



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE TRAMADOL Y GUAIFENESINA EN DISTINTAS FORMAS FARMACÉUTICAS POR HPLC

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BILÓGO  
P R E S E N T A:  
PIOTR VÍCTOR ÁLVAREZ POREBSKI



MÉXICO, D.F.

2008



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	M. en C. Humberto Ramón Gómez Ruiz
Vocal	Q. Josefina Elizalde Torres
Secretario	M. en F. María del Socorro Alpizar Ramos
1er. Suplente	Q. Georgina Artemisa Duarte Lisci
2º. Suplente	Q.F.B. Iván Alejandro Franco Morales

**Sitio donde se desarrolló en tema:**

Laboratorio 108. Departamento de Química Analítica. División de Estudios de Posgrado. Edificio B. Facultad de Química. UNAM.

**Asesor:**

---

M. en C. Humberto Ramón Gómez Ruiz

**Sustentante:**

---

Piotr Víctor Álvarez Porebski

A mis PADRES:

**Barbara y Francisco**, gracias por su admirable esfuerzo y apoyo incondicional. Gracias por ser el pilar más importante de mi vida y brindarme la oportunidad de concluir ésta etapa y poder comenzar con una nueva.

A mi Tutor: Humberto Gómez, por haberme dado la oportunidad de superarme y haberme guiado durante mi formación profesional, con gran respeto y admiración le agradezco.

A mis Hermanos: Anabel, Kiruna y Ralf, por su cariño y consejos.

A Pedro Villanueva, por haberme brindado su amistad, por darme las bases y la orientación a seguir en mi vida profesional.

A Lesli González, por haber mostrado una superación admirable y ser una persona importante en mi vida que me motivó y apoyó constantemente, con cariño gracias.

A la Profa. Lucia Hernández, gracias por a sus consejos y apoyo que fueron de importante valía durante mi formación académica.

A mis amigos invaluable: Eduardo, Emmanuel, Luís, Enrique, Gabriel, Claudia, Odette, Ernesto, Karla y Joselin; con quienes pase una de las mejores etapas de mi vida, gracias por su confianza, amistad y apoyo incondicional.

A Rodrigo, Marisol, Jesús y Marino, por ser los mejores amigos que conocí en la facultad.

Agradezco a la USAI por la realización de los termogramas.

---

**ÍNDICE**

RESUMEN / ABSTRACT.....	1
<b>CAPÍTULO I. Introducción.....</b>	<b>2</b>
I-1. Hipótesis.....	4
I-2. Objetivos.....	4
<b>CAPÍTULO II. Antecedentes.....</b>	<b>5</b>
II-1. Tramadol.....	5
II-1.1 <i>Propiedades fisicoquímicas</i> .....	6
II-1.2 <i>Propiedades farmacológicas y toxicológicas</i> .....	6
II-2. Guaifenesina.....	7
II-2.1 <i>Propiedades fisicoquímicas</i> .....	8
II-2.2 <i>Propiedades farmacológicas y toxicológicas</i> .....	8
II-3. Formas farmacéuticas.....	9
II-3.1 <i>Tabletas</i> .....	9
II-3.2 <i>Cápsulas</i> .....	11
II-3.3 <i>Soluciones</i> .....	12
II-4. Métodos de análisis.....	13
II-4.1 Cromatografía.....	13
II-4.1.1 <i>Ventajas de la cromatografía de líquidos sobre la cromatografía de gases</i> .....	14
II-4.1.2 <i>Cromatografía de líquidos de alta resolución</i> .....	15
II-4.1.3 <i>Cromatografía de fase químicamente unida</i> .....	16
II-4.1.4 <i>Cromatografía líquido-líquido</i> .....	19
II-4.1.5 <i>Cromatografía líquido-sólido</i> .....	20
II-4.1.6 <i>Cromatografía de pares iónicos</i> .....	20
II-4.1.7 <i>Cromatografía de intercambio iónico</i> .....	20
II-4.1.8 <i>Cromatografía de exclusión molecular</i> .....	21
II-5. Componentes de un sistema HPLC.....	22
II-5.1 <i>Reservorios para fase móvil</i> .....	22

<i>II-5.2</i>	<i>Sistemas de desgasificación...</i>	<i>24</i>
<i>II-5.3</i>	<i>Sistemas de bombeo...</i>	<i>24</i>
II-5.3.1	Bombas de flujo constante.....	25
II-5.3.2	Bombas de presión constante.....	27
II-5.3.3	Sistemas para elución por gradiente.....	28
<i>II-5.4</i>	<i>Sistemas de inyección de muestra...</i>	<i>29</i>
<i>II-5.5</i>	<i>Detectores...</i>	<i>29</i>
II-5.3.1	Detectores UV-VIS.....	32
II-5.3.2	Detectores de masas.....	34
<b>II-6.</b>	<b>Disolventes.....</b>	<b>35</b>
<b>II-7.</b>	<b>Interpretación del cromatograma.....</b>	<b>35</b>
<i>II-7.1</i>	<i>Eficiencia...</i>	<i>37</i>
<i>II-7.2</i>	<i>Mecanismos de ensanchamiento de pico cromatográfico...</i>	<i>40</i>
II-7.2.1	Difusión longitudinal.....	40
II-7.2.2	Transferencia de materia.....	40
II-7.2.3	Difusión por caminos múltiples de flujo.....	41
<i>II-7.3</i>	<i>Resolución...</i>	<i>42</i>
<i>II-7.4</i>	<i>Simetría de pico...</i>	<i>44</i>
<i>II-7.5</i>	<i>Pureza de pico...</i>	<i>45</i>
<b>II-8.</b>	<b>Validación de métodos analíticos.....</b>	<b>46</b>
 <b>CAPÍTULO III. Parte experimental.....</b>		<b>50</b>
	Materiales y equipo.....	50
<b>III-1.</b>	<b>Tramadol.....</b>	<b>52</b>
<i>III-1.1</i>	<i>Pruebas de identidad...</i>	<i>52</i>
III-1.1.1	Análisis térmico.....	52
III-1.1.2	Cromatografía de gases – espectrometría de masas.....	53
<i>III-1.2</i>	<i>Desarrollo del método...</i>	<i>53</i>
<i>III-1.3</i>	<i>Tratamiento de las muestras...</i>	<i>54</i>
III-1.3.1	Tabletas y cápsulas.....	54
III-1.3.2	Solución inyectable y solución oral.....	55

---

<b>III-1.4</b>	<b><i>Optimización del método</i></b> ... ..	<b>55</b>
<b>III-1.5</b>	<b><i>Evaluación de parámetros de validación</i></b> ... ..	<b>59</b>
III-1.5.1	Linealidad.....	59
III-1.5.2	Precisión.....	60
III-1.5.3	Especificidad.....	60
III-1.5.4	Exactitud.....	60
III-1.5.5	Robustez.....	61
III-1.5.6	Adecuabilidad del sistema.....	61
<b>III-1.6</b>	<b><i>Análisis de muestras</i></b> ... ..	<b>61</b>
<b>III-2.</b>	<b>Guaifenesina</b> .....	<b>62</b>
<b>III-2.1</b>	<b><i>Prueba de identidad</i></b> ... ..	<b>62</b>
<b>III-2.2</b>	<b><i>Desarrollo del método</i></b> ... ..	<b>62</b>
<b>III-2.3</b>	<b><i>Tratamiento de la muestra</i></b> ... ..	<b>64</b>
<b>III-2.4</b>	<b><i>Evaluación de parámetros de validación</i></b> ... ..	<b>64</b>
III-2.4.1	Linealidad.....	64
III-2.4.2	Precisión.....	65
III-2.4.3	Especificidad.....	65
III-2.4.4	Exactitud.....	65
III-2.4.5	Estabilidad analítica de la muestra.....	65
III-2.4.6	Robustez.....	66
<b>III-2.5</b>	<b><i>Análisis de muestras</i></b> ... ..	<b>66</b>
<b>III-2.6</b>	<b><i>Comparación de estándares</i></b> ... ..	<b>66</b>
<b>CAPÍTULO IV.</b>	<b>Resultados y análisis</b> .....	<b>67</b>
<b>IV-1.</b>	<b>Tramadol</b> .....	<b>67</b>
<b>IV-1.1</b>	<b><i>Pruebas de identidad</i></b> ... ..	<b>67</b>
IV-1.1.1	Análisis térmico.....	67
IV-1.1.2	Cromatografía de gases - espectrometría de masas.....	68
<b>IV-1.2</b>	<b><i>Optimización del método</i></b> ... ..	<b>69</b>
<b>IV-1.3</b>	<b><i>Evaluación del método</i></b> ... ..	<b>80</b>
IV-1.3.1	Linealidad.....	80
IV-1.3.2	Precisión.....	83
IV-1.3.3	Especificidad.....	84



---

IV -1.3.4	Exactitud.....	84
IV -1.3.5	Robustez.....	88
IV -1.3.6	Adecuabilidad del sistema.....	91
<i>IV-1.4 Análisis de muestras... ..</i>		<b>91</b>
<b>IV-2. Guaifenesina.....</b>		<b>94</b>
IV -2.1	<i>Prueba de identidad... ..</i>	94
IV -2.2	<i>Desarrollo del método... ..</i>	94
IV -2.3	<i>Evaluación de parámetros de validación... ..</i>	96
IV-2.3.1	Linealidad.....	96
IV -2.3.2	Comparación de estándares.....	102
IV -2.3.3	Precisión.....	103
IV -2.3.4	Especificidad.....	104
IV -2.3.5	Exactitud.....	104
IV -2.3.6	Estabilidad analítica de la muestra.....	107
IV -2.3.7	Robustez.....	107
IV -2.4	<i>Análisis de muestras... ..</i>	<b>108</b>
<b>IV-3. Resultados generales de concentración.....</b>		<b>109</b>
<b>CONCLUSIÓN.....</b>		<b>110</b>
<b>ANEXO 1. Cuadro ANOVA del diseño factorial.....</b>		<b>112</b>
<b>ANEXO 2. Ecuaciones para evaluar linealidad.....</b>		<b>113</b>
<b>ANEXO 3. Ecuaciones para evaluación de precisión y reporte de resultados.....</b>		<b>115</b>
<b>ANEXO 4. Pruebas de contraste.....</b>		<b>116</b>
<b>ANEXO 5. Espectro de masas del tramadol.....</b>		<b>117</b>
<i>    Apéndice 5.1 Patrón de fragmentación de la molécula de tramadol.....</i>		<i>118</i>
<b>ANEXO 6. Espectro de masas de la guaifenesina.....</b>		<b>119</b>
<i>    Apéndice 6.1 Patrón de fragmentación de la molécula de guaifenesina.....</i>		<i>120</i>
<b>ANEXO 7. Datos de evaluación de la robustez del tramadol.....</b>		<b>121</b>
<b>ANEXO 8. Datos del análisis de la adecuabilidad del sistema.....</b>		<b>125</b>
<b>ANEXO 9. Etiquetas y recibos de los productos analizados.....</b>		<b>126</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>		<b>127</b>

## RESUMEN

Se desarrollaron dos métodos analíticos por cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación de guaifenesina en jarabe y para la cuantificación de tramadol en tabletas, cápsulas, solución inyectable y solución oral. Los métodos se optimizaron mediante el establecimiento de las condiciones cromatográficas que generaran resultados adecuados para su aplicación en la industria farmacéutica. Se evaluaron los parámetros de validación de mayor importancia para métodos analíticos mediante los cuales se analizó el desempeño y alcance de los métodos.

Una vez que los métodos mostraron una evaluación satisfactoria, se determinó la concentración de los principios activos en formas farmacéuticas provenientes de lotes distintos de diferentes laboratorios.

## ABSTRACT

Two analytical methods for the determination of guaiphenesin in cough syrup and tramadol in capsules, tablets, oral solution and injectable solution were developed by high performance liquid chromatography.

The methods were optimized establishing the chromatographic conditions that would permit to obtain high quality results, indispensable for analyzing products in the pharmaceutical industry.

The most important validation parameters for analytical methods were evaluated, to determine their applications and limitations.

Once the methods showed acceptable results, the concentration of the drugs in the pharmaceutical preparations, obtained from various batches from different laboratories was measured.

## Capítulo I. Introducción

El tramadol es un analgésico potente que se emplea para aliviar desde el dolor moderado a severo del tipo agudo y/o crónico. Se utiliza como analgésico preoperatorio y postoperatorio, en varios traumatismos, como complemento de anestesia quirúrgica y en pacientes con cáncer. Se encuentra en el mercado como fármaco solo o en combinación en distintas formas farmacéuticas. Debido a su elevada importancia farmacológica, asegurar una dosis adecuada en la forma farmacéutica es indispensable para garantizar la calidad del producto.

La guaifenesina es un expectorante de uso común. Se le puede encontrar en diversas formas farmacéuticas entre las cuales destaca el jarabe. Se encuentra solo o en combinación con otros fármacos, entre los cuales se encuentran ciertos antibióticos, analgésicos, descongestionantes de las vías aéreas superiores y antitusivos. La guaifenesina por su estructura y la forma farmacéutica más común en la cual se encuentra (jarabe) es más susceptible a degradarse y formar el guayacol. Basándose en esta problemática, es necesario contar con un método analítico capaz de discriminar al fármaco de sus productos de degradación y los demás compuestos presentes en el jarabe.

Por ser dichos fármacos de gran interés para la sociedad, uno de los aspectos primordiales para evaluar la calidad de productos farmacéuticos consiste en la identificación y cuantificación del fármaco. Contar con métodos analíticos para su cuantificación que sean confiables, rápidos y que generen la mínima cantidad de residuos, así como un uso racional de reactivos, es indispensable hoy en día para cubrir las necesidades de calidad de una industria farmacéutica. Por ello, los métodos cromatográficos han desplazado a técnicas convencionales de análisis, permitiendo un ahorro en los aspectos mencionados, además de una mayor confiabilidad y calidad de los resultados analíticos.

La cromatografía de líquidos a pesar de ser una técnica que requiere de una elevada inversión para adquirir el instrumento, gastos para mantenimiento y suficiente tiempo para capacitar al personal, es una de las técnicas más adecuadas para laboratorios de investigación y rutina, en donde se manejan un gran número de muestras complejas. Ésta técnica permite el ahorro de numerosos pasos de extracción, omite a su vez, en un gran número de análisis, las reacciones de derivatización, así como varios tratamientos fisicoquímicos que deben realizarse a una matriz con el fin de poder determinar cierto analito en una muestra dada. Omitir varios de los aspectos antes mencionados, sería imposible si se desea realizar un análisis por alguna otra técnica, tal es el caso de las técnicas espectrofotométricas, las cuales, poco a poco han sido desplazadas por las cromatográficas. Sin embargo, las técnicas espectrofotométricas aun son utilizadas con frecuencia en varios laboratorios por su sencillez de manejo y bajo costo.

La cromatografía de líquidos de alta resolución, por sus siglas en inglés HPLC (High Performance Liquid Chromatography), no es solo un técnica cuantitativa, permite además, una vez establecidas las condiciones cromatográficas y mediante el uso de una sustancia de referencia realizar un análisis cualitativo para una muestra dada.

Actualmente la cromatografía de líquidos se ha podido acoplar a varios sistemas de detección; gracias a eso se ha logrado emplear para la detección y cuantificación selectiva y/o general de una gran gama de compuestos, desde pequeñas moléculas con propiedades oxidoreductoras hasta moléculas de elevado peso molecular como polímeros y proteínas.

Para que un método analítico pueda ser utilizado para asegurar un aspecto de la calidad de un producto farmacéutico, debe estar validado. El proceso de validación de métodos analíticos consiste en evaluar ciertos parámetros, los cuales, son descriptores de una adecuada consistencia y confiabilidad de los resultados bajo las condiciones de análisis dadas. Estos parámetros se determinan y ajustan conforme lo indicado en normas y guías nacionales e internacionales.

### **I-1. Hipótesis**

Si se desarrolla un método analítico capaz de generar resultados consistentes y con un elevado grado de confianza, entonces se podrá utilizar para cuantificar el o los principios activos en las formas farmacéuticas para las cuales éste fue desarrollado.

### **I-2. Objetivos**

- Desarrollar un método analítico por HPLC para la cuantificación de tramadol en las siguientes formas farmacéuticas: cápsulas, tabletas recubiertas, solución inyectable y solución oral.
- Desarrollar un método analítico por HPLC para la cuantificación de guifenesina en jarabe.
- Determinar los parámetros críticos que afectan a la separación de compuestos en cromatografía de líquidos.
- Evaluar el efecto de algunas condiciones cromatográficas sobre parámetros fundamentales de HPLC.
- Realizar un análisis estadístico a partir los resultados de concentración de los fármacos en sus respectivas formas farmacéuticas y determinar si cumplen con las especificaciones Farmacopéicas.
- Optimizar los métodos analíticos a partir del ajuste de sus condiciones cromatográficas.
- Evaluar los parámetros de validación de mayor importancia para los métodos desarrollados.

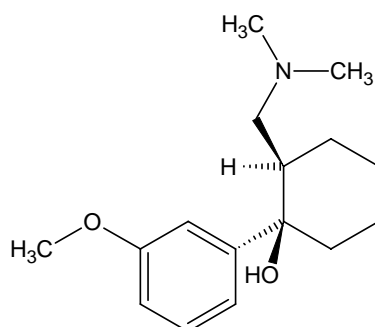
## Capítulo II. Antecedentes

### II-1. TRAMADOL

El tramadol, (1*RS*,2*RS*)-2-[(dimetilamino)-metil]-1-(3-metoxi-fenil)ciclohexanol (Fig. II-1) es un analgésico potente que actúa a nivel del sistema nervioso central. Está clasificado dentro del grupo de los analgésicos opiáceos. Actualmente no está catalogado como una sustancia controlada por la CSA (Controlled Substances Act) siendo esto un requerimiento para que la DEA (Drug Enforcement Administration) lo clasifique dentro de este grupo<sup>(5)</sup>.

Existe como una mezcla racémica del isómero trans, presentándose una importante diferencia de actividad y metabolismo entre los dos enantiómeros <sup>(4, 13)</sup>. Es un análogo sintético de la codeína, presenta además una menor afinidad por los receptores opiáceos respecto a la codeína <sup>(4)</sup>.

Se usa para aliviar desde el dolor moderado a severo del tipo agudo y/o crónico. Se emplea para aliviar el dolor asociado a cáncer, a varios traumatismos músculo esqueléticos, como analgésico preoperatorio y postoperatorio, así como complemento en anestesia quirúrgica <sup>(31)</sup>.



**Figura II-1.** Estructura química del tramadol

Éste fármaco se encuentra en el mercado como producto solo o en combinación en distintas formas farmacéuticas, entre las cuales destacan: cápsulas, tabletas, solución inyectable y solución oral (31, 23).

### II-1.1 Propiedades fisicoquímicas

La siguiente tabla muestra algunas de las propiedades fisicoquímicas de mayor interés para el tramadol.

	<b>Tramadol</b>	<b>Clorhidrato de tramadol</b>
<b>Fórmula química</b>	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>2</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>2</sub> · HCl
<b>Peso molecular</b>	263.375 g/mol	299.84 g/mol
<b>Punto de fusión</b>	180 - 181 °C	
<b>Solubilidad en agua</b>	Soluble en agua	
<b>Log P (octanol/agua)</b>	2.951	
<b>pKa</b>	9.41	
<b>DL<sub>50</sub> (oral en ratón)</b>	350 mg/Kg	

**Tabla II-1** Propiedades fisicoquímicas del tramadol y su sal, clorhidrato de tramadol (4, 29).

### II-1.2 Propiedades farmacológicas y toxicológicas

Es una agonista puro con una elevada sensibilidad contra los receptores  $\mu$  (principal receptor para fármacos opiáceos). Los receptores  $\mu$  están acoplados a una proteína G que tiene como enzima efectora a la adenilato ciclasa. Esta enzima es responsable de la producción de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), la cual es una importante molécula en la transducción de señales celulares. Los receptores opiáceos inhiben a la adenilato ciclasa y como consecuencia se presenta una disminución de la concentración intracelular de AMPc, subsecuentemente ocurre la liberación de

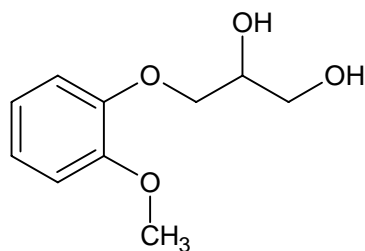
neurotransmisores que deprimen al sistema nervioso central, tales como: dopamina, acetilcolina, noradrenalina, y el ácido gamma-aminobutírico (GABA). Adicionalmente al efecto antagónico sobre los receptores  $\mu$ , el tramadol, inhibe la reabsorción de norepinefrina y serotonina; dichos neurotransmisores inhiben la transmisión de estímulos del dolor. (4, 13, 20). La potencia del tramadol oscila entre 1/6 - 1/10 respecto a la de la morfina. (31).

El tramadol no ha presentado efectos significativos adversos asociados con el uso común de opioides, entre ellos, depresión de la respiración y sedación. Se le han asociado ciertas reacciones adversas menores, como sudoración, salivación, náuseas y en ocasiones ligera sedación, mareos y somnolencia. A su vez, no presenta propiedades carcinogénicas ni teratogénicas (20, 31).

### II-2. GUAIFENESINA

La guaifenesina, 3-(2-metoxifenoxi)-propano-1,2-diol (Fig. II-2), se utiliza para facilitar la expectoración de flemas de las vías respiratorias durante una infección respiratoria (4, 29).

Se le puede encontrar en el mercado en presentaciones como fármaco solo o en combinación; entre éstos se encuentran ciertos antibióticos, analgésicos, descongestionantes de las vías aéreas superiores y antitusivos. Las formas farmacéuticas más comunes en las cuales se comercializa son: el jarabe y las cápsulas (30).



**Figura II-2.** Estructura química de la guaifenesina



### II-2.1 Propiedades fisicoquímicas

La siguiente tabla enlista algunas de las propiedades fisicoquímicas de relevancia para la guaifenesina.

<b>Formula química</b>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>
<b>Peso molecular</b>	198.22 g/mol
<b>Punto de fusión</b>	78.5 - 79 °C
<b>Punto de ebullición</b>	215 °C
<b>Solubilidad en agua</b>	1g en 25 mL de agua a 25 °C
<b>Solubilidad en otros disolventes</b>	Muy soluble en metanol, soluble en cloroformo, propilen-glicol, moderadamente soluble en benceno, insoluble en éter de petróleo.
<b>Log P (octanol/agua)</b>	0.95
<b>DL<sub>50</sub> (oral en rata)</b>	1510 mg/Kg

Tabla II-2. Propiedades fisicoquímicas de la guaifenesina (4, 29).

### II-2.2 Propiedades farmacológicas y toxicológicas

La guaifenesina es un expectorante que incrementa y facilita la expulsión de flemas (esputo) y secreciones bronquiales mediante la reducción de su adhesividad y tensión superficial. Al disminuir la viscosidad de las secreciones, se facilita su flujo, promoviendo un incremento en la actividad ciliar, pasando de una tos seca y frecuente a una tos más eficiente y menos frecuente (4, 31).

No se han reportado hasta la fecha reacciones adversas de interés; en casos extremos se llega a presentar vómito y náuseas, que cesan al suprimirse la administración. No se han reportado efectos carcinogénicos ni teratogénicos (31).

## II-3. FORMAS FARMACÉUTICAS

### II-3.1 Tabletas

Las tabletas son formas farmacéuticas sólidas de dosificación única que contienen uno o más principios activos y una mezcla de excipientes. Estas se clasifican en tabletas comprimidas o tabletas moldeadas de acuerdo con su método de fabricación.

La mayoría de las tabletas se fabrican por compresión. Éste método consiste en la aplicación de elevadas presiones sobre polvos o granulados empleando punzones o matrices de acero. Los métodos de compresión se clasifican en compresión directa y compresión de gránulos fabricados por vía húmeda o vía seca. El propósito de la granulación húmeda así como de la granulación seca es mejorar el flujo de la mezcla y su compresibilidad.

Las tabletas moldeadas se preparan forzando polvos mojados dentro de un molde a presión moderada. La solidificación depende de la formación y agregación de cristales durante el proceso posterior de secado y no de la fuerza de compresión.

Las tabletas comprimidas constan generalmente de una mezcla de ingredientes activos y el diluyente, aglutinante, desintegrante y lubricante, adicionalmente también se incluyen colorantes, aromatizantes y saborizantes. Los diluentes se agregan cuando la cantidad de principio activo es pequeña o difícil de comprimir; los excipientes comunes incluyen: lactosa, fosfato de calcio, almidón, manitol y celulosa microcristalina.

Los aglutinantes confieren adhesividad al polvo durante la granulación preliminar y a la tableta comprimida y aumentan la fuerza de compresión del diluyente. Es preferible su adición en solución a la formulación ya que se incrementa su eficacia. Entre los aglutinantes mas comunes se encuentran: gelatina, polivinilpirrolidina, metil celulosa, carboximetilcelulosa y pastas de almidón hidrolizado<sup>(30)</sup>.

Los agentes desintegrantes sirven para facilitar la fragmentación de las tabletas después de su administración; el desintegrante más utilizado en tabletas es el almidón.

Los lubricantes reducen la fricción durante el ciclo de compresión y eyección de la tableta, asimismo tienen un efecto antiadherente sobre la mezcla a comprimir en las matrices y punzones. Entre algunos de los agentes lubricantes se incluyen los estearatos metálicos, el ácido esteárico, los aceites vegetales hidrogenados y el talco.

Las tabletas se pueden recubrir por varias razones que incluyen: protección de los ingredientes por efectos del aire, la humedad o la luz, enmascaramientos de olores y sabores desagradables, mejoramiento de la apariencia y control del sitio de liberación dentro del tracto gastrointestinal <sup>(1)</sup>.

El recubrimiento se puede realizar por el método clásico o por el de película "Film coating". En el recubrimiento clásico, las tabletas se recubren con una capa de azúcar; actualmente este tipo de recubrimiento se ha dejado de emplear debido al tiempo que se consume y la necesidad de una impermeabilización para la aplicación del azúcar, lo cual afecta la disolución y el volumen de la tableta terminada. El recubrimiento pelicular consiste en un material hidrosoluble o dispersable aplicado con disolventes acuosos o no acuosos; la evaporación de los disolventes deja una película fina que se adhiere sobre las tabletas y permite retener la forma original, incluyendo las ranuras u códigos de identificación <sup>(1, 30)</sup>.

El asegurar la uniformidad de dosificación resulta algo complejo en las tabletas. Se requiere de un proceso de mezclado óptimo para obtener la homogeneidad, además se deben tener un adecuado control en el tamaño de partícula tanto del principio activo como de los excipientes, los cuales permitirán obtener la homogeneidad en el granulado antes de ser comprimido. Las mismas consideraciones se deben de mantener para las cápsulas.

### II-3.2 Cápsulas

Las cápsulas son formas farmacéuticas sólidas de dosificación única en las cuales el fármaco está contenido dentro de un receptáculo o cubierta soluble, que puede ser dura o blanda. Por lo general las cubiertas son de gelatina, la cual tiene como característica un poder gelificante relativamente alto <sup>(6, 30)</sup>.

Las cápsulas de gelatina dura se elaboran mediante un proceso que consiste en la inmersión de punzones moldeados en una solución de gelatina; a continuación, la solución de gelatina se seca, se recorta y se extrae de los punzones, posteriormente se ensamblan el cuerpo y la tapa. Previo al llenado, las cápsulas de gelatina dura, el cuerpo y la tapa deben separarse.

Estas cápsulas se suelen llenar con polvos, esferas o gránulos, los cuales consisten en una mezcla de los ingredientes activos con los excipientes. Consecuentemente al llenado, en ocasiones la cápsula pasa por un proceso de sellado.

Los gránulos y esferas se pueden recubrir para proporcionar una liberación prolongada o propiedades entéricas <sup>(25, 30)</sup>.

En la mayoría de las cápsulas de gelatina blanda los ingredientes activos se disuelven o suspenden en un vehículo líquido. Tradicionalmente se empleaban para esto vehículos oleosos; sin embargo, en la actualidad, los vehículos no acuosos miscibles con agua (polietilenglicoles de bajo peso molecular) son los más usados.

Las cubiertas de las cápsulas de gelatina blanda son un poco más gruesas que las de gelatina dura y están plastificadas mediante el agregado de un polialcohol (sorbitol o glicerina). La relación en proporción entre el plastificante seco y la gelatina, determina la dureza de la cubierta y se puede modificar en función de las condiciones ambientales y el contenido.

A diferencia de las cápsulas de gelatina dura, las cápsulas de gelatina blanda se moldean, se llenan y se sellan en la misma maquinaria. Los métodos de llenado existentes incluyen el de matrices rotativas, matrices reciprocas o de placas y el de goteo (1, 25).



**Figura II-3.** Cápsula de gelatina blanda (izquierda), capsulas de gelatina dura (derecha)

### II-3.3 Soluciones

Las soluciones son preparaciones líquidas que contienen una o mas sustancias químicas disueltas, es decir, dispersas molecularmente en un disolvente o en una mezcla apropiada de disolventes miscibles entre si.

Las sustancias en solución son más susceptibles a la inestabilidad química que los estados sólidos y generalmente requieren envases especiales y sustancias químicas específicas para su conservación. Éstas formas farmacéuticas se clasifican según la vía de administración en: orales tópicas y parenterales (25, 30).

Las soluciones orales son preparaciones líquidas que contienen una o varias sustancias, con o sin aromatizantes, endulzantes o colorantes disueltas en agua o en una mezcla de cosolventes. Se pueden formular para la administración oral directa al

paciente o se pueden dispensar en una forma concentrada que debe diluirse antes de la administración <sup>(30)</sup>.

Las soluciones orales que contienen concentraciones altas de sacarosa u otros azúcares son denominadas jarabes. Además de sacarosa y otros azúcares, se pueden incluir ciertos polialcoholes para inhibir la cristalización y modificar la solubilidad, el sabor, la palatabilidad y otras propiedades del vehículo. Por lo general contienen agentes antimicrobianos para impedir la proliferación de bacterias levaduras y hongos <sup>(25)</sup>.

Las soluciones parenterales (inyectables), a diferencia de las demás, son elaboradas bajo condiciones asépticas y con equipo, material y compuestos sometidos a un proceso de esterilización <sup>(25)</sup>.

### II-4. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Las técnicas analíticas más comunes para el análisis de éstos principios activos incluyen las espectrofotométricas y las cromatográficas. Se describen brevemente las técnicas cromatográficas por su relación con el presente trabajo.

#### II-4.1 CROMATOGRAFÍA

La cromatografía se define como un procedimiento mediante el cual se separan solutos por un proceso dinámico de migración diferencial, que consta de dos o más fases, una de las cuales se mueve continuamente en una dirección dada y en la cual, los solutos presentan distintas movibilidades a causa de diferencias de absorción,

partición, solubilidad, presión de vapor tamaño molecular o diferencia de carga iónica<sup>(30)</sup>.

La técnica cromatográfica requiere que un soluto se distribuya entre dos fases, una fija (fase estacionaria) y otra móvil (fase móvil). La fase móvil transfiere el analito a través del medio hasta que este finalmente emerge separado de los demás compuestos, los cuales eluyen antes o después. La fase estacionaria actúa mediante un proceso de adsorción, o por un proceso de solvatación del soluto, produciendo una partición del soluto entre la fase móvil y la estacionaria. En la práctica, la separación se debe a un proceso mixto de adsorción y partición. Otros principios de separación incluyen el intercambio iónico, la formación de pares iónicos, la exclusión por tamaño, la interacción hidrófoba y el reconocimiento quiral<sup>(30)</sup>.

### II-4.1.1 Ventajas de la cromatografía de líquidos sobre la cromatografía de gases

La cromatografía de gases (CG) a diferencia de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), utiliza un gas inerte como fase móvil, mientras que la de líquidos utiliza una mezcla de uno o más disolventes en estado líquido miscibles entre sí.

La CG tiene una gran capacidad para la separación y análisis de mezclas complejas de compuestos, mostrando para esto separaciones de mejor calidad y mayor rapidez. Sin embargo, numerosas sustancias no pueden ser analizadas por cromatografía de gases, tales sustancias son aquellas termolábiles y las que no son lo suficientemente volátiles. Se ha estimado que solo el 20 % de los compuestos orgánicos conocidos pueden ser separados por esta técnica<sup>(28)</sup>.

Por otro lado, la HPLC no está limitada por la volatilidad y termoestabilidad de los compuestos. Se utiliza para la separación de macromoléculas y especies iónicas de interés biomédico, productos naturales, entre otra gran variedad de compuestos de elevado peso molecular y de baja estabilidad o polaridad.

La HPLC presenta otras ventajas respecto a la cromatografía de gases. Para separaciones complejas es preferible utilizarla por las siguientes razones:

- Las dos fases (fase estacionaria y fase móvil) interactúan en la CLAR con las moléculas, mientras que en CG solo una (fase estacionaria), la fase móvil solo es portadora de la muestra.
- Se encuentra con una gran variedad de fases estacionarias mas su combinación con fases móviles.
- Se emplean menores temperaturas de separación (temperatura ambiente o menor a esta para moléculas termolábiles)

La HPLC ofrece una gran variedad de detectores a los cuales puede ser acoplada, además la mayoría de estos son no destructivos:

- |   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| ▪ UV-visible, fluorescencia y colorímetros combinados con reacciones de derivatización (formación de compuestos que absorben en la región UV-visible) | ▪ Detectores de conductividad        |
| ▪ Detectores electroquímicos (amperométricos)   | ▪ Detectores de radioactividad       |
|   | ▪ Detectores de infrarrojo           |
|   | ▪ Detectores de índice de refracción |
|   | ▪ Detectores de masas                |

Los detectores de CG son por lo general más sensibles y proveen selectividad única para numerosos tipos de compuestos. Las características de los detectores para HPLC se verán mas adelante en el la sección II-5.8.

### II-4.1.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución

La cromatografía de líquidos de alta resolución por sus siglas en inglés (HPLC), es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil



liquida, en la cual la fase móvil es bombeada a través de la columna cromatográfica (fase estacionaria) a elevadas presiones. Las separaciones se logran por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada.

Dependiendo de la fase estacionaria, la cromatografía de líquidos se subdivide en:

- Cromatografía de fase químicamente unida
  - Fase normal*
  - Fase reversa*
- Cromatografía líquido-líquido (cromatografía de reparto)
  - Fase normal*
  - Fase reversa*
- Cromatografía líquido sólido (cromatografía de adsorción)
- Cromatografía de intercambio iónico
- Cromatografía de pares iónicos
- Cromatografía de exclusión molecular
  - Cromatografía de permeación por gel*
  - Cromatografía de filtración por gel*

Cada una de estas técnicas se emplea para separar diferentes tipos de moléculas basándose en sus propiedades fisicoquímicas. La figura II-4 muestra un esquema general para la selección del tipo de técnica a emplear en función de algunas de las propiedades fisicoquímicas de una molécula.

### II-4.1.3 Cromatografía de fase químicamente unida

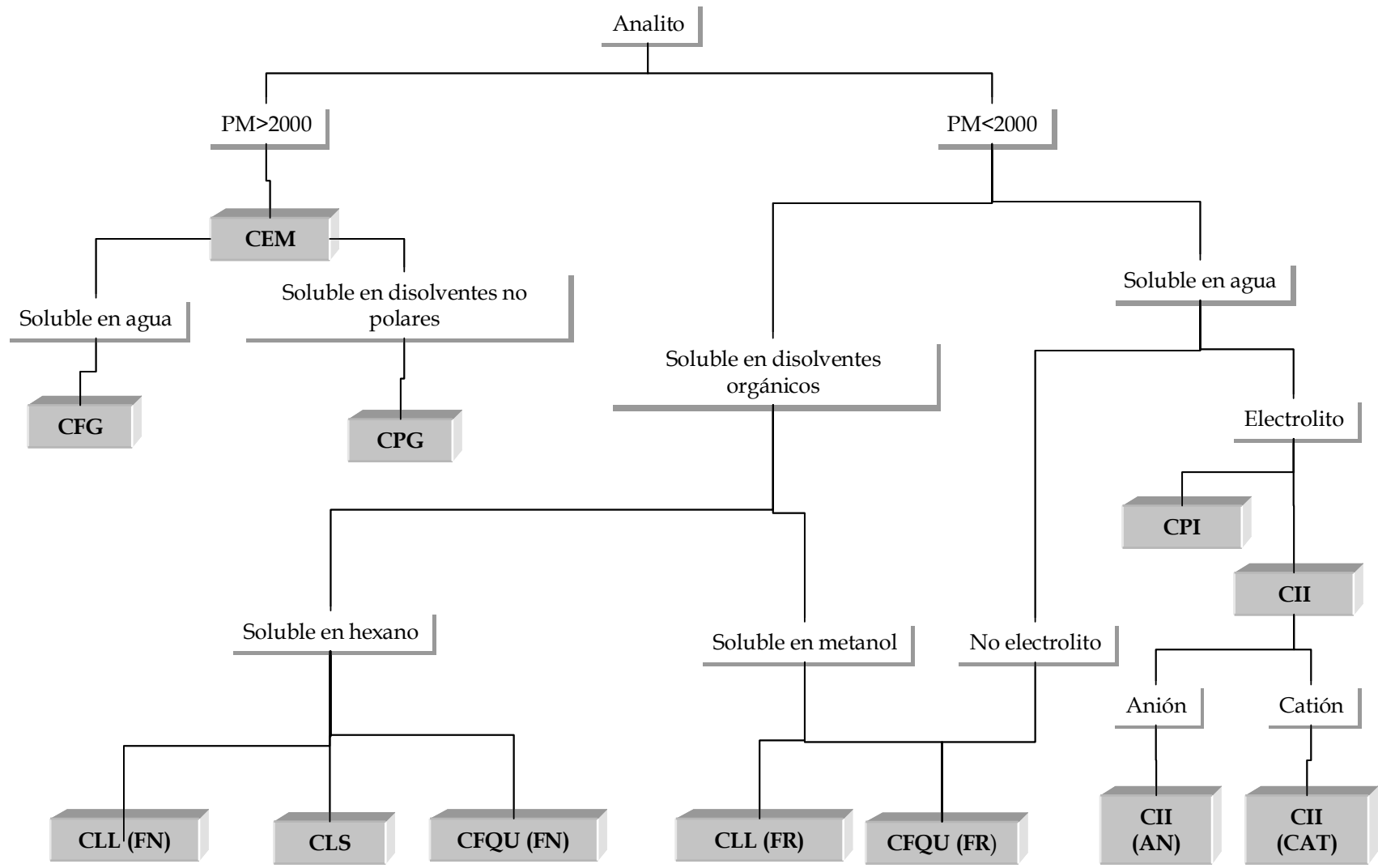
Las columnas para este tipo de cromatografía son las más empleadas debido a su elevada estabilidad y gran número de compuestos a los cuales puede ser aplicada. La fase estacionaria está unida químicamente a un soporte sólido y no puede ser

fácilmente removida durante su uso. Adicionalmente se puede escoger entre soportes para fase normal o fase reversa. En términos generales, la fase normal se refiere cuando la columna está empacada con soportes polares y se emplean fases móviles no polares (cloroformo, n-hexano, etc.). Por otro lado, la fase reversa se refiere a fases estacionarias no polares y fases móviles polares (agua, metanol, acetonitrilo, etc.).

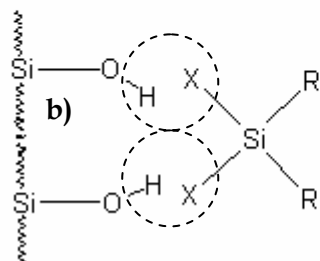
Este tipo de columnas se preparan sintéticamente; se emplean soportes rígidos a base de sílica, a los cuales mediante una reacción química les son unidos grupos de carácter no polar o polar. Entre los principales grupos de carácter no polar se encuentran: n-octilo ( $C_8$ ) y n-octadecilo ( $C_{18}$ ). Los principales grupos polares incluyen: ciano ( $C_3H_6CN$ ), diol ( $C_3H_6OCH_2CHOHCH_2OH$ ), amino ( $C_3H_6NH_2$ ) y dimetilamino propil ( $C_3H_6N(CH_3)_2$ ).

El método de preparación más común es mediante la reacción de la sílice con un organoclorosilano para formar una unión del tipo siloxano (Fig. II-5). Existen otros métodos de preparación tales como la formación de ésteres de silicato ( $\equiv Si-O-R$ ), uniones sílice-carbón ( $\equiv Si-C-R$ ) y uniones sílice-nitrógeno ( $\equiv Si-N-R$ ). Estas últimas no son usadas ampliamente debido a que restringen el uso de la columna, ya que ésta no presenta una adecuada termo estabilidad y no se puede utilizar en un rango amplio de pH; por lo general se restringe su uso a un rango de pH entre 4-8 <sup>(28)</sup>.

Los empaques con un soporte de puente siloxano son muy estables y se pueden usar en un rango de pH entre 2-8. Sin embargo, la reacción de silanización por efectos estéricos, no permite que todos los grupos SiOH reaccionen, produciendo una polaridad y/o reactividad indeseable en la columna que se manifiesta en una baja eficiencia y picos coleados. Para reducir este efecto, los grupos SiOH se desactivan mediante una reacción con clorometilsilano que introduce un grupo metilo en los grupos SiOH libres, venciendo así el impedimento estérico; también se ha reducido esta presencia mediante la reacción con modificadores bifuncionales (Fig. II-5) <sup>(28)</sup>.



**Figura II-4.** Esquema general para la selección de la técnica cromatografía . CEM=Cromatografía de exclusión molecular, CFG= Cromatografía de filtración por gel, CPC = Cromatografía de permeación por gel, CLL = Cromatografía líquido-líquido, CLS = Cromatografía líquido-sólido, CFQU = Cromatografía de fase químicamente unida, CPI = cromatografía de pares iónicos, CII = Cromatografía de intercambio iónico, AN = Aniónico, CAT = Catiónico, FR = Fase reversa, FN = Fase normal.



**Figura II-5. "Endcapping"**

Preparación de soportes de fase químicamente unidas. a) Reacción de formación del puente siloxano con un modificador monofuncional.

b) "Crosslinking" Formación de puente siloxano con modificador bifuncional. (27)

El mecanismo de retención en los soportes de fase químicamente unida aun no esta del todo definido, existen dos mecanismos, uno de adsorción y otro de reparto. Actualmente se ha establecido que el mecanismo predominante es un reparto, en donde la fase químicamente unida actúa como si fuera un soporte líquido diferenciado de la fase móvil (21, 27, 28).

#### II-4.1.4 Cromatografía líquido-líquido

En este tipo de cromatografía el soluto es distribuido entre dos líquidos inmiscibles, uno de ellos es la fase móvil y otro la fase estacionaria. El líquido de la fase estacionaria esta adherido al soporte (tierra diatomea) mediante adsorción. Se encuentra en dos modalidades, fase normal y reversa.

Presenta algunas ventajas como son un incremento en la velocidad de separación y la resolución; sin embargo, este tipo de columnas requiere de numerosos cuidados preventivos y de mantenimiento, además la fase móvil es muy susceptible a ser perdida durante su uso. Por estas razones su uso ha decaído desde la aparición de columnas de cromatografía de fase químicamente unida (27, 28).

#### II-4.1.5 Cromatografía líquido-sólido

En esta técnica el soluto es separado una vez que está sujeto al fenómeno de adsorción sobre la fase estacionaria. Los adsorbentes más comunes incluyen a la sílice y la alúmina, motivo por el que las fases móviles más comunes son de carácter no polar. Los compuestos más estudiados por esta técnica se limitan a los polares solubles en agua y en ocasiones compuestos iónicos. Al igual que la cromatografía líquido-líquido, la de adsorción ha perdido popularidad a causa de las ventajas de la cromatografía de fase químicamente unida.

#### II-4.1.6 Cromatografía de pares iónicos

Es un tipo de cromatografía de reparto en fase inversa; la fase móvil está constituida por una disolución amortiguadora acuosa con una mezcla de cosolventes (metanol, acetonitrilo) y un contraión, mientras que la fase estacionaria es un líquido de carácter no polar.

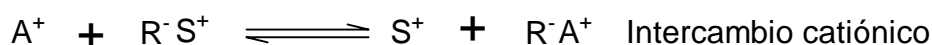
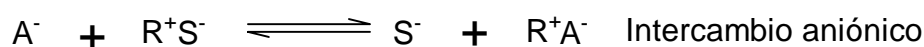
El contraión interactúa con el analito (con carga opuesta al contraión) y forma una especie neutra y menos polar que interactuaría con la fase estacionaria.

#### II-4.1.7 Cromatografía de intercambio iónico

Se utiliza para separar compuestos que tengan carácter iónico. Los procesos de intercambio iónico se basan en los equilibrios de intercambio entre los iones de una disolución y iones que están en la superficie (todos los signos son iguales) de una resina sólida (fase estacionaria). Existen dos tipos de resinas de intercambio iónico (Fig. II-6). Aquellas que intercambian aniones (resinas de intercambio aniónico) se caracterizan por poseer en su superficie grupos con carga positiva. Las resinas que

intercambian cationes (resinas de intercambio catiónico) tienen en su superficie grupos con carga negativa.

Los solutos se separan mediante un mecanismo de competencia por la interacción con los grupos de la resina, entre las cargas de los solutos y otros iones de la fase móvil; los solutos que interaccionen con menos fuerza serán los que primero emergerán de la columna.



**Figura II-6.** Intercambio de los iones en las dos variantes de cromatografía de intercambio iónico. (A) es un analito, (R) es la fase estacionaria (resina de intercambio), (S) es cualquier ión en solución de la fase móvil.

#### II-4.1.8 Cromatografía de exclusión molecular

La separación en este tipo de cromatografía depende solamente de la fase estacionaria, las variaciones en la composición de la fase móvil tienen un efecto nulo sobre esta. Como su nombre lo indica, ésta técnica separa las moléculas con base a su tamaño en solución y se utiliza preferentemente para compuestos cuyo peso molecular es mayor a 2000 g/mol <sup>(28)</sup>.

Se utilizan fases estacionarias con poros de tamaño definido. Un soluto cuyo tamaño es mayor al de los poros será excluido y migrará más rápidamente a través de la columna, mientras que otros solutos, dependiendo de su tamaño, entrarán a través de los poros tomando múltiples caminos y se separarán diferencialmente.

Muestra ciertas ventajas sobre las demás técnicas cromatográficas así como: facilidad de predicción, elución rápida y baja reactividad. Su principal desventaja es la limitada capacidad para distinguir entre compuestos de tamaño similar.

Se divide a su vez en cromatografía de filtración por gel (fase móvil de carácter acuoso o polar) y cromatografía de permeación por gel (fase móvil de carácter no polar), con base en su aplicación para la separación de compuestos solubles en agua o en disolventes acuosos.

### II-5. COMPONENTES DE UN SISTEMA HPLC

A grandes rasgos un equipo de HPLC se divide en dos conjuntos; la columna cromatográfica y la parte instrumental. Ambas deben estar en combinación adecuada con el objetivo de obtener separaciones de elevada eficiencia.

A su vez un equipo de HPLC está compuesto de varios suprasistemas; cuando éstos muestran un desempeño adecuado y se juntan sus funciones individuales, el resultado es un instrumento de HPLC capaz de realizar trabajos de elevada precisión con gran eficiencia. La figura II-6 esquematiza los componentes básicos de un equipo de HPLC.

#### II-5.1 Reservorios para fase móvil

Anteriormente los reservorios estaban diseñados para desgasificar los disolventes; estos tenían entradas especiales por donde se burbujeaba al disolvente He o N<sup>(28)</sup>.

Ciertos reservorios están equipados con un termopar, una resistencia y un agitador, que en conjunto permiten ajustar la temperatura del disolvente en el reservorio.

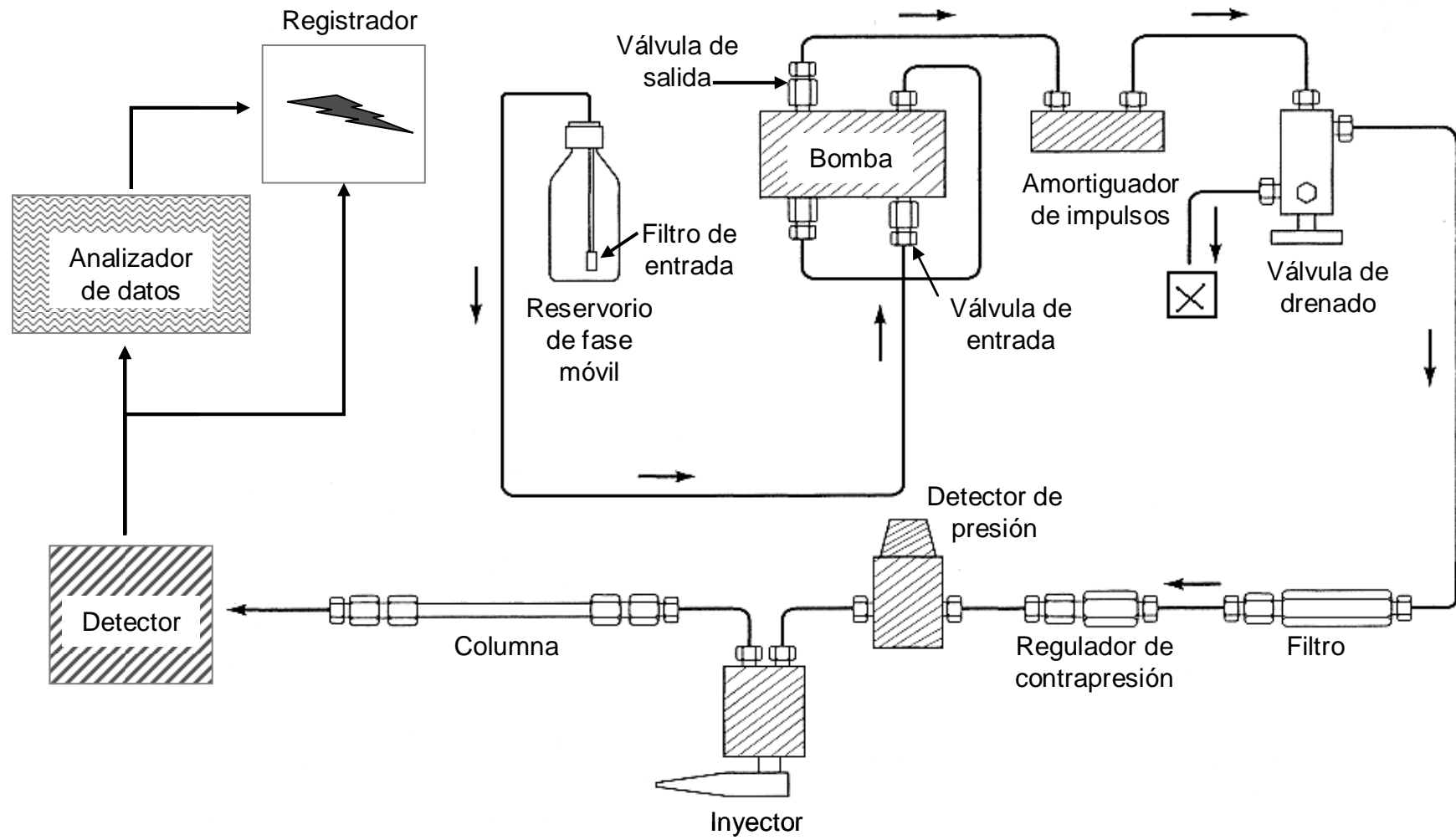


Figura II-7. Esquema de un equipo de HPLC <sup>(26)</sup>



### II-5.2 Sistema de desgasificación

Actualmente, los sistemas modernos de HPLC cuentan con sistema de desgasificación incluido. Éste sistema consiste en un capilar elaborado de un material semipermeable (permite el paso de los gases pero no de los líquidos) por el cual pasa la fase móvil. La sección capilar se encuentra bajo vacío; la diferencia de presión produce la migración del gas fuera de la fase móvil, mientras que el disolvente no puede atravesar la barrera semipermeable.

La desgasificación de disolventes polares y acuosos es indispensable. La desgasificación previene la formación de burbujas en la bomba y en el detector, las cuales producen variaciones drásticas en la señal registrada. La desgasificación mejora la eficiencia de las válvulas check (sección II-5.3) por la eliminación de las microburbujas. Además la eliminación de O<sub>2</sub> de la fase móvil previene la reacción con otras fases móviles o estacionarias dentro de una columna.

### II-5.3 Sistemas de bombeo

La función del sistema de bombeo es la de proporcionar un flujo constante y reproducible de fase móvil a la columna. Las pequeñas partículas de la columna, crean una resistencia considerable al flujo, por lo que las bombas deben de ser capaces de generar presiones cerca de los 5000 psi <sup>(10, 27, 28)</sup>.

Están construidas de materiales resistentes al ataque químico, como acero inoxidable y teflón (politetrafluoroetileno). Los sellos de las bombas están hechos por lo general de teflón, el cual resistirá todos los disolventes empleados en cromatografía de líquidos. En ciertas bombas reciprocantes (Fig. II-8) los pistones y los balines de las válvulas check están hechos de zafiro. El cuadro II-1 resume los requerimientos deseables para una bomba de HPLC.

---

---

Generar una velocidad de flujo por lo menos de 3 mL/min

Producir una presión por lo menos de 5000 psi

Genere un flujo libre de pulsos

Fabricada de materiales químicamente inertes

Reproducibilidad del caudal <<<< 1%

---

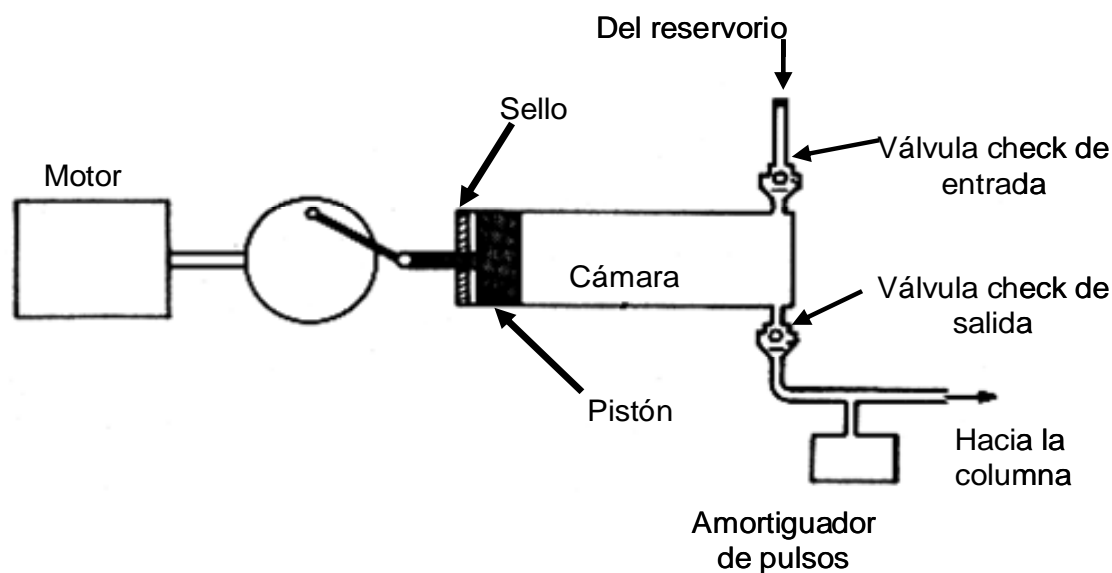
---

**Cuadro II-1.** Requerimientos para de una bomba cromatográfica

Existen dos sistemas de bombeo; los que generan un flujo constante y los que generan una presión constante <sup>(28)</sup>. Los sistemas de bombeo de flujo constante son los más empleados en HPLC.

### *II-5.3.1 Bombas de flujo constante*

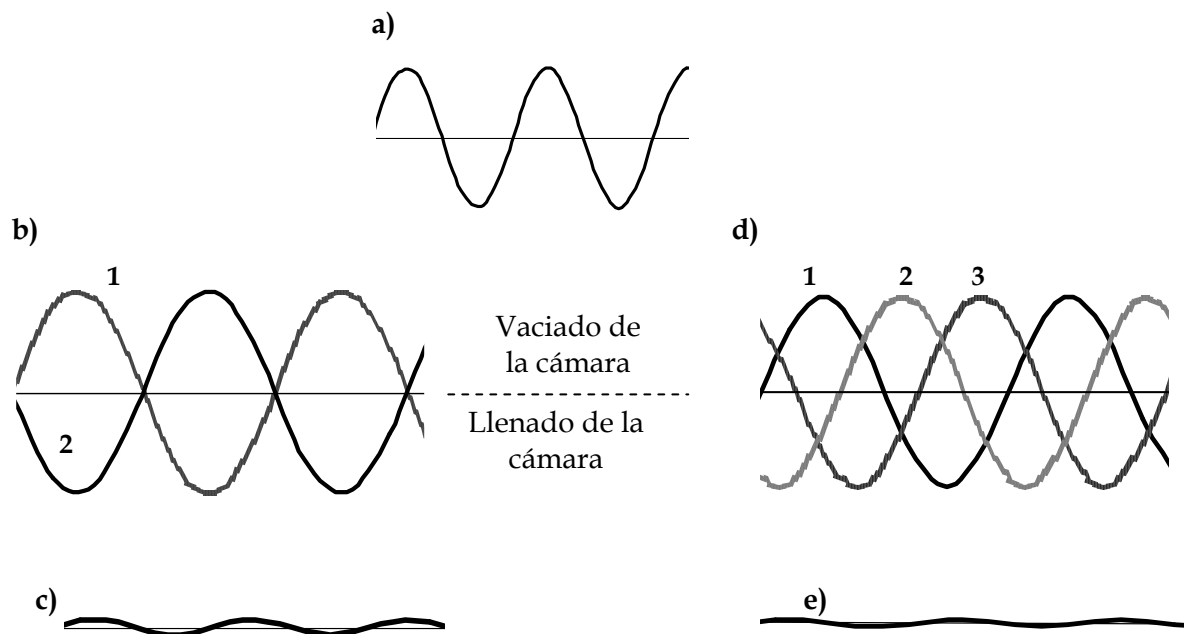
Las bombas reciprocantes son el ejemplo más común para este tipo de sistema de bombeo. Emplean cámaras con pistones reciprocantes, los cuales pueden ser de varios tipos: de cabeza simple (Fig. II-8), doble cabeza y triple cabeza. Pueden adicionalmente estar acopladas a una cámara de amortiguación de pulsos. Las válvulas check se abren o cierran por una diferencia de presión. Este hecho produce un retraso en el ciclo de bombeo y por lo tanto, mayores pulsaciones ya que se necesita alcanzar un volumen definido. Las bombas de equipos modernos abren o cierran las válvulas check de manera computarizada, lo cual minimiza las pulsaciones durante un ciclo de bombeo.



**Fig. II-8.** Bomba recíproca de una sola cabeza. Al disminuir la presión en la cámara, la válvula check de entrada se abre mientras que la de salida se cierra; esto permite el llenado de la cámara. Lo contrario ocurre cuando el pistón comienza a ejercer presión (28).

La figura II-9 esquematiza los ciclos de bombeo de una bomba recíproca de una cabeza, de dos cabezas (las cabezas están a  $180^\circ$  una de otra) y de tres cabezas (Las cabezas están ubicadas a  $120^\circ$ ).

Entre las ventajas generales de las bombas recíprocas están: suministro de un flujo constante y la ausencia de un volumen limitante en la cámara de llenado. La ventaja específica de este tipo de bombas, es el pequeño volumen interno de la cámara, lo que permite realizar cambios en la composición de los disolventes de manera rápida y exacta, siendo esto esencial para realizar una elución por gradiente.



**Figura II-9.** Ciclos de bombeo de tres variedades de bombas reciprocantes. a) bomba de una sola cabeza. b) bomba de dos cabezas, d) bomba de tres cabezas. c) y e) muestra el flujo resultante de la suma de los ciclos de las cabezas. Los valores por encima del eje de las abscisas esquematizan el vaciado de la cámara, mientras los que están por debajo de éste esquematizan el llenado. Cada cabeza tiene su propio ciclo, mostrado con los números 1,2 y 3. Las pulsaciones disminuyen y el flujo se hace cada vez más lineal conforme se incrementa el número de cabezas en las bombas. Adicionalmente las bombas están acopladas a una cámara de amortiguamiento, lo que hace que el flujo sea prácticamente libre de pulsos.

### II-5.3.2 Bombas de presión constante

Este tipo de bombas no generan un flujo con pulsaciones. El flujo de la fase móvil es creado por la aplicación de una presión constante a una cámara que contiene el disolvente. Existen dos tipos de bombas con éstas características: las de desplazamiento o de jeringa y las bombas neumáticas. Las bombas de desplazamiento consisten de grandes cámaras equipadas con un embolo activado por un motor. Éste tipo de bombas producen un flujo independiente de la viscosidad y compresibilidad de los disolventes, la principal desventaja es la capacidad limitada para almacenar los disolventes y la incomodidad en el llenado de la cámara.

En las bombas neumáticas, la fase móvil se encuentra en una cámara que puede presurizarse mediante un gas comprimido. Estas bombas tienen como ventaja

su bajo costo; sin embargo, tienen una limitada capacidad y presión de salida. El caudal depende de la viscosidad del disolvente y de la contrapresión de la columna, por lo que no pueden ser utilizadas en la elución por gradiente.

### II-5.3.3 Sistemas para elución por gradiente

Una elución isocrática se lleva a cabo con único disolvente o una mezcla de disolventes de composición fija.

Si una fase móvil no permite una elución lo suficientemente rápida de todos los componentes, se puede utilizar una elución por gradiente. En este caso se van añadiendo cantidades crecientes de un disolvente sobre otro, produciendo un gradiente continuo.

Éste tipo de sistemas (Fig. II-10) consisten por lo general de bombas reciprocantes programables que dirigen su flujo hacia una cámara de mezclado, de la cual emerge la fase móvil con una composición constante. La composición de cada uno de los disolventes en la fase móvil se ajusta modificando las velocidades de flujo de cada una de las bombas.

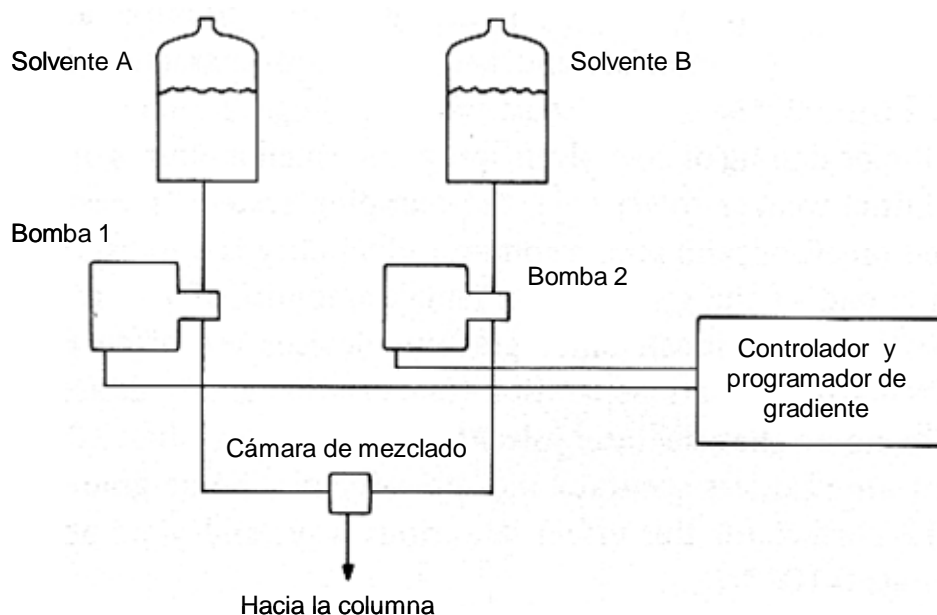


Figura II-10. Esquema de un sistema de bombeo por gradiente de elución <sup>(28)</sup>.

### II-5.4 Sistemas de inyección de muestra

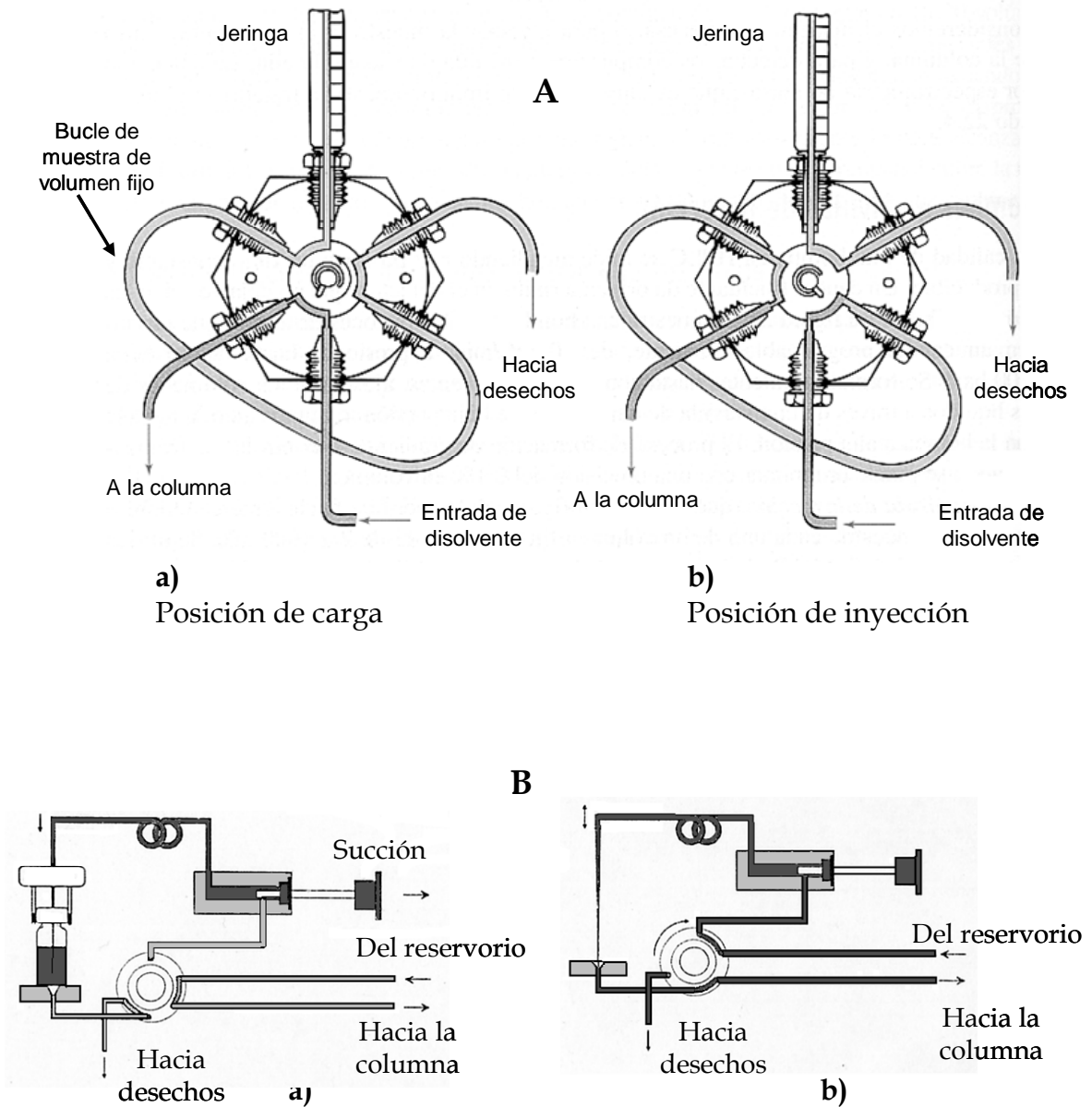
El sistema de inyección de muestra es el factor crítico en la precisión de las medidas analíticas. Éste sistema debe permitir la introducción de volúmenes de muestra desde décimas de microlitro hasta un máximo de 500 microlitros y sin despresurizar al sistema <sup>(27)</sup>.

Actualmente se emplean bucles (capilares calibrados para contener un volumen fijo). Éstos están acoplados a una válvula que permite su llenado con la muestra, para la posterior integración con el sistema cromatográfico. La válvula mas empleada es la de seis vías (Fig. II-11 A), la cual se ajusta en dos posiciones: una para el llenado del bucle y otra para su inyección. En la posición de inyección, la fase móvil pasa a través del bucle y arrastra la muestra hacia la columna.

Equipos modernos con inyectores automáticos se basan en el mismo principio; sin embargo, ya no se emplean bucles debido a que la gran mayoría de estos inyectores tienen un volumen de inyección ajustable (Figura II-11 B). El volumen de inyección se ajusta creando un vacío equivalente al volumen a succionar por la aguja del inyector.

### II-5.5 Detectores

De la gran gama de detectores que se han podido acoplar a la cromatografía de líquidos, solo unos pocos han logrado adquirir popularidad comercial, debido a que varios de ellos son difíciles de operar, requieren una gran inversión, mantenimiento constante y algunos solo se pueden emplear para un grupo específico de compuestos. Sin embargo, varios de ellos siguen existiendo debido a su aplicación en áreas específicas de la química, tal es el caso, de los detectores de índice de refracción que son muy comunes en los laboratorios en donde se trabaja con polímeros.



**Figura II-11. A.** Válvula de seis vías. a) Posición de carga. Se inyecta un volumen por lo menos 3 veces superior al volumen del bucle, el exceso sale hacia el depósito de desechos. Durante esta etapa el flujo de la fase móvil hacia la columna no se ve interrumpido. b) Posición de inyección. Al girar la válvula la fase móvil pasa a través del bucle arrastrando la muestra hacia la columna <sup>(9)</sup>.

**B.** Inyector automatizado del cromatógrafo Agilent 1100. a) Posición de carga, se crea un vacío en la jeringa equivalente al volumen a succionar, la fase móvil no pasa a través del bucle ni la jeringa. b) posición de inyección, la fase móvil arrastra la muestra contenida en el bucle, lava toda la jeringa y la lleva hacia la columna. <sup>(15)</sup>

El cuadro II-2 muestra las características de un detector ideal para HPLC.

---

---

Elevada sensibilidad y la misma respuesta predecible  
Que sea universal y tenga una especificidad predecible  
Que su respuesta sea lineal y tenga un elevado rango de linealidad  
Que su respuesta no se vea alterada por cambios en el flujo de fase móvil y temperatura  
Que genere una respuesta independiente de la fase móvil  
Que no contribuya al ensanchamiento de pico (efecto extracolumna)  
Que su uso sea redituable  
No sea destructivo  
Genere información cualitativa acerca del pico analizado  
Respuesta rápida

---

---

### **Cuadro II-2.** Características de un detector ideal para HPLC

La tabla (II-3) muestra las características de los detectores para HPLC.

Hoy en día, el detector más utilizado es de UV-VIS por la elevada versatilidad que posee. Éste detector es capaz de detectar una gran gama de compuestos (los no detectables se pueden hacer reaccionar para formar derivados que si lo son), tiene además una adecuada sensibilidad (picogramos), es fácil de operar, estable y no destructivo entre otras. Su costo figura entre los detectores mas económicos y redituables para cromatografía.

Otro tipo de detectores que han aumentando en popularidad son los detectores de masas, estos son detectores universales y mucho mas sensibles que los de UV-VIS. Presentan la desventaja de que no ser tan sencillos para su operación y tener un costo de mantenimiento y adquisición elevado.

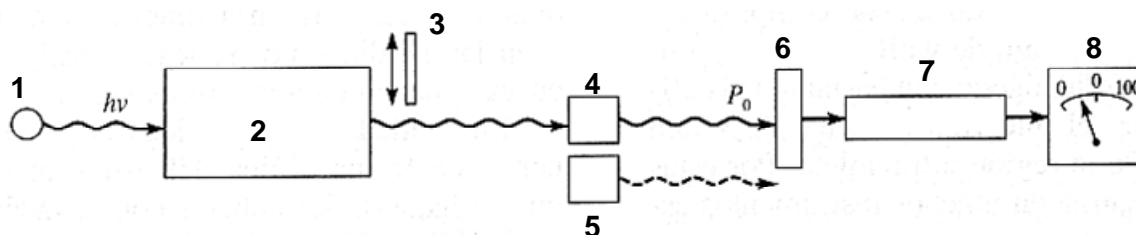
Se describirán brevemente las características de los detectores UV-VIS y los de masas, ya que tienen una relación directa con el presente trabajo.



II-5.5.1 Detectores UV-VIS

Estos detectores utilizan una celda de flujo a través de la cual pasa un haz de luz monocromático o policromático (detectores de arreglo de diodos), el cual es detectado por un fototubo que trasforma la intensidad de luz en una señal eléctrica. Este fenómeno se fundamenta en la ley de Lambert-Beer que establece que si al hacer incidir un haz de luz sobre una celda de longitud constante y que tenga en solución algún compuesto que absorba dicha energía incidente, entonces, la intensidad del haz de luz que emerge de la celda es directamente proporcional a su concentración.

Los espectrofotómetros (Fig II-12) se caracterizan por la incorporación de un monocromador, el cual permite la selección y variación la longitud de onda.



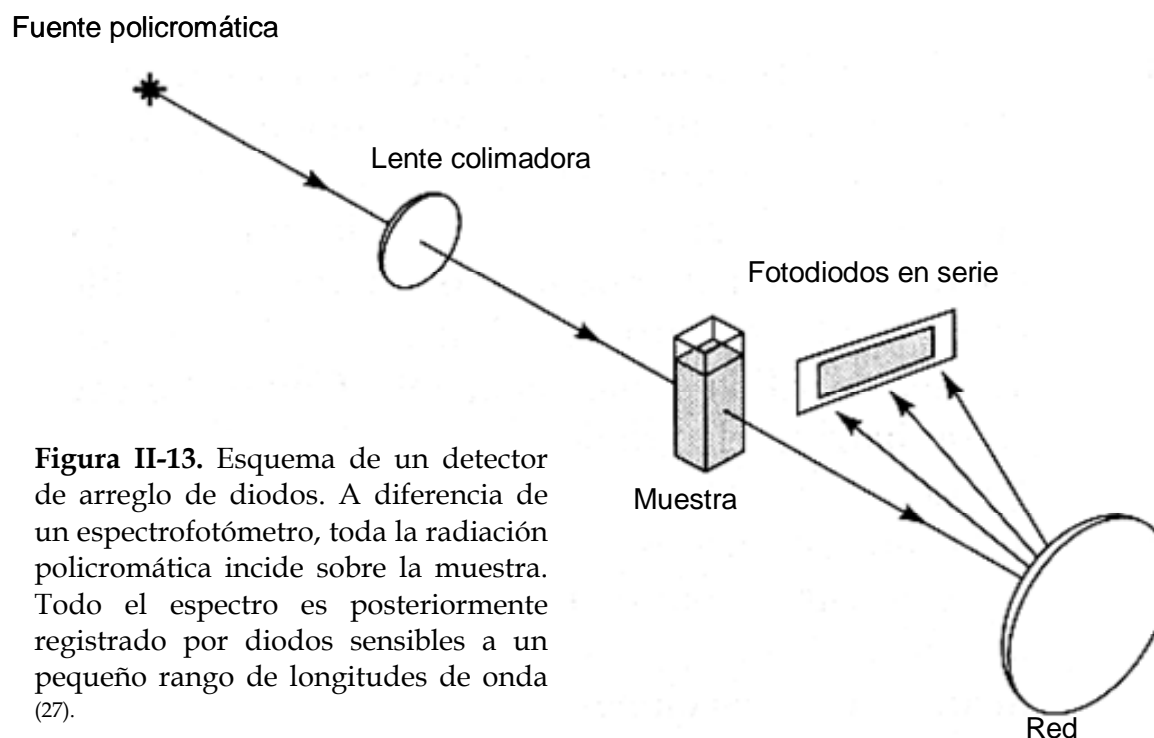
**Figura II-12.** Esquema de un espectrofotómetro. 1) Fuente de radiación policromática. 2) Filtro o monocromador. 3) Obturador. 4) Celda de referencia. 5) Celda de muestra. 6) Fotodetector. 7) Amplificador. 8) Dispositivo de lectura <sup>(27)</sup>.

Otro tipo de detectores son los de arreglo de diodos (Fig. II-13). En ellos se hace incidir un haz de luz policromático, el cual es luego detectado por una placa acoplada con varios diodos, en donde cada uno de ellos es sensible a cierto rango de longitudes de onda. Éste tipo de detectores, a diferencia los anteriores, son capaces de generar el espectro de absorción de los compuestos de manera instantánea.

Detector		Sensibilidad	Selectividad	Estabilidad *	Rango de concentración para una respuesta lineal	Funcionalidad con gradiente de elución	Tipo de compuestos detectados	Información cualitativa
UV-VIS	Espectrofotómetro	+++	+++	++++	++++	Si	Aquellos que presentan dobles enlaces conjugados	No
	Arreglo de diodos	++	+++	++++	++++	Si		Si
Fluorescencia		++++	++++	++++	++++	Si	Compuestos que presenten el fenómeno de fluorescencia	No
Índice de refracción		+	+	+	+	No	Todos (universal)	No
Infrarrojo		+	++++	++	++	Con fases móviles con poca absorptividad	Todos (universal)	Si
Electroquímicos		++	+	+++	+++	Si	Los que presentan propiedades oxido-reductoras	No
Radioactividad		++++	++++	++++	++++	Si	Aquellos que emitan radiación o se acoplen o modifiquen para que la emitan	No
Masas		++++	++++	+++	++++	Si	Todos (universal)	Si

**Tabla II-3.** Características de los detectores para HPLC. El número mayor de cruces se asigna al que presente la mejor propiedad, las demás se asignan de manera relativa a la mejor del grupo.

\* Se refiere a la estabilidad debida a una variación en la temperatura, flujo y composición de la fase móvil.



**Figura II-13.** Esquema de un detector de arreglo de diodos. A diferencia de un espectrofotómetro, toda la radiación policromática incide sobre la muestra. Todo el espectro es posteriormente registrado por diodos sensibles a un pequeño rango de longitudes de onda (27).

### II-5.5.2 Detectores de masas

La importancia de la espectrometría de masas en los estudios analíticos, recae en la amplia aplicación que esta tiene para proporcionar información estructural acerca de las moléculas orgánicas, inorgánicas y biológicas, las relaciones isotópicas de átomos en las muestras, la composición elemental de las muestras, la composición cualitativa y cuantitativa de muestras complejas.

Un detector de masas está compuesto de dos componentes que funcionan en conjunto. Este detector consta de una fuente de ionización de la muestra y un analizador de masas. La primera se encarga de fragmentar los compuestos y formar los iones respectivos, los cuales son separados por el segundo componente.

Las fuentes de ionización se clasifican en fuentes de fase gaseosa y fuentes de desorción (26). La primera consiste en volatilizar la muestra y luego ionizarla. Las

fuentes de desorción transforman directamente muestras en estado sólido o líquido a iones gaseosos. Éstas últimas son utilizadas en cromatografía de líquidos ya que es aplicable a compuestos no volátiles y térmicamente inestables. A su vez existen diferentes analizadores de masas; algunos de los más utilizados son: el cuádruplo, tiempo de vuelo y trampa de iones. Todos varían ligeramente en su función; sin embargo, tienen el mismo objetivo común de separar los iones con base a su relación masa-carga.

### II-6. DISOLVENTES

Los disolventes para cromatografía de líquidos deben de ser de elevada pureza, compatibles con el detector, no tóxicos e inertes. El disolvente debe ser capaz de disolver la muestra; por lo general, se prefieren disolventes con bajo punto de ebullición (20 - 50 °C por encima de la temperatura de separación), baja viscosidad (no mas de 0.5 cP) y debido a la gran cantidad en la cual son usados estos deben estar disponibles a un precio razonable (26, 28).

Es recomendable filtrar todos los disolventes antes de su uso por un poro menor a 0.5  $\mu\text{m}$ . Las fases móviles acuosas con un amortiguador de pH deben de ser filtradas forzosamente antes de su uso y periódicamente después de no ser utilizadas por varios días, debido al crecimiento de microorganismos; en ocasiones se puede añadir un agente antimicrobiano que no interfiera en el análisis.

### II-7. INTERPRETACIÓN DEL CROMATOGRAMA

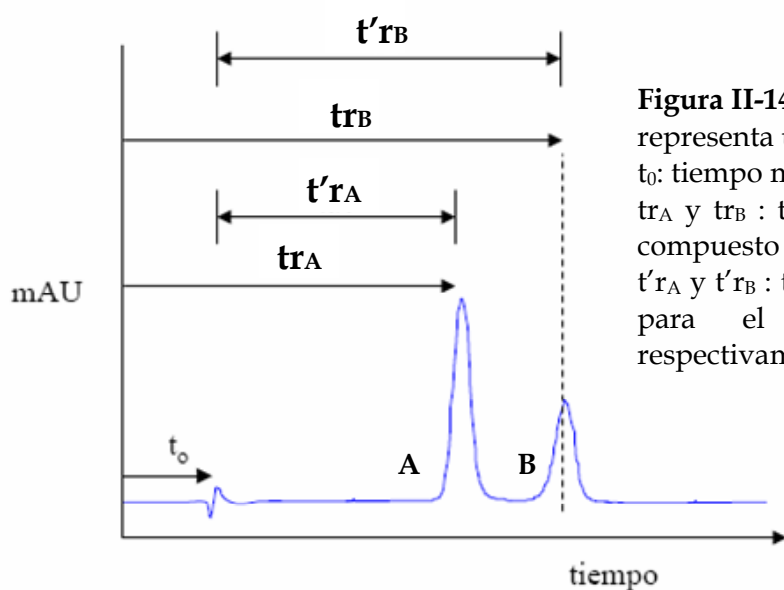
Un cromatograma es la representación gráfica de la respuesta del detector en función del tiempo (Fig. II-14).

Cada pico de un cromatograma representa un compuesto; el orden en el que estos aparecen depende de la naturaleza del compuesto, la técnica cromatográfica empleada, la fase móvil y la fase estacionaria. Éste orden se presenta debido a que cada soluto migra a velocidades diferentes, dependiendo esto principalmente de las constantes de distribución del soluto entre la fase móvil y la estacionaria.

El tiempo de retención ( $t_r$ ) para un compuesto, es el tiempo que transcurre desde la inyección hasta que el componente llega al detector. Por lo general el disolvente no es retenido por la columna; sin embargo, un periodo de tiempo transcurre desde que este se encuentra en el inyector hasta que llega al detector. Éste periodo de tiempo depende de la velocidad de flujo, volumen de la columna y volumen de los componentes del instrumento que transportan la muestra. Dicho periodo es designado como tiempo muerto ( $t_0$ ) y varía según el modelo del instrumento y las características físicas de la columna.

El tiempo de retención relativo ( $t_r'$ ) (Ecuación II-1) de un compuesto, es la diferencia del tiempo que tarda un soluto en atravesar la columna y el que emplea un componente que no se retiene.

$$t_r' = t_r - t_0 \quad \text{(II-1)}$$



**Figura II-14.** Cromatograma. Cada pico representa un compuesto separado.  
 $t_0$ : tiempo muerto.  
 $t_{rA}$  y  $t_{rB}$ : tiempo de retención para el compuesto A y B respectivamente.  
 $t'_{rA}$  y  $t'_{rB}$ : tiempo de retención relativo para el compuesto A y B respectivamente.

Para dos compuestos A y B, el cociente de sus tiempos de retención ajustados es denominado factor de selectividad ( $\alpha$ ) (Ecuación II-2). Es independiente de la velocidad de flujo, por lo que se puede utilizar para la comparación de picos cuando se realizan variaciones de esta. El  $t_{rB} > t_{rA}$  mostrara un valor de  $\alpha > 1$ ; cuanto mayor es el factor de capacidad mayor es la separación entre los componentes.

$$\alpha = \frac{t_{r2}'}{t_{r1}'} \quad (\text{II-2})$$

El factor de capacidad ( $k'$ ) (Ecuación II-3) es una medida de la permanencia de un compuesto en la columna, las cuales se deben a los fenómenos de adsorción-absorción del analito dentro de la fase estacionaria.

$$k' = \frac{t_r - t_o}{t_o} \quad (\text{II-3})$$

### II-7.1 Eficiencia

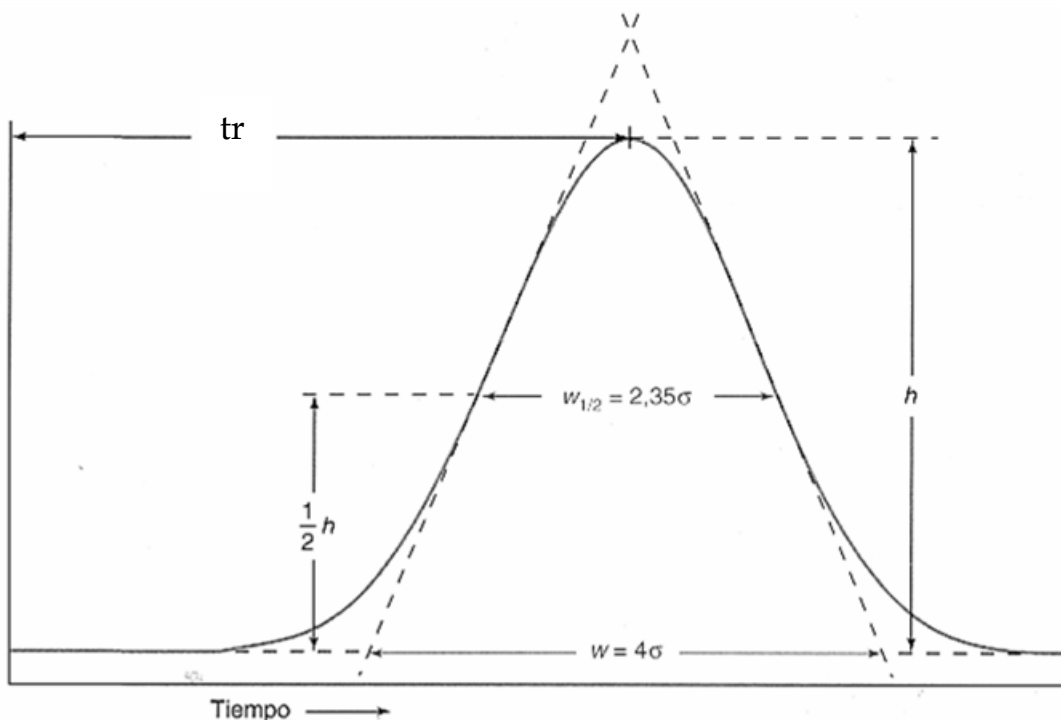
Una de las principales metas de un análisis cromatográfico es obtener una adecuada separación entre los compuestos. Dos factores determinan esta separación: uno es el tiempo de retención de los respectivos compuestos y el otro es la anchura de los picos, entre mas anchos sean, peor será la separación.

El número de platos teóricos de la columna ( $N$ ) se expresa por lo general en términos del ancho de pico ( $W$ ).  $N$  (Ecuación II-4) es una medida de la eficiencia de la columna, mientras mayor sea, se tendrán picos mas estrechos.  $N$  se expresa en función del ancho de pico en la base ( $W$ ) o función del ancho de pico a la mitad de la altura de pico ( $W_{1/2}$ ).

La forma habitual de expresar  $N$  es en función de  $W_{1/2}$  (Ecuación II-5) ya que la medición de  $W$  involucra un error ya que los picos no son exactamente gaussianos, y es por lo que  $W_{1/2}$  muestra un valor más real. Para el cálculo de  $W$  se necesitan trazar las tangentes (Figura II-15) en la porción de mayor pendiente del pico. Esto produce un error especialmente cuando no se tiene experiencia, y la presencia de picos asimétricos (figura II-23) generan problemas en su determinación. Cabe mencionar que la eficiencia incrementa directamente proporcional a la longitud de la columna e inversamente proporcional al tamaño de partícula del empaque.

$$N = \frac{16t_r^2}{w^2} \quad (\text{II-4})$$

$$N = \frac{5.55t_r^2}{W_{1/2}^2} \quad (\text{II-5})$$

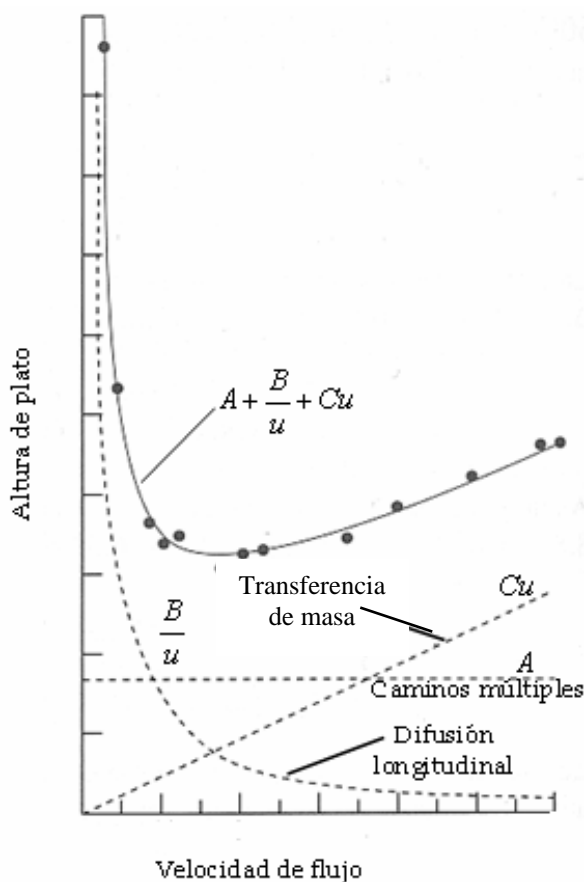


**Figura II-15.** Representación del cálculo de en ancho de pico ( $w$ ) por medio del método de las tangentes. Este método de calculo genera errores, principalmente cuando se tienen picos asimétricos. Por conveniencia se utiliza el ancho a la mitad de la altura de pico  $W_{1/2}$ .<sup>(9)</sup>

La altura equivalente a un plato teórico (H) es la medida de la de la eficiencia de la columna por unidad de longitud de la columna. H es inversamente proporcional a N. La influencia del tipo de columna, fase móvil y velocidad de flujo sobre H es representada por la ecuación de van Deemter (Ecuación II-6).

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \tag{II-6}$$

En donde  $u$  representa la velocidad de flujo;  $A$ ,  $B$  y  $C$  son constantes para una columna y fase estacionaria dadas. Ésta ecuación describe la existencia de diferentes mecanismos de ensanchamiento de pico, entre los cuales uno es proporcional a la velocidad de flujo, otro inversamente proporcional y finalmente otros independientes. La figura II-16 representa la ecuación de van Deemter y el comportamiento de cada uno de sus parámetros.



**Figura II-16.** Representación gráfica de la ecuación de van Deemter. Los gráficos punteados representan los diferentes mecanismos por los cuales se ensancha una banda cromatográfica en función de la velocidad de flujo. El punto mínimo en esta ecuación que representa la velocidad de flujo óptima para obtener una mayor eficiencia y resolución (9).



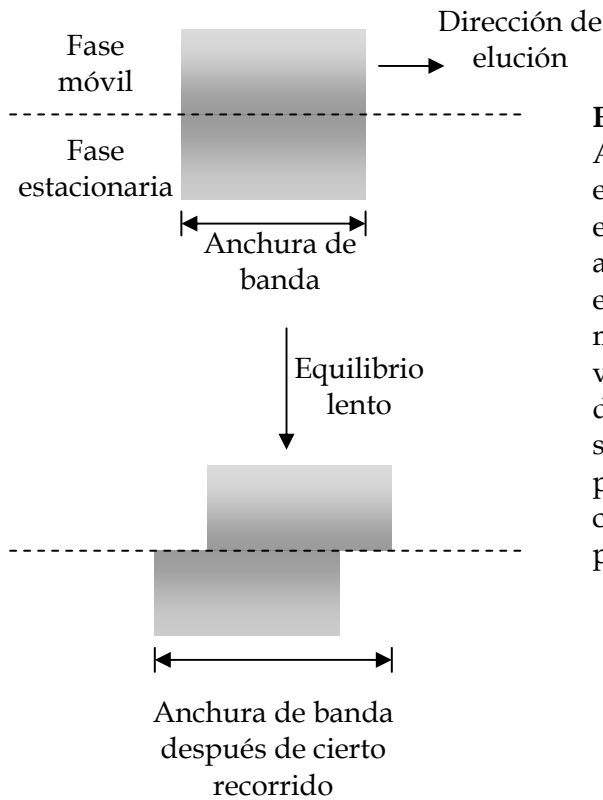
## II-7.2 Mecanismos de ensanchamiento de pico cromatográfico

### II-7.2.1 *Difusión longitudinal*

La difusión longitudinal se presenta a lo largo del eje de la columna y ocurre mientras la banda del soluto pasa a lo largo de la columna por el flujo de la fase móvil. La difusión longitudinal aumenta a medida que los solutos permanecen más tiempo dentro de la columna, por lo que aumentando la velocidad de flujo, la difusión disminuye ya que el tiempo de permanencia dentro de la columna es más corto. Esta es representado por el término  $B/u$  de la ecuación de van Deemter.

### II-7.2.2 *Transferencia de materia*

El término  $C_u$  de la ecuación de van Deemter representa el tiempo necesario para que el soluto pueda alcanzar el equilibrio entre la fase móvil y la fase estacionaria. Como se puede observar en la figura II-17, el ensanchamiento de pico aumenta proporcionalmente a medida que lo hace la velocidad de flujo. Durante la elución de un soluto, parte de este se queda en la fase estacionaria, mientras que el resto se encuentra en la fase móvil; la diferencia de avance entre las dos fases resulta en un ensanchamiento.

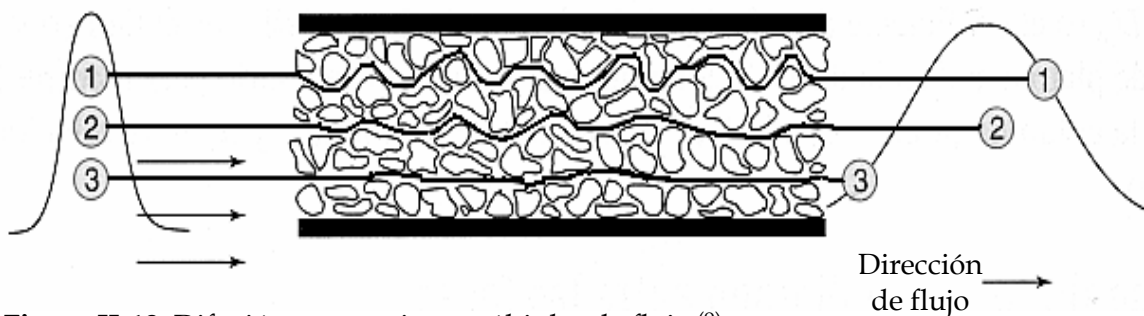


**Figura II-17.**

A bajas velocidades de flujo, el equilibrio entre la fase estacionaria y la fase móvil se alcanza más rápidamente. Un equilibrio lento ocurre a medida que se incrementa la velocidad de flujo. La diferencia de migración del soluto entre las dos fases produce un ensanchamiento como se puede observar en la parte inferior de la figura.

**II-7.2.3 Difusión por caminos múltiples de flujo**

Esta difusión se debe a las diferentes trayectorias que sigue el disolvente entre las partículas de la columna; las diferencias modifican la velocidad de migración de las partículas, produciendo un ensanchamiento de los picos cromatográficos. El efecto de difusión es independiente de la velocidad de flujo; depende principalmente del tipo de empaque de la columna. Se ve representado por el término A de la ecuación de van Deemter.



**Figura II-18.** Difusión por caminos múltiples de flujo <sup>(9)</sup>.

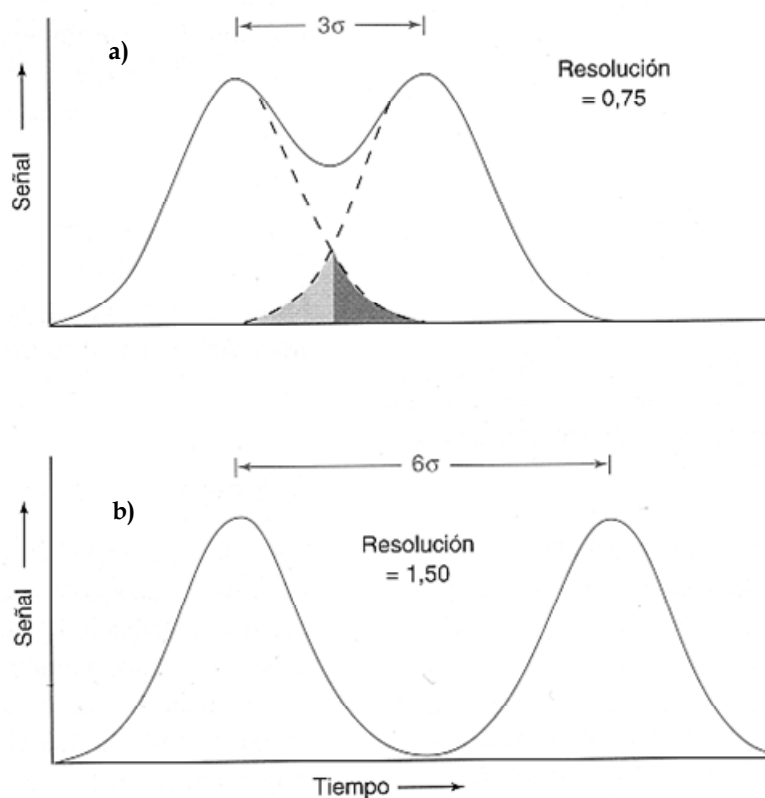
### II-7.3 Resolución

Una medida de la eficacia de separación es la resolución (Ecuación II-7) que existe entre los picos de un cromatograma. En la (Fig. II-19) se puede observar el efecto de distintos valores de resolución sobre la separación de dos picos cromatográficos. Para una adecuada separación entre dos compuestos es necesario obtener un valor de resolución de mayor de 1.5.

$$R_s = \frac{\Delta t_r}{W_m} \quad (\text{II-7})$$

Donde  $\Delta t_r$  es la diferencia entre los tiempos de retención y  $W_m$  es la media de la anchura de las bases de los picos cromatográficos.

Tres parámetros afectan la resolución, estos son: el número de platos teóricos (N), el factor de selectividad ( $\alpha$ ) y el factor de capacidad ( $k'$ ); su relación con la resolución se expresa mediante la ecuación II-8.



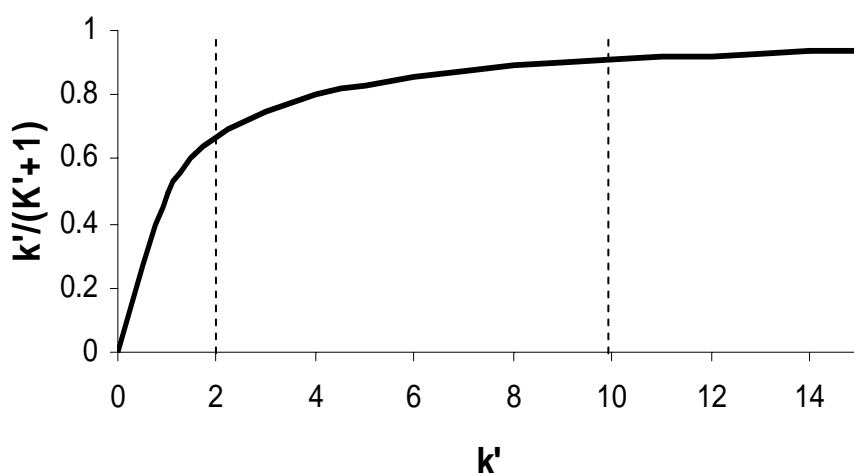
**Figura II-19.**

a) Cuando hay dos o más picos no resueltos, resulta imposible calcular el área de un solo compuesto. Se comete un error en el cálculo del área debido a que ocurre en cierta medida una coelución de dos compuestos (parte sombreada de a)).  
 b) Picos cromatográficos completamente separados o resueltos <sup>(9)</sup>.

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k'}{k' + 1} \right) \quad (\text{II-8})$$

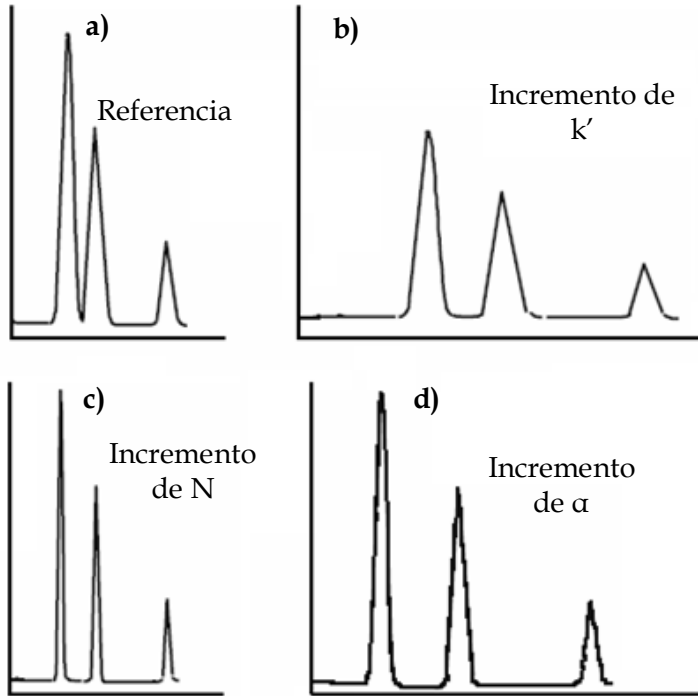
La resolución incrementa directamente proporcional a  $\sqrt{N}$ , por lo que duplicando la longitud de la columna la resolución incrementa en  $\sqrt{2}$ . Ésta ecuación muestra que la relación entre  $\alpha$  y  $k'$  es también directamente proporcional. El factor de selectividad ( $\alpha$ ) puede modificarse cambiando la fase móvil o la fase estacionaria. El modificar  $k'$  implica que los solutos permanecerán más tiempo en la fase estacionaria favoreciendo la resolución; sin embargo, una permanencia demasiado larga producirá un ensanchamiento de los picos, lo que provocará una disminución en la resolución.

La influencia del factor de capacidad se representa en la (Fig. II-20). Éste factor tiene un valor óptimo sobre la resolución cuando se encuentra entre 2 y 10. No tiene caso seguir aumentando su valor ya que tiende asintóticamente hacia 1 y empeorará la resolución.



**Figura II-20.** Influencia del factor de capacidad  $k'$  sobre la resolución. Un valor entre 2 y 10 es considerado óptimo para una adecuada resolución.

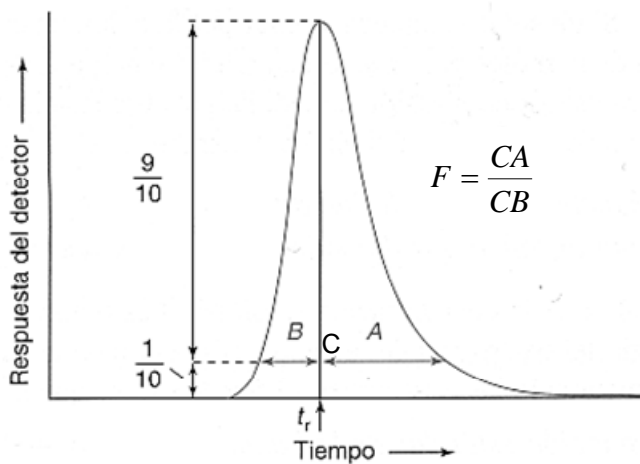
La figura II-21 muestra el efecto que tiene una modificación en los parámetros cromatográficos sobre la resolución.



**Figura II-21.** Efecto del incremento de algunos parámetros cromatográficos sobre la resolución.  
 a) Cromatograma de referencia. b) Incremento del factor de selectividad ( $k'$ ). c) Incremento de la eficiencia ( $N$ ). d) Incremento del factor de selectividad ( $\alpha$ ).

#### II-7.4 Simetría de pico

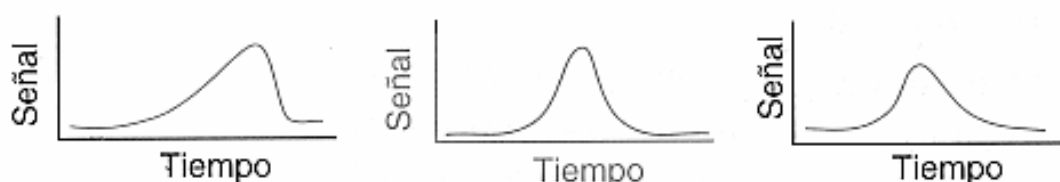
Otro modo para calcular la eficiencia de la columna es la simetría de pico, dado que el cálculo de  $N$  es adecuado cuando se tienen picos simétricos.



**Figura II-22.** Pico asimétrico y calculo de su factor de simetría. Un pico perfecto tiene un valor de factor de simetría de 1 <sup>(28)</sup>.

La forma de un pico asimétrico puede proporcionar información acerca de la eficiencia de la columna así como de una sobrecarga en ésta (Fig. II-23). Cuando se sobrecarga la columna con un soluto, éste incrementa su concentración en la fase estacionaria, desplazando el equilibrio. A medida que el soluto emerge de la columna se observa que casi todo el soluto sale al final de la banda, generando un pico con “cabeceo”.

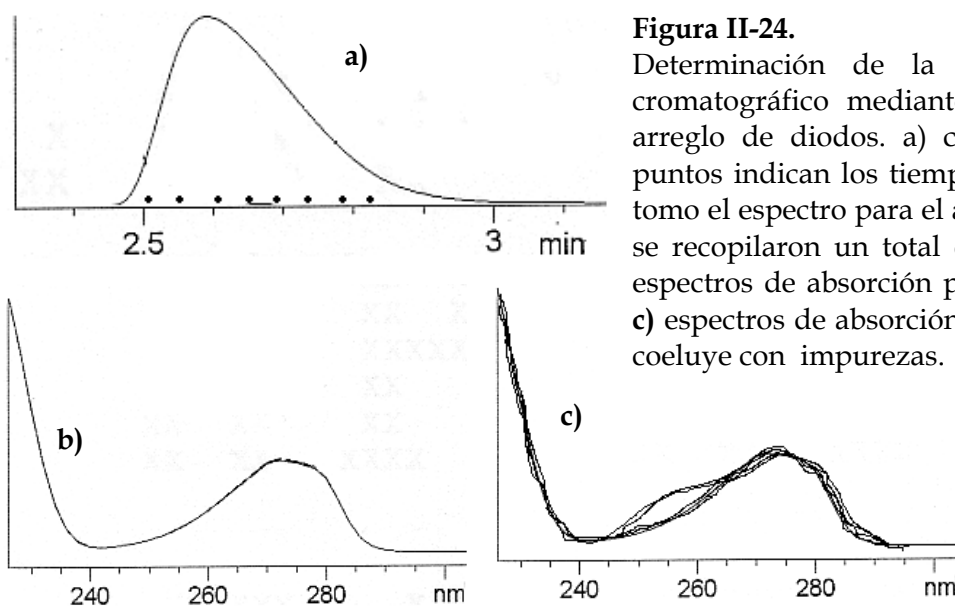
El comportamiento contrario, un pico con “coleo” indica que hay una concentración elevada al principio del pico y ocurre un descenso gradual al ir emergiendo el pico. El coleo es indicativo de mecanismos fuertes de interacción de la columna con el soluto; pueden deberse a una baja calidad de la columna, a un deterioro de la misma o efectos de la matriz sobre los sitios activos de la columna.



**Figura II-23.** Picos asimétricos en cromatografía de líquidos. *Centro*, pico simétrico de referencia. *Izquierda*, pico cabeceado, indica a una sobrecarga de la columna. *Derecha*, pico coleado, indica la presencia de interacciones fuertes de la fase estacionaria con el soluto por una baja eficiencia de la columna <sup>(28)</sup>.

### II-7.5 Pureza de pico

Los detectores de arreglo de diodos generan un espectro de absorción para cada pico cromatográfico. El análisis de pureza de pico consiste en obtener el espectro de absorción de diferentes puntos de un pico cromatográfico y posteriormente superponerlos. Para un pico puro todos los espectros deben ser exactamente iguales, cuando ocurre lo contrario se observan espectros de absorción con ligeras variaciones, los cuales no son superponibles o se encuentran fuera del rango de tolerancia de similitud (Fig. II-24). Cabe recalcar que el análisis de pureza de pico no garantiza la ausencia de impurezas ya que solo se limita a detectar compuestos que absorban radiación UV-VIS.



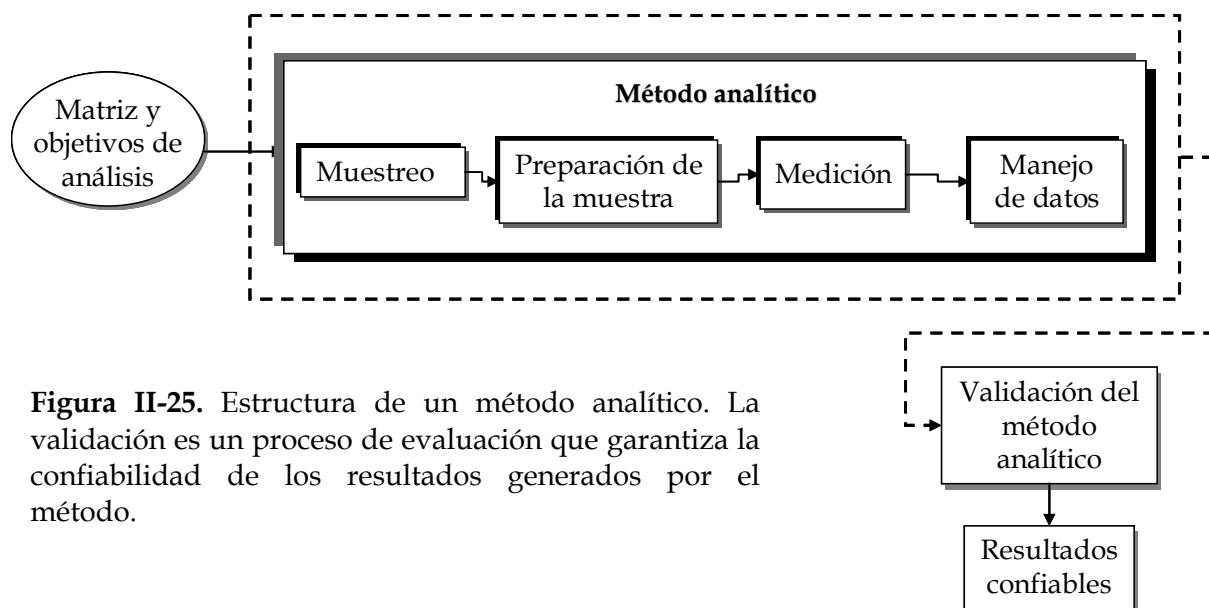
**Figura II-24.**

Determinación de la pureza de pico cromatográfico mediante un detector de arreglo de diodos. a) cromatograma, los puntos indican los tiempos a los cuales se tomo el espectro para el análisis de pureza, se recopilaron un total de 8 espectros. b) espectros de absorción para un pico puro. c) espectros de absorción para un pico que coeluye con impurezas.

## II-8. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Un método analítico se define como la secuencia de actividades, recursos, materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra <sup>(8)</sup>.

Un método analítico consiste de cuatro etapas fundamentales (Fig. II-25); las cuales deben de planearse de acuerdo a los objetivos del análisis. Para poder obtener resultados confiables, es necesario validar el método analítico. El objetivo de la validación consiste en establecer mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas <sup>(30)</sup>.



**Figura II-25.** Estructura de un método analítico. La validación es un proceso de evaluación que garantiza la confiabilidad de los resultados generados por el método.

Hay diferentes clasificaciones para los métodos analíticos; entre los más comunes se encuentran: métodos para identificar analitos, métodos para establecer la presencia de un analito a un límite, métodos para la cuantificar el contenido de impurezas y métodos para cuantificar el analito (principio activo de una forma farmacéutica) (8, 11, 12).

Las siguientes características son primordiales para evaluar un método analítico:

- **Exactitud:** La concordancia entre el valor medido y un valor aceptado como valor verdadero o un valor aceptado como referencia.
- **Precisión:** La concordancia ente las series de mediciones obtenidas de un muestreo múltiple de la misma muestra homogénea bajo las condiciones de análisis preestablecidas.
  - *Repetibilidad:* Es la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo de tiempo corto.



- *Precisión intermedia*: Es la precisión entre las variaciones de un mismo laboratorio (diferentes días, analistas, equipos, etc.)
- *Reproducibilidad*: Precisión entre distintos laboratorios.
- **Especificidad**: Capacidad de un método para medir un analito inequívocamente en presencia de otros componentes de la muestra.
- **Límite de detección**: La concentración mínima de un analito que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada.
- **Límite de cuantificación**: La concentración mas baja de un analito en una muestra que es cuantificada con una precisión y exactitud aceptables.
- **Linealidad**: La capacidad de obtener resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, dentro de un rango establecido.
- **Rango**: Intervalo entre la concentración superior e inferior de un analito en la muestra, para el cual se ha demostrado que el método analítico tiene una precisión, linealidad y exactitud aceptables.

La robustez y la adecuabilidad del sistema son dos parámetros no primordiales; sin embargo, su verificación es recomendable durante el desarrollo de un método analítico <sup>(11, 12)</sup>.

La robustez se refiere a la capacidad de un método de mantenerse inalterado por pequeñas variaciones en los parámetros del método. La adecuabilidad del sistema se refiere a la verificación de que el sistema opera con base a criterios preestablecidos que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados, siendo los componentes del sistema: la instrumentación, analistas y muestras de referencia.

Comúnmente, no todos los parámetros son evaluados para determinado método, la tabla II-4 muestra los parámetros que generalmente son necesarios para validar cierto tipo de método.

Método analítico Parámetro	Identificación	Análisis de trazas		Cuantificación
		Cuantificación	Límite	
Exactitud	-	+	-	+
Precisión	-	+	-	+
Especificidad (*)	+	+	+	+
Límite de detección	-	- (**)	+	-
Límite de cuantificación	-	+	-	-
Linealidad	-	+	-	+

**Tabla II-4.** Parámetros a evaluar para los métodos analíticos. (\*) La falta de especificidad de un método puede compensarse con otros métodos de soporte. (\*\*) En ciertos métodos es necesaria su evaluación (11, 12).

Finalmente, un método analítico debe ser revalidado cuando se presenten cambios en:

- **Instrumentación** (Sustitución por otro modelo, cambio/reparación de un componente crítico del instrumento, etc.)
- **Producto** (Para productos farmacéuticos; cambio en el método de síntesis, cambio en composición del producto terminado, etc.)
- **Método analítico** (Condiciones instrumentales, modificación de procedimiento de preparación de la muestra, etc.)
- **Operadores /analistas.**

## Capítulo III. Parte experimental

### Instrumentación

- Cromatógrafo de líquidos Agilent 1100 acoplado a un detector de arreglo de diodos.
- Cromatógrafo de gases HP 6890 acoplado a un detector de masas HP 5973.
- Calorímetro diferencial de barrido 821<sup>e</sup>, Mettler Toledo.
- Termobalanza TGA/SDTA 851<sup>e</sup> Mettler Toledo

### Columnas

- C-8, Zobrax Eclipse HP, 4.6 x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula. Lote B98050
- C-18, Nova Pack Waters, 3.9 x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula. Lote T02951 I 20
- Columna capilar, HP-5 19091J-433, 5% de metilfenil siloxano, 30 m de longitud, 250  $\mu\text{m}$  de diámetro y 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor de película.

### Material y equipo

- Centrífuga Solbat, modelo J-600
- Potenciometro Cole Parmer, modelo 05669-20
- Baño de ultrasonido Sper Cientific, modelo 100005
- Micropipeta Gilson Pipetman, 50-200  $\mu\text{L}$
- Micropipeta Labsystems Finipipete, 200-1000  $\mu\text{L}$
- Balanza analítica Ohaus, modelo AP210S
- Tubos de plástico para centrífuga de 15 mL, Corning.
- Matraces volumétricos de 10 mL  $\pm$  0.002 mL, Kimax
- Matraces volumétricos de 5 mL  $\pm$  0.002 mL, Kimax
- Matraces volumétricos de 100 mL  $\pm$  0.08 mL, Pirex
- Matraces volumétricos de 50 mL  $\pm$  0.05 mL, Pirex

- Matraces volumétricos de 25 mL  $\pm$  0.03 mL, Pyrex
- Pipetas volumétricas de 3 y 2 mL  $\pm$  0.03 mL, Kimax.
- Filtros de celulosa de 0.45  $\mu$ m, Millipore, Lote H2HM964444

### Reactivos

- Ácido clorhídrico concentrado, J.T. Baker, Lote 404904
- Acetato de sodio anhidro R.A. Técnica Química, Lote 1603
- Hidróxido de sodio granular R.A. Granular, Sigma, Lote 67H15601
- Solución de peróxido de hidrógeno 30 %, Mallickrodt, Lote 5440KLTZ
- Metanol HPLC, J.T. Baker, Lote 9093-03
- Acetonitrilo HPLC, J.T. Baker, Lote 9017-03

### Estándares

- Clorhidrato de tramadol, pureza de 98.38 %. AFM, Lote 25MF1016
- Guaifenesina, pureza de 99.84 %. COSUFAR, Lote 09 55A5
- Guaifenesina, pureza de 99.30 %. USP, Lote L1C098

### Muestras

- Tabletas recubiertas de tramadol de 50 mg. "Taxidil", Laboratorios Best. Lote 1: 0603186, Lote 2: 0610184.
- Cápsulas de tramadol de 50 mg. "Tradol". Laboratorios Grünenthal. Lote 1: M102L01, Lote 2: M123L01.
- Solución oral de tramadol 100 mg/mL. "Tradol", Laboratorios Grünenthal. Lote 1: M101L01, Lote 2: M144L01.
- Solución inyectable de tramadol 100 mg/2 mL. "Trexol", laboratorios Atalntis Pharma. Lote 1: 04607007, Lote 2: 04607014
- Jarabe de guaifenesina 1.5 g/100 mL. "Histicil G", Laboratorios Sanofi-synthelabo. Lote 1: B7C894, Lote 2: B7C423

## III-1. Tramadol

La sustancia de referencia utilizada fue:

- Clorhidrato de tramadol, pureza de 98.38 %. AFM.

El estándar se seco a 80 °C durante 24 horas previamente a su uso.

Las muestras analizadas fueron:

- Tabletas recubiertas de tramadol de 50 mg. "Taxidil", Laboratorios Best.
- Cápsulas de tramadol de 50 mg. "Tradol", Laboratorios Grünenthal.
- Solución oral de tramadol 100 mg/mL. "Tradol", Laboratorios Grünenthal.
- Solución inyectable de tramadol 100 mg/2mL. "Trexol", Laboratorios Atlantis Pharma.

### III-1.1 Pruebas de identidad

Se comprobó la identidad del tramadol (sustancia de referencia) mediante técnicas de análisis térmico y espectrometría de masas.

#### III-1.1.1 *Análisis térmico*

Las técnicas de análisis térmico empleadas fueron: termogravimetría, análisis térmico diferencial y calorimetría diferencial de barrido. Se realizaron bajo una atmósfera de nitrógeno en un rango de temperatura de 20 - 300 °C con una rampa de 10 °C/min. Mediante estas técnicas se obtuvo el punto de fusión y la temperatura de

ebullición del tramadol, además de comprobar la presencia de sustancias volátiles en el estándar.

### III-1.1.2 Cromatografía de gases - espectrometría de masas

Las condiciones cromatográficas se encuentran en la tabla III-1. Una pequeña cantidad de tramadol se disolvió en 1 mL de metanol e inyectó en el equipo. Se obtuvo el espectro de masas y se comparó con la base de datos del equipo para confirmar su identidad. La biblioteca de espectros usada fue: *Mass Spectral Library, NIST, 1999*.

<b>Tiempo de retardo*</b>	2 min	<b>Temperatura del inyector</b>	275 °C
<b>Volumen de inyección</b>	1 µL	<b>Modo de inyección</b>	Split
<b>Velocidad de flujo</b>	1.6 mL/min	<b>Temperatura de la columna</b>	300 °C
<b>Gas acarreador</b>	Helio		
<b>Columna</b>	Columna capilar, HP-5 19091J-433, 5% de metilfenil siloxano, 30 m de longitud, 250 µm de diámetro y 0.25 µm de espesor de película.		

**Tabla III-1.** Condiciones del cromatógrafo de gases para identificación de tramadol. (\*) Es el tiempo que la fuente de ionización permanecerá apagada después de la inyección, con el objetivo de permitir la salida del disolvente.

### III-1.2 Desarrollo del método

Se comenzó por evaluar la retención del tramadol. La disolución usada en el cromatógrafo de gases, se inyectó en el cromatógrafo de líquidos y se evaluó el factor de capacidad obtenido en cada corrida. En dos diferentes columnas se

realizaron variaciones de la fase móvil. Los solventes utilizados fueron metanol (MeOH) y acetonitrilo (MeCN) de grado HPLC y solución amortiguadora de acetatos 0.015 M de pH 2.7. Todas las soluciones acuosas se desgasificaron mediante vacío-ultrasonido y filtraron a través de un poro de 0.45  $\mu\text{m}$  con filtros de celulosa.

Las columnas utilizadas fueron: C-8, Zobrax Eclipse HP, 4.6 X 150 mm, 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula; y una columna C-18, Nova Pak Waters, 3.9 x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula.

El flujo se mantuvo en 1 mL/min, la temperatura de la columna fue de 25 °C y el volumen de inyección de 5  $\mu\text{L}$ . La longitud de onda de absorción fue de 275 nm para todos los experimentos.

Consecuentemente se inyectó cada una de las muestras previamente tratadas con la finalidad de evaluar la resolución entre los picos. Mediante esto se establecieron las condiciones cromatográficas preliminares del método analítico, que posteriormente fueron optimizadas mediante un diseño factorial

### III-1.3 Tratamiento de las muestras

#### III-1.3.1 *Tabletas y cápsulas*

Cada tableta se trituró y el triturado se depositó en un tubo de centrifuga, posteriormente se adicionó un volumen de 10 mL de MeOH y se colocó en un baño de ultrasonido por 5 minutos. La mayor parte de la tableta no se disolvió por lo que la muestra se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se paso cuantitativamente a matraz volumétrico de 25 mL. La operación se repitió una vez más. Finalmente el matraz se llevó al aforo con MeOH, obteniéndose una concentración teórica de tramadol de 2 mg/mL.

Para las cápsulas se depositó su contenido en el tubo para centrifuga y se trataron igual que las tabletas. No fue necesario llevara a cabo un proceso de

triturado; y al igual que en las tabletas gran parte del contenido de la cápsula no se disolvió.

### *III-1.3.2 Solución inyectable y solución oral.*

Para la solución oral se tomó volumen equivalente a 50 mg de tramadol y se depositó en un matraz volumétrico de 25 mL, posteriormente el matraz se llevó al aforo con MeOH.

Para la solución inyectable se vertió cuantitativamente el contenido de una ampolleta a un matraz volumétrico de 10 mL, se llevó al aforo con MeOH, se tomó una alícuota de 1 mL y se depositó en un matraz de 5 mL, finalmente el matraz se llevó al aforo con MeOH.

## **III-1.4 Optimización del método**

La optimización consistió en establecer los porcentajes de los solventes de la fase móvil y el pH de la solución amortiguadora. Las condiciones adecuadas para el análisis y que se mantuvieron constantes durante la optimización fueron: columna C-8, temperatura de columna a 25 °C, volumen de inyección de 5 µL, y velocidad de flujo en 1 mL/min. Mediante estos parámetros se enfocó la optimización en las condiciones críticas del método.

Se realizó un diseño factorial 2<sup>2</sup> estableciéndose los niveles de la tabla III-2 para los factores. Los experimentos realizados con las respectivas modificaciones de los factores se encuentran en la tabla III-3. La fase móvil estuvo compuesta únicamente de una mezcla de MeOH y solución amortiguadora de acetatos, la elución fue isocrática.

La muestra usada en el diseño fue la de solución oral, siendo la única que presentó compuestos detectables adicionales al tramadol.



Nivel	Factor	
	pH	% de Agua
Alto (+)	3.5	65 %
Bajo (-)	2.5	45 %

Tabla III-2. Valores de los distintos niveles de los factores evaluados en el diseño factorial.

# de experimento	Nivel del factor	
	pH	% de agua
1	(+)	(+)
2	(+)	(-)
3	(-)	(+)
4	(-)	(-)

Tabla III-3. Experimentos llevados a cabo para el diseño factorial.

Se analizó la muestra bajo las condiciones establecidas por el diseño factorial; consecuentemente se obtuvieron los parámetros necesarios para el cálculo de la eficiencia (N) y la resolución (Rs). Con los datos se elaboraron las ecuaciones que describen el comportamiento de los parámetros en función de los factores. Las ecuaciones se generaron mediante el método de los contrastes. El cálculo de los contrastes se describe a continuación:

Se obtuvo la suma de las respuestas (N ó Rs) del nivel alto de un factor (pH ó % de agua); basándose en la tabla III-3 y tomando como ejemplo al pH como factor, la suma de las respuestas para el nivel alto y bajo son:

$$\sum_{(+)\text{pH}} = X_1 + X_2 \quad \text{(III-1)}$$

$$\sum_{(-)\text{pH}} = X_3 + X_4 \quad \text{(III-2)}$$

En donde  $X_{\alpha}$  representa el valor de la eficiencia o resolución obtenida en el experimento respectivo. Con base a las ecuaciones III-1 y III-2 la suma de las respuestas en donde el factor es el % de agua, estarán dadas por:

$$\sum_{(+)\% H_2O} = X_1 + X_3 \quad \text{(III-3)} \quad \sum_{(-)\% H_2O} = X_2 + X_4 \quad \text{(III-4)}$$

Fue también necesario obtener la suma de las respuestas de la combinación de los factores; la ecuación para la suma de los niveles altos de la combinación esta dada por la ecuación III-5. Una interacción de nivel alto se obtiene en el cuarto experimento ya que el producto de dos niveles bajos (signos negativos) generara un nivel alto.

$$\sum_{(+)\% pH(\% H_2O)} = X_1 + X_4 \quad \text{(III-5)} \quad \sum_{(-)\% pH(\% H_2O)} = X_2 + X_3 \quad \text{(III-6)}$$

El contraste, es la diferencia entre la suma de las respuestas del nivel alto menos la suma de las respuestas del nivel bajo de un factor; las ecuaciones III-7, III-8 y III-9 muestran el cálculo del contraste para cada uno de los factores y la combinación de ellos.

$$C_{pH} = \left[ \sum_{(+)\% pH} \right] - \left[ \sum_{(-)\% pH} \right] \quad \text{(III-7)}$$

$$C_{\% H_2O} = \left[ \sum_{(+)\% H_2O} \right] - \left[ \sum_{(-)\% H_2O} \right] \quad \text{(III-8)}$$

$$C_{\% pH(\% H_2O)} = \left[ \sum_{(+)\% pH(\% H_2O)} \right] - \left[ \sum_{(-)\% pH(\% H_2O)} \right] \quad \text{(III-9)}$$

A partir de los contrastes se calculó el efecto de cada factor y su combinación mediante la ecuación III-10. Finalmente, se calcularon los coeficientes de la ecuación del modelo estadístico (Ecuación III-12) mediante la ecuación III-11.

$$Efecto\ del\ Factor = \frac{C_x}{2^{k-1}} = \frac{C_x}{2} \quad (III-10)$$

donde  $k$  es el número de factores

$$Coeficiente = \frac{Efecto}{2} \quad (III-11)$$

$$y = b_0 + b_1(pH^*) + b_2(\% H_2O^*) + b_3[(pH^*)(\% H_2O^*)] \quad (III-12)$$

El término  $b_0$ , se calculó mediante la ecuación III-13;  $Y...$  representa la suma de los resultados de los experimentos y  $N...$  el número total de observaciones.

$$b_0 = \frac{\sum Y...}{N...} \quad (III-13)$$

Los términos  $(pH^*)$  y  $(\% H_2O^*)$  de la ecuación III-12 son variables codificadas, para poder obtener la ecuación del modelo en función de variables naturales (pH y % de agua), se deben descodificar mediante la ecuación III-14, en donde los valores de los niveles son aquellos establecidos en la tabla III-2.

$$Código = \frac{Valor_{real} - promedio_{niveles}}{\left( \frac{nivel_{alto} - nivel_{bajo}}{2} \right)} \quad (III-14)$$

Mediante un análisis de varianza (ANOVA) se comprobó si los factores de estudio presentaron un efecto significativo para el proceso cromatográfico. Éste análisis fue realizado a un nivel de confianza del 95 %. El cuadro ANOVA se elaboró con las ecuaciones mostradas en el anexo 1.

Finalmente, a partir de la gráfica generada por la ecuación III-12 descodificada, se seleccionó el valor de pH y el porcentaje de agua mas adecuados

para los parámetros del método. La validez de los resultados se comprobó mediante el análisis de los residuos (ecuaciones del anexo 2). Las condiciones cromatográficas del método desarrollado para el tramadol se encuentran en la tabla III-4.

<b>Velocidad de flujo</b>	1 mL/min	<b>Columna</b>	C-8
<b>Volumen de inyección</b>	5 $\mu$ L	<b>Temperatura de la columna</b>	25 °C
<b>pH de la fase acuosa</b>	3	<b>Tipo de elución</b>	Isocrática
<b>Composición de la fase móvil</b>	55% H <sub>2</sub> O 45% MeOH		

**Tabla III-4.** Condiciones cromatográficas del equipo de HPLC para la cuantificación de tramadol.

### III-1.5 Evaluación de parámetros de validación

#### III-1.5.1 Linealidad

Se elaboró una curva de calibración de cinco niveles, siendo el punto de concentración central el de 2 mg/mL. Los puntos restantes se encuentran en un rango mayor a un  $\pm$  20 % de la concentración central. Cada nivel se preparó por triplicado obteniéndose un total de 15 datos que fueron empleados en el análisis de regresión lineal (Anexo 2).

### *III-1.5.2 Precisión*

Se prepararon por triplicado soluciones a dos distintas concentraciones, tales que representasen los puntos superior e inferior de la curva de calibración. El análisis de los datos se realizó empleando las ecuaciones del anexo 3.

### *III-1.5.3 Especificidad*

Se evaluó la pureza de pico del analito para descartar una posible coelución con otros compuestos en las muestras analizadas.

### *III-1.5.4 Exactitud*

Se evaluó el porcentaje de recobro. Para el caso de la tabletas se obtuvo el peso promedio de las tabletas, consecuentemente se trituró cierta cantidad y se homogenizó el triturado. Se analizaron muestras de triturado con un peso cercano al peso promedio y se obtuvo la cantidad de analito por peso de muestra. Posteriormente se tomó un peso equivalente a la mitad de la cantidad de analito por tableta. La cantidad faltante de analito para obtener un 100% se adicionó en la etapa inicial del tratamiento de la muestra; esta adición fue realizada a partir del estándar de referencia.

El tratamiento de las cápsulas se realizó de manera similar. No se realizó ésta prueba en las soluciones ya que su manejo consiste únicamente en diluir la muestra, por lo que no se involucra una pérdida de analito.

#### **III-1.5.5 Robustez**

Se realizaron variaciones a las siguientes condiciones cromatográficas: pH de la fase móvil, composición de la fase móvil, temperatura de la columna, volumen de inyección y velocidad de flujo. Estas variaciones fueron en un rango aproximado de  $\pm 5\%$  con la finalidad de representar variaciones entre distintos laboratorios y/o equipos. Durante cada variación se corrió un estándar a una concentración equivalente al 100% en una muestra, la cual, fue la solución oral. La misma muestra se utilizó durante todo el análisis. Finalmente se calculó la concentración de analito en cada variación y se comparó con los valores obtenidos en las condiciones estándar. Adicionalmente, se calcularon parámetros cromatográficos tales como: la resolución, la eficiencia y tiempo de retención. Del mismo modo se compararon contra los valores obtenidos bajo las condiciones estándar con la finalidad de determinar cual de las condiciones cromatográficas presenta mayor influencia sobre dichos parámetros.

#### **III-1.5.6 Adecuabilidad del sistema**

Se analizó un estándar y una muestra de solución oral en dos fechas distintas (1 mes de diferencia). Se evaluó la diferencia significativa en cuanto a tiempo de retención, resolución, eficiencia y concentración del analito.

#### **III-1.6 Análisis de muestras**

Dos lotes distintos de cada forma farmacéutica fueron analizados. Se realizó un análisis por unidad para las tabletas y las cápsulas; las soluciones se analizaron por triplicado.

## III-2. Guaifenesina

Las sustancias de referencia utilizadas fueron:

- Guaifenesina, sustancia de referencia COSUFAR, pureza de 99.84 %.
- Guaifenesina, estándar USP, pureza de 99.30 %.

Se secaron previamente a su uso durante 24 horas a 50 °C.

La muestra analizada fue:

- Jarabe de guaifenesina con dextrometorfano conteniendo 1.5 g de guaifenesina por cada 100 mL. "Histiakil G", Laboratorios Sanofi-synthelabo.

### III-2.1 Pruebas de identidad

La prueba se realizó mediante cromatografía de gases - espectrometría de masas. Adicionalmente esta técnica fue útil para evaluar la presencia de guayacol (producto de degradación de la guaifenesina) en los jarabes. Las condiciones instrumentales se muestran en la tabla III-5.

### III-2.2 Desarrollo del método

Se procedió de manera similar como en el tramadol. La separación de los compuestos se evaluó en las columnas C-8 y C-18 variando la composición de los solventes. Se utilizó solución amortiguadora de acetatos 0.015 M de pH 4 y agua

destilada con un pH entre 6-7. El volumen de inyección se mantuvo constante en 20  $\mu\text{L}$ , la temperatura de la columna en 25  $^{\circ}\text{C}$  y una velocidad de flujo de 1 mL/min. La longitud de onda de absorción de fue de 285 nm.

<b>Tiempo de retardo*</b>	2 min	<b>Temperatura del inyector</b>	275 $^{\circ}\text{C}$
<b>Volumen de inyección</b>	1 $\mu\text{L}$	<b>Modo de inyección</b>	Split
<b>Velocidad de flujo</b>	1.6 mL/min	<b>Temperatura de la columna</b>	120 $^{\circ}\text{C}$ (2 min); 120-300 $^{\circ}\text{C}$ (10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )
<b>Gas acarreador</b>	Helio		
<b>Columna</b>	Columna capilar, HP-5 19091J-433, 5% de metilfenil siloxano, 30 m de longitud, 250 $\mu\text{m}$ de diámetro y 0.25 $\mu\text{m}$ de espesor de pelvcula.		

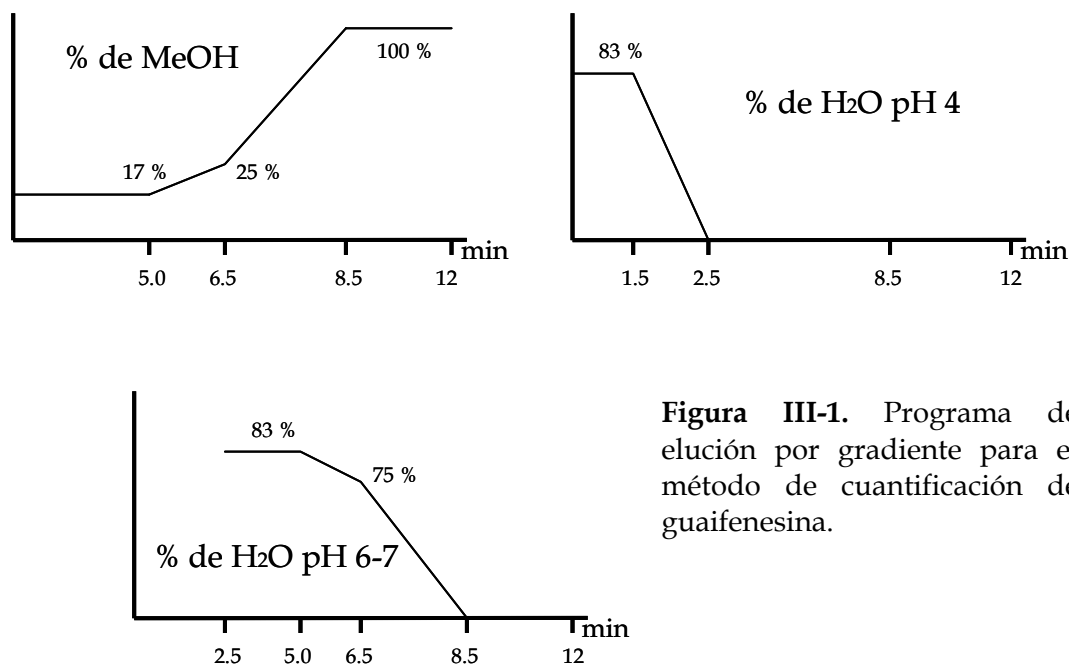
**Tabla III-5.** Condiciones del cromatógrafo de gases para identificación de guaifenesina. (\*) Es el tiempo que la fuente de ionización permanecerá apagada después de la inyección, con el objetivo de permitir la salida del disolvente.

La muestra presentó varios compuestos, que para ser separados se requirió un tiempo de elución cercano a los 20 minutos. Una vez seleccionada la columna, se desarrolló una elución por gradiente para reducir el tiempo de análisis. Las condiciones cromatográficas del método se encuentran en la tabla III-6.

<b>Velocidad de flujo</b>	1 mL/min	<b>Columna</b>	C-18
<b>Volumen de inyección</b>	20 $\mu\text{L}$	<b>Temperatura de la columna</b>	25 $^{\circ}\text{C}$
<b>pH de la fase acuosa</b>	4 y 6-7	<b>Tipo de elución</b>	Gradiente
<b>Composición de la fase móvil</b>	Ver figura III-1		

**Tabla III-6.** Condiciones cromatográficas del equipo de HPLC para la cuantificación de guaifenesina.





**Figura III-1.** Programa de elución por gradiente para el método de cuantificación de guaifenesina.

### III-2.3 Tratamiento de la muestra

Se tomó una alícuota de jarabe equivalente a 15 mg de guaifenesina y se diluyó con agua en un matraz volumétrico de 100 mL para obtener una concentración de 0.15 mg/mL.

### III-2.4 Evaluación de parámetros de validación

#### III-2.4.1 Linealidad

Se preparó una curva de calibración de 5 niveles. La concentración del punto central fue de 0.15 mg/mL; los puntos restantes se prepararon en un rango superior a un  $\pm$

20% de la concentración central; cada punto se preparó por triplicado. El manejo de los datos se realizó mediante un análisis de regresión (Anexo 2).

#### *III-2.4.2 Precisión*

Se prepararon por triplicado soluciones a dos distintas concentraciones, tales que, representasen los puntos superior e inferior de la curva de calibración. El análisis de los datos se realizó mediante las ecuaciones del anexo 3.

#### *III-2.4.3 Especificidad*

Alícuotas del jarabe se sometieron a las siguientes condiciones: HCl 0.1 M, NaOH 0.1 M, peróxido de hidrógeno al 3% y calor a 70 ° C. Las muestras permanecieron bajo las condiciones durante 24 horas antes de ser evaluadas. Se analizaron los cromatogramas respectivos y la pureza de pico del analito para verificar la adecuada separación de analito, los demás compuestos y productos de degradación.

#### *III-2.4.4 Exactitud*

Se evaluó por triplicado el porcentaje de recobro de muestras equivalentes a un 50 % de la concentración teórica, a las cuales se añadió estándar para completar un 100 % de ésta concentración.

#### *III-2.4.5 Estabilidad analítica de la muestra*

Se analizó una muestra de jarabe por triplicado, la cual, corresponde a la concentración inicial de analito. Las muestras permanecieron a temperatura ambiente y en presencia de luz durante 1 mes para volver a ser analizadas. Se

calculó la diferencia absoluta entre la concentración de las muestras, la cual no debe de exceder un 2.0 %.

#### **III-2.4.6 Robustez**

Se evaluó modificando la composición la fase móvil en un  $\pm 5\%$  respecto a la composición de agua. Se calculó la diferencia absoluta entre las concentraciones obtenidas por el método modificado, respecto al de referencia.

#### **III-2.5 Análisis de muestras**

Se analizó la concentración de guifenesina por triplicado de distintos lotes de jarabe.

#### **III-2.6 Comparación de estándares**

Se realizó una comparación entre los dos estándares para evaluar la calidad del estándar nacional respecto al de importación. Se preparó una curva de calibración con cada uno de los estándares. Mediante un análisis de regresión se evaluó la concordancia entre la respuesta de los estándares.

## Capítulo IV. Resultados y análisis

### IV-1. Tramadol

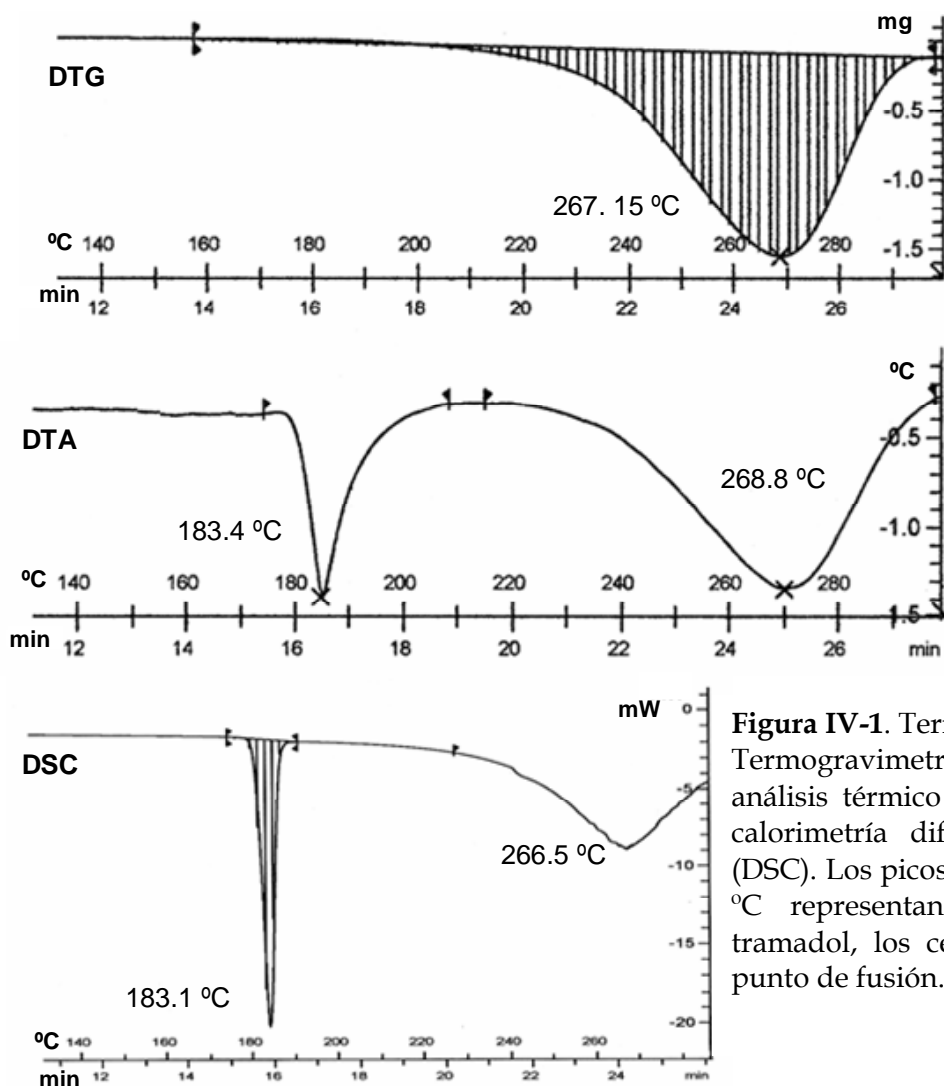
#### IV-1.1 Pruebas de identidad

##### IV-1.1.1 *Análisis térmico*

En la figura IV-1 se muestran los distintos termogramas. La termogravimetría diferencial de barrido (DTG) no presenta picos adicionales al de la ebullición ó descomposición del tramadol. El pico observado corresponde a una evaporación, la cual fue comprobada mediante el análisis por espectrometría de masas.

En los termogramas del análisis térmico diferencial (DTA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC), además de los picos que representan el punto de ebullición del tramadol, se observan los picos correspondientes a su punto de fusión; todos los picos observados denotan un proceso endotérmico.

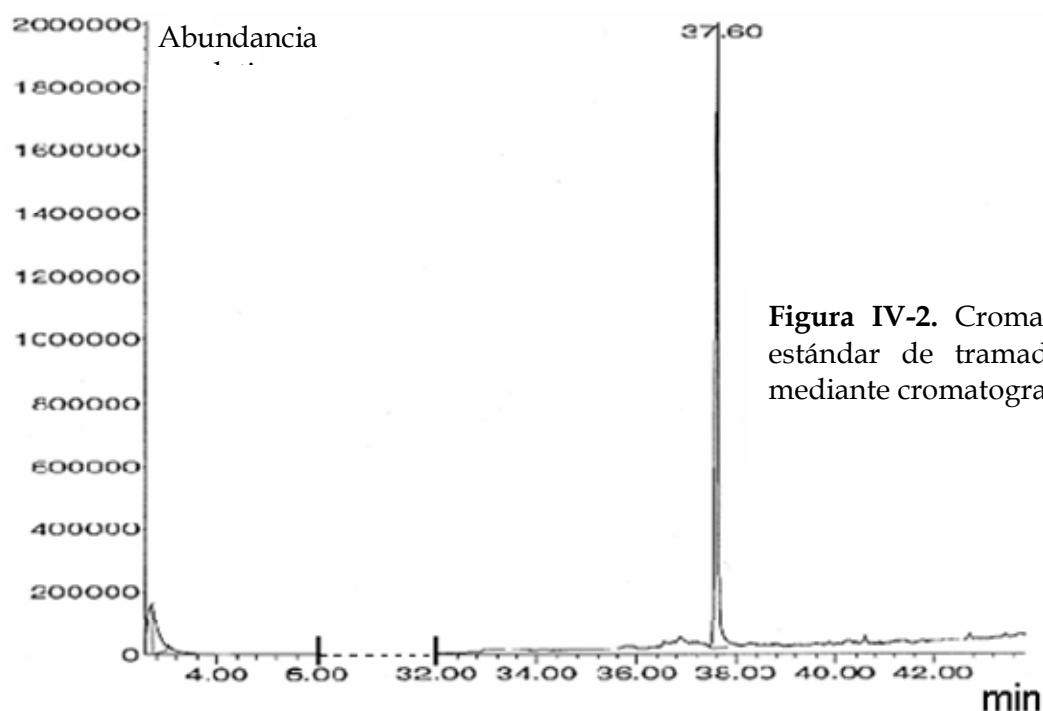
El pico del punto de fusión por DSC muestra que el estándar utilizado tiene una buena pureza ya que el pico es estrecho y libre de cabeceo o coleo. La temperatura a la cual se registra el punto de fusión no coincide exactamente con el reportado en la literatura, además el fenómeno se presenta en un intervalo de temperaturas superior a los 2 °C; esto se debe a que la rampa de calentamiento es demasiado elevada. Al disminuir la velocidad de calentamiento se obtendrán picos mas estrechos y la temperatura del punto de fusión disminuirá ajustándose a los valores reportados en la literatura.



**Figura IV-1.** Termogramas: Termogravimetría diferencial (DTG), análisis térmico diferencial (DTA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los picos alrededor de los 270 °C representan la ebullición del tramadol, los cercanos a 180 °C su punto de fusión.

#### IV-1.1.2 Espectrometría de masas

El cromatograma de la figura IV-2, por la forma del pico que presenta, descarta la posibilidad de que los picos observados en los termogramas alrededor de los 270 °C se deban a una descomposición del principio activo. En el anexo 5 se encuentra el espectro de masas del tramadol y las fragmentaciones generales de la molécula que explican algunos de los picos de mayor relevancia del espectro de masas. Se comprobó mediante el ión molecular que el peso molecular del tramadol corresponde al reportado en la literatura.



**Figura IV-2.** Cromatograma del estándar de tramadol obtenido mediante cromatografía de gases.

### IV-1.2 Optimización del método

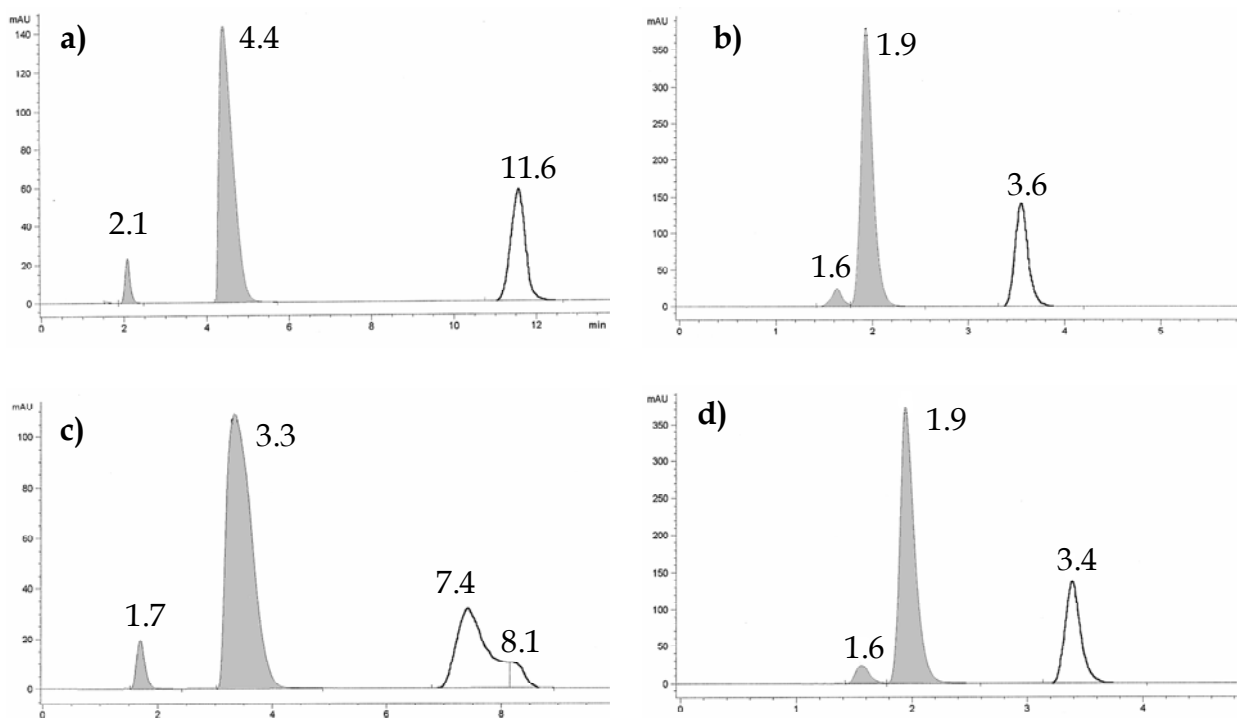
En la tabla IV-1 se muestran los valores de pH y porcentaje de agua utilizados en los distintos experimentos.

Factores	(-)	(+)	promedio
pH	2.53	3.5	3.015
FM (% agua)	45	65	55

**Tabla IV-1.** Valores experimentales de los factores utilizados en el diseño factorial.

La figura IV-3 muestra los cromatogramas obtenidos en cada uno de los tratamientos. La tabla IV-2 contiene los valores de los parámetros cromatográficos para dichos tratamientos. Los parámetros cromatográficos se calcularon con los datos del pico más cercano al principio activo. En el cromatograma "c" de la figura IV-3, el

pico del compuesto mas retenido sugiere que el compuesto presenta propiedades ácido-base, por las cuales éste compuesto tiende a separarse como si se tratase de dos compuestos diferentes cuando se mantiene el pH a 3.5; este efecto ocurre a pH 2.5 (cromatograma "a") en donde se observó que el tiempo de retención de los compuestos incrementa considerablemente.



**Figura IV-3.** Cromatogramas obtenidos en los experimentos del diseño factorial. La muestra empleada corresponde a la solución oral. Se muestran los tiempos de retención de cada pico. Los picos oscuros indican que fueron empleados para el cálculo de los parámetros cromatográficos. El pico mas alto corresponde al tramadol. a) pH 2.53, 65 % de H<sub>2</sub>O; b) pH 2.53, 45 % de H<sub>2</sub>O; c) pH 3.50, 65 % de H<sub>2</sub>O; d) pH 3.50 y 45 % de H<sub>2</sub>O.

Con los datos de eficiencia y resolución de la tabla IV-2 se calcularon las ecuaciones que describen su comportamiento en función del pH y el porcentaje de agua. Los datos para el cálculo de los coeficientes de la ecuación se encuentran en las tablas IV-4 y IV-5.

to (min)	tr <sub>1</sub> (min)	tr <sub>2</sub> (min)	W <sub>1/2</sub> (min)	K' 1	K' 2	α	N	Rs	
1.5	2.1	4.4	0.353	0.40	1.96	4.92	869.7	3.9	pH 2.53 65 % agua
1.5	2.1	4.4	0.351	0.39	1.95	4.94	868.4	3.9	
1.5	2.1	4.4	0.354	0.40	1.95	4.94	859.9	3.9	
1.5	2.1	4.4	0.352	0.40	1.96	4.93	865.9	3.9	Promedio
1.5	1.6	1.9	0.128	0.09	0.29	3.11	1246.3	1.3	pH 2.53, 45 % agua
1.5	1.6	1.9	0.128	0.09	0.29	3.12	1243.7	1.3	
1.5	1.6	1.9	0.128	0.09	0.29	3.08	1248.9	1.3	
1.5	1.6	1.9	0.128	0.09	0.29	3.10	1246.3	1.3	Promedio
1.5	1.7	3.2	0.447	0.12	1.2	9.7	291.3	2.1	pH 3.50, 65 % agua
1.5	1.6	3.3	0.498	0.11	1.2	11.6	248.6	2.0	
1.5	1.7	3.4	0.477	0.15	1.3	8.7	283.5	2.1	
1.5	1.7	3.3	0.474	0.13	1.2	9.9	273.4	2.1	Promedio
1.5	1.6	1.9	0.1299	0.05	0.30	6.31	1241.9	1.7	pH 3.50, 45 % agua
1.5	1.6	1.9	0.1297	0.05	0.30	6.44	1241.9	1.7	
1.5	1.6	1.9	0.1329	0.05	0.30	6.29	1185.2	1.7	
1.5	1.6	1.9	0.1308	0.05	0.30	6.35	1222.5	1.7	Promedio

Tabla IV-2. Valores de parámetros cromatográficos de los tratamientos del diseño factorial. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Para todos los casos el subíndice (2) refiere al valor del pico del tramadol. La eficiencia se calculó para el tramadol. La resolución se calculó con los dos primeros picos (picos oscuros de la figura IV-3).

Tratamientos	pH	FM	(pH)(FM)	N
1	-	-	+	1246.3
2	+	-	-	1222.5
3	-	+	-	865.9
4	+	+	+	273.4
Suma +	1496.0	1139.4	1519.8	
Suma -	2112.3	2468.9	2088.5	
Contraste	-616.3	-1329.5	-568.7	
Efecto	-308.2	-664.7	-284.4	
Coefficiente	-154.1	-332.4	-142.2	
Suma total	3608.2			
bo	902.1			

Tabla IV-3. Valores obtenidos por el método de los contrastes para el cálculo de los coeficientes de la ecuación que describe la eficiencia en función del pH y % de H<sub>2</sub>O de la fase móvil. FM: porcentaje de H<sub>2</sub>O.



Tratamientos	pH	FM	(pH)(FM)	Rs
1	-	-	+	1.3
2	+	-	-	1.7
3	-	+	-	3.9
4	+	+	+	2.1
<b>Suma +</b>	3.8	5.9	3.4	
<b>Suma -</b>	5.2	3.1	5.6	
<b>Contraste</b>	-1.5	2.9	-2.2	
<b>Efecto</b>	-0.7	1.4	-1.1	
<b>Coefficiente</b>	<b>-0.365</b>	<b>0.718</b>	<b>-0.550</b>	
<b>Suma total</b>	9.0			
<b>bo</b>	<b>2.25</b>			

Tabla IV-4. Valores obtenidos por el método de los contrastes para el cálculo de los coeficientes de la ecuación que describe la resolución en función del pH y % de H<sub>2</sub>O de la fase móvil. FM: porcentaje de H<sub>2</sub>O.

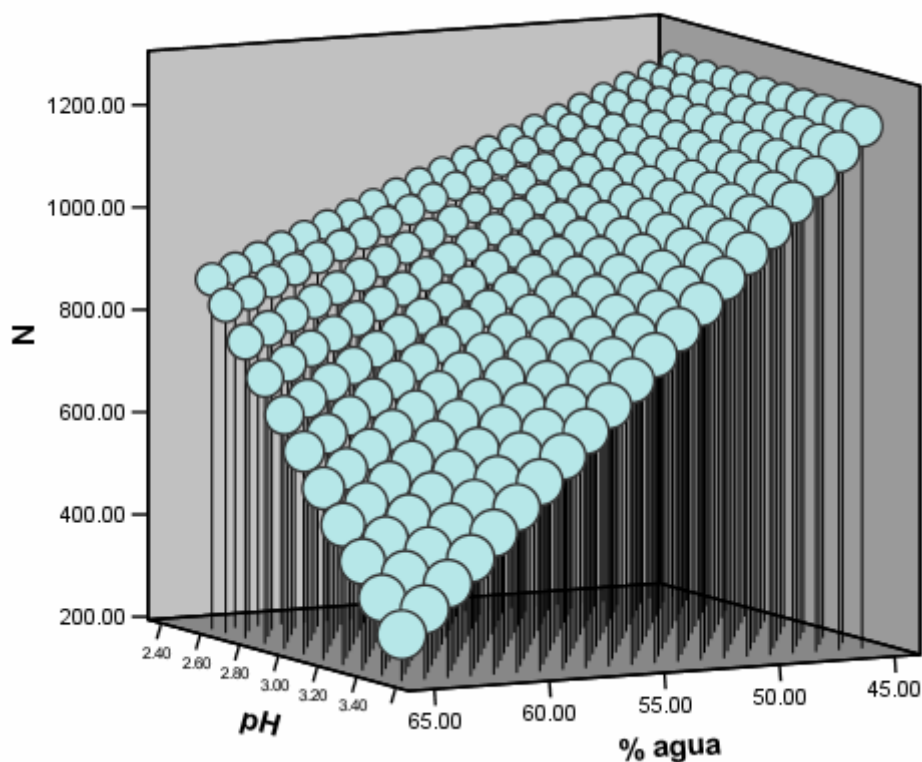
Las ecuaciones IV-1 y IV-2 tienen las variables codificadas. Las ecuaciones IV-3 y IV-4 se encuentran en función de las variables naturales. Las figuras IV-4 y IV-5 muestran las gráficas generadas por cada una de las ecuaciones.

$$N = 902.1 - 154.1 \cdot (pH^*) - 322.4 \cdot (\% H_2O^*) - 142.2 \cdot [(pH^*) \cdot (\% H_2O^*)] \quad (IV-1)$$

$$Rs = 2.25 - 0.365 \cdot (pH^*) + 0.718 \cdot (\% H_2O^*) - 0.55 \cdot [(pH^*) \cdot (\% H_2O^*)] \quad (IV-2)$$

$$N = 3633.3 - 317.7 \cdot (pH) - 32.2 \cdot (\% H_2O) - 142.2 \cdot \left[ \left( \frac{pH - 3.015}{0.485} \right) \cdot \left( \frac{\% H_2O - 55}{10} \right) \right] \quad (IV-3)$$

$$Rs = 0.57 - 0.75 \cdot (pH) + 0.072 \cdot (\% H_2O) - 0.55 \cdot \left[ \left( \frac{pH - 3.015}{0.485} \right) \cdot \left( \frac{\% H_2O - 55}{10} \right) \right] \quad (IV-4)$$



**Figura IV-4.** Gráfica de la eficiencia de separación del tramadol en función del pH y % de H<sub>2</sub>O de la fase móvil.

Las tablas IV-5 y IV-6 contienen el análisis de varianza para los factores.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F <sub>0</sub>
Ph	94956.4	1	94956.4	10177.5
% de H <sub>2</sub> O	441892.6	1	441892.6	47362.6
(pH)(% H <sub>2</sub> O)	80854.9	1	80854.9	8666.1
Error	74.7	8	9.3	
Total	617778.6	11		

**Tabla IV-5.** Cuadro ANOVA para el estudio de efecto del pH, % de H<sub>2</sub>O y su interacción sobre la eficiencia cromatográfica del método.

Planteamiento de las hipótesis de prueba:

*pH*

**H<sub>0</sub>:** El efecto del pH sobre la eficiencia es cero.

**Ha:** El efecto del pH sobre la eficiencia es diferente de cero.

*% H<sub>2</sub>O*

**Ho:** El efecto del % de H<sub>2</sub>O sobre la eficiencia es cero.

**Ha:** El efecto del % de H<sub>2</sub>O sobre la eficiencia es diferente de cero.

*Interacción entre el pH y % de H<sub>2</sub>O*

**Ho:** El efecto de la interacción del pH y el % H<sub>2</sub>O sobre la eficiencia es cero.

**Ha:** El efecto de la interacción del pH y el % H<sub>2</sub>O sobre la eficiencia es diferente de cero.

Para todos los casos:

$$F_{8, 11 \alpha = 0.05} = 2.95$$

$$F_0 > 2.95$$

Por lo tanto se rechaza la hipótesis nula, y se concluye que el pH, el % de H<sub>2</sub>O y la interacción entre estos dos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la eficiencia de separación del tramadol. Éste efecto se observa claramente en la gráfica de la figura IV-4, en la cual la eficiencia varía considerablemente al modificarse los factores. El valor de pH se ajustó a 3.0 y el porcentaje de agua se mantuvo en 55 %; estos factores generan valores adecuados de eficiencia y resolución, además de un tiempo de análisis corto. No se ajustó el método para una menor resolución ya que éste corre el riesgo de no ser lo suficientemente robusto y a cierta variación no se resolverán adecuadamente los picos cromatográficos.

La optimización del método mediante un diseño factorial puede ser de utilidad en separaciones más complejas. Para fines de este método, la matriz a analizar es poco compleja por lo que su utilidad es principalmente descriptiva del comportamiento de los compuestos en función de las condiciones cromatográficas críticas. Puede ser utilizado para inferir algunas propiedades fisicoquímicas de los

compuestos, como por el ejemplo la presencia de propiedades ácido-base. Las propiedades ácido-base pueden cambiar significativamente la polaridad de una molécula y modificar su retención o producir un ensanchamiento de la banda cromatográfica; este efecto puede observarse entre los cromatogramas “b” y “d” de la figura IV-3, en donde a pesar de que los picos sombreados tienen los mismos tiempos de retención a un porcentaje de agua del 45 %, una variación en el pH produjo un ensanchamiento del pico del tramadol en el cromatograma “d” respecto al “b”. La tabla IV-6 muestra el análisis de varianza para los factores de estudio.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F <sub>0</sub>
pH	0.53	1	0.53	202.3
% de H <sub>2</sub> O	2.059	1	2.06	785.9
(pH)(% H <sub>2</sub> O)	1.21	1	1.21	461.8
Error	0.021	8	0.00262	
Total	3.82	11		

Tabla IV-6. Cuadro ANOVA para el estudio de efecto del pH, % de H<sub>2</sub>O, y su interacción sobre la resolución del método.

Las hipótesis de prueba generalizadas del análisis de varianza para observar el efecto de los factores sobre la resolución son:

**H<sub>0</sub>:** El efecto del pH, % de H<sub>2</sub>O y su interacción en la fase móvil sobre la resolución es cero.

**H<sub>a</sub>:** El efecto del pH, % de H<sub>2</sub>O y su interacción en la fase móvil sobre la resolución es diferente de cero.

Para los casos de estudio:

$$F_{8, 11, (0.05)} = 2.95$$

$$F_0 > 2.95$$

Por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se concluye que los factores de estudio y su interacción tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la resolución, lo que se puede apreciar en la gráfica de la figura IV-5.

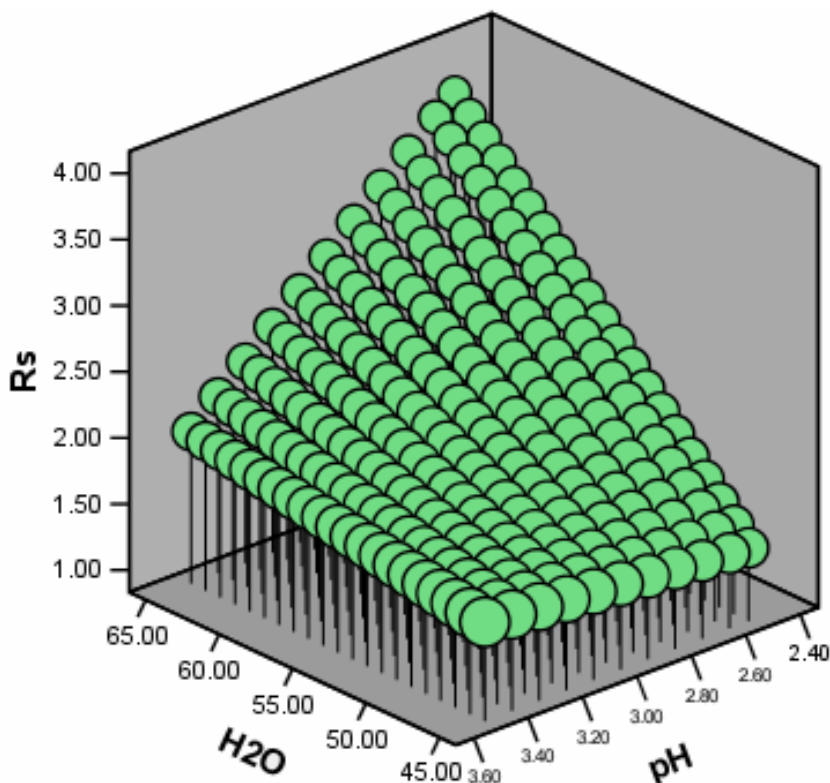


Figura IV-5.

Gráfica de la resolución de separación del tramadol en función del pH y % de H<sub>2</sub>O de la fase móvil.

Para evaluar la validez de los resultados y su ajuste al modelo, se analizaron los residuos de éstos. Los residuos se calculan a partir de la resta del valor obtenido experimentalmente menos el valor predicho (tabla IV-7) por la ecuación del modelo. Consecuentemente los residuos son divididos sobre su desviación estándar para obtener los valores estándar, éstos residuos son conocidos también como residuos de Pearson. Los residuos estandarizados se caracterizan por tener una media de cero y una desviación estándar de 1. La figura IV-6 presenta las gráficas de ajuste a una distribución normal y de los residuales contra los valores predichos por las ecuaciones del modelo, que describen la resolución y la eficiencia en función de los factores. Se puede observar que los residuos se ajustan a una distribución normal y se distribuyen de manera satisfactoria, teniendo una media de cero y una desviación

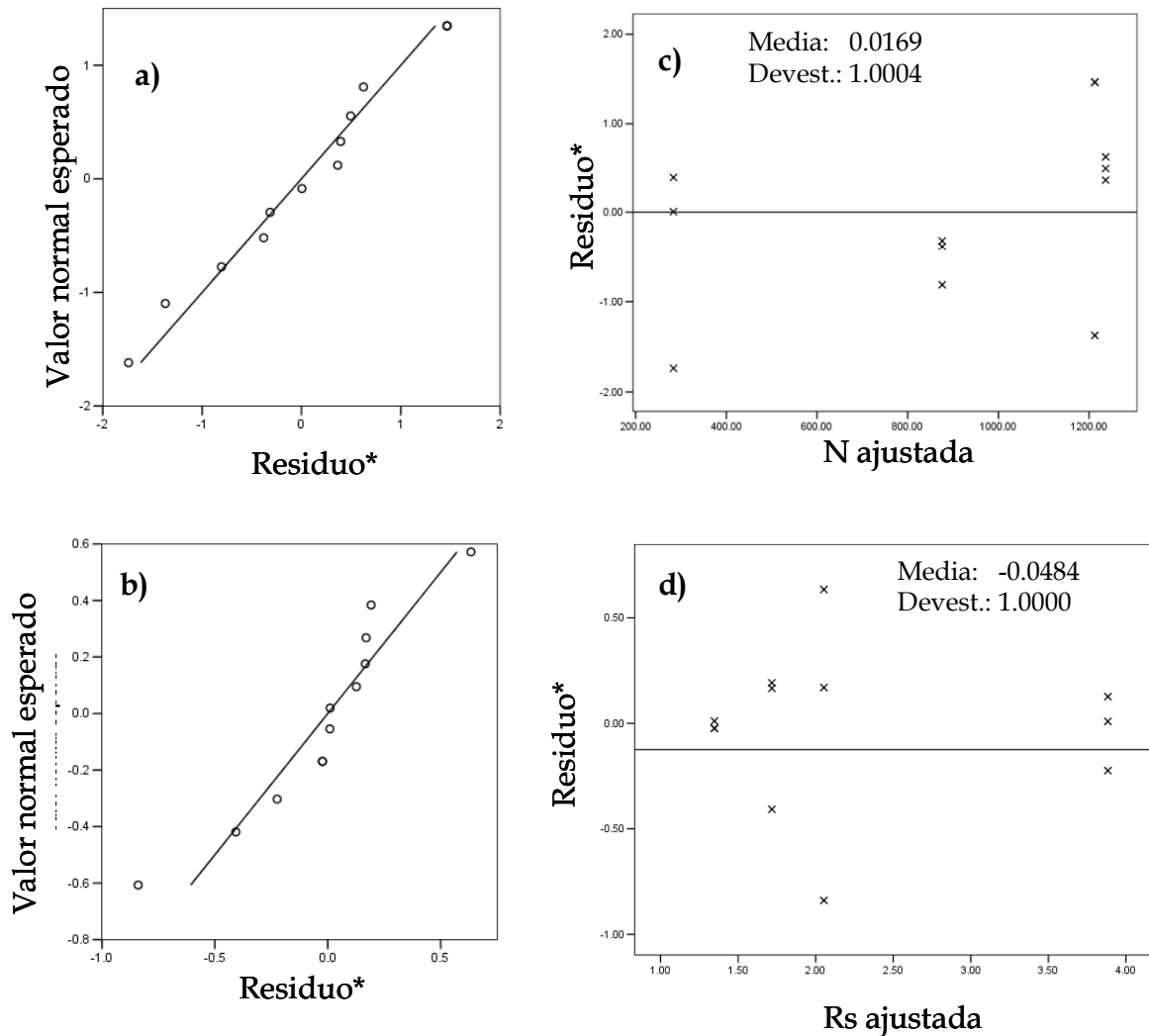
estándar de 1, por lo que no hay motivos para sospechar de la validez de los resultados.

Valor experimental		Valor ajustado		Residuos		Residuos estandarizados	
N	Rs	N	Rs	N	Rs	N	Rs
869.7	1.3455	876.0	1.3472	-6.3	-0.00172	-0.3152	-0.0236
868.4	1.3479	876.0	1.3472	-7.6	0.00077	-0.3802	0.0106
859.9	1.3455	876.0	1.3472	-16.1	-0.00172	-0.8052	-0.0236
1246.3	3.8924	1236.4	3.8832	9.9	0.00919	0.4948	0.1266
1243.7	3.8838	1236.4	3.8832	7.3	0.00067	0.3648	0.0093
1248.9	3.8669	1236.4	3.8832	12.5	-0.01627	0.6248	-0.2240
291.3	1.7312	283.4	1.7173	7.9	0.01394	0.3948	0.1919
248.6	1.7293	283.4	1.7173	-34.8	0.01207	-1.7403	0.1662
283.5	1.6877	283.4	1.7173	0.1	-0.02957	0.0048	-0.4071
1241.9	2.0656	1212.6	2.0533	29.3	0.01233	1.4648	0.1697
1241.9	1.9923	1212.6	2.0533	29.3	-0.06098	1.4648	-0.8395
1185.2	2.0993	1212.6	2.0533	-27.4	0.04606	-1.3703	0.6341

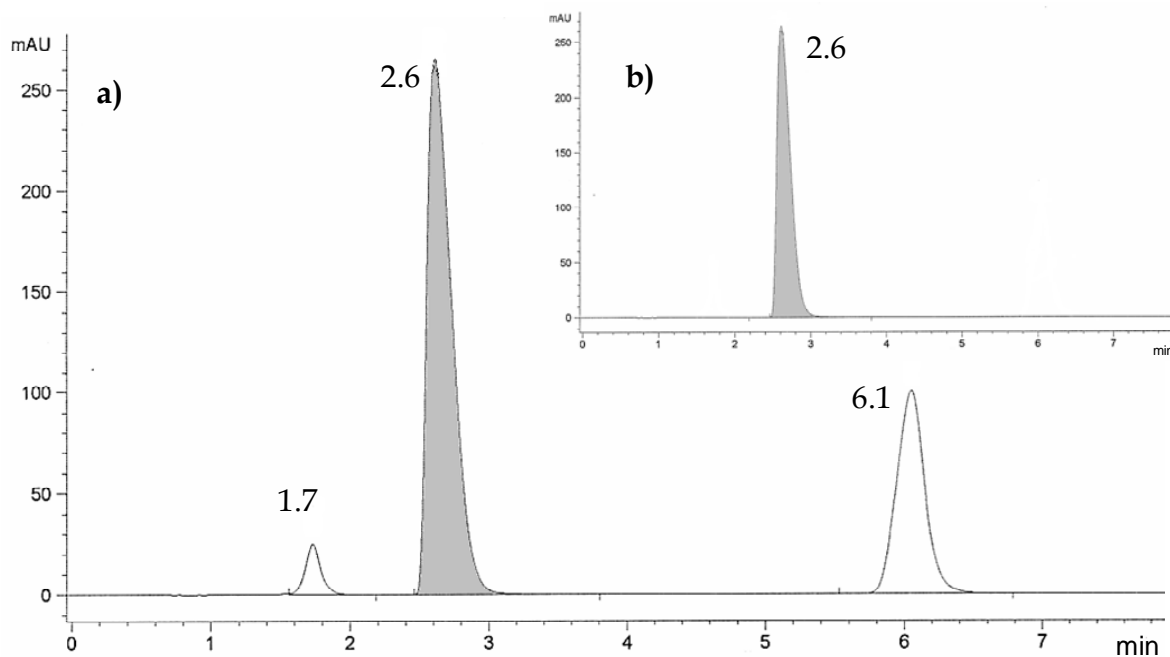
**Tabla IV-7.** Residuos de los experimentos de los diseños factoriales de estudio de la resolución y eficiencia. Los residuos estandarizados se generan a partir de la división de los residuos sobre su desviación estándar.

La figura IV-7 presenta los cromatogramas obtenidos con los parámetros ajustados del método. El cromatograma "a" se genera a partir de la muestra de solución oral, mientras que el cromatograma "b" corresponde a las demás muestras (cápsulas, tabletas y solución inyectable) y estándar de referencia.

Para estas últimas formas farmacéuticas, cabe la posibilidad de que su análisis se lleve a cabo por espectrofotometría UV, la cual, es una técnica más accesible, económica y sencilla de manejar.



**Figura IV-6.** Gráficas de los residuales para los experimentos del diseño factorial. a) y b) gráficas de probabilidad de ajuste de los residuales del modelo para la eficiencia y la resolución respectivamente. Se grafican los cuantiles de los datos de prueba contra los cuantiles de una distribución normal. c) y d) gráficas de los residuales contra los valores de eficiencia y resolución ajustados por el modelo. Se distribuyen adecuadamente con una media de cero y desviación estándar de 1. \*Residuos estandarizados.



**Figura IV-7.** Cromatogramas representativo de las muestras de tramadol por el método desarrollado. a) cromatograma de la solución oral. b) cromatograma representativo de las cápsulas, tabletas, solución inyectable y estándar de referencia. Encima de los picos se muestra el tiempo de retención. Los picos oscuros son los del tramadol.

La tabla IV-8 contiene los valores de los parámetros cromatográficos del método. Los parámetros son de utilidad en caso de pruebas de identificación, detección de variaciones en las condiciones cromatográficas y para evaluar el estado del sistema cromatográfico. El pico no es simétrico, presenta un ligero coleo en todos los tipos de muestras, debido a una baja eficiencia de la columna por su uso.

$t_r'$ (min)	w 1/2 (min)	$\alpha$	$k'$	N	Rs	Factor de simetría
1.1	0.193	5.5	0.73	1007.2	2.78	0.405

**Tabla IV-8.** Parámetros cromatográficos del método. Se calcularon a partir de la muestra de solución oral de tramadol.



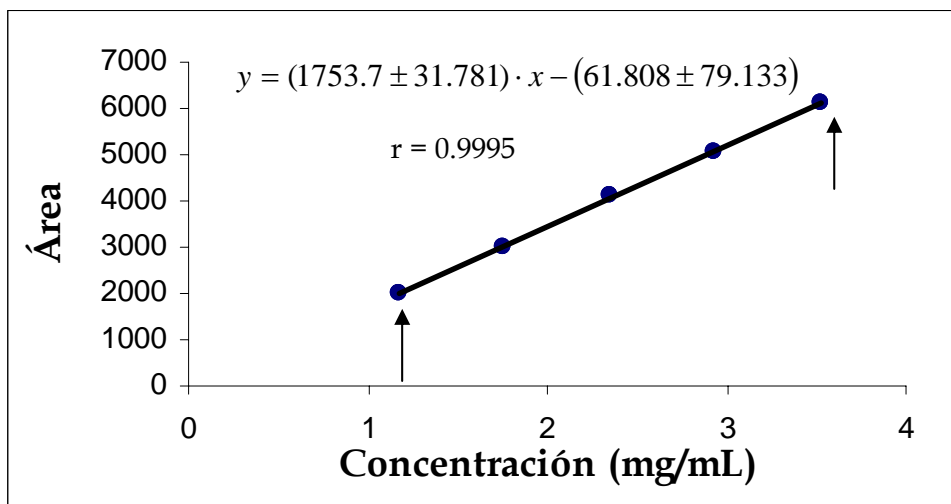
### IV-1.3 Evaluación del método

#### IV-1.3.1 Linealidad

Se preparó una curva de calibración con concentraciones de tramadol de 3.5 a 1.7 mg/ mL. La figura IV-8 muestra la recta de regresión obtenida junto con su ecuación. El análisis de varianza (tabla IV-10) muestra que existe una correlación significativa. El valor tabulado de  $F_{13,14, 0.05} = 2.507$  es menor a  $F_0$ , por lo que se rechaza la hipótesis nula que establece que no hay una relación lineal entre la concentración y el área.

Concentración (mg/mL)	Área	Residual	Residual de Pearson		
1.174	1994.8	-2.2	-0.047	<b>A</b>	<b>b</b>
1.174	1999.9	2.9	0.061	-61.808	1753.7
1.174	1994.9	-2.1	-0.045	<b>R</b>	
1.761	2994.4	-32.1	-0.678	0.9995	
1.761	2984.4	-42.1	-0.889	<b>S<sub>y/x</sub></b>	<b>S<sub>b</sub></b>
1.761	2992.9	-33.6	-0.709	47.297	14.711
2.348	4135.0	79.1	1.673	<b>S<sub>a</sub></b>	
2.348	4138.2	82.3	1.741	36.367	
2.348	4129.3	73.4	1.553	<b>IC(b)</b>	<b>IC(a)</b>
2.935	5037.8	-47.5	-1.004	31.781	79.133
2.935	5041.3	-44.0	-0.930	<b>S<sub>xy</sub></b>	<b>S<sub>yy</sub></b>
2.935	5035.9	-49.4	-1.044	18128.0	31820030.2
3.522	6120.8	6.1	0.129		
3.522	6117.7	3.0	0.063		
3.522	6120.7	6.0	0.127		

Tabla IV-9. Datos de la regresión lineal. Se muestran los residuales, valores de los coeficientes de las ecuaciones de la recta y sus intervalos de confianza.



**Figura IV-8.** Curva de calibración para el tramadol. Las flechas indican las concentraciones que se emplearon para evaluar la precisión.

**IV-1.3.1.1** Análisis de varianza

Planteamiento de las hipótesis:

**H<sub>0</sub>:** no hay una relación lineal entre la concentración y el área.

**H<sub>a</sub>:** Existe una relación lineal entre el la concentración y el área.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F <sub>0</sub>
<b>Regresión</b>	31790960.2	1	31790960.2	14210.8
<b>Residual</b>	29082.2	13	2237.1	
<b>Total</b>	31820042.4	14		

**Tabla IV-10.** Cuadro ANOVA, para probar una relación lineal entre la concentración de tramadol y el área de pico cromatográfico.

$$F_{13, 14 (0.05)} = 2.057; \quad F_0 > 2.95;$$

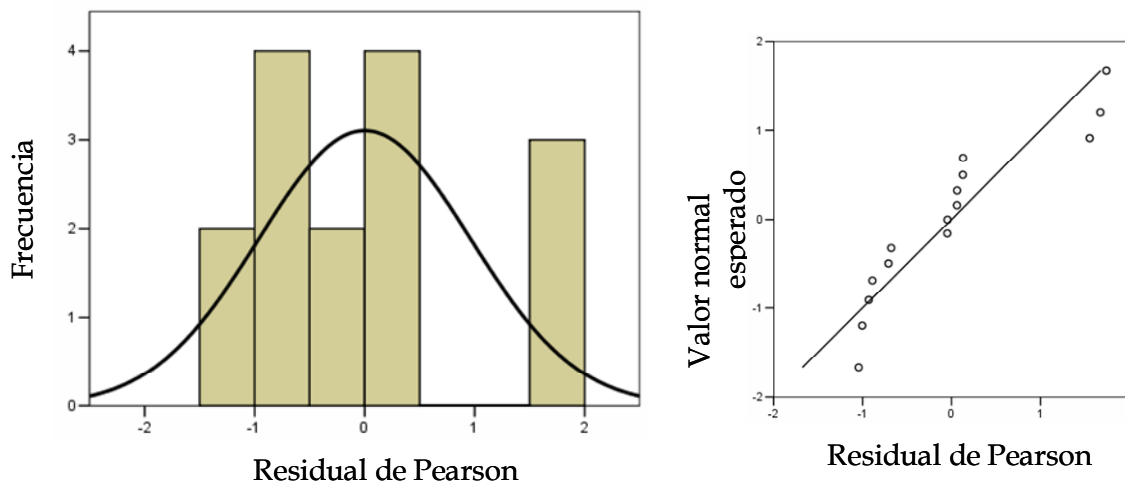
por lo tanto se rechaza H<sub>0</sub>.

IV-1.3.1.2 Análisis de los residuos

	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
Residuo	-49.4	82.3	0.0	45.6
Residuo de Pearson	-1.044	1.741	0.000	0.964

Tabla IV-11. Análisis de los residuos de regresión lineal.

La tabla IV-11 presenta el análisis de los residuos de regresión lineal. Se puede observar que los residuos de Pearson muestran un comportamiento que denota un ajuste al modelo. Los datos siguen una distribución normal como se puede observar en el histograma y en el gráfico de probabilidad normal de la figura IV-9. Se observa que los datos no se ajustan perfectamente a la distribución; sin embargo los datos no muestran una gran dispersión y se distribuyen en ambos lados de la recta. Para mejorar el ajuste es conveniente incrementar el número de datos.



**Figura IV-9.** Gráficas de los residuales. *Izquierda*, histograma con la curva de distribución normal. *Derecha*, gráfico de probabilidad de ajuste a distribución normal, obtenida a partir de los de los cuantiles de la distribución normal y los datos de prueba.

IV-1.3.2 *Precisión*

Las concentraciones de los extremos de la curva de calibración fueron analizadas para determinar su precisión. La finalidad de esta evaluación radica en comprobar si trabajando en los límites alto y bajo de la capacidad de la micropipeta se obtienen resultados consistentes. Varias guías de validación establecen que la precisión debe de evaluarse a tres distintas concentraciones. Sin embargo, la mayoría de las ocasiones suele ser innecesario realizar ese tipo de análisis ya que contando con una precisión adecuada en los extremos de la curva y teniendo una adecuada linealidad, se espera una precisión apropiada en el resto de los puntos dentro de la curva de calibración.

En la tabla IV-12 se muestran las desviaciones estándar relativas (DR) de los datos; en ambos puntos se obtiene una precisión aceptable, tomado como criterio una DR menor al 2 %. A pesar de que se trabajo con el mismo material, hay una diferencia entre las DR de las series de datos, siendo mayor para los de menor concentración. Entre mas bajos valores de concentración se trabajen, se tiene una mayor variabilidad de los datos debida a errores aleatorios.

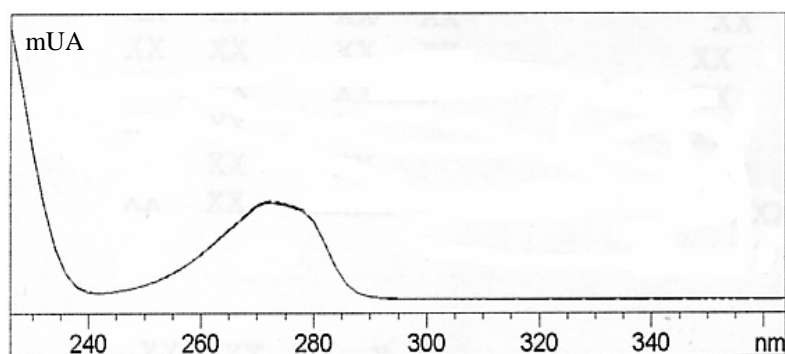
	<b>A</b>	<b>B</b>
	1.1727	3.5254
	1.1757	3.5237
	1.1727	3.5254
	1.1727	3.5255
	1.1727	3.5255
	1.1727	3.5255
	1.1727	3.5255
	1.1727	3.5255
	1.1727	3.5255
<b>Promedio</b>	1.1730	3.5253
<b>Desvest.</b>	0.0009905	0.0005805
<b>DR</b>	0.084	0.016

**Tabla IV-12.**

Datos para evaluación de la precisión. Las concentraciones se obtuvieron a partir de la curva de de calibración. Ambas desviaciones estándar relativas (DR) muestran valores aceptables. (A) Concentración en el nivel bajo y (B) con concentración en el nivel alto de la curva de calibración.

### IV-1.3.3 Especificidad

El análisis de pureza de pico de todas las muestras fue satisfactorio (figura IV-10). Una de las impurezas del tramadol (ciclohexanona) carece de grupos cromóforos. Las otras cuatro impurezas asociadas al tramadol son detectables, entre las cuales se pueden encontrar al isómero óptico del tramadol e de isómeros geométricos de la impureza que contiene un grupo ciclohexeno. El tramadol es detectado como una mezcla racémica, sin embargo, los estudios revelan que hay una importante diferencia de actividad y metabolismo entre los enantiómeros; y para poder separar dicha mezcla, es necesario utilizar columnas con grupos quirales.



**Figura IV-10.** Análisis de pureza del pico del tramadol. Se superponen un total de nueve espectros de absorción de diferentes zonas del pico cromatográfico. Todas las muestras presentan un análisis satisfactorio.

### IV-1.3.4 Exactitud

Los datos y evaluación del porcentaje de recobro se muestran en las tablas IV-13 y IV-14. Adicionalmente se incluye un análisis de contenido de tramadol. El porcentaje de recobro para ambos casos es satisfactorio; para el caso de las tabletas el intervalo de confianza incluye el 100 % y para el de las cápsulas se tiene un recobro del  $98.0 \pm 0.3$  %. Para disminuir la dispersión entre los datos de recobro en las tabletas se puede incrementar el número de muestras, sin embargo, los resultados de recobro permanecerán en un rango aceptable. La dispersión se debe al recubrimiento de la tableta, el cual no llega a molerse hasta obtener una adecuada homogeneidad, por lo

que en cada pesada existirá una pequeña variación; sin embargo, para los fines del análisis carece de importancia.

	Rec A	Rec B	Rec C+	Rec D+		
<b>Pesos de muestras</b>	0.2274 g	0.155 g	0.0712 g	0.0992 g		
Muestra	Área	Conc. (mg/mL)	Factor de dilución	mg/muestra	mg/tableta	mg tramadol / g de muestra
Rec A	3431.7	1.9921	25	49.8025	40.4925	220.0633
	3433.7	1.9932		49.8300	40.5148	
	3437.5	1.9954		49.8850	40.5595	
Rec B	2334.8	1.3666		34.1650	40.7533	
	2345.1	1.3725		34.3125	40.9293	
	2342.0	1.3707		34.2675	40.8756	
					mg recuperados	% de recobro
Rec C+	1636.3	0.9683		24.2075	8.5390	105.3
	1650.0	0.9761		24.4025	8.7340	107.7
	1641.2	0.9711		24.2775	8.6090	106.2
Rec D+	2009.8	1.1813		29.5325	7.7022	95.0
	2010.5	1.1817		29.5425	7.7122	95.1
	2012.8	1.1830	29.5750	7.7447	95.5	
Peso promedio de tabletas	Cantidad adicionada	Media mg/cápsula	Desvest.	IC (mg)	DR	
0.18489	8.1065 mg	40.7	0.1910	0.2	0.5	
Media recobros (%)	Desvest.	IC (%)	$t_{(n-1), 0.05}$			
100.8	6.1830	6.5	2.57			

**Tabla IV-13.** Determinación del porcentaje de recobro en las muestras de tabletas. Se incluye el peso promedio de 10 tabletas, así como el análisis de su contenido. El porcentaje de recobro es aceptable. Las muestras con el símbolo (+) son las adicionadas. Tabletás del lote 1.

A continuación se muestra el algoritmo de cálculo para el porcentaje de recobro, el cual es el mismo para las tabletas y las cápsulas.

En la parte superior de la tabla IV-13 se muestran los pesos de las muestras. Las muestras adicionadas son aproximadamente el 50 % del peso promedio de una tableta. Primero se calculan los mg de tramadol sobre gramo de triturado, del área del pico se obtiene la concentración de la solución analizada. Posteriormente se multiplica por el factor de dilución para conocer los mg de tramadol en la muestra y finalmente se dividen sobre el peso de la muestra para conocer la cantidad de tramadol por gramo de muestra. Por ejemplo para "Rec A" se tiene:

$$1.9921 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \cdot [25] = 49.8025 \frac{\text{mg de tramadol}}{0.2284 \text{g (peso de muestra)}} = 219.0084 \frac{\text{mg de tramadol}}{\text{g de triturado}}$$

El promedio de todas las determinaciones se muestra en la tabla. Partiendo de ese dato se calculan los miligramos de tramadol por tableta multiplicando el último dato por el peso promedio:

$$219.0084 \frac{\text{mg de tramadol}}{\text{g de triturado}} \cdot 0.18489 \text{g (peso promedio tabletas)} = 40.4925 \text{ mg de tramadol / tableta}$$

Se preparó una solución de estándar de tramadol a una concentración de 8.1065 mg/mL, de la cual se fortificó una alícuota de un mililitro a las muestras designadas (contienen el símbolo +). Después de determinar la concentración y multiplicar por el factor de dilución se resta la cantidad de tramadol correspondiente al peso de la muestra; los miligramos restantes corresponden a los adicionados.

Por ejemplo para "Rec C+" se tiene:

$$0.9683 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \cdot [25] = 24.2075 \text{ mg de tramadol en la muestra ;}$$

$$0.0712 \text{g de muestra} \cdot \left[ \frac{220.0633 \text{mg de tramadol}}{\text{g de muestra}} \right] = 15.6685 \text{ mg de tramadol en la muestra}$$

$$24.2075 \text{ mg} - 15.6685 \text{ mg} = 8.539 \text{ mg de tramadol recuperados}$$

$$\% \text{ de recobro} = \frac{\text{mg recuperados}}{\text{mg adicionados}} \cdot 100 = \frac{8.539\text{mg}}{8.1065\text{mg}} \cdot 100 = 105.3\%$$

		Rec A	Rec B	Rec C+	Rec D+		
<b>Pesos de muestras</b>		0.1293 g	0.1143 g	0.0582 g	0.0626 g		
Muestra	Área	Conc. (mg/mL)	Factor de dilución	mg/muestra	mg/cápsula	mg tramadol /g de muestra	
Rec A	3632.9	2.1068	25	52.6705	44.9227	407.8253	
	3630.4	2.1054		52.6350	44.8924		
	3629.7	2.1050		52.6250	44.8839		
Rec B	3214.3	1.8681		46.7025	45.0599		
	3209.0	1.8651		46.6275	44.9876		
	3217.4	1.8699		46.7475	45.1034		
						<b>mg recuperados</b>	<b>% de recobro</b>
Rec C+	2160.2	1.2670		31.6760	7.9406	98.0	
	2158.9	1.2663		31.6575	7.9221	97.7	
	2163.1	1.2687		31.7175	7.9821	98.5	
Rec D+	2288.2	1.3400		33.5000	7.9701	98.3	
	2284.6	1.3380		33.4500	7.9201	97.7	
	2287.1	1.3394	33.4850	7.9551	98.1		
<b>Peso promedio de cápsulas</b>	<b>Cantidad adicionada</b>	<b>Media mg/cápsula</b>	<b>Desvest.</b>	<b>IC (mg)</b>	<b>DR</b>		
0.11028 g	8.1065 mg	45.0	0.0913	0.1	0.2		
<b>Media recobros (%)</b>	<b>Desvest.</b>	<b>IC (%)</b>	<b>t<sub>(n-1), 0.05</sub></b>				
98.0	0.3123	0.3	2.57				

**Tabla IV-14.** Determinación del porcentaje de recobro en las muestras de cápsulas. Se incluye el peso promedio de 10 cápsulas, así como el análisis de su contenido. El porcentaje de recobro es aceptable. Las muestras con el símbolo (+) son las adicionadas. Capsulas del lote 1.



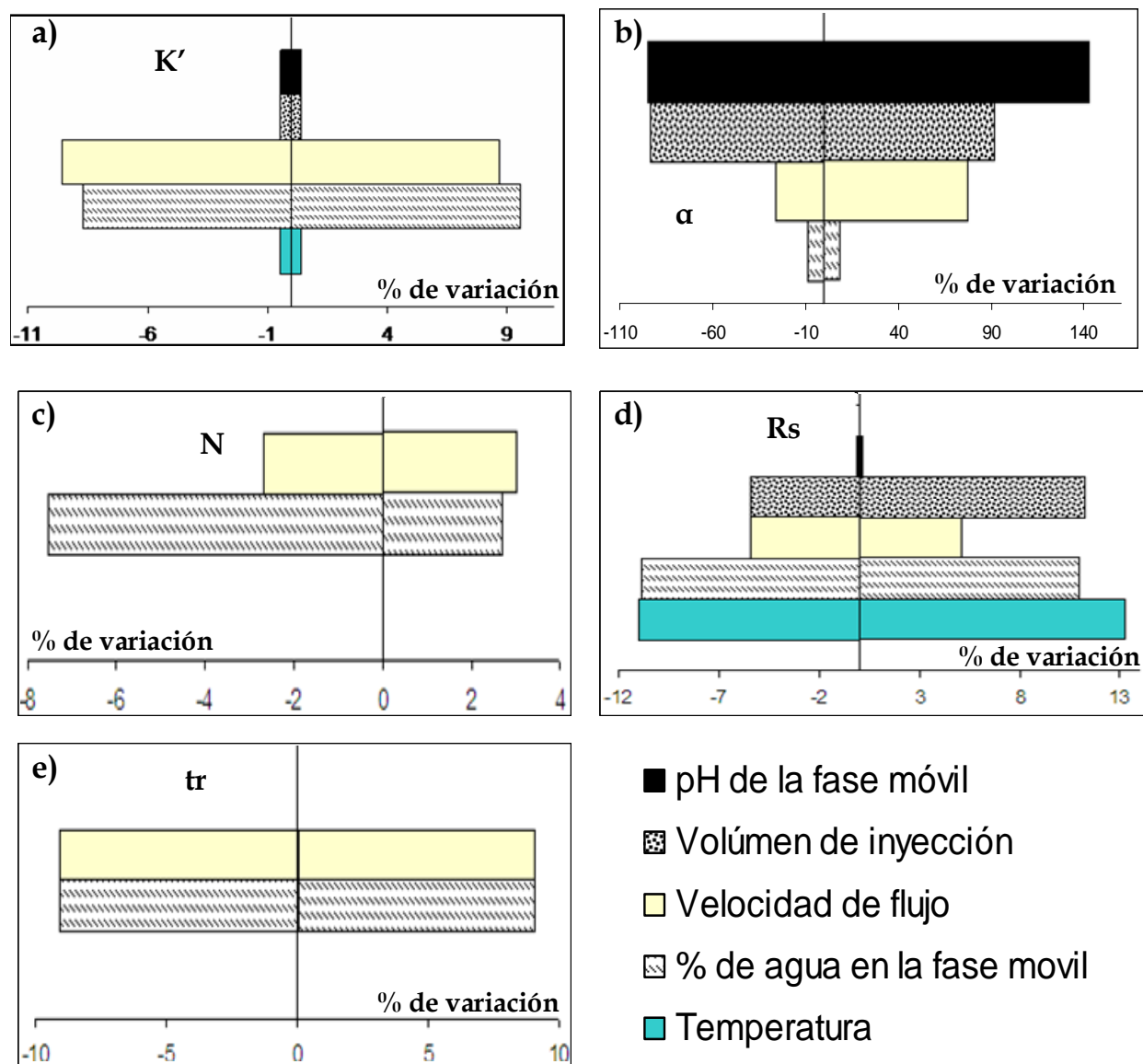
### IV-1.3.5 Robustez

Las variaciones realizadas a los parámetros se fueron en un intervalo de  $\pm 5\%$  respecto a las condiciones establecidas en el método. En el anexo 7 se presentan los valores de concentración determinados en cada variación así como las diferencias absolutas respecto a la concentración de referencia. El porcentaje de esta diferencia en ningún caso excede el 2%, por lo que se considera que el método es robusto para las variaciones establecidas.

En la figura IV-11 se encuentran las gráficas que representan el porcentaje de variación de cada parámetro cromatográfico respecto a las modificaciones realizadas a las condiciones cromatográficas. Los datos experimentales de estas gráficas se presentan en el anexo 7.

Variaciones significativas del factor de capacidad (gráfico "a") se producen modificando la velocidad de flujo y la composición de la fase móvil, siendo estos parámetros los que principalmente afectan el tiempo de retención (grafico "e") de los compuestos. Como el factor de capacidad es una medida de permanencia de los compuestos en la columna, cualquier variación sobre los tiempos de retención será significativa. Se esperaba que el pH de la fase móvil también presentase un efecto sobre el tiempo de retención del tramadol; sin embargo, con el porcentaje de agua en la fase móvil, estas variaciones carecen de importancia. Esto no sucede con el factor de selectividad (gráfico "b"), en el cual ocurre una modificación significativa debida a la variación en el tiempo de retención del primer pico usado en el cálculo de este parámetro. Puede notarse en el gráfico que el volumen de inyección tiene un notable efecto sobre la selectividad. La única posibilidad recae en la modificación del ancho de los picos por una variación en la cantidad de muestra inyectada, la cual puede producir una ligera variación en el tiempo de retención. Éste efecto se manifiesta sobre el tiempo de retención del primer compuesto, el cual es un pico pequeño y por lo tanto mas susceptible a las variaciones de cantidad de compuesto.

La eficiencia (gráfico "c") muestra una variación significativa con la velocidad de flujo y el porcentaje de agua. Estos factores producen variaciones sobre el tiempo de retención y el ancho de pico. Pudiéndose explicar el efecto de la velocidad de flujo mediante la ecuación de van Deemter.



**Figura IV-11.** Gráficos del porcentaje de variación de los parámetros cromatográficos frente a las variaciones en las condiciones cromatográficas. **a)** Variación del factor de capacidad ( $K'$ ); **b)** Variación del factor de selectividad ( $\alpha$ ); **c)** Variación de la eficiencia ( $N$ ); **d)** Variación de la resolución ( $R_s$ ); **e)** variación del tiempo de retención. Los efectos con signo negativo indican una variación realizada con la condición cromatográfica en su nivel bajo. Las variaciones porcentuales son absolutas. La muestra usada fue solución oral de tramadol.

Variaciones significativas del factor de capacidad (gráfico "a") se producen modificando la velocidad de flujo y la composición de la fase móvil, siendo estos parámetros los que principalmente afectan el tiempo de retención (gráfico "e") de los compuestos. Como el factor de capacidad es una medida de permanencia de los compuestos en la columna, cualquier variación sobre los tiempos de retención será significativa. Se esperaría que el pH de la fase móvil también presentase un efecto sobre el tiempo de retención del tramadol; sin embargo, con el porcentaje de agua en la fase móvil, estas variaciones carecen de importancia. Esto no sucede con el factor de selectividad (gráfico "b"), en el cual ocurre una modificación significativa debida a la variación en el tiempo de retención del primer pico usado en el cálculo de este parámetro. Puede notarse en el gráfico que el volumen de inyección tiene un notable efecto sobre la selectividad. La única posibilidad recae en la modificación del ancho de los picos por una variación en la cantidad de muestra inyectada, la cual puede producir una ligera variación en el tiempo de retención. Éste efecto se manifiesta sobre el tiempo de retención del primer compuesto, el cual es un pico pequeño y por lo tanto más susceptible a las variaciones de cantidad de compuesto.

La eficiencia (gráfico "c") muestra una variación significativa con la velocidad de flujo y el porcentaje de agua. Éstos factores producen variaciones sobre el tiempo de retención y el ancho de pico. Pudiéndose explicar el efecto de la velocidad de flujo mediante la ecuación de van Deemter.

Todas las condiciones cromatográficas producen un efecto sobre la resolución (gráfico "d"), debido a que la resolución es un parámetro que depende tanto de los tiempos de retención y anchura de los picos. A diferencia de otros parámetros que solo describen el comportamiento de un solo pico, este parámetro no solo involucra al pico principal, sino que se ve influenciado por los picos de los compuestos acompañantes.

En cuanto a la temperatura, no se observan efectos sobre las otras condiciones cromatográficas, no obstante, esto no quiere decir que no sucedan. La temperatura presenta una influencia en la viscosidad de los disolventes, con lo cual se puede

modificar el equilibrio de la separación; sin embargo, con una variación del  $\pm 5\%$  de ésta, los cambios no son significativos.

#### IV-1.3.6 Adecuabilidad del sistema

Los datos experimentales de la prueba se encuentran en el anexo 8. Se determinó mediante una prueba de t (anexo 4) si las medias de las dos determinaciones son iguales después de dos meses de diferencia entre los análisis para la misma muestra. Los resultados muestran que no hay diferencia significativa entre las medias de las dos determinaciones, lo cual es indicativo que el sistema cromatográfico se adecua a las condiciones de análisis del método.

#### IV-1.4 Análisis de muestras

La tabla IV-16 muestra el análisis de 5 tabletas por triplicado. La cantidad de principio activo no cumple con las especificaciones. Las farmacopeas establecen que la concentración de principio activo para las formas farmacéuticas de tramadol deben de encontrarse dentro de un rango de  $\pm 10\%$  respecto a la concentración reportada en el marbete, lo que incluye para las tabletas un intervalo que va desde los 45 a 55 mg de tramadol. En la tabla IV-13 se reporta la cantidad de tramadol por tableta; esas tabletas fueron analizadas a partir de un homogenizado de varias tabletas y pertenecen a un lote distinto al de la tabla IV-16. En ninguno de los dos lotes se obtuvo un análisis satisfactorio.

Tableta	1	2	3	4	5
mg de tramadol / tableta	42.3	39.3	41.3	43.0	42.9
	42.4	39.4	41.1	42.8	42.7
	42.4	39.4	41.2	42.8	42.8
Promedio	Desvest.	IC	DR	$t_{(n-1), 0.05, n = 15}$	
41.7	1.376	0.8	3.3	2.145	

Tabla IV-16. Resultados del análisis de tabletas de tramadol del lote 2 fabricadas por un laboratorio secundario. Tabletás del Lote 2

Las cantidad de tramadol en las cápsulas del lote 1 (tabla IV-14) y del lote 2 (tabla IV-17) se encuentran dentro de especificaciones. La diferencia entre las desviaciones estándar relativas de los lotes se debe a que en el lote 1 se analizó a partir una mezcla homogénea de tabletas.

Tableta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Contenido (mg/ cápsula)	44.2	44.1	47.8	46.9	44.0	45.5	48.5	45.7	46.2	47.3
	45.1	43.1	46.9	46.8	43.9	45.5	47.6	47.1	46.2	47.2
	44.1	47.8	46.7	43.9	45.6	47.4	45.3	46.2	47.3	47.2
Promedio	Desvest.	IC	DR	$t_{(n-1), 0.05, n = 30}$						
46.0	1.460	0.6	3.2	2.045						

Tabla IV-17. Resultados del análisis de cápsulas de tramadol del lote 2.

La solución oral contiene una concentración de tramadol dentro del rango de 90 a 110 mg/mL en ambos lotes (tabla IV-18), por lo que la prueba es satisfactoria. En el lote 2 se sospechó de un dato anómalo, por lo que se sometió a una prueba de contraste de Grubbs (anexo 4).

$$G = \frac{101.0 - 97.2}{1.608} = 2.363 ; G_{9(0.05)} = 2.215$$

Como  $G > G_{9(0.05)}$  se rechaza el dato.

LOTE 1				LOTE 2			
mg de tramadol/ ampolleta	94.7	94.9	95.0	mg de tramadol/ ampolleta	101.0	95.7	96.8
	94.8	93.3	95.4		97.3	97.6	95.7
	94.6	93.1	93.5		96.2	97.6	96.8
Promedio	Desvest.	IC	$t_{(n-1)}$ $\alpha=0.05$ $n = 9$	Promedio	Desvest.	IC	$t_{(n-1)}$ $\alpha=0.05$ $n = 8$
94.4	0.833	0.6	2.31	96.7	0.781	0.7	2.36
DR		0.88		DR		0.81	

Tabla IV-18. Resultados de análisis de la solución oral de tramadol fabricada por el laboratorio innovador. El dato sombreado se rechaza mediante el contraste de Grubbs.

La solución inyectable se encuentra dentro de especificaciones en cuanto a la cantidad de tramadol (tabla IV- 19). El lote2 tiene un dato anómalo que fue rechazado mediante el contraste de Grubbs.

$$G = \frac{88.7 - 95.3}{2.562} = 2.576 ; G_{9(0.05)} = 2.215$$

Como  $G > G_{9(0.05)}$  se rechaza el dato.

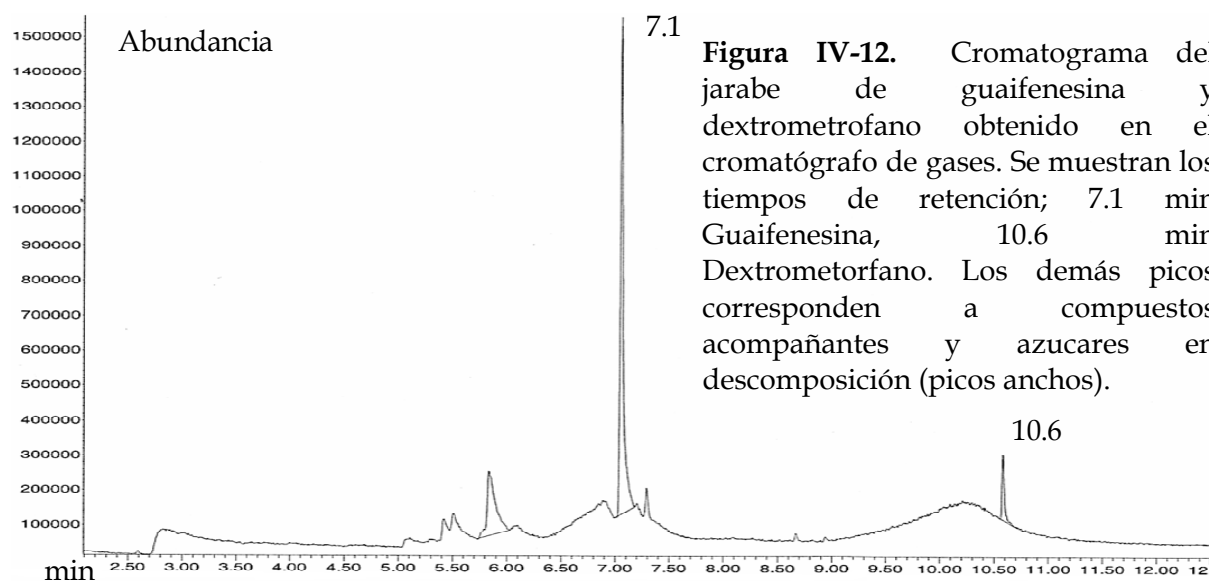
LOTE 1				LOTE 2			
mg de tramadol/ ampolleta	93.0	89.9	96.5	mg de tramadol/ ampolleta	96.0	95.7	95.6
	92.7	90.5	96.4		96.1	95.6	97.3
	92.5	90.2	96.5		95.5	97.3	88.7
Promedio	Desvest.	IC	$t_{(n-1)}$ $\alpha=0.05$ $n = 9$	Promedio	Desvest.	IC	$t_{(n-1)}$ $\alpha=0.05$ $n = 8$
93.1	2.736	2.1	2.31	96.1	0.749	0.6	2.31
DR		2.94		DR		0.78	

Tabla IV-19. Resultados de análisis de la solución inyectable de tramadol fabricadas por un laboratorio secundario. El dato sombreado se rechaza mediante el contraste de Grubbs.

## IV-2. Guaifenesina

### IV-2.1 Prueba de identidad

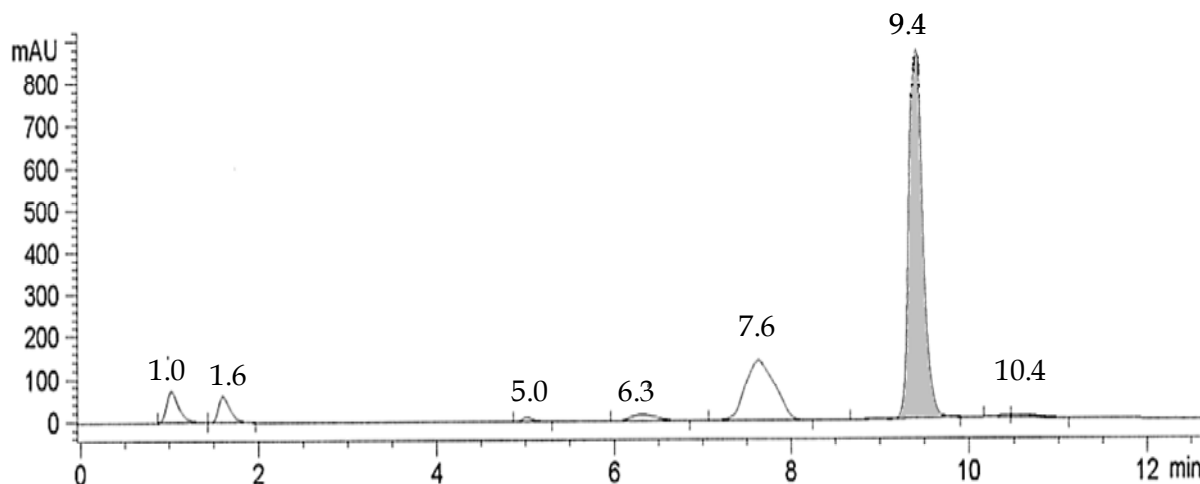
Se comprobó la identidad de la guaifenesina en el jarabe y estándar de referencia. La figura IV-12 presenta el cromatograma de la muestra de jarabe obtenido por el cromatógrafo de gases. El espectro de masas y patrón de fragmentación de la guaifenesina se encuentran en el anexo 6. Se identificó también al dextrometorfano; sin embargo, solo se le realizó un análisis cualitativo por no disponer de un estándar.



### IV-2.2 Desarrollo del método

El método desarrollado involucró una elución por gradiente con el objetivo de reducir el tiempo de análisis. Implementando de esta técnica se redujo el tiempo de

20 minutos a aproximadamente 11. En la figura IV-13 se muestra el cromatograma obtenido por HPLC para las muestras de jarabe.



**Figura IV-13.** Cromatograma del jarabe de guifenesina obtenido por HPLC. El pico relleno corresponde a la guaifenesina. El pico en 10.4 minutos corresponde al dextrometorfano.

Las fase móvil comienza con una elevada composición de agua a pH 4.0 (83 %) para poder resolver los picos de 1.0 y 1.6 minutos, los cuales se juntan al utilizar agua a un pH mayor. Posteriormente es necesario utilizar agua a un pH mayor, ya que si se continúa la elución con la de pH 4.0 los compuestos con tiempos de retención 5.9, 6.3 y 7.6 se juntan en un solo pico coleado, el cual disminuía considerablemente la resolución del pico de la guaifenesina. La elevada composición inicial de agua favorece la elución de los azúcares presentes en el jarabe. Estos azúcares a pesar de que no pueden ser detectados por el equipo manifiestan sus efectos produciendo un ensanchamiento de los picos por saturación de los grupos activos de la columna, lo que puede notarse en los picos que eluyen antes que la guaifenesina.

Los picos de 5.0, 6.3 y 10.4 minutos no llegan a apreciarse en el cromatograma debido a la escala utilizada. Por ejemplo, en el jarabe, la guaifenesina se encuentra en una concentración de 15 mg/mL y el dextrometorfano a 1 mg/mL, aparte, la



longitud de onda de detección de 285 nm no es óptima para la detección de este compuesto por lo que disminuye aun mas el nivel de su respuesta en el detector.

La tabla IV-20 contiene los parámetros cromatográficos del pico de la guaifenesina en el método desarrollado, la resolución se calculó respecto al pico del dextrometorfano.

<b>tr'</b> <b>(min)</b>	<b>W<sub>1/2</sub></b> <b>(min)</b>	<b>K'</b>	<b>α</b>	<b>N</b>	<b>Rs</b>
8.5	0.19	9.4	1.1	14212.5	2.6

**Tabla IV-20.** Parámetros cromatográficos para el pico de la guaifenesina. La resolución se calculó respecto al pico del dextrometorfano.

### IV-2.3 Evaluación de parámetros de validación

#### IV-2.3.1 Linealidad

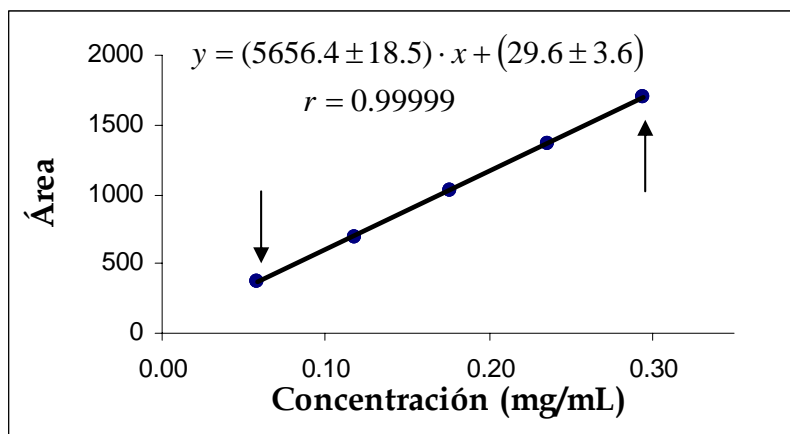
Se prepararon dos curvas de calibración; una con el estándar nacional y otra con el de importación. Consecuentemente se evaluaron las respuestas de ambos estándares para comparar su calidad.

La tabla IV-21 muestra los datos de regresión lineal del estándar nacional. Las tablas IV-22 y IV-23 contienen el análisis de varianza y el análisis de los residuales respectivamente. Finalmente en la figura IV-15 se muestra el histograma de frecuencias para los residuales y el gráfico de probabilidad normal.

Regresión lineal con el estándar COSUFAR

Concentración (mg/mL)	Área	Residual	Residual de Pearson		
0.2945	1695.3	-0.11	-0.039	<b>a</b>	<b>b</b>
0.2945	1694.8	-0.61	-0.220	29.607	5656.4
0.2945	1697.4	1.99	0.723	<b>r</b>	
0.2356	1362.4	0.15	0.056	0.99999	
0.2356	1362.4	0.15	0.056	<b>Sy/x</b>	<b>Sb</b>
0.2356	1362.6	0.35	0.128	2.759	8.552
0.1767	1030.7	1.61	0.585	<b>Sa</b>	
0.1767	1030.7	1.61	0.585	1.671	
0.1767	1029.2	0.11	0.041	<b>IC(b)</b>	<b>IC(a)</b>
0.1178	691.7	-4.23	-1.532	18.475	3.609
0.1178	691.1	-4.83	-1.749	<b>Sxy</b>	<b>Syy</b>
0.1178	691.2	-4.73	-1.713	588.7	3329966.5
0.0589	364.7	1.93	0.701		
0.0589	365.6	2.83	1.027		
0.0589	366.5	3.73	1.353		

**Tabla IV-21.** Datos de la regresión lineal. Se muestran los residuales, valores de los coeficientes de las ecuaciones de la recta y sus intervalos de confianza. Estándar usado: COSUFAR.



**Figura IV-14.**

Curva de calibración para la guafenesina del estándar nacional.

Las flechas indican las concentraciones que se emplearon para evaluar la precisión.

Estándar usado: COSUFAR.

Análisis de varianza

Planteamiento de las hipótesis:

**H<sub>0</sub>:** no hay una relación lineal entre la concentración y el área.

**H<sub>a</sub>:** Existe una relación lineal entre la concentración y el área.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F <sub>0</sub>
Regresión	3329867.6	1	3329867.6	437479.2
Residual	98.9	13	7.6	
Total	3329966.5	14		

F<sub>13,</sub>

14

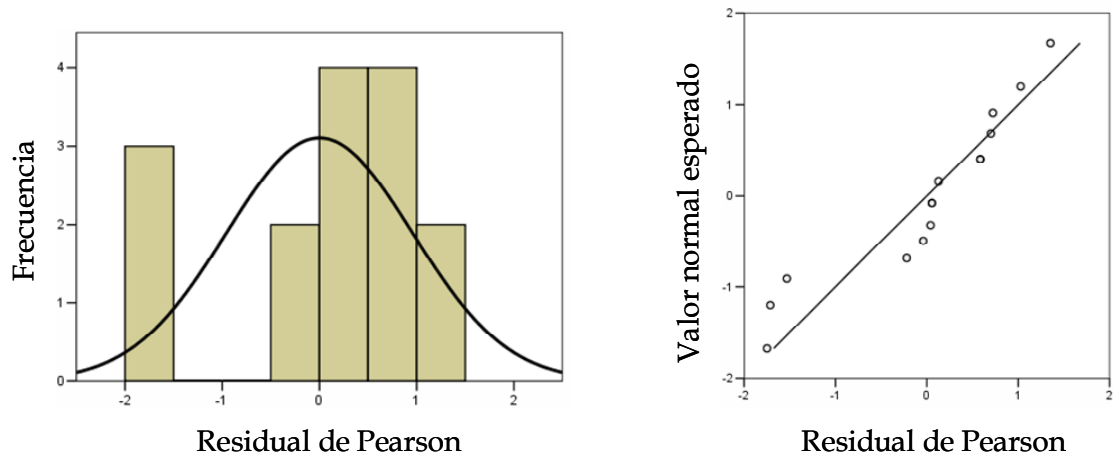
**Tabla IV-22.** Cuadro ANOVA, para probar una relación lineal entre la concentración de guañesina y el área de pico cromatográfico. Estándar usado: COSUFAR.  $F_{(0.05)} = 2.057$ ;  $F_0 > 2.95$ ; por lo tanto se rechaza H<sub>0</sub>.

Análisis de los residuos

	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
Residuo	-4.8	3.7	0.0	2.7
Residuo de Pearson	-1.749	1.353	0.000	0.964

**Tabla IV-23.** Análisis de los residuos de regresión lineal. Estándar usado: COSUFAR.

Los residuos se ajustan a una distribución normal como puede observarse en el histograma y gráfico de distribución normal, indicando un buen ajuste al modelo y validez de los datos experimentales.



**Figura IV-15.** Gráficas de los residuales. Izquierda, histograma con la curva de distribución normal. Derecha gráfica de probabilidad de ajuste a distribución normal, obtenida a partir de los de los cuantiles de la distribución normal y los datos de prueba. Estándar usado: COSUFAR.

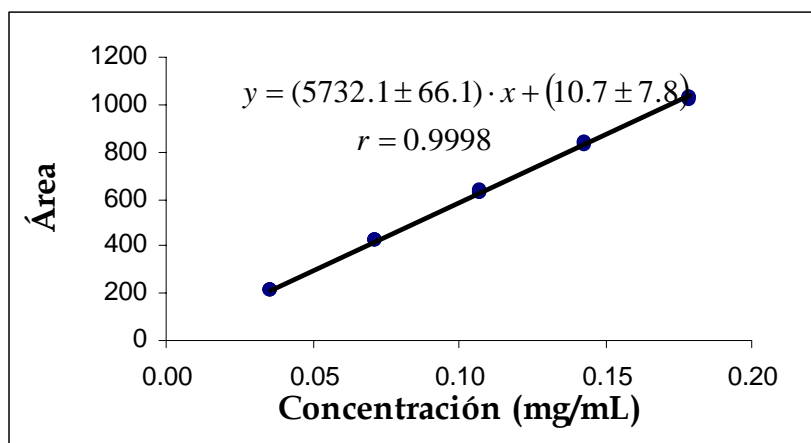
Regresión lineal con el estándar USP

Al igual que el nacional los datos son adecuados. El análisis de residuales muestra que pertenecen a una distribución normal lo cual confirma la validez de los resultados.

Concentración (mg/mL)	Área	Residual	Residual de Pearson		
0.1787	1033.1	-1.81	-0.301	<b>a</b>	<b>b</b>
0.1787	1021.3	-13.61	-2.270	10.57280421	5732.1
0.1787	1032.1	-2.81	-0.468	<b>r</b>	
0.1430	841.9	11.63	1.940	0.99981	
0.1430	831.4	1.13	0.189	<b>Sy/x</b>	<b>Sb</b>

0.1430	836.3	6.03	1.006	5.994	30.614
0.1072	623.0	-2.06	-0.343	<b>Sa</b>	
0.1072	632.6	7.54	1.258	3.629	
0.1072	628.3	3.24	0.541	<b>IC(b)</b>	<b>IC(a)</b>
0.0715	419.2	-1.22	-0.204	66.136	7.84
0.0715	420.7	0.28	0.047	<b>Sxy</b>	<b>Syy</b>
0.0715	420.4	-0.02	-0.004	219.8	1260177.7
0.0357	211.4	-3.81	-0.636		
0.0357	213.0	-2.21	-0.369		
0.0357	212.9	-2.31	-0.385		

**Tabla IV-24.** Datos de la regresión lineal. Se muestran los residuales, valores de los coeficientes de las ecuaciones de la recta y sus intervalos de confianza. Estándar usado: USP.



**Figura IV-16.** Curva de calibración para la guaifenesina. Estándar usado: USP.

### Análisis de varianza

Planteamiento de las hipótesis:

**H<sub>0</sub>:** no hay una relación lineal entre la concentración y el área.

**H<sub>a</sub>:** Existe una relación lineal entre la concentración y el área.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F <sub>0</sub>
Regresión	1259817.7	1	1259817.7	35059.5
Residual	467.1	13	35.9	
Total	1260284.8	14		

**Tabla IV-25.** Cuadro ANOVA, para probar una relación lineal entre la concentración de guaifenesina y el área de pico cromatográfico. Estándar usado: USP.

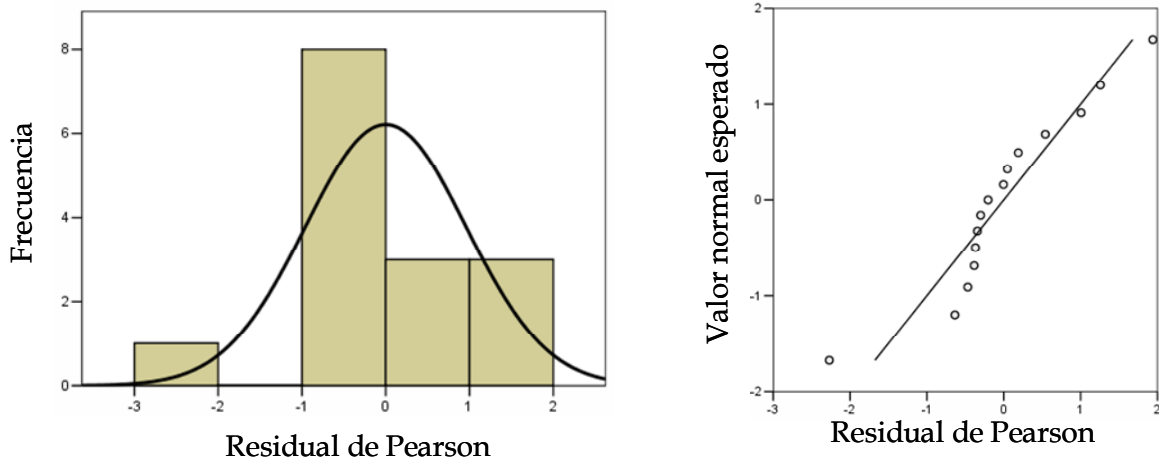
$$F_{13, 14 (0.05)} = 2.057; \quad F_0 > 2.95;$$

por lo tanto se rechaza H<sub>0</sub>.

*Análisis de los residuos*

	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
Residuo	-13.6	11.6	0.0	5.8
Residuo de Pearson	-2.270	1.940	0.000	0.964

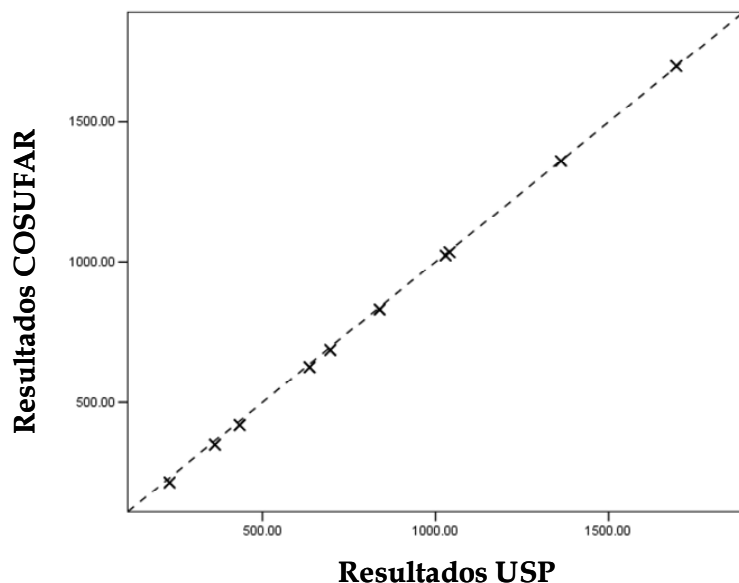
**Tabla IV-26.** Análisis de los residuos de regresión de lineal. Estándar usado: USP.



**Figura IV-7.** Gráficas de los residuales. Izquierda, histograma con la curva de distribución normal. Derecha gráfico de probabilidad de ajuste a distribución normal, obtenida a partir de los de los cuantiles de la distribución normal y los datos de prueba. Estándar usado: USP

#### IV-2.3.2 Comparación de estándares

Las series de concentración de ambos estándares fueron usadas como variables independientes por cada una de las ecuaciones de regresión lineal. Se obtuvieron un total de 30 valores de área por ecuación. Posteriormente se evaluó la correlación entre los resultados generados por cada una de las ecuaciones. En la figura IV-18 se puede observar que los resultados generados por las ecuaciones tienen una excelente correlación, lo que indica que ambos estándares son de buena calidad. El coeficiente de correlación es superior a 0.9999.



**Figura IV-18.** Comparación de los resultados generados por dos estándares de guaifenesina. Estándares evaluados: USP y COSUFAR.

**IV-2.3.3 Precisión**

	<b>A</b>	<b>B</b>
	0.0610	0.2959
	0.0609	0.2959
	0.0610	0.2960
	0.0590	0.2933
	0.0589	0.2932
	0.0587	0.2934
	0.0596	0.2921
	0.0595	0.2930
	0.0593	0.2933
<b>Promedio</b>	0.0598	0.2940
<b>Desvest.</b>	0.00096	0.00149
<b>DR</b>	1.61	0.51

**Tabla IV-27.**

Datos para evaluación de la precisión. Las concentraciones se obtuvieron a partir de la curva de calibración. Ambas desviaciones estándar relativas (DR) muestran valores aceptables. (A) Concentración baja y (B) concentración alta de la curva de calibración.

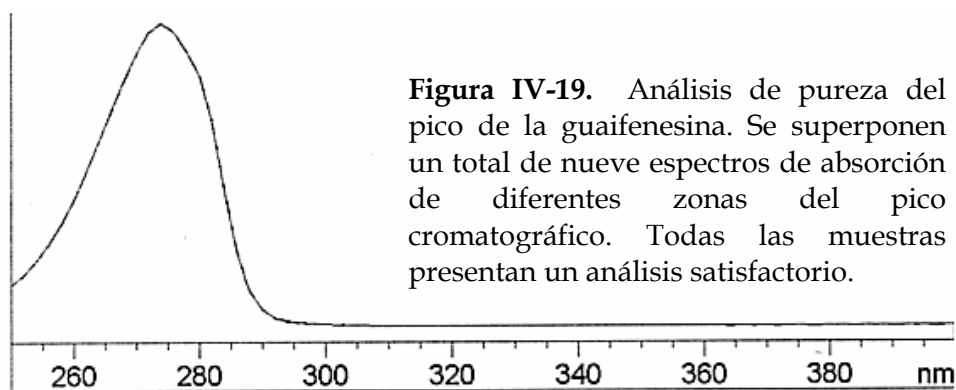
Los resultados de la tabla IV-27 muestran una precisión adecuada; ninguna de las DR supera el 2 %. Una DR mayor en el nivel bajo de concentración respecto a la otra concentración es esperada.

**IV-2.3.4 Especificidad**



La degradación ácida produjo un desplazamiento del tiempo de retención de los compuestos con tiempos de retención 5.0, 6.3 y 7.6 (Fig. IV-13), lo que modificó la resolución de pico de guaifenesina, aun así el pico se separa adecuadamente.

La degradación básica mostró un aumento en la cantidad de picos, pero ninguno modificó la resolución de la guaifenesina. Por otro lado, la degradación con peróxido de hidrógeno solo incremento el área del pico de 1.0 min. La degradación con calor no produjo modificaciones detectables. En todos los casos el análisis de pureza de pico mostró resultados satisfactorios (Fig. IV-19).



**Figura IV-19.** Análisis de pureza del pico de la guaifenesina. Se superponen un total de nueve espectros de absorción de diferentes zonas del pico cromatográfico. Todas las muestras presentan un análisis satisfactorio.

#### IV-2.3.5 Exactitud

Como puede observarse en la tabla IV-28, los porcentajes de recobro son adecuados. Los resultados podrían ser superiores incrementando las concentraciones de trabajo; sin embargo, esto implicaría un gasto mayor en estándares. Los resultados muestran además una excelente consistencia.

	mg/ mL	mg/ muestra	mg/ g de muestra	
--	--------	----------------	---------------------	--

J1	0.1584	15.84	13.5	<b>Media</b>	
	0.1553	15.53	13.2	13.2	
	0.1550	15.50	13.2	<b>desvest.</b>	
J2	0.1549	15.49	13.2	0.11	
	0.1547	15.47	13.2	<b>DR</b>	
	0.1544	15.44	13.1	0.87	
J3	0.1545	15.45	13.1	<b>IC</b>	
	0.1545	15.45	13.1	0.088	
	0.1544	15.44	13.1		
			<b>mg recuperados</b>	<b>% de recobro</b>	<b>Media recobros</b>
R1	0.1590	15.90	8.17	96.3	96.8
	0.1598	15.98	8.25	97.3	<b>desvest.</b>
	0.1591	15.91	8.17	96.4	0.47
R2	0.1599	15.99	8.23	97.1	<b>DR</b>
	0.1600	16.00	8.24	97.2	0.48
	0.1600	16.00	8.24	97.2	<b>IC</b>
R3*	0.1342	13.42	5.70	96.7	0.4
	0.1339	13.39	5.66	96.1	<b>t(n-1),</b>
	0.1340	13.40	5.67	96.3	<b>0.05</b>
			<b>Cantidad adicionada</b>		
			8.48 mg	5.89 mg*	

Tabla IV-28. Determinación del porcentaje de recobro en las muestras de jarabe.

\* Se utilizó otra solución para recobro. J1, J2 y J3 son las muestras sin adicionar, mientras que R1, R2, y R3 son las adicionadas. El factor de

El ejemplo de algoritmo de cálculo para la obtención de los miligramos de guaifenesina por gramo de jarabe para "J1" se presenta a continuación:

$$0.1584 \frac{mg}{mL} \cdot 100 = \frac{15.84mg}{1.1751 mg \text{ de jarabe}} = 13.5mg \text{ de guaifene sin a} / g \text{ de jarabe}$$

La concentración de la solución inyectada en el equipo se obtuvo a partir de la curva de calibración del estándar COSUFAR. Ésta concentración se multiplico por el factor de dilución y luego se dividió sobre el peso de la alícuota de jarabe.

A la cantidad de guaifenesina de la muestra fortificada se le resto la cantidad de guaifenesina equivalente a la cantidad de la alícuota de jarabe, consecuentemente el resultado se dividió sobre la cantidad añadida y multiplico por 100 para obtener el porcentaje de recobro. El ejemplo para la muestra "R1" se describe a continuación:

$$0.5864 \text{ g de jarabe} \cdot \left( \frac{13.2 \text{ mg de guaifene sin a}}{\text{g de jarabe}} \right) = 7.74 \text{ mg de guaifene sin a}$$

$$0.1590 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \cdot 100 = 15.9 \text{ mg} - 7.74 \text{ mg} = 8.17 \text{ mg de guaifene sin a recuperados}$$

$$\frac{8.17}{8.48} \cdot 100 = 96.3 \%$$

	Peso de la muestra (mg)
J1	1175.1
J2	1176.6
J3	1176.8
R1	586.4
R2	588.0
R3	585.6

**Tabla IV-29.**  
Pesos de las alícuotas de jarabe para el análisis del porcentaje de recobro.

#### IV-2.3.6 Estabilidad analítica de la muestra

La tabla IV-30 Contiene los resultados del análisis de la muestra. El porcentaje de la diferencia absoluta entre las concentraciones no excede un 2.0 %, lo que, indica que la muestra preparada puede permanecer un mes en las condiciones mencionadas sin

una variación significativa en la concentración de guaifenesina. Los resultados se presentan de manera lógica, disminuyendo la concentración de principio activo después de 1 mes de almacenamiento, las desviaciones estándar relativas en ambos casos son menores al 0.4 %.

Concentración (mg / 100 mL)		
Inicial	1 mes de almacenamiento	
1548.3	1514.2	
1553.5	1518.4	
1550.5	1515.3	
1549.4	1514.2	
1547.4	1526.4	
1544.4	1523.6	
1544.8		
1544.8		
1543.8		
1547.4	1518.7	<b>Media</b>
28.7		<b>  di  </b>
1.86		<b>%</b>

Tabla IV-30.

Resultados del análisis para estabilidad analítica de la muestra.

#### IV-2.3.7 Robustez

La tabla IV-31 muestra los resultados de la evaluación de la robustez. El método es robusto para una variación del  $\pm 5\%$  en la composición de agua ya que en ningún caso se excede un porcentaje de la diferencia absoluta del 2.0 % respecto a la referencia. Únicamente se evaluó el efecto de la fase móvil por ser el principal factor crítico que modifica los parámetros del método.

	Concentración (mg / 100 mL)		
	Referencia	A	B
	1503.2	1508.7	1535.7
	1505.4	1502.1	1527.9

Tabla IV-31.

Resultados de la evaluación de la robustez. (A): variación de + 5% en la composición de agua en la fase móvil. (B): variación de -5% en la composición de la fase móvil.

	1507.9	1507.9	1532.0
	1517.3		
	1510.2		
	1511.8		
<b>Media</b>	1509.3	1506.2	1531.9
<b>  di  </b>		3.1	25.6
<b>%</b>		0.2	1.7

#### IV-2.4 Análisis de muestras

<b>Concentración (mg / 100 mL)</b>				
<b>Lote 1</b>	<b>Lote 2</b>	<b>Media</b>	1509.3	1518.7
1503.2	1514.2	<b>Desvest.</b>	5.0	5.2
1505.4	1518.4	<b>DR</b>	0.33	0.34
1507.9	1515.3	<b>IC</b>	5.3	5.5
1517.3	1514.2	<b>t<sub>n-1, (0.05)</sub></b>	2.6	
1510.2	1526.4			
1511.8	1523.6			

**Tabla IV-32.**

Resultados del análisis de los lotes de jarabe.

La concentración de guifenesina en los jarabes se encuentra dentro de las especificaciones, siendo un rango de concentración aceptable entre  $\pm 10\%$  de la concentración reportada en el marbete.

Resultados generales de concentración

A continuación se presenta la tabla que resume los resultados de las determinaciones de concentración para los principios activos.

Principio activo	Forma farmacéutica	Laboratorio	Lote	Conc. Especificada *	Conc. determinada	Cumple con las especificaciones
Tramadol	Tabletas recubiertas	Best	603186	50 mg/tableta	40.7 mg ± 0.2 mg	NO
			610184		41.7 mg ± 0.8 mg	NO
	Cápsulas	Grünenthal	M102L01	50 mg/cápsula	45.0 mg ± 0.1 mg	SI
			M123L01		46.0 mg ± 0.6 mg	SI
	Solución oral	Grünenthal	M101L01	100 mg/mL	94.4 mg/mL ± 0.6 mg	SI
			M144L01		96.7 mg/mL ± 0.7 mg	SI
	Solución inyectable	Atlantis Pharma	4607007	100 mg/2 mL	93.1 mg/2 mL ± 2.1 mg	SI
			4607014		96.1 mg/2 mL ± 0.6 mg	SI
Guaifenesina	Jarabe	Sanofi-synthelabo	B7C894	1500 mg/100 mL	1509.3 mg/100 mL ± 5.3 mg	SI
			B7C423		1518.7 mg/100 mL ± 5.5 mg	SI

Tabla IV-33. Concentraciones de principio activo de terminadas para los principios activos.

\* Es la concentración especificada en el marbete; la tolerancia permitida por las farmacopeas se encuentra en un rango de ± 10 % respecto a la especificada.

## CONCLUSIÓN

El sistema cromatográfico se adecua a las condiciones de trabajo de los métodos desarrollados, garantizando resultados consistentes y confiables en las determinaciones realizadas.

El método para cuantificación de tramadol puede utilizarse en tabletas, cápsulas, solución oral y solución inyectable. Tiene una adecuada precisión, linealidad y exactitud. Es específico y robusto para variaciones de un  $\pm 5\%$  en las condiciones cromatográficas.

Para la cuantificación de guaifenesina en jarabe con dextrometorfano, el método es preciso, exacto, lineal, robusto y específico.

A pesar de que la guaifenesina es más susceptible a hidrólisis en solución y se degrada con la luz, las muestras de jarabe son estables hasta por un mes a temperatura ambiente y presencia de luz.

Los jarabes mostraron una cantidad de guaifenesina dentro de las especificaciones farmacopéicas y no se detectó la presencia de guayacol.

Las tabletas de tramadol elaboradas por los Laboratorios Best, en ninguno de los lotes analizados se encontró una concentración dentro de las especificaciones farmacopéicas; éstas se encuentran por debajo de un 15% respecto a la concentración especificada en el marbete. Esto es reflejo de una baja calidad del medicamento y falta de responsabilidad del laboratorio, lo cual permite suponer que dicho medicamento tiene cierta probabilidad a no aprobar otros tipos de pruebas farmacopéicas fundamentales, requisito para que el medicamento pueda venderse.

Las cápsulas y solución oral de tramadol elaboradas por los Laboratorios Grünental, contienen una cantidad de tramadol dentro de las especificaciones farmacopéicas.

La solución inyectable de tramadol fabricada por los laboratorios Atlantis Pharma muestra una concentración de tramadol dentro de las especificaciones farmacopéicas.

La cantidad de principio activo no es el único aspecto que determina la calidad de un medicamento, no obstante, es una prueba esencial y determinante para que los productos puedan salir a la venta.

Los estándares de USP y COSUFAR son equivalentes en los resultados cuantitativos determinados, demostrando que es más redituable utilizar un estándar nacional.



## ANEXO 1

### CUADRO ANOVA PARA EL DISEÑO FACTORIAL

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F <sub>0</sub>
pH	$SC_{pH} = \frac{C_{pH}^2}{4}$	$gl_{pH} = \text{niveles} - 1 = 1$	$CM_{pH} = \frac{SC_{pH}}{gl_{pH}}$	$CM_{pH} / CM_z$
% H <sub>2</sub> O	$SC_{\%H_2O} = \frac{C_{\%H_2O}^2}{4}$	$gl_{\%H_2O} = 1$	$CM_{\%H_2O} = \frac{SC_{\%H_2O}}{gl_{\%H_2O}}$	$CM_{\%H_2O} / CM_z$
(pH)(% H <sub>2</sub> O)	$SC_{(pH)(\%H_2O)} = \frac{C_{(pH)(\%H_2O)}^2}{4}$	$gl_{(pH)(\%H_2O)} = 1$	$CM_{(pH)(\%H_2O)} = \frac{SC_{(pH)(\%H_2O)}}{gl_{(pH)(\%H_2O)}}$	$CM_{(pH)(\%H_2O)} / CM_z$
Error	$SC_z = SCT - SC_{pH} - SC_{\%H_2O} - SC_{(pH)(\%H_2O)}$	$gl_z = (r - 1) \cdot 2^k$	$CM_z = \frac{SC_z}{gl_z}$	
Total	$SCT = \sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{N_{...}}$	$gl_r = (r \cdot 2^k) - 1$		

C<sub>x</sub>: contraste del factor

k: número de factores

r: número de replicas

## ANEXO 2

Ecuaciones para evaluar la linealidad

- Ecuación de la línea recta

$$y = a + bx$$

$y$  = Variable dependiente;  $x$  =  
variable independiente;  $a$  =  
ordenada al origen;  $b$  =  
pendiente.

- Pendiente

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

$\bar{x}$  = media de los valores de  $x$

$\bar{y}$  = media de los valores de  $y$

- Ordenada al origen

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

- Coeficiente de correlación

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\left[ \sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[ \sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right]}$$

- Estadístico  $S_{y/x}$  (estimador de errores aleatorios en la dirección  $y$ )

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

$\hat{y}_i$  = Valor de  $y$  ajustado por la recta de regresión para un determinado valor de  $x$ .

- Desviación estándar de la pendiente

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

- Desviación estándar de la ordenada al origen

$$S_a = \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

- Intervalo de confianza para la pendiente

$$IC(b) = b \pm (t_{0.95, n-2})(S_b)$$

- Residuos de y

$$R_{y_i} = y_i - \hat{y}_i$$

- Intervalo de confianza para la ordenada al origen

$$IC(a) = a \pm (t_{0.95, n-2})(S_a)$$

- Residuos de Pearson

$$SRy = \frac{R_{y_i}}{S_{y/x}}$$

### Análisis de varianza de la regresión

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad (gl)	Cuadrado medio	F <sub>0</sub>
Regresión	$SC_R = b \cdot S_{xy}$	1	$CM_R = \frac{SC_R}{gl_R}$	$\frac{CM_R}{CM_E}$
Residual	$SC_E = S_{yy} - SC_R$	n-2	$CM_E = \frac{SC_E}{gl_E}$	
Total	$S_{yy} = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}$	n-1		

- Suma corregida del producto cruzado de xy

$$S_{xy} = \sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n}$$

- Suma de cuadrados corregida de y

$$S_{yy} = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}$$

## ANEXO 3

Ecuaciones para evaluación de la precisión y reporte de resultados

- Media aritmética

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

- Desviación estándar (desvest.)

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \hat{x})^2}{(n-1)}}$$

- Desviación estándar relativa

$$DR = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100$$

- Intervalo de confianza de la media de muestras pequeñas.

$$\bar{x} \pm t_{n-1} \cdot \frac{S}{\sqrt{n}}$$

## ANEXO 4

## Pruebas de contraste

Prueba de t para varianzas desiguales

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$$

$$gl = \frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{S_1^4}{n_1^2(n_1-1)} + \frac{S_2^4}{n_2^2(n_2-1)}\right)}$$

gl: Grados de libertad, el resultado se redondea a un número entero.

s: desviación estándar.

n: número de observaciones

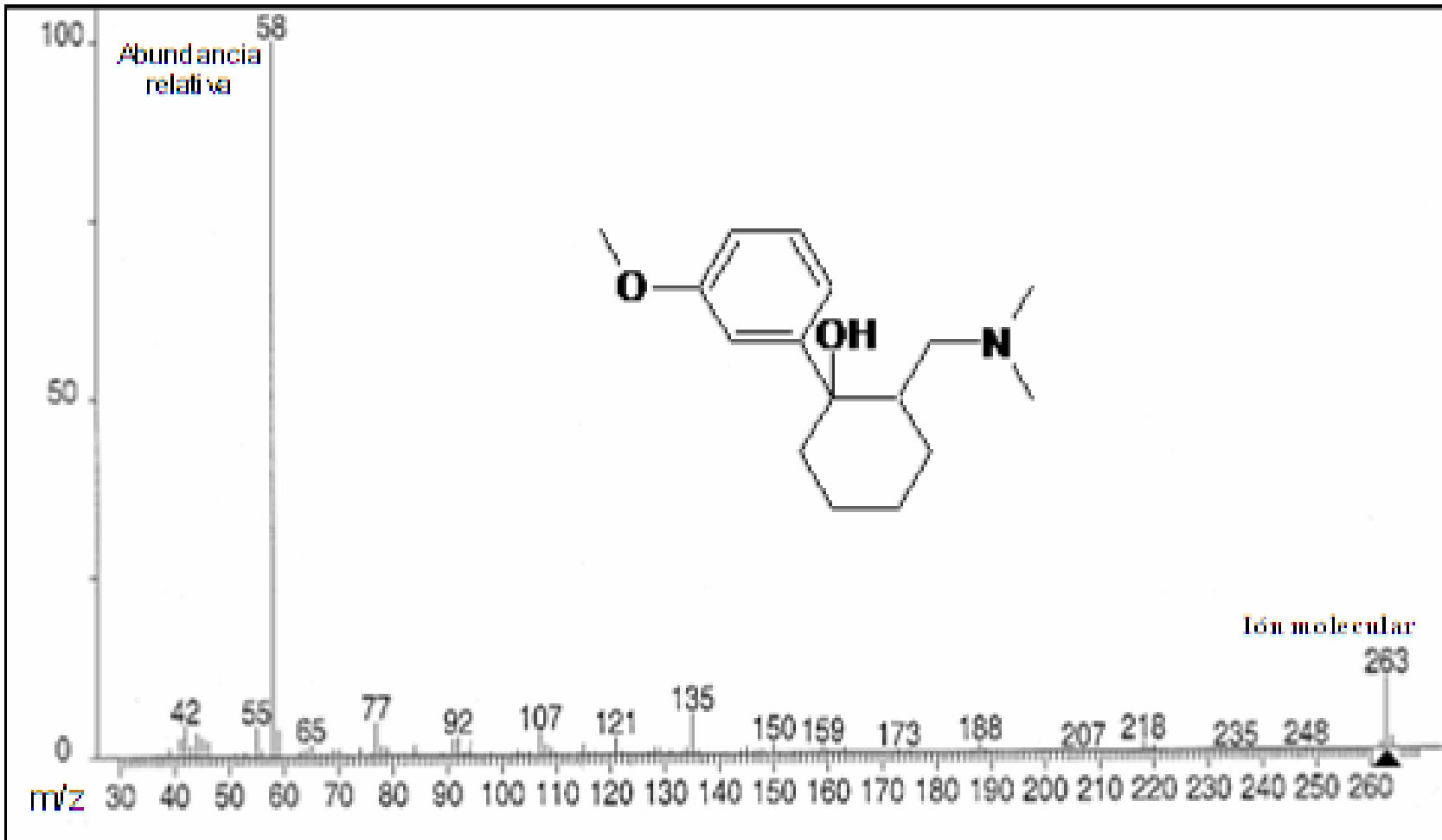
Contraste de Grubbs para datos anómalos

$$G = \frac{\text{Valor sospechoso} - \bar{x}}{s}$$

La media y la desviación estándar se calculan incluyendo el valor sospechoso.

## ANEXO 5

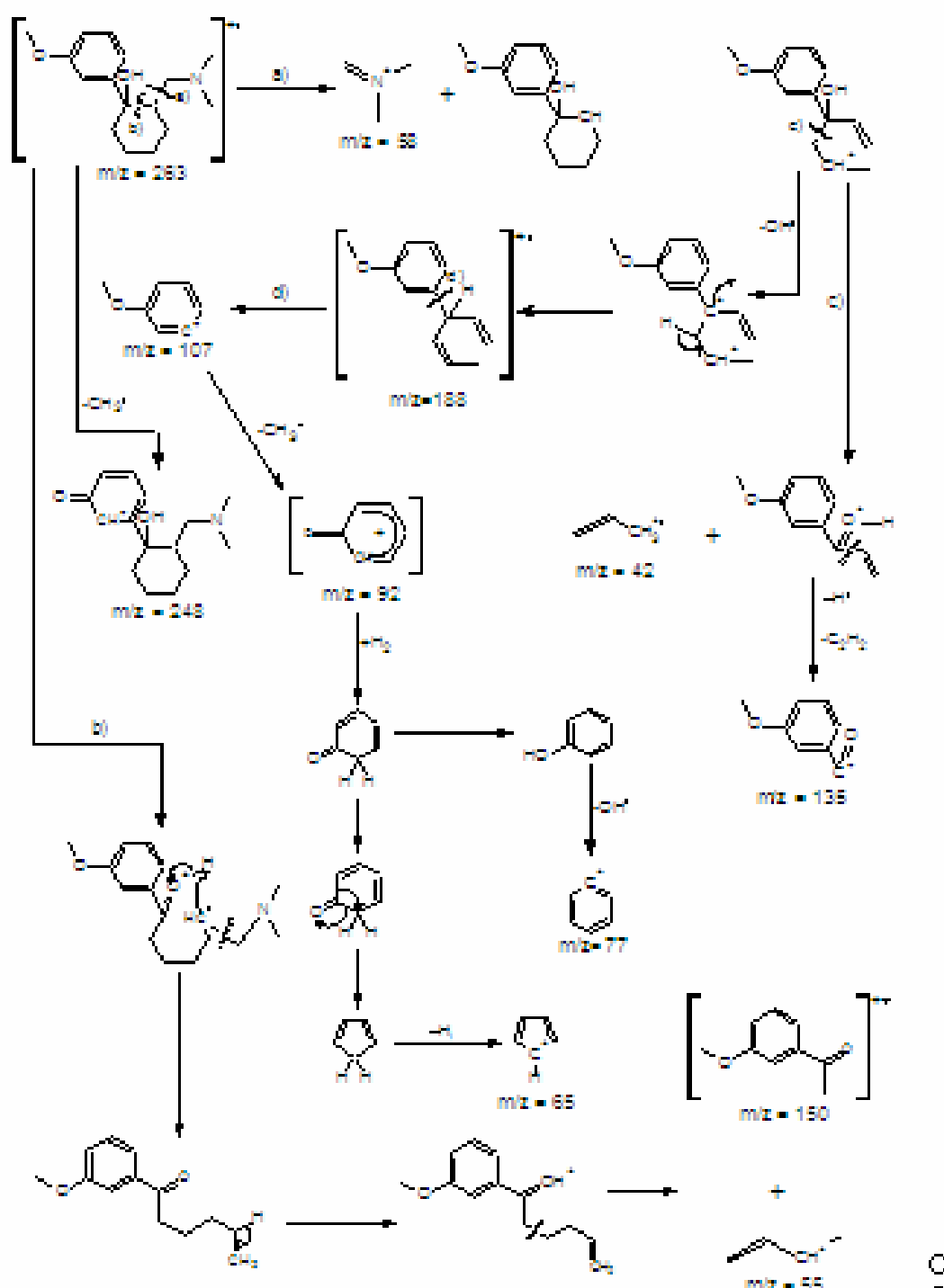
## Espectro de masas del tramadol



## ANEXO 5.1

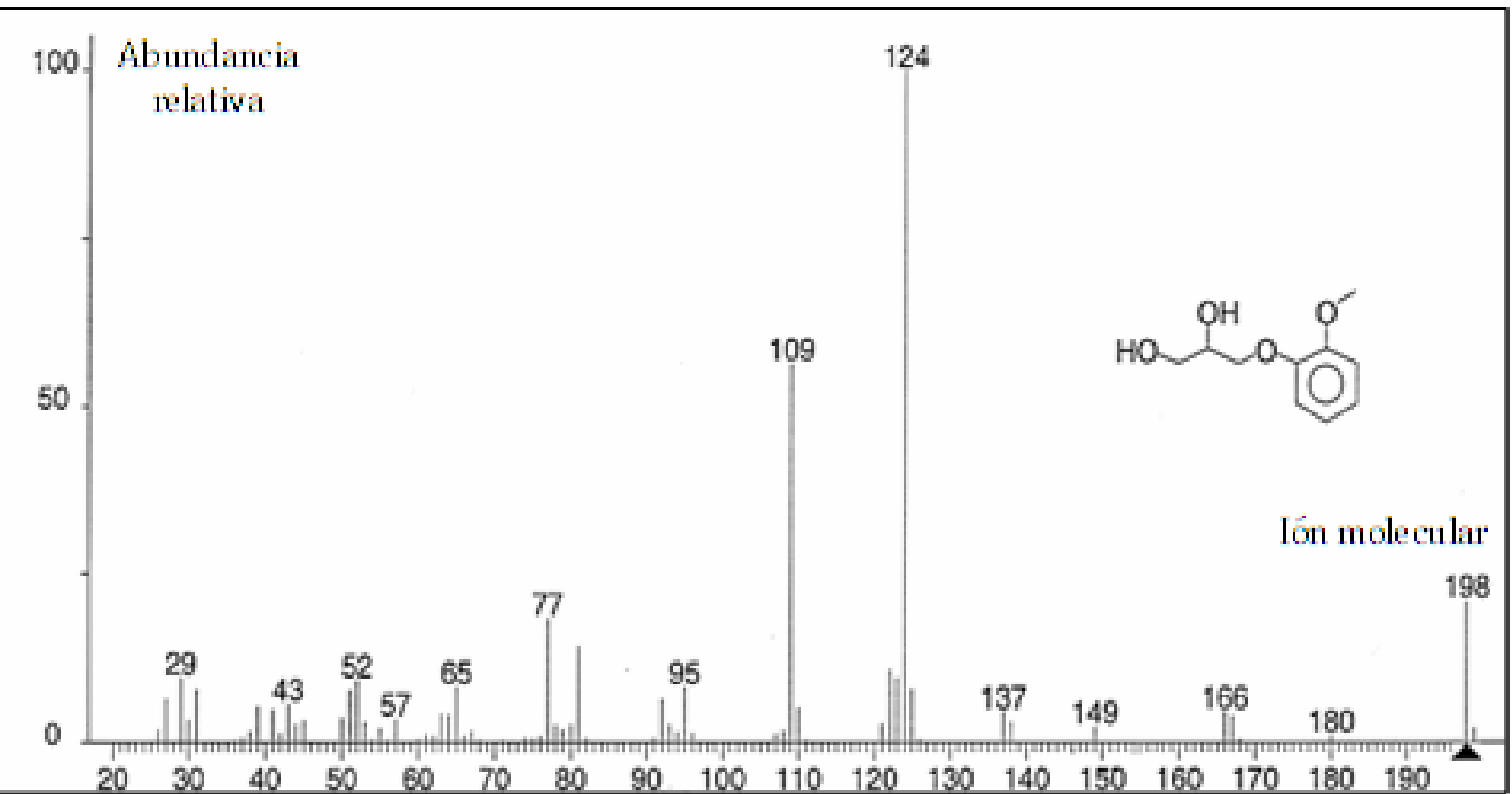
## Patrón de fragmentación de la molécula de tramadol

- Un pico molecular de masa impar es característico de la presencia de un átomo de nitrógeno. Los fragmentos iónicos más importantes tendrán masa par.



## ANEXO 6

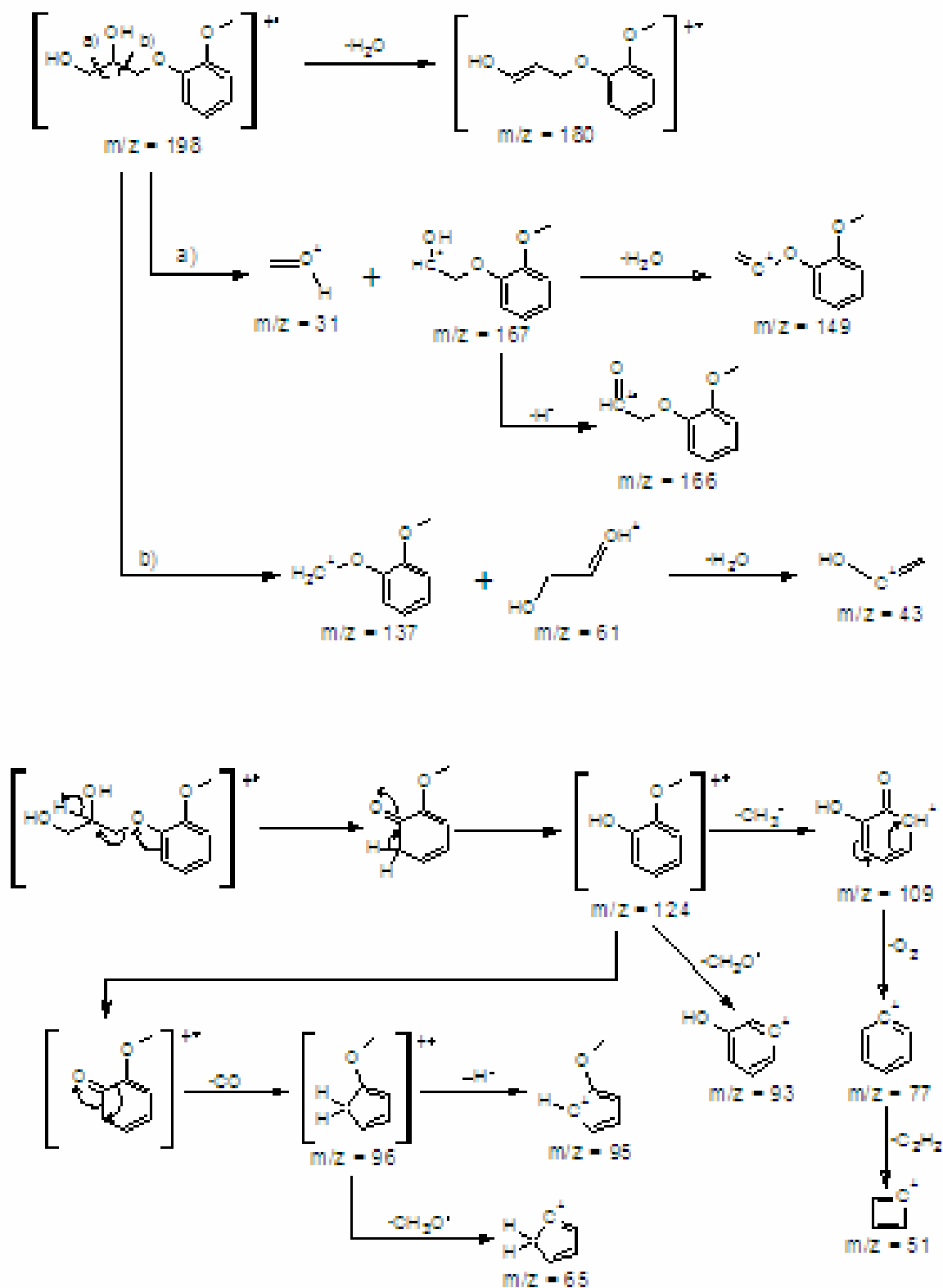
## Espectro de masas de la guaifenesina





## ANEXO 6.1

## Patrón de fragmentación de la molécula de guaifenesina



## ANEXO 7

Datos experimentales de la variación de los parámetros cromatográficos respecto a las modificaciones de las condiciones cromatograficas para el método de cuantificación de tramadol.

	Ref.	T. de columna 26.3 °C	T. de columna 23.8 °C	42.8 % de agua en FM	47.3 % de agua en FM	Vel. de flujo 0.95 mL/min	Vel. de flujo 1.05 mL/min	Vol. de inyección 4.8 µL	Vol. de inyección 5.3 µL	pH de FM 3.15	pH de FM 2.85
Conc.	91.78	91.85	91.68	92.06	91.53	91.64	91.72	91.50	91.70	93.11	92.50
	92.20	91.98	91.75	92.05	91.52	91.50	91.58	91.37	91.56	91.04	91.62
	92.13	92.22	91.81	92.09	91.58	91.78	91.61	91.73	91.49	92.43	92.59
	89.16										
	92.16										
	91.48										
Promedio	91.48	92.02	91.75	92.07	91.54	91.64	91.64	91.53	91.58	92.19	92.24
absoluto		0.17	0.10	0.22	0.30	0.21	0.21	0.31	0.26	0.35	0.39
%		0.19	0.11	0.24	0.33	0.22	0.23	0.34	0.29	0.38	0.43

Datos para la evolución de la robustez. (Ref.) Concentración de las condiciones de referencia.  $|d_i|$  diferencia absoluta entre el promedio de la concentración de referencia y los problemas. % porcentaje que representa la diferencia absoluta respecto al promedio de concentraciones de referencia. (FM) Fase móvil.

	Variación de K'										
	Referencia	26.3 °C	23.8 °C	H <sub>2</sub> O 42.8 %	H <sub>2</sub> O 47.3 %	0.95 mL/min	1.05 mL/ min	Vol. Inyec. 4.8 µL	Vol. Inyec. 5.3 µL	pH 3.15	pH 2.85
	0.73	0.73	0.73	0.67	0.80	0.80	0.67	0.73	0.73	0.73	0.73
	0.73	0.73	0.73	0.67	0.80	0.80	0.67	0.73	0.73	0.73	0.73
	0.73	0.73	0.73	0.67	0.80	0.80	0.67	0.73	0.73	0.73	0.73
	0.73										
	0.73										
	0.73										
<b>Promedio</b>	<b>0.73</b>	0.73	0.73	0.67	0.80	0.80	0.67	0.73	0.73	0.73	0.73
<b> di </b>		0.00	0.00	0.06	0.07	0.07	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>%</b>		0.46	0.46	8.68	9.59	9.59	8.68	0.46	0.46	0.46	0.46

**|di|**: Diferencia absoluta entre el promedio de la referencia y el promedio de cada observación.

**%**: Porcentaje de la diferencia respecto al promedio de la referencia.

La muestra utilizada en la determinación fue la solución oral de tramadol.

Variación de N											
Referencia	26.3 °C	23.8 °C	H <sub>2</sub> O 42.8 %	H <sub>2</sub> O 47.3 %	0.95 mL/min	1.05 mL/min	Vol. Inyec. 4.8 µL	Vol. Inyec. 5.3 µL	pH 3.15	pH 2.85	
1029.92	1029.92	1029.92	952.22	1002.38	1002.38	1060.96	1029.92	1029.92	1029.92	1029.92	
1029.92	1029.92	1029.92	952.22	1002.38	1002.38	1060.96	1029.92	1029.92	1029.92	1029.92	
1029.92	1029.92	1029.92	952.22	1002.38	1002.38	1060.96	1029.92	1029.92	1029.92	1029.92	
1029.92											
1029.92											
1029.92											
<b>Promedio</b>	<b>1029.92</b>	1029.92	1029.92	952.22	1002.38	1002.38	1060.96	1029.92	1029.92	1029.92	1029.92
<b> di </b>		0.00	0.00	77.70	27.55	27.55	31.04	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>%</b>		0.00	0.00	7.54	2.67	2.67	3.01	0.00	0.00	0.00	0.00

Variación de σ											
Referencia	26.3 °C	23.8 °C	H <sub>2</sub> O 42.8 %	H <sub>2</sub> O 47.3 %	0.95 mL/min	1.05 mL/min	Vol. Inyec. 4.8 µL	Vol. Inyec. 5.3 µL	pH 3.15	pH 2.85	
5.5	5.5	5.5	5.0	6.0	4.0	10.0	10.8	11.0	12.6	11.7	
5.5	5.5	5.5	5.0	6.0	4.0	10.0	11.0	10.7	14.7	10.9	
5.5	5.5	5.5	5.0	6.0	4.0	10.0	11.0	10.9	14.1	10.5	
5.5											
5.5											
5.5											
<b>Promedio</b>	<b>5.50</b>	5.50	5.50	5.00	6.00	4.00	10.00	10.93	10.86	13.80	11.02
<b> di </b>		0.00	0.00	0.50	0.50	1.50	4.50	5.43	5.36	8.30	5.52
<b>%</b>		0	0	9.09	9.09	27.27	81.82	98.69	97.40	150.99	100.42

	Variación de Rs										
	Referencia	26.3 °C	23.8 °C	H <sub>2</sub> O 42.8 %	H <sub>2</sub> O 47.3 %	0.95 mL/min	1.05 mL/min	Vol. Inyec. 4.8 µL	Vol. Inyec. 5.3 µL	pH 3.15	pH 2.85
	2.78	3.10	3.13	3.09	3.08	2.93	2.64	2.93	2.47	2.78	2.78
	2.78	3.08	3.16	3.08	3.09	2.93	2.64	2.93	2.47	2.78	2.78
	2.78	3.07	3.15	3.08	3.09	2.93	2.64	2.93	2.47	2.78	2.78
	2.78										
	2.78										
	2.78										
<b>Promedio</b>	<b>2.78</b>	<b>3.09</b>	<b>3.15</b>	<b>3.08</b>	<b>3.08</b>	<b>2.93</b>	<b>2.64</b>	<b>2.93</b>	<b>2.47</b>	<b>2.78</b>	<b>2.78</b>
<b> di </b>		<b>0.31</b>	<b>0.37</b>	<b>0.30</b>	<b>0.30</b>	<b>0.15</b>	<b>0.14</b>	<b>0.15</b>	<b>0.31</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
<b>%</b>		<b>11.00</b>	<b>13.22</b>	<b>10.85</b>	<b>10.93</b>	<b>5.45</b>	<b>5.10</b>	<b>5.45</b>	<b>11.20</b>	<b>0.10</b>	<b>0.10</b>

	Variación de tr										
	Referencia	26.3 °C	23.8 °C	H <sub>2</sub> O 42.8 %	H <sub>2</sub> O 47.3 %	0.95 mL/min	1.05 mL/min	Vol. Inyec. 4.8 µL	Vol. Inyec. 5.3 µL	pH 3.15	pH 2.85
	1.10	1.10	1.10	1.00	1.20	1.20	1.00	1.10	1.10	1.10	1.10
	1.10	1.10	1.10	1.00	1.20	1.20	1.00	1.10	1.10	1.10	1.10
	1.10	1.10	1.10	1.00	1.20	1.20	1.00	1.10	1.10	1.10	1.10
	1.10										
	1.10										
	1.10										
<b>Promedio</b>	<b>1.10</b>	<b>1.10</b>	<b>1.10</b>	<b>1.00</b>	<b>1.20</b>	<b>1.20</b>	<b>1.00</b>	<b>1.10</b>	<b>1.10</b>	<b>1.10</b>	<b>1.10</b>
<b> di </b>		<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.10</b>	<b>0.10</b>	<b>0.10</b>	<b>0.10</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
<b>%</b>		<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>9.09</b>	<b>9.09</b>	<b>9.09</b>	<b>9.09</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>

## ANEXO 8

Datos del análisis de adecuabilidad del sistema.

A										
	tr	w 1/2	area	tr <sub>2</sub>	tr' <sub>2</sub>	tr'	K'	α	N	Rs
	2.62	0.19	3342.50	1.77	0.27	1.12	0.75	4.20	1021.22	2.60
	2.62	0.19	3367.70	1.77	0.27	1.12	0.75	4.22	1011.49	2.59
	2.62	0.20	3328.20	1.77	0.27	1.12	0.75	4.22	1003.43	2.59
<b>Promedio</b>	2.62	0.19	3346.13	1.77	0.27	1.12	0.75	4.21	1012.05	2.59
<b>Desvest.</b>	0.0021	0.0010	19.9991	0.0006	0.0006	0.0000	0.0000	0.0103	8.9038	0.0073
<b>CV</b>	0.08	0.52	0.60	0.03	0.22	0.00	0.00	0.24	0.88	0.28
B										
	2.63	0.19	3313.80	1.76	0.26	1.13	0.75	4.27	1016.90	2.62
	2.62	0.19	3379.00	1.77	0.27	1.12	0.75	4.21	1025.90	2.62
	2.62	0.20	3331.60	1.77	0.27	1.12	0.75	4.24	1004.97	2.59
<b>Promedio</b>	2.62	0.19	3341.47	1.77	0.27	1.12	0.75	4.24	1015.92	2.61
<b>Desvest.</b>	0.0012	0.0010	33.7012	0.0015	0.0015	0.0012	0.0000	0.0278	10.5023	0.0125
<b>CV</b>	0.04	0.52	1.01	0.09	0.58	0.10	0.00	0.66	1.03	0.48
Pruebas de t							Grados de libertad	Valor crítico de t*		
Variable comparada	tr'	K'	α	N	Rs	área	2	3.18		
Grados de libertad	2	**	3	4	3	3	3	4.30		

\* Para un contraste de dos colas.

\*\* No realizada debido a que las medias son exactamente iguales.



---

---

## Bibliografía

- 1) **Alpizar S., Hernández H. (2004)** Formas Farmacéuticas sólidas. UNAM/UAEM; México.
- 2) **Barbas C. et al. (2004)** "High-performance liquid chromatographic analysis of dextromethorphan, guaifenesin and benzoate in a cough syrup for stability testing". Journal of Chromatography A, 1048, July, pp. 207-211
- 3) **Bolton, S. (1990)**. Pharmaceutical Statistics, 2<sup>nd</sup> Ed. Marcel Dekker, Inc. USA
- 4) **Drug Bank, (2006)**. University of Alberta. (<http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/drugbank/>) Consultado: noviembre de 2007.
- 5) **Drugs and chemicals of concern, Tramadol. (2007)**. September, Office of division control, DEA. USA. ([http://www.deadiversion.usdoj.gov/drugs\\_concern/tramadol.htm](http://www.deadiversion.usdoj.gov/drugs_concern/tramadol.htm)). Consultado: noviembre de 2007.
- 6) **Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2004)**. 8<sup>a</sup> Ed. Secretaria de Salud, México.
- 7) **Grosa G. et al. (2006)** "Simultaneous, stability indicating, HPLC-DAD determination of guaifenesin and methyl and propyl-parabens in cough syrup". Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 41 January, pp. 798-803



- 
- 8) **Guía de validación de métodos analíticos. (2002).** Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. México.
  - 9) **Harris D. (2007).** Análisis químico cuantitativo. 3ª Ed. Reverte, España.
  - 10) **Hefman E. (1992).** Chromatography. 5<sup>th</sup> Ed.
  - 11) **ICH-Q2A. ( 1995).** Text on validation of analytical procedures. Guideline for industry. FDA, USA.
  - 12) **ICH-Q2B. (1996).** Validation of analytical procedures; Methodology. Guidance for industry. FDA, USA.
  - 13) **Ide Soichiro, et al. (2005)** “Mu opioid receptor-dependent and independent components in effects of tramadol”. Neuropharmacology. 51, May, pp. 651-658
  - 14) **Levin J. (2002).** Fundamentos de estadística en la investigación social. Oxford Univesity press. 2ª Ed.
  - 15) **Manual de referencia,(1996)** Inyector automático HP 1100. 2ª Ed. Hewlett Packard, Alemania.
  - 16) **McLafferty F. & Ture F. (1993).** Interpretation of mass spectra. 4<sup>th</sup> edition. John Wiley & Sons, USA.
  - 17) **Medvedovici A., et al. (2004)** “Validated HPLC determination of 2[(dimethylamino)methyl]cyclohexanone, an impurity in Tramadol, using a precolumn derivatisation reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine”. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 34, July, pp. 67-74

- 18) Miller & Miller, (2002). Estadística y quimiometría para química analítica. 4<sup>a</sup> Ed. Prentice Hall, España.
- 19) Montgomery, D.C. (1984). Design and analysis of experiments. John Wiley & Sons. USA. pp. 357-399.
- 20) Myers Debbie. (2005) "Tramadol, therapeutic review". Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine, Vol. 14, No 4, October. pp. 284-287
- 21) Neue U. (1997). HPLC Columns. John Wiley & Sons, USA. pp. 56-78.
- 22) Plegar K., et al. (1992). Mass Spectral and GC Data. Part 1. 2<sup>nd</sup> Ed. VHC pub. USA.
- 23) PLM-Diccionario de especialidades farmacéuticas. (2002). 48<sup>a</sup> Ed. Thomson, México.
- 24) Ramis G., García C., (2001). Quimiometría. Síntesis. pp.108-131
- 25) Remington, (2000). Farmacología. Tomo 1, 20<sup>a</sup> Ed., Editorial Panamericana EUA.
- 26) Sadek P. (2002). The HPLC Solvent Guide. 2<sup>nd</sup> Ed. John Wiley & Sons, Canada. pp. 13-36
- 27) Skoog D. et al. (2001) Principios de análisis instrumental. 5<sup>a</sup> Ed. Mc Graw Hill, España.
- 28) Snyder R.L. & Kirkland J.J. (1979). Introduction to modern liquid chromatography. 2<sup>nd</sup> Ed. John Wiley & Sons, Canada.

- 29) The Index Merck, (2001),** 13<sup>th</sup> Ed. Merck & Co. Inc. N. J. USA.
- 30) The United States Pharmacopoeia, (2006),** No. 29.
- 31) Vademecum,** on line. (<http://www.prvademecum.com/default.asp>),  
Consultado: noviembre de 2007.
- 32) Vasudevan M., et al. (2000)** “Simultaneous estimation of phenylpropanolamine HCl, guaiphenesin and diphenylpyraline HCl in syrups by LC”. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 24, May, pp. 25-31
- 33) Vores L. (1992).** Instrumentation in analytical chemistry. American Chemical Society, USA. Pp. 78-94
- 34) Wenclawiak B. (2005).** Quality assurance in analytical chemistry. Springer . pp 15-75
- 35) Zecevic M., et al. (2006)** “Validation of a high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of tramadol and its impurities in oral drops as a pharmaceutical formulation”. Journal of Chromatography A. 1119, January, pp. 251-256