfica 2**, podemos encontrar tales condiciones:



Gráfica 2. Gráfica de contornos sobrepuestos de Tr 2 y Res.
 A: 0.3 – 1.1 mL/min; B: 3.0 – 5.0; C: 5.0 cm; D: 5.0 µm.

La **Tabla 14** muestra a manera de resumen, las conclusiones que se pueden sacar de la **Gráfica 2**.

| Resolución | Tr 2 (min.) | Longitud de Columna (cm.) | Tamaño de partícula (µm) | pH | Flujo (mL/min.) | Tiempo de análisis (min.) | Volumen gastado de fase móvil (mL) |
|-------------|-------------|---------------------------|--------------------------|------------|-----------------|---------------------------|------------------------------------|
| 1.99 | 1.24 | 5 | 5 | 4.2 | 0.55 | 2.24 | 1.23 |
| 1.99 | 1.36 | 5 | 5 | 3.8 | 0.42 | 2.36 | 0.99 |
| 2.08 | 1.24 | 5 | 5 | 4.4 | 0.56 | 2.24 | 1.25 |
| 2.08 | 1.36 | 5 | 5 | 4.1 | 0.44 | 2.36 | 1.04 |
| 2.17 | 1.24 | 5 | 5 | 4.8 | 0.56 | 2.24 | 1.25 |
| 2.17 | 1.36 | 5 | 5 | 4.5 | 0.46 | 2.36 | 1.09 |
| 2.26 | 1.36 | 5 | 5 | 4.8 | 0.48 | 2.36 | 1.13 |

Tabla 14. Resumen de los puntos de intersección de las gráficas de contornos sobrepuestos de Tr 2 y Res., cuando A: 0.3 – 1.1 mL/min; B: 3.0 – 5.0; C: 5.0 cm; D: 5.0 µm.



En la **Tabla 14** se han registrado sólo aquellas combinaciones que están dentro de los valores establecidos para los factores y las respuestas. Para el cálculo del tiempo de análisis se adicionó de manera constante un minuto al Tr 2 observado en cada caso. **Los valores de las observaciones y por tanto de los cálculos realizados son aproximados.** Se destacan con negritas las condiciones más adecuadas para implementar el método.

Dado lo observado en la **Tabla 14**, se proponen entonces los siguientes valores óptimos para cada factor:

- **Flujo: 0.42 mL/min.**
- **pH: 3.8**
- **Longitud de la columna: 5 cm.**
- **Tamaño de partícula: 5 μm .**

Bajo estas condiciones, se espera obtener un tiempo de análisis aproximado de 2.36 min. (Tr 2 aproximado de 1.36 min.); el volumen gastado de fase móvil será de 0.99 mL, siendo la mínima cantidad gastada; y se alcanzará una resolución de 1.99, lo que es más que suficiente para separar totalmente los analitos de la muestra.

Sin embargo, la utilidad de este método dependerá de la muestra analizada. Si ésta contiene otros principios activos, excipientes y/o productos de degradación, que puedan interferir con los picos establecidos para el clorhidrato de fenilefrina y el maleato de clorfeniramina, habrá entonces que encontrar las mejores condiciones de operación que mejoren la resolución al menor tiempo de análisis posible.

Para ello, es posible observar la relación existente entre el tiempo de retención 2 y la resolución en otras superficies de su espacio total, registrando aquellas condiciones que tengan una utilidad potencial.

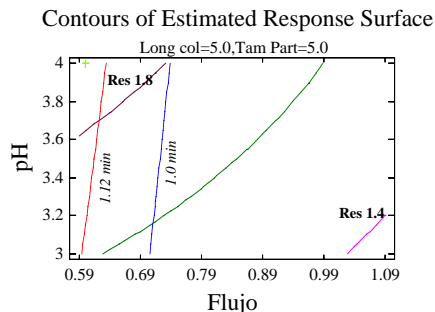
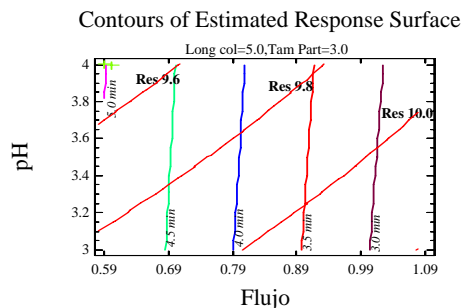
En la **Gráfica 3 (A, B, C y D)** se presentan las cuatro combinaciones posibles de los niveles de los factores. Por conveniencia, en cada una se han mantenido constantes los niveles para los factores C (longitud de la columna) y D (tamaño de partícula) ya que en muchos casos se cuenta con una sola columna, además de que la mayoría de las veces es muy difícil y costoso conseguir columnas con características especiales; lo que hace evidente la importancia de conocer más detalladamente como optimizar el método manipulando los factores más accesibles como A (flujo) y B (pH de la fase móvil).

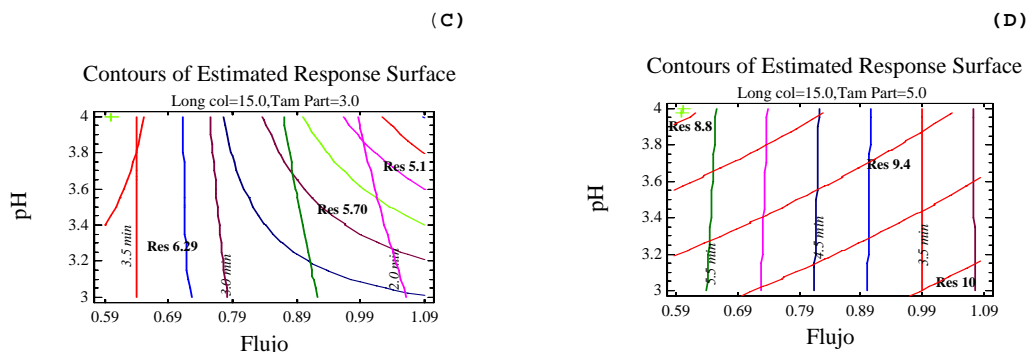
Las líneas verticales representan la superficie de respuesta para Tr 2 a un tiempo específico, dentro del intervalo de 1 - 7 min., mientras que las curvas diagonales representan las superficies de respuesta para Res en el intervalo de 1 - 11. Los puntos de intersección de ambos perfiles señalan las condiciones bajo las cuales se cumplen las condiciones especificadas. (En el **ANEXO 3** se pueden observar las gráficas completas para cada caso)

Por ejemplo, en la **Gráfica 3 (A)**, definida por una longitud de columna de 5 cm. y un tamaño de partícula de 3 μm , se observa que al fijar el pH en 3.6 y el flujo en aproximadamente 0.8 mL/min., se obtendrá una Res de 9.8 y un Tr 2 de 4 min.

(A)

(B)





Gráfica 3. Gráficas de contornos sobrepuestos para las respuestas Tr 2 y Res
 (A) Flujo: 0.6 – 1.0 mL/min. pH: 3.0 – 4.0; Longitud de la columna: 5 cm; Tamaño de partícula: 3 μ m.
 (B) Flujo: 0.6 – 1.0 mL/min. pH: 3.0 – 4.0; Longitud de la columna: 5 cm; Tamaño de partícula: 5 μ m.
 (C) Flujo: 0.6 – 1.0 mL/min. pH: 3.0 – 4.0; Longitud de la columna: 15 cm; Tamaño de partícula: 3 μ m.
 (D) Flujo: 0.6 – 1.0 mL/min. pH: 3.0 – 4.0; Longitud de la columna: 15 cm; Tamaño de partícula: 5 μ m.

Una gráfica muy importante es la **Gráfica 3 (B)**, definida por una longitud de columna de 5 cm. y un tamaño de partícula de 5 μ m. En ésta se observa que no hay valores de Res mayores a 2. Al revisar los datos experimentales, se encuentra que ésta combinación de niveles en los factores C y D genera valores de Res menores a 2, lo que no es extraño si recordamos que a menor longitud de la columna y mayor tamaño de partícula el número de platos teóricos decrece considerablemente teniendo por lo tanto una muy pobre separación de los analitos en la muestra.

Las **Gráficas 3 (C) y 3 (D)** se interpretan de manera similar al primer caso **3 (A)**.

Estas gráficas de contornos sobrepuestos nos dan una muy buena idea del comportamiento general del sistema. Nos permiten anticipar cuales serán las mejores condiciones bajo las cuales se obtienen respuestas dentro de un intervalo determinado. O bien, desde otra perspectiva, cómo cambian las respuestas determinantes del sistema cuando se modifica ligeramente alguno de los factores principales dentro de los niveles establecidos, es decir, que tan robusto es el método.

Al encontrar las condiciones bajo las cuales se obtienen las respuestas más adecuadas, finalmente también se debe considerar el costo económico del método, por lo que es necesario verificar si es factible “sacrificar” la calidad de las respuestas con el fin de gastar menos reactivos y producir una cantidad mínima de residuos.

La **Tabla 15** muestra a manera de resumen, las conclusiones que se pueden sacar de la **Gráfica 3**.

| Resolución | Tr 2 (min.) | Longitud de Columna (cm.) | Tamaño de partícula (μ m) | pH | Flujo (mL/min.) | Tiempo de análisis (min.) | Volumen gastado de fase móvil (mL) |
|------------|-------------|---------------------------|--------------------------------|------------|-----------------|---------------------------|------------------------------------|
| 10 | 3.0 | 5 | 3 | 3.5 | 1.0 | 4.0 | 4.00 |
| 9.6 | 4.5 | 5 | 3 | 4.0 | 0.7 | 5.5 | 3.85 |
| 10 | 3.0 | 15 | 5 | 3.2 | 1.1 | 4.0 | 4.40 |
| 9.1 | 5.5 | 15 | 5 | 3.6 | 0.65 | 6.5 | 4.23 |
| 5.1 | 2.0 | 15 | 3 | 3.8 | 1.0 | 3.0 | 3.00 |
| 6.9 | 3.5 | 15 | 3 | 3.8 | 0.65 | 4.5 | 2.93 |
| 1.8 | 1.1 | 5 | 5 | 3.7 | 0.60 | 2.1 | 1.26 |
| 1.6 | 1.0 | 5 | 5 | 3.2 | 0.70 | 2.0 | 1.40 |

Tabla 15. Resumen de los puntos de intersección de las gráficas de contornos sobrepuestos de Tr 2 y Res.



Se destacan con negritas las condiciones más adecuadas para implementar el método observándose que se cumple la teoría establecida anteriormente para cada factor.

Cuando sea necesario tener una mayor resolución, respecto al valor óptimo encontrado (1.99), por la presencia de interferencias en el sistema, aún a costa de aumentar el tiempo de análisis, se pueden proponer las siguientes condiciones como las más adecuadas para reproducir el método dentro de los niveles especificados para cada factor:

- **Flujo: 1.0 mL/min.**
- **pH: 3.8**
- **Longitud de columna: 15 cm.**
- **Tamaño de partícula: 3 μm .**

Bajo las condiciones establecidas en este caso, se obtiene una resolución (Res = 5.1), un tiempo total de análisis de 3.0 min. ($T_r 2 = 2.0$ min.) y un volumen gastado de 3.0 mL. de fase móvil.

Respecto a las condiciones óptimas, se observa que la resolución aumenta apenas lo suficiente para separar cualquier interferencia potencial en la muestra, y aunque se aumenta el tiempo de análisis, se usan más reactivos y se generan más residuos, lo cual se traduce en un mayor costo, aún el método continúa siendo rápido y muy conveniente desde el punto de vista económico.

Cabe señalar que, aunque con el flujo en su nivel bajo se obtienen valores mayores para la resolución, también se generan tiempos de retención más altos, por lo que se considera más conveniente en el caso de este sistema, trabajar con el flujo en su nivel alto, lo cual genera respuestas más rápidas.



5. CONCLUSIONES.

1. En relación al método de valoración de Clorhidrato de Fenilefrina y Maleato de Clorfeniramina por HPLC, de acuerdo a la teoría cromatográfica, se encontró que:

- Las características de la columna (longitud y tamaño de partícula) son factores con influencia estadísticamente significativa sobre la mayoría de las respuestas estudiadas, por lo que se debe evaluar con cuidado cualquier modificación en sus valores. El tamaño de partícula no tiene efecto significativo sobre la simetría del maleato de clorfeniramina.
- El flujo de la fase móvil también tiene efecto estadísticamente significativo sobre las respuestas estudiadas, con excepción de la resolución.
- El pH de la fase móvil sólo tiene influencia estadísticamente significativa, sobre el tiempo de retención 1 y la simetría 1, es decir sobre el maleato de clorfeniramina, aunque tal influencia es mínima y puede deberse más a algún otro factor no estudiado, (como las características de las columnas) que al pH mismo.
- La interacción de la longitud de la columna con el tamaño de partícula mostró ser de gran influencia sobre la resolución, siendo más importante para esta respuesta que los factores principales. Lo anterior demuestra no sólo que la resolución no depende de un solo factor, sino que además la manera en que se combinan dichos factores trasciende directamente en el grado de separación de los analitos en la muestra. Esta misma interacción tiene gran relevancia en el tiempo de retención de ambos analitos.
- El método es robusto a cualquier cambio de pH dentro del intervalo estudiado, pero no puede considerarse lo mismo para los otros factores ya que cualquier variación en sus niveles genera cambios importantes en casi todas las respuestas.
- ***De acuerdo a análisis realizado a cada una de las respuestas estudiadas, se puede determinar que se cumple con la teoría cromatográfica previamente establecida.***
- Al hacer más flexibles los criterios de aceptación, tal como establecer intervalos de resolución más amplios y/o tiempos de análisis más largos, podemos predecir las condiciones más adecuadas para el método cuando se encuentren interferencias con los picos de interés, pero es muy posible perder exactitud y precisión en las respuestas ya que aunque los resultados predichos se basan en ecuaciones matemáticas, estas no necesariamente se cumplen fuera de los espacios estudiados. ***Para poder asegurar la calidad de los resultados analíticos, es necesario confirmarlos al reproducir el método bajo las condiciones supuestas o mejor aún, realizar un nuevo estudio de robustez, seleccionando nuevos niveles para los factores con efectos estadísticamente significativos, o incluso, factores diferentes a los aquí estudiados.***

2. En relación al uso de la herramienta estadística de Diseño de Experimentos:

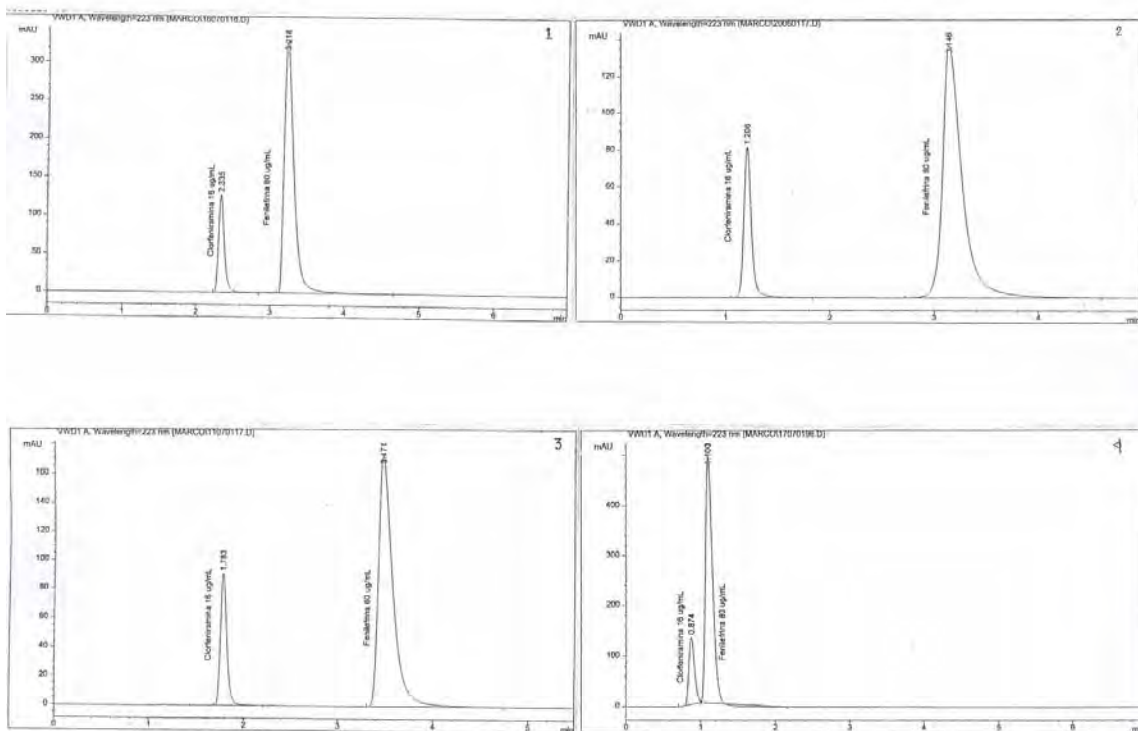
- Al conocer como cambian las respuestas por la influencia de cada uno de los factores, así como de sus interacciones, podremos proponer soluciones más rápidas cuando se observen anomalías o bien cuando las respuestas no sean las esperadas, mejorando no sólo el análisis primario, sino además, los tiempos de re análisis derivados de tales respuestas.
- ***El estudio de Robustez, asistido por un diseño de experimentos, es la forma más rápida y confiable para conocer las limitaciones de nuestro sistema, su potencial y sus carencias, de manera tal que podamos tomar la mejor decisión para su implementación, alcanzando la mayor calidad posible en los resultados, con la menor disposición de recursos –contrastando siempre los aspectos teóricos con los prácticos–. Así, no sólo aseguramos la consistencia de los resultados, sino que además obtendremos las condiciones cromatográficas más adecuadas, con un alto grado de certeza estadística.***

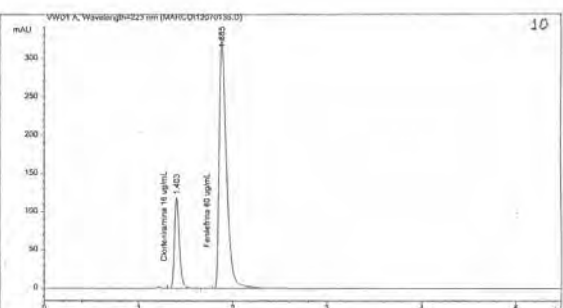
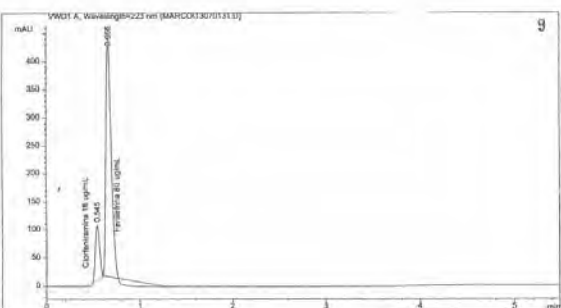
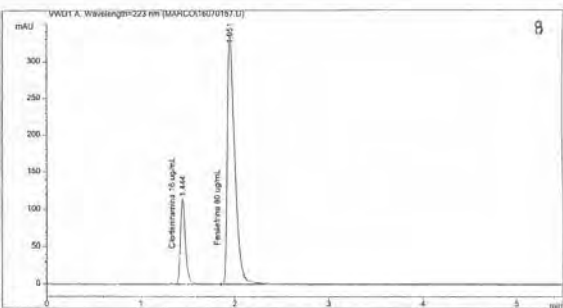
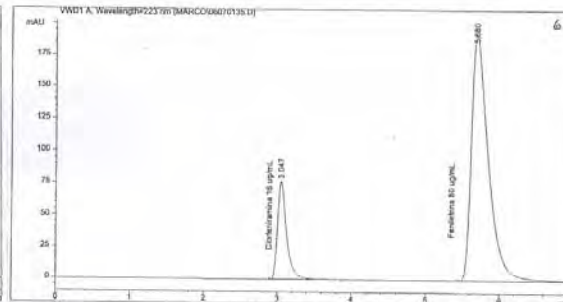
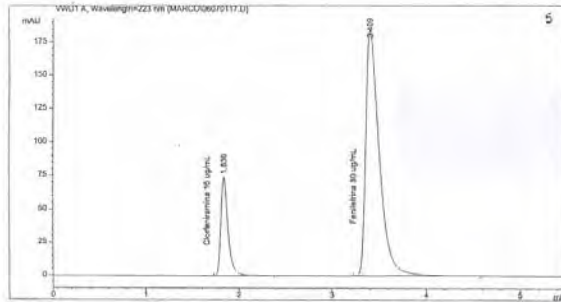


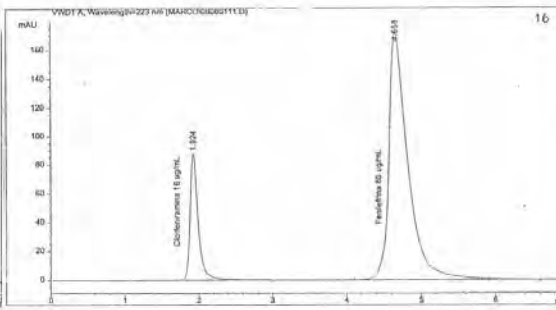
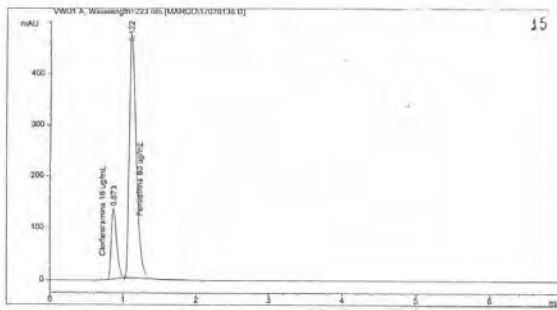
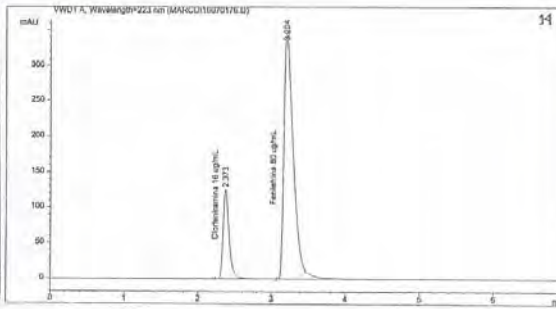
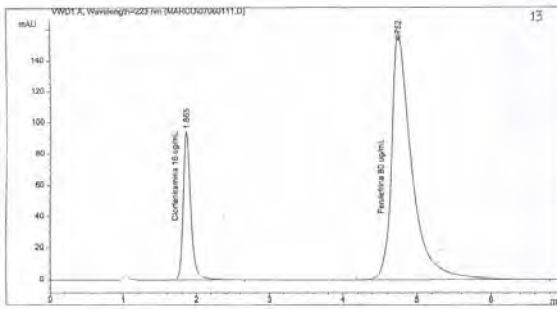
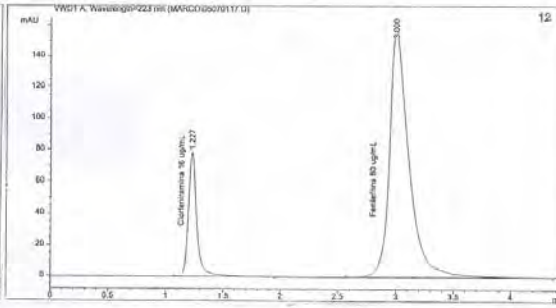
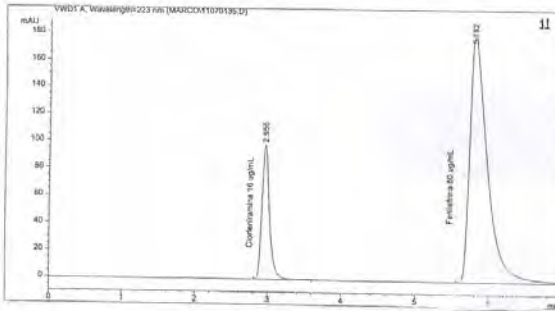
ANEXO 1.

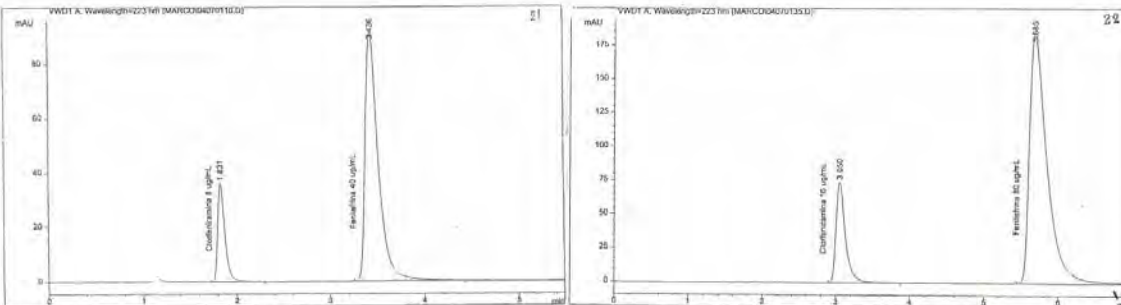
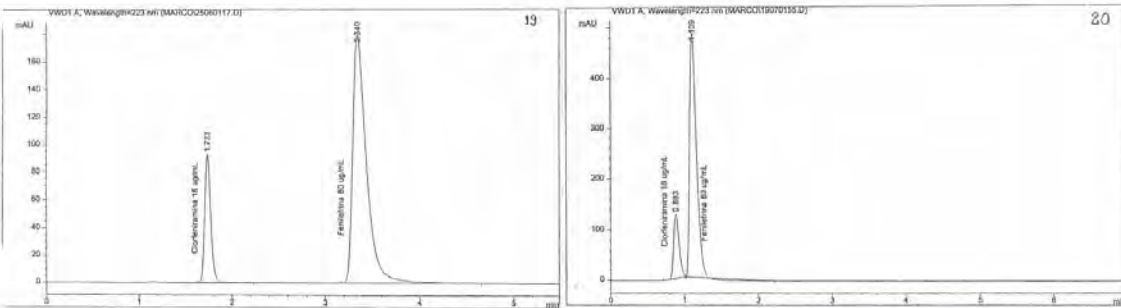
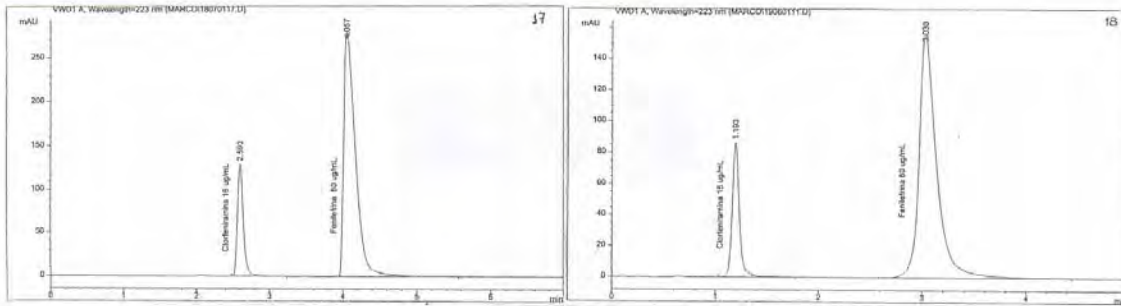
A1.1. CROMATOGRAMAS TÍPICOS DE CADA CORRIDA.

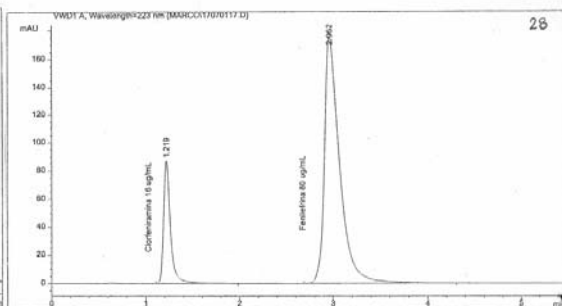
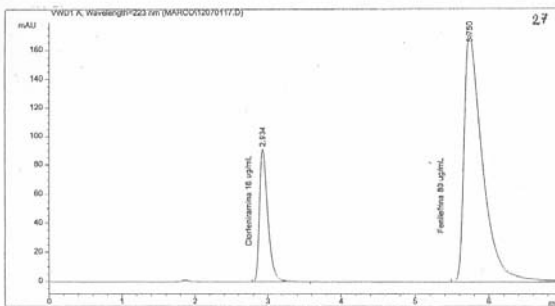
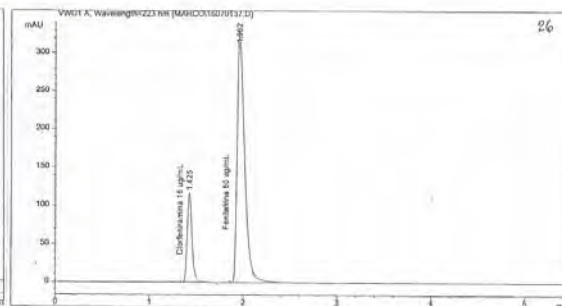
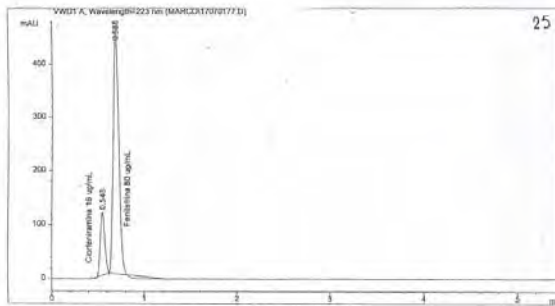
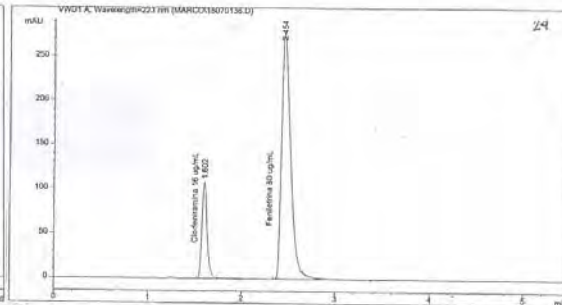
Se muestran aquí ejemplos de los cromatogramas obtenidos en cada corrida, en el orden establecido en el diseño experimental (página 35).

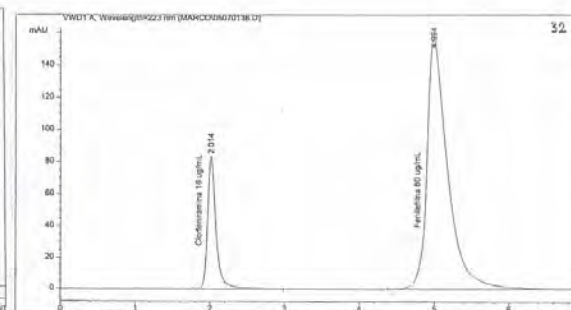
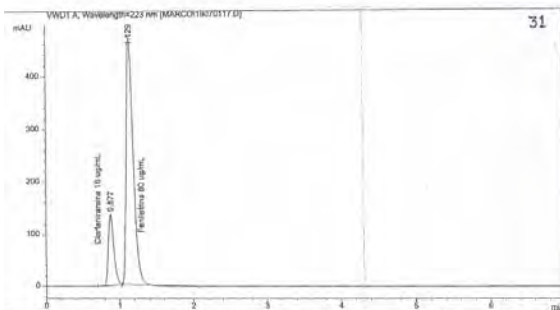
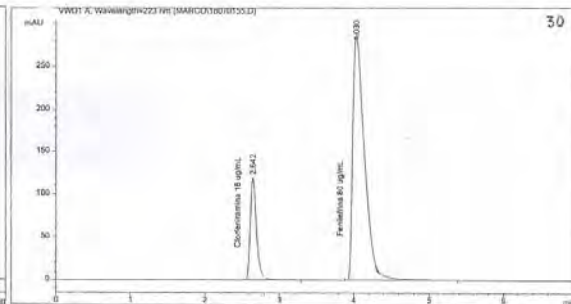
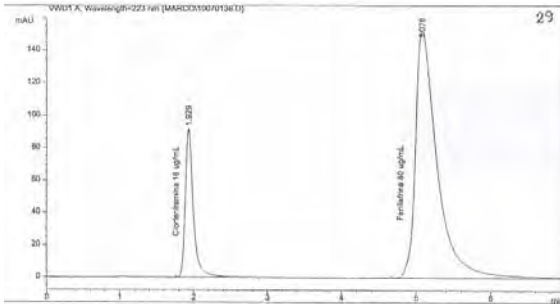












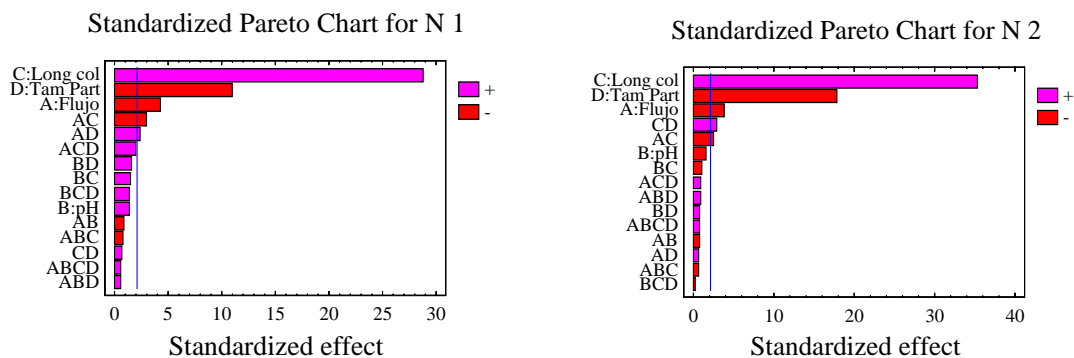


ANEXO 2.

A2.1. NÚMERO DE PLATOS TEÓRICOS (N).

A2.1.1. Efectos estimados sobre N.

a) Diagramas de Pareto.



Según los diagramas de Pareto para N 1 y N 2, es evidente que las características de la columna (longitud y tamaño de partícula) tienen mucha mayor influencia sobre N, mientras que los otros factores principales, flujo y pH, así como las interacciones entre los cuatro factores, tienen efectos relativamente menores.

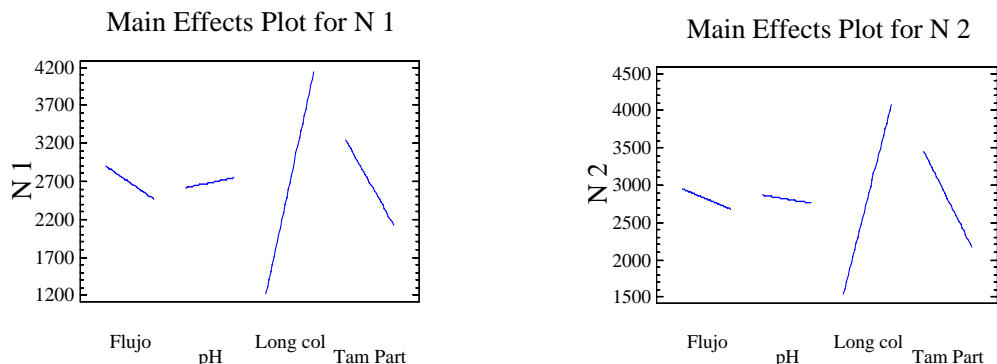
Hay que resaltar aquí la mínima influencia del pH sobre la respuesta N, teniendo un efecto incluso menor que algunas de las interacciones. Cabe señalar que el rango de pH manejado está dentro de las especificaciones de uso señaladas para las columnas, cuando esta información está disponible.

b) Gráficos de Efectos Estimados.

| Estimated effects for N 1 | | Estimated effects for N 2 | |
|---------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|
| average | = 2681.34 +/- 51.062 | average | = 2813.2 +/- 36.2572 |
| A:Flujo | = -432.894 +/- 102.124 | A:Flujo | = -265.969 +/- 72.5144 |
| B:pH | = 128.069 +/- 102.124 | B:pH | = -103.906 +/- 72.5144 |
| C:Long col | = 2930.07 +/- 102.124 | C:Long col | = 2551.29 +/- 72.5144 |
| D:Tam Part | = -1108.06 +/- 102.124 | D:Tam Part | = -1284.72 +/- 72.5144 |
| AB | = -79.4313 +/- 102.124 | AB | = -47.3938 +/- 72.5144 |
| AC | = -296.181 +/- 102.124 | AC | = -171.444 +/- 72.5144 |
| AD | = 239.869 +/- 102.124 | AD | = 41.5187 +/- 72.5144 |
| BC | = 146.931 +/- 102.124 | BC | = -64.5563 +/- 72.5144 |
| BD | = 155.431 +/- 102.124 | BD | = 50.5063 +/- 72.5144 |
| CD | = 60.3312 +/- 102.124 | CD | = 200.756 +/- 72.5144 |
| ABC | = -68.2937 +/- 102.124 | ABC | = -38.2687 +/- 72.5144 |
| ABD | = 46.6313 +/- 102.124 | ABD | = 55.5688 +/- 72.5144 |
| ACD | = 198.931 +/- 102.124 | ACD | = 60.7687 +/- 72.5144 |
| BCD | = 131.994 +/- 102.124 | BCD | = -12.7188 +/- 72.5144 |
| ABCD | = 49.1187 +/- 102.124 | ABCD | = 49.9687 +/- 72.5144 |
| block | = 92.7313 +/- 102.124 | block | = 107.381 +/- 72.5144 |

Standard errors are based on total error with 15 d.f.

Analizando la tabla y las gráficas de efectos principales para N1 y N 2, se observa que tanto la longitud de la columna como el tamaño de partícula de la fase estacionaria, tienen efectos de un orden de magnitud (aproximadamente diez veces) más grande que el resto de los factores, por lo que habrá que determinar cuáles de estos son estadísticamente significativos.



El efecto de mayor influencia sobre la respuesta N es el generado por la longitud de la columna, siendo además un efecto positivo, lo cual refuerza el concepto teórico de que a mayor longitud de la columna, mayor número de platos teóricos y por lo tanto mayor eficiencia.

En orden de influencia, le sigue el tamaño de partícula, aunque con un efecto negativo, lo que nos indica que al disminuir el tamaño de partícula, aumenta el número de platos teóricos.

En cuanto al flujo, se observa que su efecto es menor al del efecto principal, pero además, que es un efecto negativo, señalando que a menor flujo, mayor número de platos teóricos.

Al parecer, el pH presenta un efecto mínimo sobre la respuesta, por lo que habrá que establecer primero de manera formal si éste efecto es estadísticamente significativo como para ser tomado en cuenta.

Por otra parte, se observa que el efecto del pH tiene diferente sentido en cada molécula, esto puede deberse a la naturaleza propia de las mismas, las cuales se ven más o menos afectadas en su equilibrio iónico o incluso a alteraciones en el funcionamiento de las columnas por su probable uso fuera de especificaciones, en aquellas donde esa información no está disponible.

Si se consideran sólo estos efectos principales, podemos correr el factor C en su nivel alto, A y D en su nivel bajo, manteniendo B en cualquiera de sus niveles, para maximizar el número de platos teóricos N, es decir, la eficiencia de la columna.

En este caso, las interacciones de los factores no tienen efectos importantes sobre esta respuesta, por lo que no se consideran para su análisis.

c) Análisis de Varianza.

En las tablas de análisis de varianza para N 1 y N 2 observamos que el pH es el único factor principal que no tiene influencia estadísticamente significativa sobre el número de platos teóricos, confirmando que el pequeño efecto mostrado es despreciable.

| Analysis of Variance for N 1 | | | | | |
|------------------------------|----------------|----|-------------|---------|---------|
| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
| A:Flujo | 1.49918E6 | 1 | 1.49918E6 | 17.97 | 0.0007 |
| B:pH | 131213.0 | 1 | 131213.0 | 1.57 | 0.2290 |
| C:Long col | 6.86824E7 | 1 | 6.86824E7 | 823.19 | 0.0000 |
| D:Tam Part | 9.82231E6 | 1 | 9.82231E6 | 117.72 | 0.0000 |
| AB | 50474.6 | 1 | 50474.6 | 0.60 | 0.4488 |
| AC | 701787.0 | 1 | 701787.0 | 8.41 | 0.0110 |
| AD | 460296.0 | 1 | 460296.0 | 5.52 | 0.0330 |
| BC | 172710.0 | 1 | 172710.0 | 2.07 | 0.1708 |
| BD | 193271.0 | 1 | 193271.0 | 2.32 | 0.1488 |
| CD | 29118.9 | 1 | 29118.9 | 0.35 | 0.5635 |
| ABC | 37312.3 | 1 | 37312.3 | 0.45 | 0.5138 |
| ABD | 17395.8 | 1 | 17395.8 | 0.21 | 0.6545 |
| ACD | 316589.0 | 1 | 316589.0 | 3.79 | 0.0704 |
| BCD | 139379.0 | 1 | 139379.0 | 1.67 | 0.2157 |
| ABCD | 19301.2 | 1 | 19301.2 | 0.23 | 0.6375 |
| blocks | 68792.7 | 1 | 68792.7 | 0.82 | 0.3782 |
| Total error | 1.25152E6 | 15 | 83434.4 | | |
| ----- | | | | | |
| Total (corr.) | 8.35931E7 | 31 | | | |
| R-squared = 98.5028 percent | | | | | |

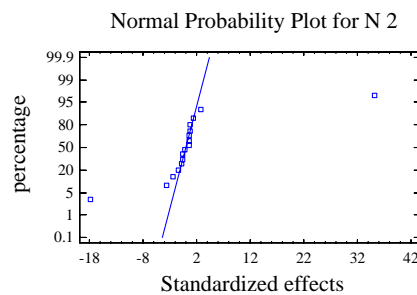
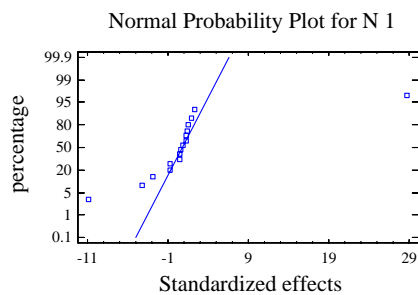


| Analysis of Variance for N 2 | | | | | |
|------------------------------|----------------|----|-------------|----------------|---------|
| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
| A:Flujo | 565915.0 | 1 | 565915.0 | 13.45 | 0.0023 |
| B:pH | 86372.1 | 1 | 86372.1 | 2.05 | 0.1724 |
| C:Long col | 5.20728E7 | 1 | 5.20728E7 | 1237.86 | 0.0000 |
| D:Tam Part | 1.3204E7 | 1 | 1.3204E7 | 313.88 | 0.0000 |
| AB | 17969.3 | 1 | 17969.3 | 0.43 | 0.5233 |
| AC | 235144.0 | 1 | 235144.0 | 5.59 | 0.0320 |
| AD | 13790.5 | 1 | 13790.5 | 0.33 | 0.5754 |
| BC | 33340.1 | 1 | 33340.1 | 0.79 | 0.3874 |
| BD | 20407.1 | 1 | 20407.1 | 0.49 | 0.4968 |
| CD | 322425.0 | 1 | 322425.0 | 7.66 | 0.0143 |
| ABC | 11716.0 | 1 | 11716.0 | 0.28 | 0.6054 |
| ABD | 24703.1 | 1 | 24703.1 | 0.59 | 0.4554 |
| ACD | 29542.7 | 1 | 29542.7 | 0.70 | 0.4152 |
| BCD | 1294.13 | 1 | 1294.13 | 0.03 | 0.8631 |
| ABCD | 19975.0 | 1 | 19975.0 | 0.47 | 0.5013 |
| blocks | 92245.9 | 1 | 92245.9 | 2.19 | 0.1594 |
| Total error | 631001.0 | 15 | 42066.7 | | |
| ----- | | | | | |
| Total (corr.) | 6.73827E7 | 31 | | | |
| R-squared = 99.0636 percent | | | | | |

En conclusión, los efectos estadísticamente significativos que se observan en este análisis son los generados por los factores principales A, C y D. Si consideramos sólo estos, podemos correr un experimento al nivel alto de C y el nivel bajo de A y D, para maximizar el número de platos teóricos.

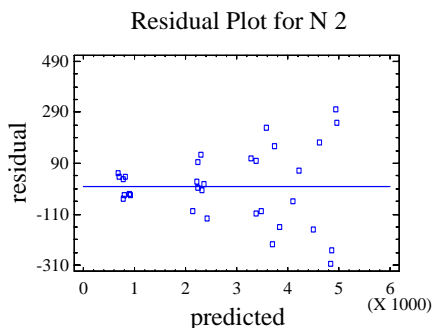
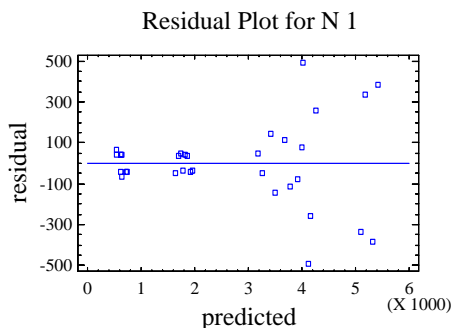
A2.1.2. Comprobación de la idoneidad del modelo.

a) Gráficos de Probabilidad Normal.



Mediante las gráficas de probabilidad normal para N 1 y N 2 podemos observar claramente cómo los efectos más importantes se muestran como errores fuera de la normalidad y están representados por los puntos que se alejan de la línea recta que representa normalidad, siendo estos los producidos por C y D, apareciendo este último a la izquierda de la recta (negativo), mientras que los errores insignificantes están normalmente distribuidos sobre la línea. **No existe alguna fuerte indicación de no-normalidad, ni evidencia que sugiera posibles residuos inusitados.**

b) Gráficos de Residuos contra el Valor Ajustado.





Las gráficas de residuos para N 1 y N 2 no revelan un patrón evidente de los residuos con respecto a los valores ajustados mediante la ecuación que describe al modelo y aunque hay una pequeña variación en la varianza de las observaciones, no es tan importante como para considerar que exista relación de los residuos con alguna variable, es decir, que los residuos no sean independientes.

De lo anterior se concluye entonces que el modelo explica adecuadamente los datos obtenidos y que los errores son independientes, por lo que podemos aceptar entonces las conclusiones derivadas del análisis de varianza.

A2.1.3. Robustez.

a) Ecuación del Modelo.

| Regression coeffs. for N 1 | | Regression coeffs. for N 2 | |
|----------------------------|------------|----------------------------|------------|
| constant | = 3376.45 | constant | = 6708.03 |
| A:Flujo | = -2634.06 | A:Flujo | = -2623.34 |
| B:pH | = -785.894 | B:pH | = -1105.04 |
| C:Long col | = 231.015 | C:Long col | = -316.591 |
| D:Tam Part | = -640.912 | D:Tam Part | = -1570.04 |
| AB | = 1317.91 | AB | = 1033.09 |
| AC | = 380.737 | AC | = 626.244 |
| AD | = 508.125 | AD | = 576.406 |
| BC | = 135.606 | BC | = 187.779 |
| BD | = 97.8687 | BD | = 253.419 |
| CD | = -28.4025 | CD | = 144.584 |
| ABC | = -264.769 | ABC | = -238.144 |
| ABD | = -258.031 | ABD | = -221.844 |
| ACD | = -72.45 | ACD | = -144.506 |
| BCD | = -12.8962 | BCD | = -42.5187 |
| ABCD | = 49.1187 | ABCD | = 49.9687 |

Los valores de las variables se especifican en sus unidades originales.

La tabla de coeficientes de regresión para N 1 y N 2, nos muestra los coeficientes para la ecuación que se ajusta mejor a los datos de cada respuesta, quedando las ecuaciones entonces como:

$$N 1 = 3376.45 - 2634.06 * \text{Flujo} - 785.894 * \text{pH} + 231.015 * \text{Long col} - 640.912 * \text{Tam Part} + 1317.91 * \text{Flujo} * \text{pH} + 380.737 * \text{Flujo} * \text{Long col} + 508.125 * \text{Flujo} * \text{Tam Part} + 135.606 * \text{pH} * \text{Long col} + 97.8687 * \text{pH} * \text{Tam Part} - 28.4025 * \text{Long col} * \text{Tam Part} - 264.769 * \text{Flujo} * \text{pH} * \text{Long col} - 258.031 * \text{Flujo} * \text{pH} * \text{Tam Part} - 72.45 * \text{Flujo} * \text{Long col} * \text{Tam Part} - 12.8962 * \text{pH} * \text{Long col} * \text{Tam Part} + 49.1187 * \text{Flujo} * \text{pH} * \text{Long col} * \text{Tam Part}$$

$$N 2 = 6708.03 - 2623.34 * \text{Flujo} - 1105.04 * \text{pH} - 316.591 * \text{Long col} - 1570.04 * \text{Tam Part} + 1033.09 * \text{Flujo} * \text{pH} + 626.244 * \text{Flujo} * \text{Long col} + 576.406 * \text{Flujo} * \text{Tam Part} + 187.779 * \text{pH} * \text{Long col} + 253.419 * \text{pH} * \text{Tam Part} + 144.584 * \text{Long col} * \text{Tam Part} - 238.144 * \text{Flujo} * \text{pH} * \text{Long col} - 221.844 * \text{Flujo} * \text{pH} * \text{Tam Part} - 144.506 * \text{Flujo} * \text{Long col} * \text{Tam Part} - 42.5187 * \text{pH} * \text{Long col} * \text{Tam Part} + 49.9687 * \text{Flujo} * \text{pH} * \text{Long col} * \text{Tam Part}$$

b) Predicción de Resultados.

Con ayuda de estos modelos, se puede calcular el número de platos teóricos que se obtendrían al trabajar bajo ciertas condiciones específicas (tablas de estimación de resultados para N 1 y N 2):



 Estimation Results for N 1

| Row | Observed Value | Fitted Value | Lower 95.0% CL for Mean | Upper 95.0% CL for Mean |
|-----|----------------|--------------|-------------------------|-------------------------|
| 1 | 4940.1 | 5323.33 | 4874.59 | 5772.08 |
| 2 | 1589.2 | 1639.83 | 1191.09 | 2088.58 |
| 3 | 3799.1 | 3686.23 | 3237.49 | 4134.98 |
| 4 | 665.6 | 624.534 | 175.791 | 1073.28 |
| 5 | 3223.7 | 3175.78 | 2727.04 | 3624.53 |
| 6 | 3559.8 | 3414.08 | 2965.34 | 3862.83 |
| 7 | 574.7 | 533.334 | 84.5911 | 982.078 |
| 8 | 3909.2 | 4167.88 | 3719.14 | 4616.63 |
| 9 | 609.3 | 542.384 | 93.6411 | 991.128 |
| 10 | 3835.0 | 3911.98 | 3463.24 | 4360.73 |
| 11 | 4519.0 | 4028.48 | 3579.74 | 4477.23 |
| 12 | 1726.7 | 1690.78 | 1242.04 | 2139.53 |
| 13 | 1870.6 | 1826.13 | 1377.39 | 2274.88 |
| 14 | 4757.0 | 5092.28 | 4643.54 | 5541.03 |
| 15 | 682.7 | 642.734 | 193.991 | 1091.48 |
| 16 | 1897.9 | 1859.78 | 1411.04 | 2308.53 |
| 17 | 5799.3 | 5416.07 | 4967.32 | 5864.81 |
| 18 | 1783.2 | 1732.57 | 1283.82 | 2181.31 |
| 19 | 3666.1 | 3778.97 | 3330.22 | 4227.71 |
| 20 | 676.2 | 717.266 | 268.522 | 1166.01 |
| 21 | 3220.6 | 3268.52 | 2819.77 | 3717.26 |
| 22 | 3361.1 | 3506.82 | 3058.07 | 3955.56 |
| 23 | 584.7 | 626.066 | 177.322 | 1074.81 |
| 24 | 4519.3 | 4260.62 | 3811.87 | 4709.36 |
| 25 | 568.2 | 635.116 | 186.372 | 1083.86 |
| 26 | 4081.7 | 4004.72 | 3555.97 | 4453.46 |
| 27 | 3630.7 | 4121.22 | 3672.47 | 4569.96 |
| 28 | 1747.6 | 1783.52 | 1334.77 | 2232.26 |
| 29 | 1874.4 | 1918.87 | 1470.12 | 2367.61 |
| 30 | 5520.3 | 5185.02 | 4736.27 | 5633.76 |
| 31 | 695.5 | 735.466 | 286.722 | 1184.21 |
| 32 | 1914.4 | 1952.52 | 1503.77 | 2401.26 |

 Estimation Results for N 2

| Row | Observed Value | Fitted Value | Lower 95.0% CL for Mean | Upper 95.0% CL for Mean |
|-----|----------------|--------------|-------------------------|-------------------------|
| 1 | 4537.3 | 4839.46 | 4520.82 | 5158.1 |
| 2 | 2034.6 | 2130.31 | 1811.67 | 2448.95 |
| 3 | 3377.5 | 3270.21 | 2951.57 | 3588.85 |
| 4 | 814.0 | 784.309 | 465.673 | 1102.95 |
| 5 | 3479.6 | 3381.01 | 3062.37 | 3699.65 |
| 6 | 3894.4 | 3736.01 | 3417.37 | 4054.65 |
| 7 | 729.6 | 694.409 | 375.773 | 1013.05 |
| 8 | 4336.1 | 4506.01 | 4187.37 | 4824.65 |
| 9 | 724.6 | 674.059 | 355.423 | 992.695 |
| 10 | 4048.5 | 4108.56 | 3789.92 | 4427.2 |
| 11 | 3814.1 | 3585.46 | 3266.82 | 3904.1 |
| 12 | 2239.5 | 2247.61 | 1928.97 | 2566.25 |
| 13 | 2236.3 | 2220.31 | 1901.67 | 2538.95 |
| 14 | 4605.2 | 4854.51 | 4535.87 | 5173.15 |
| 15 | 848.2 | 811.709 | 493.073 | 1130.35 |
| 16 | 2432.6 | 2308.16 | 1989.52 | 2626.8 |
| 17 | 5249.0 | 4946.84 | 4628.2 | 5265.48 |
| 18 | 2333.4 | 2237.69 | 1919.05 | 2556.33 |
| 19 | 3270.3 | 3377.59 | 3058.95 | 3696.23 |
| 20 | 862.0 | 891.691 | 573.055 | 1210.33 |
| 21 | 3389.8 | 3488.39 | 3169.75 | 3807.03 |
| 22 | 3685.0 | 3843.39 | 3524.75 | 4162.03 |
| 23 | 766.6 | 801.791 | 483.155 | 1120.43 |
| 24 | 4783.3 | 4613.39 | 4294.75 | 4932.03 |
| 25 | 730.9 | 781.441 | 462.805 | 1100.08 |
| 26 | 4276.0 | 4215.94 | 3897.3 | 4534.58 |
| 27 | 3464.2 | 3692.84 | 3374.2 | 4011.48 |
| 28 | 2363.1 | 2354.99 | 2036.35 | 2673.63 |
| 29 | 2311.7 | 2327.69 | 2009.05 | 2646.33 |
| 30 | 5211.2 | 4961.89 | 4643.25 | 5280.53 |
| 31 | 882.6 | 919.091 | 600.455 | 1237.73 |
| 32 | 2291.1 | 2415.54 | 2096.9 | 2734.18 |

Estas tablas contienen información acerca de los valores de N 1 y N 2 generados al usar los modelos ajustados. Las tablas incluyen:

(1) El valor observado de N. (2) La predicción del valor de N usando el modelo ajustado. (3) Los límites de confianza (CL) al 95% para la respuesta media ajustada.

c) Optimización de Resultados.

El modelo nos permite hacer predicciones sobre las condiciones óptimas para obtener valores de N1 ó N 2 más adecuados, es decir optimizar la eficiencia de la columna. Podemos además predecir, por ejemplo, el valor de N2 al establecer las condiciones óptimas para N1.



Optimize Response

 Goal: maximize N1

 Optimum value of N1 = **5369.7**
 Calculated value of N2 = **4893.15**

| Factor | Low | High | Optimum |
|----------|-----|------|-------------|
| Flujo | 0.6 | 1.0 | 0.6 |
| pH | 3.0 | 4.0 | 4.0 |
| Long col | 5.0 | 15.0 | 15.0 |
| Tam Part | 3.0 | 5.0 | 3.0 |

De igual manera, podemos calcular primero las condiciones óptimas para N2 y predecir el valor de la respuesta N1.

Optimize Response

 Goal: maximize N2

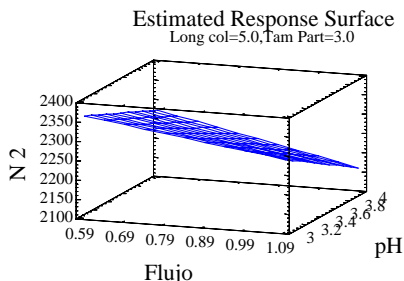
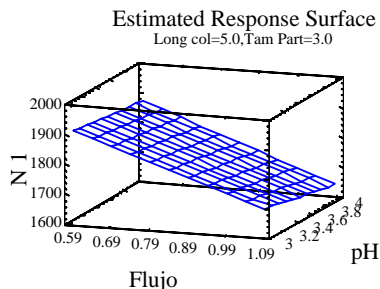
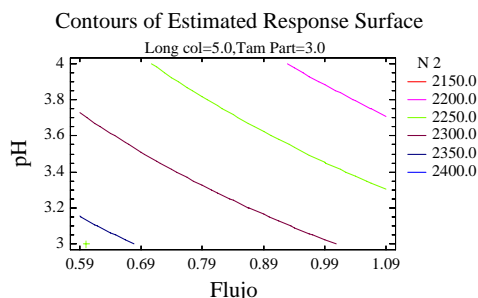
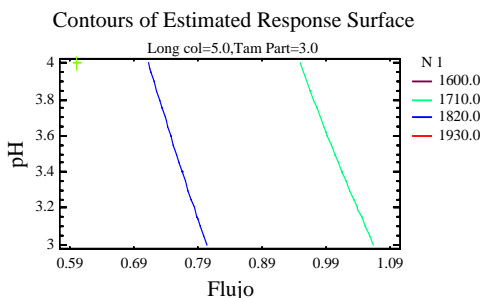
 Optimum value of N2= **4908.2**
 Calculated value of N1= **5138.65**

| Factor | Low | High | Optimum |
|----------|-----|------|-------------|
| Flujo | 0.6 | 1.0 | 0.6 |
| pH | 3.0 | 4.0 | 3.0 |
| Long col | 5.0 | 15.0 | 15.0 |
| Tam Part | 3.0 | 5.0 | 3.0 |

Para N 1 y N 2, las condiciones óptimas no son las mismas (cambia el valor de pH). Sin embargo, la variación observada en una de ellas al optimizar la otra es prácticamente insignificante.

Los datos generados concuerdan plenamente con la teoría propuesta arriba obteniendo un mejor desempeño de la columna cuando se tiene un flujo lento, mayor longitud de la columna y menor tamaño de partícula. En cuanto al pH, es evidente también que los valores que generan una mayor eficiencia están en función de la molécula analizada.

d) Superficies de Respuesta.



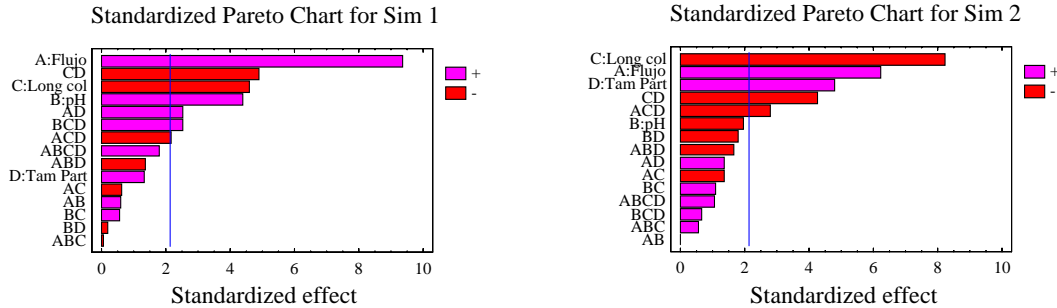
En las gráficas de contornos para N 1 y N 2, se puede observar que el factor A (flujo) genera mejores respuestas a medida que es más lento. Por su parte, el factor B (pH) no genera cambios dramáticos en la respuesta en el intervalo examinado, pero sí se observa clara diferencia de acuerdo con la molécula examinada, mejorando la respuesta al aumentar el pH para el caso de N1 y al disminuir el pH para el caso de N2.



A2.2. SIMETRÍA (Sim).

A2.2.1. Efectos estimados sobre Sim.

a) Diagramas de Pareto.



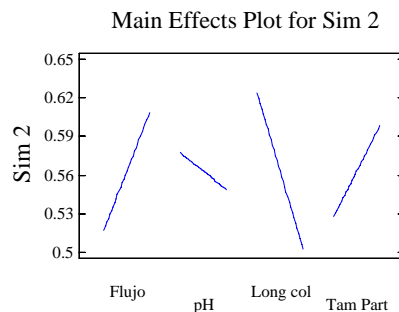
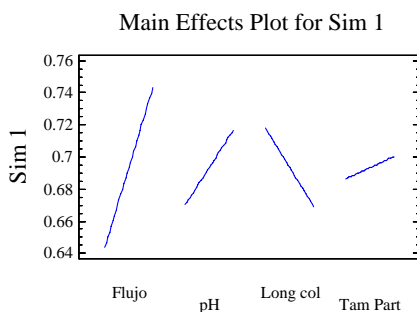
En los diagramas de Pareto para Sim 1 y Sim 2, se observa la importancia del efecto generado por el flujo, así como por la longitud de la columna, mientras que los otros factores principales, tamaño de partícula y pH, así como sus interacciones, tienen efectos menores. Cabe señalar aquí la diferencia que tiene el pH sobre la respuesta de los dos analitos, teniendo un efecto positivo sobre la respuesta del analito 1 y negativo para la respuesta del analito 2.

Entenderemos aquí, que una respuesta positiva significa que se tiene un valor de simetría cercano a uno, mientras que una respuesta negativa representa un valor alejado de uno. En ningún caso se obtuvieron valores iguales o mayores a uno.

b) Gráficos de Efectos Estimados.

| Estimated effects for Sim 1 | | | Estimated effects for Sim 2 | | |
|-----------------------------|---|--------------------------|-----------------------------|---|--------------------------|
| average | = | 0.693406 +/- 0.00533746 | average | = | 0.563156 +/- 0.00734595 |
| A:Flujo | = | 0.0996875 +/- 0.0106749 | A:Flujo | = | 0.0910625 +/- 0.0146919 |
| B:pH | = | 0.0465625 +/- 0.0106749 | B:pH | = | -0.0281875 +/- 0.0146919 |
| C:Long col | = | -0.0486875 +/- 0.0106749 | C:Long col | = | -0.120562 +/- 0.0146919 |
| D:Tam Part | = | 0.0138125 +/- 0.0106749 | D:Tam Part | = | 0.0698125 +/- 0.0146919 |
| AB | = | 0.0059375 +/- 0.0106749 | AB | = | -0.0001875 +/- 0.0146919 |
| AC | = | -0.0065625 +/- 0.0106749 | AC | = | -0.0195625 +/- 0.0146919 |
| AD | = | 0.0266875 +/- 0.0106749 | AD | = | 0.0195625 +/- 0.0146919 |
| BC | = | 0.0055625 +/- 0.0106749 | BC | = | 0.0154375 +/- 0.0146919 |
| BD | = | -0.0016875 +/- 0.0106749 | BD | = | -0.0259375 +/- 0.0146919 |
| CD | = | -0.0519375 +/- 0.0106749 | CD | = | -0.0623125 +/- 0.0146919 |
| ABC | = | -0.0003125 +/- 0.0106749 | ABC | = | 0.0076875 +/- 0.0146919 |
| ABD | = | -0.0143125 +/- 0.0106749 | ABD | = | -0.0239375 +/- 0.0146919 |
| ACD | = | -0.0228125 +/- 0.0106749 | ACD | = | -0.0408125 +/- 0.0146919 |
| BCD | = | 0.0265625 +/- 0.0106749 | BCD | = | 0.0094375 +/- 0.0146919 |
| ABCD | = | 0.0186875 +/- 0.0106749 | ABCD | = | 0.0151875 +/- 0.0146919 |
| block | = | 0.0040625 +/- 0.0106749 | block | = | -0.0191875 +/- 0.0146919 |

Standard errors are based on total error with 15 d.f.





Analizando la tabla y las gráficas de efectos principales para Sim1 y Sim 2, se observa el efecto positivo del flujo sobre la respuesta, lo que confirma que a mayor flujo, más simétrico será el pico, debido a que no se permite la difusión longitudinal. Por su parte, el efecto del tamaño de partícula, también positivo, se debe a que a mayor tamaño de ésta, mayor será el volumen interno “estancado” de fase móvil (o bien las partículas tendrán menos rutas para poderse dispersar), lo que retardará el intercambio entre fase estacionaria y fase móvil, generando una dispersión uniforme de las partículas de analito y por tanto mayor simetría.

El efecto negativo de la longitud de la columna, se debe a que a mayor longitud hay más tiempo a que las partículas se dispersen revirtiendo el efecto generado por el tamaño de partícula.

Finalmente, se observa el efecto del pH, positivo para Sim1 y negativo para Sim2. El sentido de este efecto se debe a la naturaleza de cada analito, además de que para Sim2 es muy pequeño, por lo que hay que revisar si es estadísticamente significativo.

Si se consideran sólo los efectos principales, podemos correr el problema usando los niveles altos de los factores A y D; C en su nivel bajo y manteniendo el factor B en cualquiera de sus niveles, para incrementar el valor de Simetría de los picos.

c) Análisis de Varianza.

Según las tablas de análisis de varianza para Sim 1 y Sim 2 observamos que entre los factores principales, sólo el tamaño de partícula no tiene influencia estadísticamente significativa sobre Sim1, confirmando la poca influencia de éste observada antes.

Para las interacciones, es notoria la influencia sobre la variación de la respuesta, de la interacción C-D, la cual tiene incluso efecto más importante sobre Sim1, que el factor C de manera individual.

Analysis of Variance for Sim 1

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|-----------------------------|----------------|----|--------------|--------------|---------|
| A:Flujo | 0.0795008 | 1 | 0.0795008 | 87.21 | 0.0000 |
| B:pH | 0.0173445 | 1 | 0.0173445 | 19.03 | 0.0006 |
| C:Long col | 0.0189638 | 1 | 0.0189638 | 20.80 | 0.0004 |
| D:Tam Part | 0.00152628 | 1 | 0.00152628 | 1.67 | 0.2153 |
| AB | 0.000282031 | 1 | 0.000282031 | 0.31 | 0.5863 |
| AC | 0.000344531 | 1 | 0.000344531 | 0.38 | 0.5479 |
| AD | 0.00569778 | 1 | 0.00569778 | 6.25 | 0.0245 |
| BC | 0.000247531 | 1 | 0.000247531 | 0.27 | 0.6099 |
| BD | 0.0000227813 | 1 | 0.0000227813 | 0.02 | 0.8765 |
| CD | 0.02158 | 1 | 0.02158 | 23.67 | 0.0002 |
| ABC | 7.8125E-7 | 1 | 7.8125E-7 | 0.00 | 0.9770 |
| ABD | 0.00163878 | 1 | 0.00163878 | 1.80 | 0.2000 |
| ACD | 0.00416328 | 1 | 0.00416328 | 4.57 | 0.0495 |
| BCD | 0.00564453 | 1 | 0.00564453 | 6.19 | 0.0251 |
| ABCD | 0.00279378 | 1 | 0.00279378 | 3.06 | 0.1004 |
| blocks | 0.000132031 | 1 | 0.000132031 | 0.14 | 0.7089 |
| Total error | 0.0136745 | 15 | 0.000911631 | | |
| ----- | | | | | |
| Total (corr.) | 0.173558 | 31 | | | |
| R-squared = 92.1211 percent | | | | | |

Analysis of Variance for Sim 2

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|-----------------------------|----------------|----|-------------|--------------|---------|
| A:Flujo | 0.066339 | 1 | 0.066339 | 38.42 | 0.0000 |
| B:pH | 0.00635628 | 1 | 0.00635628 | 3.68 | 0.0743 |
| C:Long col | 0.116283 | 1 | 0.116283 | 67.34 | 0.0000 |
| D:Tam Part | 0.0389903 | 1 | 0.0389903 | 22.58 | 0.0003 |
| AB | 2.8125E-7 | 1 | 2.8125E-7 | 0.00 | 0.9900 |
| AC | 0.00306153 | 1 | 0.00306153 | 1.77 | 0.2029 |
| AD | 0.00306153 | 1 | 0.00306153 | 1.77 | 0.2029 |
| BC | 0.00190653 | 1 | 0.00190653 | 1.10 | 0.3100 |
| BD | 0.00538203 | 1 | 0.00538203 | 3.12 | 0.0978 |
| CD | 0.0310628 | 1 | 0.0310628 | 17.99 | 0.0007 |
| ABC | 0.000472781 | 1 | 0.000472781 | 0.27 | 0.6084 |
| ABD | 0.00458403 | 1 | 0.00458403 | 2.65 | 0.1241 |
| ACD | 0.0133253 | 1 | 0.0133253 | 7.72 | 0.0141 |
| BCD | 0.000712531 | 1 | 0.000712531 | 0.41 | 0.5303 |
| ABCD | 0.00184528 | 1 | 0.00184528 | 1.07 | 0.3176 |
| blocks | 0.00294528 | 1 | 0.00294528 | 1.71 | 0.2112 |
| Total error | 0.0259022 | 15 | 0.00172681 | | |
| ----- | | | | | |
| Total (corr.) | 0.32223 | 31 | | | |
| R-squared = 91.9616 percent | | | | | |



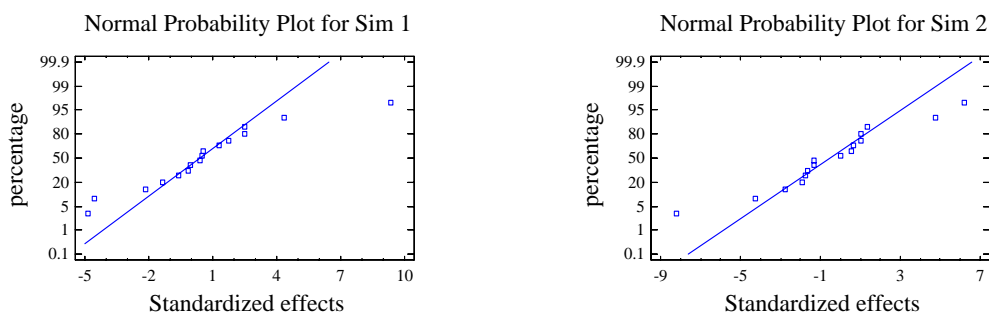
Destaca aquí el hecho de que el pH no tiene influencia estadísticamente significativa sobre Sim2, así como en sus interacciones. Al igual que para Sim1, en las interacciones, es notoria la influencia sobre la variación de la respuesta, de la interacción C-D, aunque no en el mismo orden.

En conclusión, los efectos principales A y C, son los que generan un mayor efecto sobre la respuesta medida, por lo que deben de considerarse para optimizar la misma.

Si consideramos solo la interacción A-C podemos correr un experimento a los niveles altos de A y el nivel bajo de C para aumentar el valor de la respuesta Simetría.

A2.2.2. Comprobación de la idoneidad del modelo.

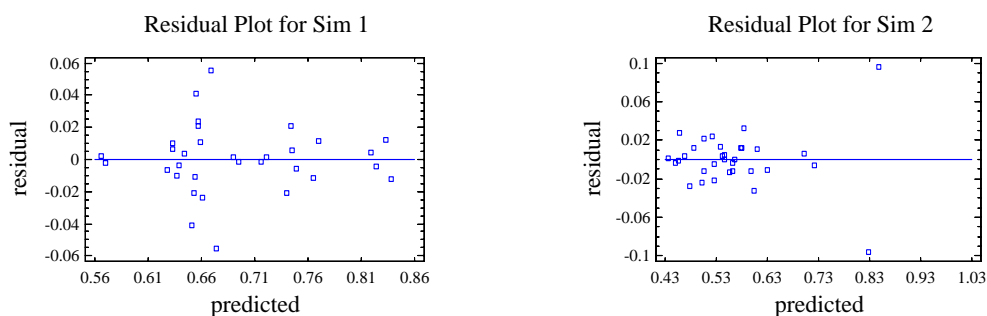
a) Gráficos de Probabilidad Normal.



En las gráficas de probabilidad normal para Sim 1 y Sim 2 observamos claramente los efectos más importantes sobre las respuestas, los cuales se muestran como errores fuera de la normalidad y están representados por los puntos que se alejan de la línea recta, siendo los más lejanos los generados por A, a la derecha de la recta y C-D a la izquierda, para Sim1. Para Sim2, son lo puntos que representan a A y C, los que ocupan los extremos de la gráfica. Estos datos coinciden con los mostrados anteriormente en los diagramas de Pareto.

Los errores insignificantes están normalmente distribuidos sobre la línea. **No existe alguna fuerte indicación de no-normalidad, ni evidencia que sugiera posibles residuos inusitados.**

b) Gráficos de Residuos contra el Valor Ajustado.



Las gráficas de residuos para Sim 1 y Sim 2 no revelan un patrón evidente de los residuos con respecto a los valores ajustados mediante la ecuación que describe al modelo y aunque hay una pequeña variación de la varianza de las observaciones, no es tan importante como para considerar que exista relación de los residuos con alguna variable, es decir, que los residuos no sean independientes.

De lo anterior se concluye entonces que el modelo explica adecuadamente los datos obtenidos y que los errores son independientes, por lo que podemos aceptar entonces las conclusiones derivadas del análisis de varianza.



A2.2.3. Robustez.

a) Ecuación del Modelo.

| Regression coeffs. for Sim 1 | | Regression coeffs. for Sim 2 | |
|------------------------------|--------------|------------------------------|--------------|
| constant | = 2.95456 | constant | = 3.24694 |
| A:Flujo | = -4.17406 | A:Flujo | = -4.21594 |
| B:pH | = -0.598563 | B:pH | = -0.686562 |
| C:Long col | = -0.157663 | C:Long col | = -0.177562 |
| D:Tam Part | = -0.617562 | D:Tam Part | = -0.708687 |
| AB | = 1.06656 | AB | = 1.00844 |
| AC | = 0.305063 | AC | = 0.257562 |
| AD | = 1.08531 | AD | = 1.20344 |
| BC | = 0.0399125 | BC | = 0.0379875 |
| BD | = 0.151938 | BD | = 0.172437 |
| CD | = 0.0376625 | CD | = 0.0460125 |
| ABC | = -0.0750625 | ABC | = -0.0530625 |
| ABD | = -0.258437 | ABD | = -0.271562 |
| ACD | = -0.0768125 | ACD | = -0.0735625 |
| BCD | = -0.0096375 | BCD | = -0.0102625 |
| ABCD | = 0.0186875 | ABCD | = 0.0151875 |

Los valores de las variables se especifican en sus unidades originales.

La tabla de coeficientes de regresión para Sim 1 y Sim 2 nos muestra los valores de los coeficientes para la ecuación que se ajusta mejor a los datos de cada respuesta, quedando las ecuaciones entonces como:

$$\text{Sim 1} = 2.95456 - 4.17406 \cdot \text{Flujo} - 0.598563 \cdot \text{pH} - 0.157663 \cdot \text{Long col} - 0.617562 \cdot \text{Tam Part} + 1.06656 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{pH} + 0.305063 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{Long col} + 1.08531 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{Tam Part} + 0.0399125 \cdot \text{pH} \cdot \text{Long col} + 0.151938 \cdot \text{pH} \cdot \text{Tam Part} + 0.0376625 \cdot \text{Long col} \cdot \text{Tam Part} - 0.0750625 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{pH} \cdot \text{Long col} - 0.258437 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{pH} \cdot \text{Tam Part} - 0.0768125 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{Long col} \cdot \text{Tam Part} - 0.0096375 \cdot \text{pH} \cdot \text{Long col} \cdot \text{Tam Part} + 0.0186875 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{pH} \cdot \text{Long col} \cdot \text{Tam Part}$$

$$\text{Sim 2} = 3.24694 - 4.21594 \cdot \text{Flujo} - 0.686562 \cdot \text{pH} - 0.177562 \cdot \text{Long col} - 0.708687 \cdot \text{Tam Part} + 1.00844 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{pH} + 0.257562 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{Long col} + 1.20344 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{Tam Part} + 0.0379875 \cdot \text{pH} \cdot \text{Long col} + 0.172437 \cdot \text{pH} \cdot \text{Tam Part} + 0.0460125 \cdot \text{Long col} \cdot \text{Tam Part} - 0.0530625 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{pH} \cdot \text{Long col} - 0.271562 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{pH} \cdot \text{Tam Part} - 0.0735625 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{Long col} \cdot \text{Tam Part} - 0.0102625 \cdot \text{pH} \cdot \text{Long col} \cdot \text{Tam Part} + 0.0151875 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{pH} \cdot \text{Long col} \cdot \text{Tam Part}$$

b) Predicción de Resultados.

Con ayuda de estos modelos, se puede calcular el número de platos teóricos que se obtendría al trabajar bajo ciertas condiciones específicas (tablas de estimación de resultados para Sim 1 y Sim 2):

| Estimation Results for Sim 1 | | | | |
|------------------------------|----------------|--------------|-------------------------|-------------------------|
| Row | Observed Value | Fitted Value | Lower 95.0% CL for Mean | Upper 95.0% CL for Mean |
| 1 | 0.644 | 0.654469 | 0.607562 | 0.701375 |
| 2 | 0.754 | 0.765469 | 0.718562 | 0.812375 |
| 3 | 0.719 | 0.739969 | 0.693062 | 0.786875 |
| 4 | 0.610 | 0.650969 | 0.604062 | 0.697875 |
| 5 | 0.632 | 0.652969 | 0.606062 | 0.699875 |
| 6 | 0.568 | 0.565969 | 0.519062 | 0.612875 |
| 7 | 0.824 | 0.819469 | 0.772562 | 0.866375 |
| 8 | 0.715 | 0.716469 | 0.669562 | 0.763375 |
| 9 | 0.846 | 0.833469 | 0.786562 | 0.880375 |
| 10 | 0.751 | 0.744969 | 0.698062 | 0.791875 |
| 11 | 0.643 | 0.632969 | 0.586062 | 0.679875 |
| 12 | 0.681 | 0.656969 | 0.610062 | 0.703875 |
| 13 | 0.725 | 0.669469 | 0.622562 | 0.716375 |
| 14 | 0.622 | 0.628469 | 0.581562 | 0.675375 |
| 15 | 0.692 | 0.690469 | 0.643562 | 0.737375 |
| 16 | 0.636 | 0.639469 | 0.592562 | 0.686375 |
| 17 | 0.669 | 0.658531 | 0.611625 | 0.705438 |
| 18 | 0.781 | 0.769531 | 0.722625 | 0.816438 |
| 19 | 0.765 | 0.744031 | 0.697125 | 0.790938 |
| 20 | 0.696 | 0.655031 | 0.608125 | 0.701938 |
| 21 | 0.678 | 0.657031 | 0.610125 | 0.703938 |
| 22 | 0.568 | 0.570031 | 0.523125 | 0.616938 |
| 23 | 0.819 | 0.823531 | 0.776625 | 0.870438 |
| 24 | 0.722 | 0.720531 | 0.673625 | 0.767438 |
| 25 | 0.825 | 0.837531 | 0.790625 | 0.884438 |
| 26 | 0.743 | 0.749031 | 0.702125 | 0.795938 |
| 27 | 0.627 | 0.637031 | 0.590125 | 0.683938 |
| 28 | 0.637 | 0.661031 | 0.614125 | 0.707938 |
| 29 | 0.618 | 0.673531 | 0.626625 | 0.720438 |
| 30 | 0.639 | 0.632531 | 0.585625 | 0.679438 |
| 31 | 0.693 | 0.694531 | 0.647625 | 0.741438 |
| 32 | 0.647 | 0.643531 | 0.596625 | 0.690438 |



Estimation Results for Sim 2

| Row | Observed Value | Fitted Value | Lower 95.0% CL for Mean | Upper 95.0% CL for Mean |
|-----|----------------|--------------|-------------------------|-------------------------|
| 1 | 0.455 | 0.456094 | 0.391536 | 0.520651 |
| 2 | 0.571 | 0.603594 | 0.539036 | 0.668151 |
| 3 | 0.505 | 0.526094 | 0.461536 | 0.590651 |
| 4 | 0.619 | 0.629594 | 0.565036 | 0.694151 |
| 5 | 0.543 | 0.556594 | 0.492036 | 0.621151 |
| 6 | 0.493 | 0.505094 | 0.440536 | 0.569651 |
| 7 | 0.716 | 0.721594 | 0.657036 | 0.786151 |
| 8 | 0.55 | 0.545094 | 0.480536 | 0.609651 |
| 9 | 0.944 | 0.847594 | 0.783036 | 0.912151 |
| 10 | 0.565 | 0.565094 | 0.500536 | 0.629651 |
| 11 | 0.449 | 0.477094 | 0.412536 | 0.541651 |
| 12 | 0.592 | 0.580594 | 0.516036 | 0.645151 |
| 13 | 0.546 | 0.522094 | 0.457536 | 0.586651 |
| 14 | 0.472 | 0.468594 | 0.404036 | 0.533151 |
| 15 | 0.586 | 0.597594 | 0.533036 | 0.662151 |
| 16 | 0.558 | 0.561594 | 0.497036 | 0.626151 |
| 17 | 0.438 | 0.436906 | 0.372349 | 0.501464 |
| 18 | 0.617 | 0.584406 | 0.519849 | 0.648964 |
| 19 | 0.528 | 0.506906 | 0.442349 | 0.571464 |
| 20 | 0.621 | 0.610406 | 0.545849 | 0.674964 |
| 21 | 0.551 | 0.537406 | 0.472849 | 0.601964 |
| 22 | 0.498 | 0.485906 | 0.421349 | 0.550464 |
| 23 | 0.708 | 0.702406 | 0.637849 | 0.766964 |
| 24 | 0.521 | 0.525906 | 0.461349 | 0.590464 |
| 25 | 0.732 | 0.828406 | 0.763849 | 0.892964 |
| 26 | 0.546 | 0.545906 | 0.481349 | 0.610464 |
| 27 | 0.486 | 0.457906 | 0.393349 | 0.522464 |
| 28 | 0.55 | 0.561406 | 0.496849 | 0.625964 |
| 29 | 0.479 | 0.502906 | 0.438349 | 0.567464 |
| 30 | 0.446 | 0.449406 | 0.384849 | 0.513964 |
| 31 | 0.59 | 0.578406 | 0.513849 | 0.642964 |
| 32 | 0.546 | 0.542406 | 0.477849 | 0.606964 |

Estas tablas contienen información acerca de los valores de Sim 1 y Sim 2 generados al usar los modelos ajustados. Las tablas incluyen:

(1) El valor observado de Sim. (2) La predicción del valor de Sim usando el modelo ajustado. (3) Los límites de confianza (CL) al 95% para la respuesta media ajustada.

c) Optimización de Resultados.

El modelo nos permite hacer predicciones sobre las condiciones óptimas para obtener los valores de Sim 1 ó Sim 2 más cercanos a 1, evitando el coleo y mejorando la separación de los analitos. Podemos además predecir, por ejemplo, el valor de Sim 2 al establecer las condiciones óptimas para Sim 1.

```
Optimize Response
-----
Goal: maximize Sim 1

Optimum value of Sim 1 = 0.8355
Calculated value of Sim 2 = 0.838
```

| Factor | Low | High | Optimum |
|----------|-----|------|---------|
| Flujo | 0.6 | 1.0 | 1.0 |
| pH | 3.0 | 4.0 | 3.0 |
| Long col | 5.0 | 15.0 | 5.0 |
| Tam Part | 3.0 | 5.0 | 5.0 |

De igual manera, podemos calcular primero las condiciones óptimas para Sim 2 y predecir el valor de la respuesta Sim 1.

```
Optimize Response
-----
Goal: maximize Sim 2

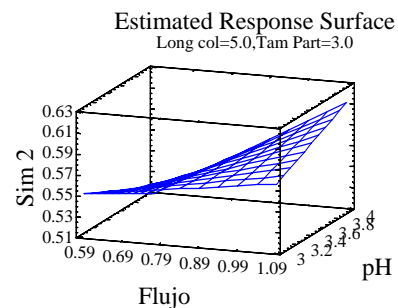
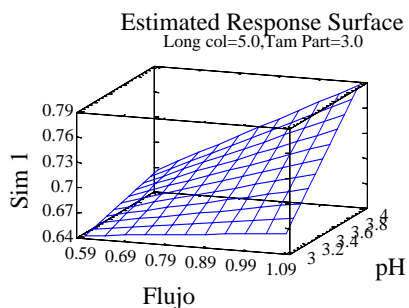
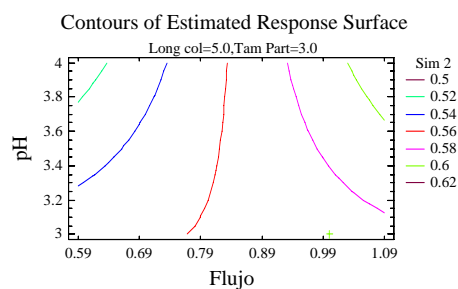
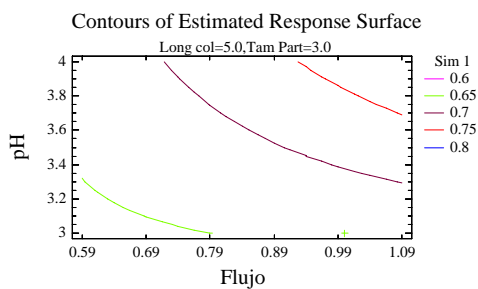
Optimum value = 0.838
Calculated value of Sim 1 = 0.8355
```

| Factor | Low | High | Optimum |
|----------|-----|------|---------|
| Flujo | 0.6 | 1.0 | 1.0 |
| pH | 3.0 | 4.0 | 3.0 |
| Long col | 5.0 | 15.0 | 5.0 |
| Tam Part | 3.0 | 5.0 | 5.0 |



Como vemos, ambas respuestas se optimizan bajo las mismas condiciones. Los datos generados concuerdan plenamente con la teoría ya propuesta, obteniendo valores mayores de simetría cuando se tiene un flujo alto, menor longitud de la columna y mayor tamaño de partícula. En cuanto al pH, es evidente también que los valores que generan una mayor eficiencia están en función de la molécula analizada, aunque a bajo pH se producen picos más simétricos, como se mencionó antes.

d) Superficies de Respuesta.



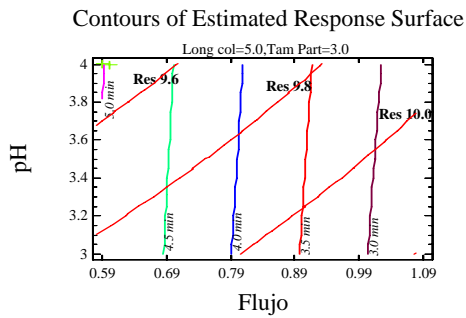
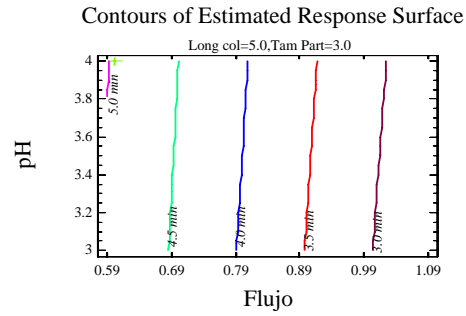
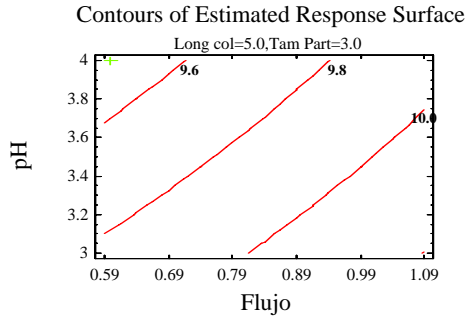
En las gráficas de contornos para Sim 1 y Sim 2, es muy claro como el factor A (flujo) genera mejores respuestas (valores de Sim más cercanos a uno) a medida que es más rápido. Por su parte, el factor B (pH) genera cambios menos dramáticos en la respuesta en el intervalo examinado, aumentando la Simetría en Sim1 y disminuyéndola en Sim2.



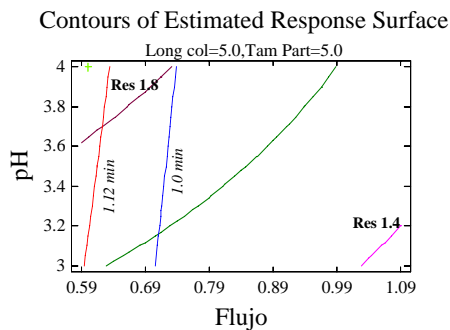
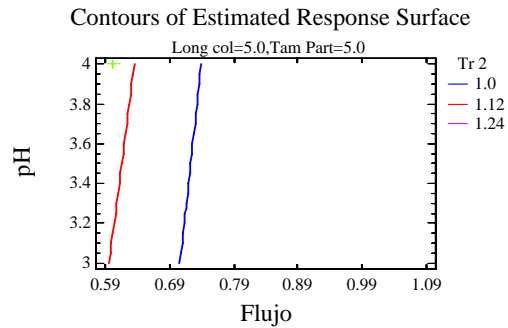
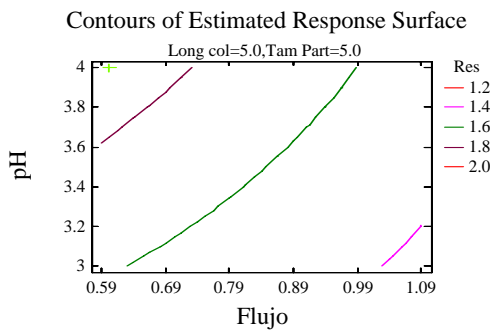
ANEXO 3.

A3.1. CONSTRUCCIÓN DE DIAGRAMAS DE CONTORNOS SOBREPUESTOS.

A: 3.0-4.0; B:0.6-1.0 mL/min.; C:5.0 cm.; D:3.0 μm.

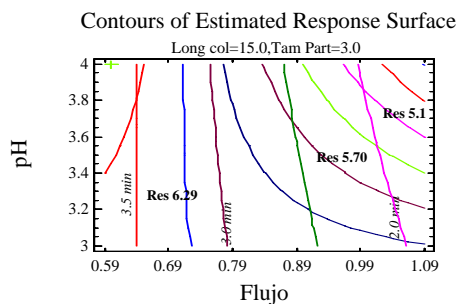
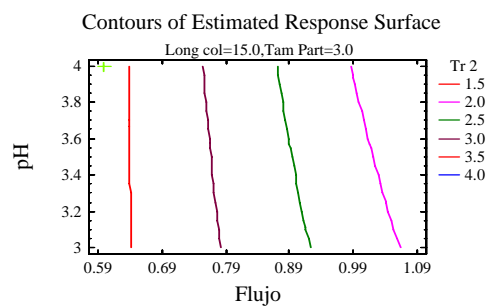
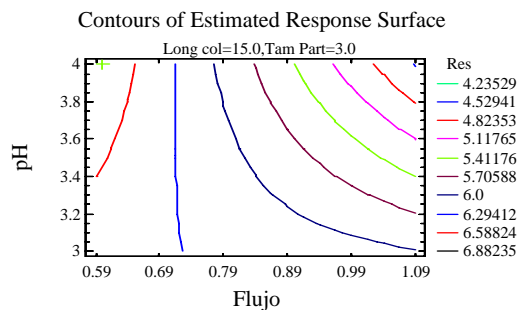


A: 3.0-4.0; B:0.6-1.0 mL/min.; C:5.0 cm.; D:5.0 μm

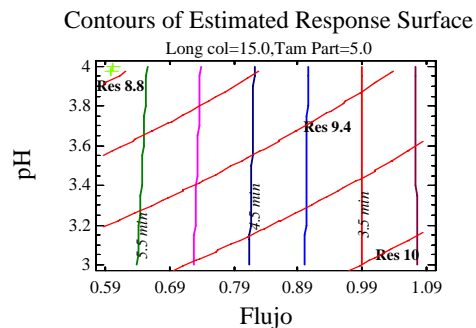
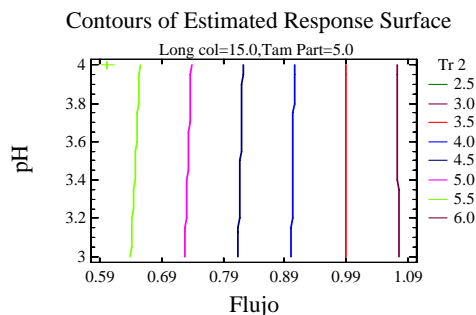
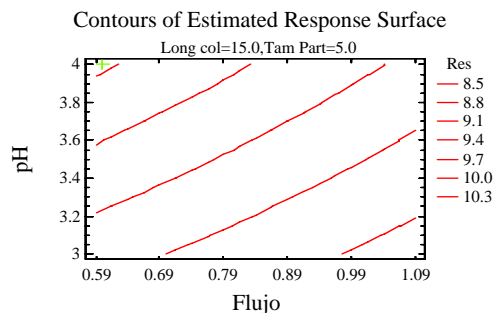




A: 3.0-4.0; B:0.6-1.0 mL/min.; C:15.0 cm.; D:3.0 μm



A: 3.0-4.0; B:0.6-1.0 mL/min.; C:15.0 cm.; D:5.0 μm





BIBLIOGRAFÍA.

- [1] International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINES: ICHQ2A (March 1995). ICHQ2B (May 1997)
- [2] VANDER Heyden y., *et al.* J. Pharm. Biomed. Anal. **24** (2001) 723 - 753
- [3] C. F. Kavanaugh & Associates
<http://www.kavanaugh.ca>
- [4] MONTGOMERY Douglas C.
"Diseño y Análisis de Experimentos"
Grupo Editorial Iberoamérica. México, 1991.
- [5] VANDER Heyden y., *et al.* J. Chromatogr. A. **845** (1999) 145 – 154
- [6] GRIZE y. L. and SEEWALD, Wolfgang
<http://www.aicos.com/Qualeng/StavexCE98/text.html>
- [7] RAGONESE, R., *et al.* J. Chromatogr. A. **870** (2000) 45 – 51
- [8] HUND, E., *et al.* J. Chromatogr. A. **874** (2000) 167 – 185
- [9] KARLSSON, Anders., *et al.* J. Chromatogr. A. **797** (1998) 75 – 82
- [10] GOGA-REMONTE, S., *et al.* J. Chromatogr. A. **868** (2000) 13 – 29
- [11] CANDELA, M., RUIZ, A., and FEO, F. J. J. Chromatogr. A. **890** (2000) 273 – 280
- [12] GASCO-LOPEZ, A. I., *et al.* J. Chromatogr. A. **775** (1997) 179 – 185
- [13] FANG yue and ZHOU, Bin. J. Stat. Plan. Inf. **74** (1998) 169 – 175
- [14] COLLINS, C., *et al.* Agr. Sys. **68** (2001) 93 – 96
- [15] GIL-AGUSTÍ, Mayte *et al.* Analyst. The Royal Soc. Chem. **126** (2001) 457–464
- [16] YAMATO, Susumu *et al.* J. Chromatogr. A. **731** (1996) 346 – 350
- [17] GIL-AGUSTÍ, Mayte *et al.* Talanta. **54** (2001) 621-630
- [18] STEPHANI, Ralph and CESARE, Victor. J. Chromatogr. A. **813** (1998) 79 – 84
- [19] MURTHA, J. L. *et al.* J. Pharm. Sci. **77** (8) (1988) 715-718
- [20] KAISER, H. Anal. Chem. **53A** (1987) 42.
- [21] The Merk Index. Twelfth Ed.
Merck Research Laboratories
Whitehouse Station, NJ, (2nd Print.) 1997
- [22] HOU, X. and WU, C.F.J. Stat. & Prob. Letters. **54** (2001) 137 – 145
- [23] ERK, Nevin. J. Pharm. Biomed. Anal. **23** (2000) 1023 – 1031
- [24] CELMA, C. *et al.* J. Chromatogr. A. **870** (2000) 77 – 86
- [25] PACIOLLA, Marck *et al.* J. Pharm. Biomed. Anal. **26** (2001) 143 – 149
- [26] DI PIETRA, A. M. *et al.* J. Chromatogr. A. **729** (1996) 355 – 361
- [27] WEED, Donald. Pharm. Tech. **23** (1999) 106



- [28] SKOOG, D. and LEARY J.
“Análisis Instrumental”
McGraw-Hill, 4a Ed. España, 1994
- [29] Cmcissues
<http://www.cmcissues.com/Validation of Robustness for Chromatographic Methods.htm>
- [30] WCAS
<http://www.wcas.com/tech/tech2/Detection Limits.htm>
- [31] Federal Drug Administration (FDA)
“Guide to Inspections of Pharmaceutical Quality Control Laboratories”
USA, (2001)
- [32] United States Pharmacopoeial Convection
The United States Pharmacopeia 24 & National Formulary 19
National Publishing, PA. 2000
- [33] PERSSON, B. A. *et al.* LC. GC. **15** (10) (1997) 944.
- [34] Ministry of Health & Welfare
The Pharmacopoeia of Japan, XII
Chiyoda-Ku. Tokyo, 1991
- [35] Her Majesty’s Stationery Office
British Pharmacopoeia
London, 1998
- [36] Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA-1993
“Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos”
Secretaría de Salud. México, 1993
- [37] ADDELMAN, S. Technometrics. **4** (1962) 21 – 46
- [38] QIN, J. P. *et al.* Yaowu Fenxi Zazhi. **15** (3) (1995) 36
- [39] United States Pharmacopoeial Convection
The United States Pharmacopeia 23 & National Formulary 18
Rockville, MD, 1995
- [40] WATERS. Chromatographic Columns. (Cat. 2000)
- [41] AGILENT TECHNOLOGIES. Consumables. (Cat. 2000)
- [42] Comisión permanente de la farmacopea de los estados Unidos Mexicanos
Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 8ª Ed.
Secretaría de Salud. México, 2004
- [43] LAU o. W. and MOK, C.S. J. Chromatogr. A **693** (1995) 45
- [44] STOEV, G. and UZONOV, D. J. Liq. Chromatogr. **15** (1992) 3097
- [45] BONET, E. *et al.* J. Chromatogr. **582** (1992) 189
- [46] DeCROO, F. *et al.* J. Chromatogr. **325** (1985) 395
- [47] ROSS, R. W. *et al.* J. Chromatogr. **370** (1986) 403
- [48] COOPER, S. F. *et al.* J. Chromatogr. **489** (1989) 65
- [49] GASCO-LOPEZ, A. I., *et al.* J. Chromatogr. Sci. (in press)
- [50] Center for Drug Evaluation and Research (CEDER)
“Reviewer Guidance. Validation of Chromatographic Methods”
CMC3, 1994
- [51] METWALLY M. E. Chromatographia **50** (1999) 113
- [52] KOZIOL, T. R. J. Pharm. Sci. **68** (1979) 1135



- [53] YAMATO, S. *et al.* J. Chromatogr. **656** (1994) 29
- [54] SA' SA, S. I. *et al.* Microchem J. **36** (1987) 391
- [55] ROTH, F.E. and GOVIER, W. M. J. Pharmacol. Exp. Ther. **124** (1958) 347
- [56] DOBASHI, A. *et al.* J. Am. Chem. Soc. **108** (1986) 307
- [57] CHARLES, R. and GIL-AV, E. J. Chromatogr. **298** (1984) 516
- [58] TSAI, W. L. *et al.* Helv. Chem. Acta. **68** (1985) 2238
- [59] FONG, G.W. and EICKHOFF, W. M. Int. J. Pharm. **53** (1989) 91
- [60] Remington's Pharmaceutical Sciences.
18th ed. Mack Publishing.
Easton, PA. 1990
- [61] CAHILL, J. E. *et al.* Am Lab. **123** (1980) 101 – 112
- [62] DAVIDSON, A. G. Analyst **107** (1982) 422
- [63] DAVIDSON, A. G. J. Pharm. Sci. **73** (1984) 1582
- [64] DAVIDSON, A. G. and STENLAKE, J. B. Analyst **99** (1974) 476
- [65] DAVIDSON, A. G. J. Pharm. pharmacol. **30** (1978) 410
- [66] KORANY M. A. *et al.* Elsayed, Pharm. Weekbl. Sci. **Ed. 7** (1985) 163
- [67] PRASAD, C. V. N. *et al.* Talanta **44** (1997) 917
- [68] LAU O. W. *et al.* J. Pharm. Biomed. Anal. **7** (1989) 725
- [69] ZAA TER, M. F. *et al.* Anal. Lett. **32** (1999) 1157
- [70] YAMAGUCHI, M. *et al.* J. Chromatogr. B **661** (1994) 168
- [71] MIYAMOTO y. J. Chromatogr. **420** (1987) 63
- [72] MIDHA, K. K. *et al.* J. Pharm. Sci. **73** (1984) 1144
- [73] SMITH, H. T. *et al.* J. Chromatogr. Sci. **16** (1978) 561
- [74] O'BRIEN, J. E. *et al.* Anal. Lett. **10** (1977) 1163
- [75] CHEN y. P. *et al.* Drug Anal. **7** (1999) 13 – 22
- [76] KHANOLKAR, D. H. and SHINDE, V. M. Indian Drugs. **36** (1999) 438
- [77] THOMAS, B. *et al.* J. Pharm. Biomed. Anal. **12** (1) (1994) 85-90
- [78] SAGARA, K. *et al.* Chem. Pharm. Bull. **31** (7) (1983) 2359-2365
- [79] HAISTEAD, G. W. J. Pharm. Sci. **71** (10) (1982) 1108-1112
- [80] MANDEL, J. and STIEHLER, R. D. J. Res. Natl. Bur. Std. **A53** (1964) 155
- [81] MASSART, Desire *et al.*
"Evaluation and Optimization of Laboratory Methods and Analytical Procedures"
Elsevier Scientific Publishing Co. 1a Ed. Amsterdam, 1978
- [82] PRADO, Ma. Guadalupe y COVARRUBIAS, Ma. del Rosario
"Introducción a la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución"
Universidad Autónoma Metropolitana. México, 1996
- [83] KAZAKEVICH yuri and McNAIR, Harold.
"Basic Liquid Chromatography"
<http://hplc.chem.shu.edu/HPLC/Title%20page.htm>
2002.