



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DE LA ROBUSTEZ PARA CUANTIFICAR  
PARACETAMOL Y TRAMADOL  
POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS  
DE ALTA RESOLUCIÓN (C.L.A.R) UTILIZANDO  
DISEÑO DE EXPERIMENTOS**

**TESIS  
MANCOMUNADA**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTAN  
ERIK ALAN DÍAZ MONTELLANO  
MARCO ANTONIO HUERTA ORTIZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Prof.: GEORGINA MARGARITA MAYA RUIZ  
**VOCAL:** Prof.: RICARDO RODRÍGUEZ SÁENZ  
**SECRETARIO:** Prof.: JUAN MANUEL RODRÍGUEZ  
**1° SUPLENTE:** Prof.: BLANCA ESTELA RIVERO CRUZ  
**2° SUPLENTE:** Prof.: NATIVIDAD GARCÍA ESCAMILLA

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 10, CONJUNTO F, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

## **ASESOR DEL TEMA:**

---

**M. en C. Juan Manuel Rodríguez**

## **SUSTENTANTES:**

---

**Erik Alan Díaz Montellano**

---

**Marco Antonio Huerta Ortiz**

# Contenido

1. Introducción.....	6
2. Objetivos.....	7
3. Antecedentes .....	7
3.1 Diseño de experimentos.....	7
3.1.1 Diseños factoriales completos .....	9
3.1.2 Diseños factoriales fraccionados .....	9
3.1.3 Diseños de Plackett-Burman.....	10
3.2 Robustez .....	10
3.3 Análisis de Robustez en Cromatografía de líquidos de Alta resolución .....	15
3.3.1 Proceso cromatográfico .....	15
3.3.2 Factores controlables y respuestas cromatográficas.....	22
3.4 Robustez como parámetro de desempeño en validación de métodos analíticos .....	24
3.5 Propiedades de los principios activos .....	25
3.5.1 Paracetamol.....	25
3.5.2 Tramadol HCl .....	26
3.5.3 Análisis de la mezcla de los principios activos .....	27
4. Desarrollo del estudio de robustez .....	28
4.1 Selección de niveles de los factores.....	28
4.2 Elaboración del diseño .....	28
4.3 Ejecución del diseño .....	29
4.3.1 Equipo.....	29
4.3.2 Preparación de las soluciones .....	30
4.3.3 Parámetros instrumentales .....	32
4.4 Metodología .....	32
5. Resultados y análisis de resultados .....	34
5.1 Resultados .....	34
5.2 Análisis de la varianza para cada respuesta .....	37
5.3 Resolución del par crítico ( $R_C$ ) .....	38
5.3.1 Cálculo de los efectos .....	38

5.3.2 Análisis de varianza (ANOVA) .....	41
5.3.3 Verificación de supuestos .....	42
5.3.4 Robustez .....	44
5.4 Tiempo de análisis .....	49
5.4.1 Cálculo de los efectos .....	49
5.4.2 Análisis de varianza (ANOVA) .....	51
5.4.3 Verificación de supuestos .....	52
5.4.4 Robustez .....	53
5.5 Predicción de respuestas (Resolución del par crítico- Tiempo de análisis) .....	57
6. Conclusiones .....	60
7. Bibliografía .....	61
8. Anexos .....	64
8.1 Anexo 1 .....	64
8.2 Anexo 2 .....	67
8.3 Anexo 3 .....	77
8.4 Anexo 4 .....	86

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ACN	Acetonitrilo
ANOVA	Analysis of Variance
cm	Centímetro
COX	Ciclooxigenasa
FDA	Food and Drug Administration
g.l.	Grados de libertad
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICH	International Conference of Harmonization
MeOH	Metanol
µg	Microgramo
µm	Micrómetro
nm	Nanómetro
OVAT	One Variable at Time
SNC	Sistema Nervioso Central
THF	Tetrahidrofurano
Tramadol HCl	Tramadol clorhidrato
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta



## 1. Introducción

El desarrollo de métodos por HPLC (*cromatografía de líquidos de alta resolución por sus siglas en inglés*) para el análisis de fármacos y medicamentos es uno de los principales desafíos al que un químico analista se enfrenta a diario. Esta tarea requiere de mucha experiencia y puede consumir mucho tiempo. A pesar de los avances en la teoría cromatográfica y el desarrollo de paquetes computacionales que facilita este proceso, el desarrollo de métodos por HPLC se basa principalmente en ensayos de “prueba y error”<sup>1</sup>. Ante esto, las autoridades regulatorias (FDA, ICH, EURACHEM, etc.) promueven y solicitan la aplicación de los principios de “Calidad por Diseño” (*procedimiento sistemático para el desarrollo de métodos a través del diseño de experimentos*) con el fin de facilitar el intercambio de información compleja acerca de la selectividad cromatográfica y valores de resolución crítica para respaldar un mejor control de los métodos, incluyendo transferencia de métodos<sup>2</sup>. Es por lo anterior que las pruebas de robustez están teniendo un rol importante en la economía, donde los productos farmacéuticos son distribuidos globalmente y los procesos de transferencia de métodos han estado funcionando sin problemas para el mismo producto en diferentes países y en diferentes laboratorios.

Inicialmente, la prueba de robustez era realizada para indicar los factores más importantes que afectaban los resultados en estudio interlaboratorio<sup>3</sup>. La prueba era ejecutada al final de la validación del método, justo antes de la evaluación de la reproducibilidad. Sin embargo, cuando un método era considerado no robusto, debía ser adaptado o rediseñado y revalidado, resultando así en un incremento en el tiempo y en los costos de su desarrollo. Hoy en día la robustez es verificada al principio o al final del desarrollo del método o en su caso, al iniciar el procedimiento de validación<sup>4</sup>.

Durante el desarrollo de un método analítico, se deben establecer rangos aceptables para los parámetros del método donde la respuesta analítica permanezca constante.

En el presente trabajo se evaluó la robustez de un método analítico para cuantificar la mezcla de los fármacos Paracetamol y Tramadol HCl por HPLC mediante el uso del diseño de experimentos. Se estudio el efecto de los factores: **tamaño de partícula de la fase estacionaria, longitud de la columna, gradiente y pH de la fase móvil**, sobre las



respuestas: **tiempo de análisis ( $T_A$ )**, **simetría (S)**, **resolución crítica ( $R_c$ )** y **número de platos teóricos (N)**.

## 2. Objetivos

- Se establecerán las condiciones cromatográficas necesarias para obtener una resolución mayor a 2 con un tiempo de análisis entre 5 y 10 minutos.
- Indicar la influencia de los factores en la resolución del par crítico y en el tiempo de análisis, así como las propuestas de cambios que mejoren el desempeño del método a través un diseño experimental  $2^4$ .

## 3. Antecedentes

### 3.1 Diseño de experimentos

En el campo de la industria es frecuente hacer experimentos o pruebas con la intención de resolver un problema o comprobar una idea. Es común que estas pruebas o experimentos se hagan sobre la marcha, con base en el ensayo y al error y a la experiencia e intuición, en lugar de seguir un plan experimental adecuado que garantice una buena respuesta a las interrogantes planteadas <sup>5</sup>.

En situaciones de cierta complejidad no es suficiente aplicar este tipo de experimentación, por lo que es mejor proceder siempre en una forma eficaz que garantice la obtención de las respuestas en un lapso corto de tiempo y utilizando pocos recursos.

El diseño de experimentos es la aplicación del método científico para generar conocimiento acerca de un sistema o proceso, consiste en planear y realizar un conjunto de pruebas con el objetivo de generar datos que al ser analizados estadísticamente, proporcionen evidencias objetivas que permitan responder las interrogantes planteadas por el experimentador sobre determinada situación <sup>3</sup>.

Algunos problemas típicos que pueden resolverse con el diseño y el análisis de experimentos son los siguientes <sup>5</sup>:



1. Comparar a dos o más materiales con el fin de elegir al que mejor cumple los requerimientos.
2. Comparar varios instrumentos de medición para verificar si trabajan con la misma precisión y exactitud.
3. Determinar los factores de un proceso que tienen impacto sobre una o más características del producto final.
4. Encontrar las condiciones de operación (temperatura, velocidad, humedad, por ejemplo) donde se reduzcan los defectos o se logre un mejor desempeño del proceso.
5. Reducir tiempos de ciclos de proceso.
6. Hacer procesos robustos a oscilaciones de variables ambientales.
7. Apoyar el diseño o rediseño de nuevos productos o proceso.

En general, los experimentos se usan para estudiar el desempeño de proceso y sistemas. El proceso o sistema puede representarse con el modelo ilustrado en la figura 1, donde puede visualizarse como una combinación de máquinas, métodos, personas u otros recursos que transforman cierta entrada (con frecuencia un material) en una salida que tiene una o más respuestas observables.

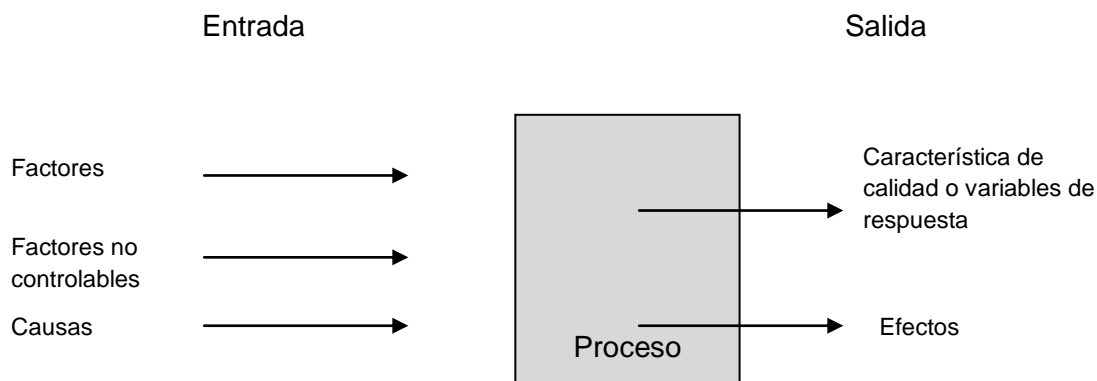


Fig.1 Modelo general de un proceso o sistema

En la literatura se consideran tres categorías de diseños de experimentos para la evaluación de la robustez:<sup>6</sup>



- Diseños factoriales completos
- Diseños factoriales fraccionados y
- Diseños de Placket-Burman

### 3.1.1 Diseños factoriales completos

En un diseño factorial completo todos los niveles de cada factor tiene una combinación con cada uno de los niveles de los otros factores. Los factoriales  $2^f$  completos son útiles principalmente cuando el número de factores a estudiar está entre 2 y 4 ( $2 \leq f \leq 4$ ), rango en el cual su tamaño se encuentra entre 4 y 16 tratamientos.<sup>3</sup>

Los tratamientos pueden ser representados en una matriz de diseño, la tabla 1 muestra la familia de diseño factoriales  $2^f$  ( $f \leq 4$ )

**Tabla 1.-** Familia de diseños factoriales  $2^f$  ( $f \leq 4$ )

Tratamiento	Notación de Yates	A	B	C	D
1	-1	-	-	-	-
2	a	+	-	-	-
3	b	-	+	-	-
4	ab	+	+	-	-
5	c	-	-	+	-
6	ac	+	-	+	-
7	bc	-	+	+	-
8	abc	+	+	+	-
9	d	-	-	-	+
10	ad	+	-	-	+
11	bd	-	+	-	+
12	abd	+	+	-	+
13	cd	-	-	+	+
14	acd	+	-	+	+
15	bcd	-	+	+	+
16	abcd	+	+	+	+

### 3.1.2 Diseños factoriales fraccionados

Cuando crece el número de factores ( $f \geq 5$ ) el número de tratamientos en los diseños factoriales se incrementa considerablemente. Para experimentar con esta cantidad de factores se requiere de una estrategia que permita reducir de manera importante el número de



tratamientos experimentales, sin perder información valiosa. Tal estrategia la conforman los diseños factoriales fraccionados ( $2^{f-1}$ ,  $f > 2$ ), las corridas son un parte o una fracción de los tratamientos de los factoriales completos.<sup>4</sup>

Al correr un diseño fraccionado habrá efectos que no podrán estimarse y se tienen menos grados de libertad para el error. Los efectos que se pierden se espera que sean, en la medida de lo posible interacciones de alto orden, las cuales se pueden ignorar de antemano con bajo riesgo.

### 3.1.3 Diseños de Plackett-Burman

Los diseños de *Plackett-Burman* representan otra alternativa para fraccionar diseños factoriales completos, donde el número de tratamientos de diseño no necesariamente es potencia de 2 pero si es múltiplo de cuatro<sup>7</sup>.

Para construir un diseño de Plackett-Burman para  $f$  factores se selecciona un renglón o columna de niveles codificados -1 y +1, de manera que el número de positivos sea  $(f + 1) / 2$  y el de negativos  $(f - 1) / 2$ . Este renglón es el primero del diseño. Los siguientes  $f-1$  renglones o columnas se generan recorriendo cada vez un lugar el primer renglón. Por último, el renglón ( $f + 1$ ) se forma sólo de números -1. Los diferentes arreglos pueden construirse mediante el uso software especializado.<sup>5</sup>

### 3.2 Robustez

La USP y la ICH<sup>8-9</sup> definen a la robustez como “la medida de capacidad de un método analítico para permanecer inalterado a pequeñas, pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y proporciona un indicativo de su confiabilidad durante el uso normal”.

La guía ICH Q2B establece que “La evaluación de la robustez deberá ser considerada durante la fase de desarrollo y depende del tipo de procedimiento en estudio. Deberá mostrar la confiabilidad de un análisis con respecto a variaciones deliberadas en los parámetros del método.”

La robustez puede evaluarse a través de un análisis OVAT (una variable a la vez) donde se varía los niveles de un factor dado y los otros factores se mantienen en niveles



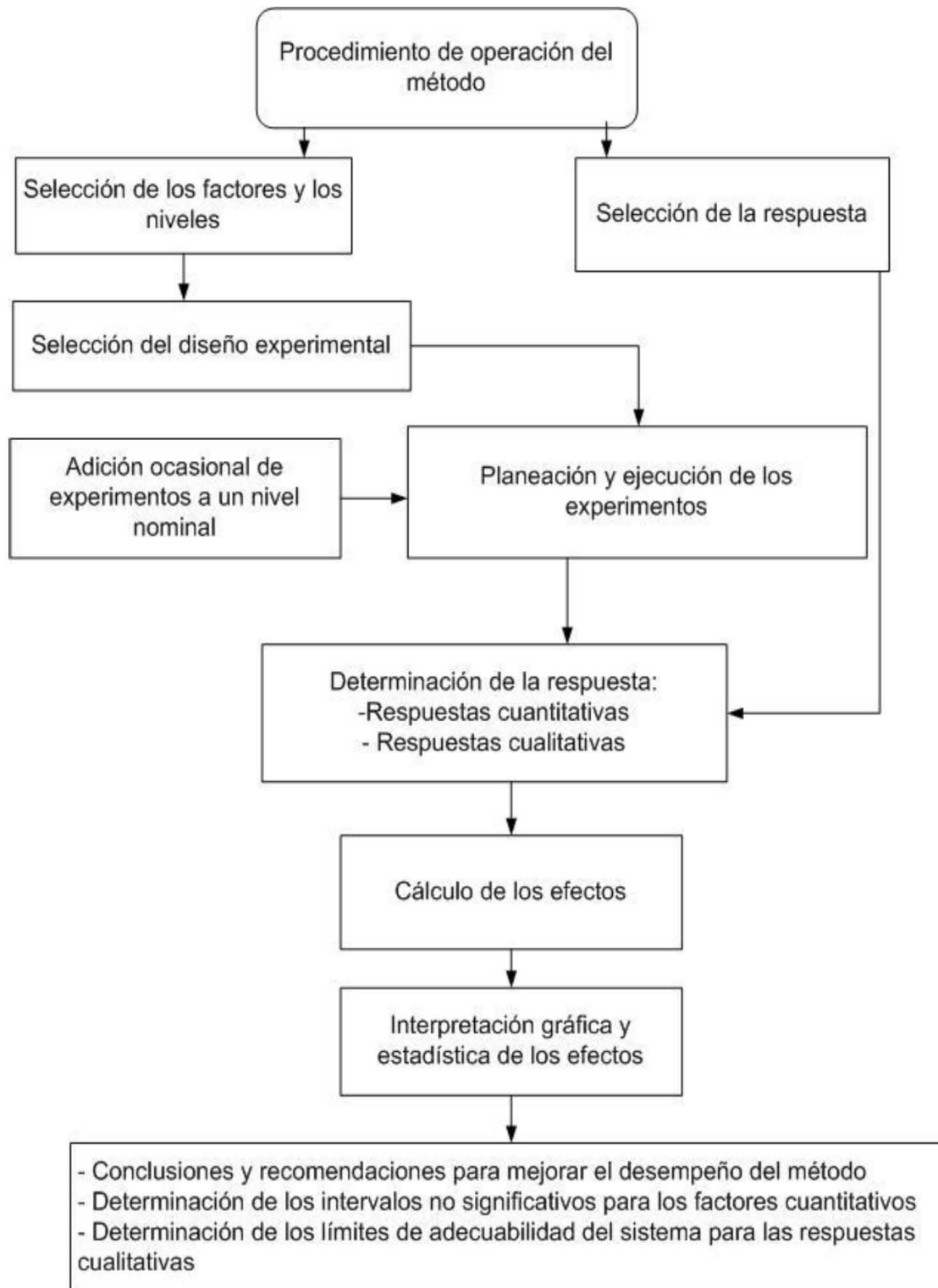
nominales. Este procedimiento univariable no se recomienda para evaluar la robustez, la principal razón es que cuando los factores son examinados en ciertos intervalos, los efectos se evalúan en un dominio muy pequeño alrededor de los niveles nominales.

Por otro lado, cuando se aplica un diseño de experimentos, el efecto de un factor dado es calculado en varios niveles de combinación de los otros factores. Además este procedimiento permite estimar el efecto de las interacciones.

En el diseño de experimentos se pueden distinguir los siguientes pasos <sup>6</sup>:

1. Selección de los factores y sus niveles,
2. Selección de un diseño experimental,
3. Selección de las respuestas,
4. Planeación y ejecución de los experimentos, medición de las respuestas,
5. Cálculo del efecto de los factores sobre las respuestas,
6. Interpretación gráfica y estadística de los efectos,
7. Establecer conclusiones químicas relevantes y si es necesario tomar precauciones para mejorar el desempeño del método, determinar los intervalos no-significativos para los factores cuantitativos y definir los límites de adecuabilidad del sistema para ciertas respuestas cualitativas. Una respuesta cuantitativa puede variar en una escala continua y se refiere a respuestas como concentración y porcentajes de recobro, mientras una respuesta cualitativa se distingue por adoptar valores discretos, como la calidad de una separación cromatográfica o la velocidad de un análisis.

Los diferentes pasos están representados en la figura 2, y son explicados brevemente a continuación.



**Figura 2.-**Representación esquemática de los diferentes pasos en una prueba de robustez



## 1. Selección de las respuestas

Los factores a evaluar deben ser aquellos que tengan la mayor probabilidad de afectar los resultados analíticos cuando se modifican condiciones como laboratorios, instrumentos o analistas.<sup>7</sup>

En general, los factores son examinados en dos niveles, los factores elegidos en el intervalo deben representar la variabilidad que puede ocurrir en el procedimiento analítico. El intervalo seleccionado también depende de la elección y la experiencia del analista. Básicamente, cualquier intervalo que exceda el error experimental (incertidumbre) en un factor puede usarse para el extremo de los niveles. Sin embargo, entre más amplio es el intervalo, la probabilidad de que el factor tenga un efecto significativo sobre la respuesta es mayor<sup>6</sup>.

## 2. Selección de un diseño experimental

La influencia de los factores sobre la respuesta es evaluada mediante un diseño experimental. En pruebas de robustez, se utilizan diseños de dos niveles, como los diseños factoriales o tipo Plackett-Burman. Los diseños factoriales completos ( $N=2^f$ ) se utilizan procurando no exceder de cuatro el número de factores<sup>5</sup>. Los diseños pueden ser contruidos manualmente por el analista o mediante el uso de programas informáticos (Excel, Statgraphics, entre otros).

## 3. Selección de las respuestas

Las respuestas pueden representar aspectos cuantitativos del método como concentración o por ciento de recobro de los compuestos. Un método es considerado robusto cuando ninguno de los factores tiene un efecto significativo en la respuesta. Asimismo, las mediciones cualitativas proporcionan información sobre la calidad de la separación en el método y también ayudan a definir los límites de adecuabilidad del sistema.



#### 4. Planeación y ejecución de los experimentos

Los experimentos son definidos al reemplazar los niveles (-1, 0, +1) teóricos por los factores reales. Es aconsejable realizar la experimentación de manera aleatoria, de este modo se minimizan algunas influencias que están en función del tiempo.

#### 5. Cálculo del efecto de los factores sobre la respuesta

El efecto de los factores es calculado a partir de las respuestas, y es estimado con la siguiente fórmula <sup>6</sup>,

$$Ex = \frac{\sum Y(+1) - \sum Y(-1)}{N/2}$$

Donde:

- $\sum Y(+1)$  y  $\sum Y(-1)$ : Representan la suma de las respuestas cuando el factor  $X$  se encuentra en los niveles (+1) y (-1)
- $N$ : Es el número de experimentos

#### 6. Interpretación gráfica y estadística de los efectos

Los efectos estimados se grafican e interpretan estadísticamente, para determinar su significancia. Los métodos estadísticos llevan al cálculo del efecto crítico,  $E_c$ . Los efectos con un valor absoluto mayor o igual a la  $E_c$  son considerados *significativos*. Por lo general, una prueba de  $t$  o un análisis ANOVA son usados para estimar el efecto crítico <sup>7</sup>.



## 7. Conclusiones químicas relevantes

Se establecen conclusiones químicas relevantes y si es necesario se toman las medidas pertinentes para mantener el funcionamiento del equipo.

Cuando los efectos significativos se encuentran en las respuestas cuantitativas y el método es considerado como no robusto, se pueden calcular los intervalos no significativos. Así los niveles de estos factores pueden ser limitados a intervalos más estrechos.

Puede realizarse una prueba de adecuabilidad del sistema para evaluar el desempeño del método, por ejemplo, cuando el método se aplica por primera vez en un laboratorio o cuando es utilizada una nueva columna.

### 3.3 Análisis de Robustez en Cromatografía de líquidos de Alta resolución

#### 3.3.1 Proceso cromatográfico

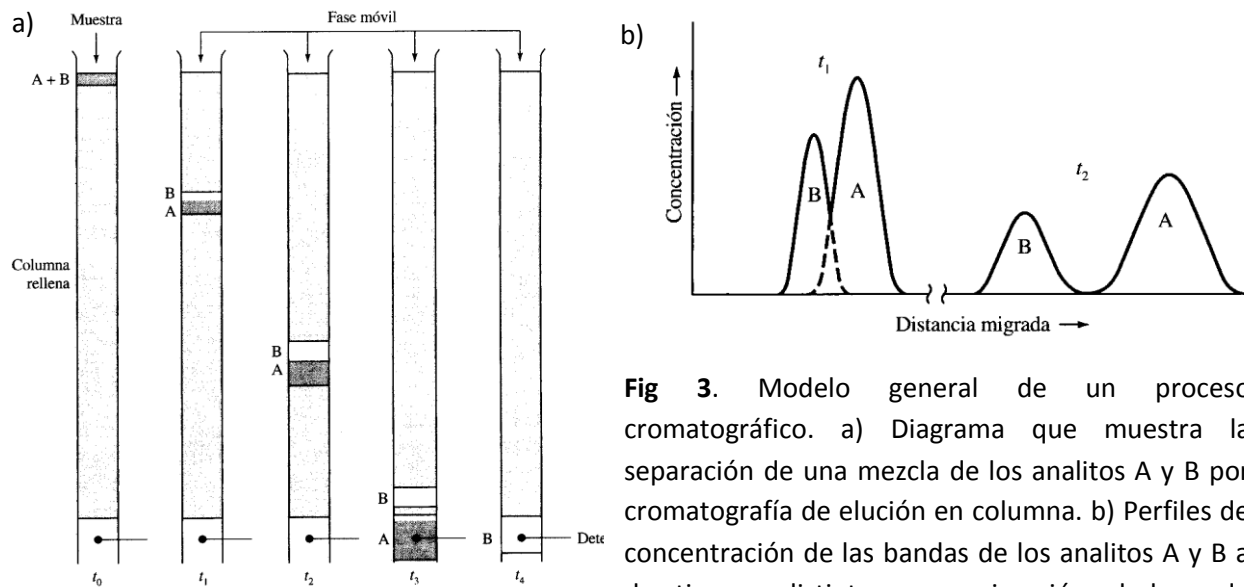
La cromatografía de líquidos de alta resolución, es la técnica principal para el análisis de una amplia variedad de muestras dentro de la industria farmacéutica. Es el método de elección para la evaluación de la pureza de nuevas entidades químicas, análisis de nuevas formulaciones y el control de calidad en el producto final <sup>10</sup>

Hay dos aspectos que comprenden la teoría de la cromatografía de líquidos de alta resolución:

1. **La cinética de migración de los analitos**, la cual es responsable de los fenómenos de ensanchamiento de las bandas cromatográficas.



2. **El equilibrio termodinámico**, el cual gobierna los fenómenos de retención de los analitos en la columna.



**Fig 3.** Modelo general de un proceso cromatográfico. a) Diagrama que muestra la separación de una mezcla de los analitos A y B por cromatografía de elución en columna. b) Perfiles de concentración de las bandas de los analitos A y B a dos tiempos distintos en su migración a lo largo de la columna.

Desde el punto de vista de la química analítica, los factores como el tamaño de partícula, viscosidad, composición, pH, y velocidad de flujo de la fase móvil, así como el pKa y peso molecular del analito están presentes en la cromatografía de líquidos independientemente del tipo de separación involucrado. Estos últimos factores se pueden agrupar en función de la fase estacionaria y de la fase móvil.<sup>10</sup>

- a. **La fase estacionaria:** consiste en pequeñas moléculas cargadas de manera positiva o negativa dependiendo de los grupos funcionales que estén presentes y forman parte del material de empaque de las columnas cromatográficas. Aquí, factores como **la longitud de la columna** y el **tamaño de partícula** repercuten directamente sobre los tiempos de retención y en la resolución de los analitos.
- b. **La fase móvil:** es la solución que transporta al analito. Esta solución es bombeada hacia la fase estacionaria hasta que se alcance un equilibrio termodinámico entre la fase estacionaria y la fase móvil.



Para mejorar la separación de los analitos, será necesario controlar el **pH** de la fase móvil y el tipo de elución (**isocrática** o en **gradiente**)

Existen 6 respuestas principales que se utilizan para describir el desempeño de un sistema cromatográfico, la columna y la separación en particular:

1. Tiempo de retención ( $t_r$ )
2. Factor de retención ( $k'$ )
3. Factor de selectividad ( $\alpha$ )
4. Resolución ( $R_s$ )
5. Factor de coeio ( $T$ )
6. Eficiencia ( $N$ )

### 1. Tiempo de retención ( $t_r$ )

El tiempo de retención ( $t_r$ ) es el tiempo medido entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto enésmiso (máxima señal). La distancia entre este máximo de la señal y la línea base es la altura del pico ( $h_n$ ) en cuestión.<sup>11</sup> De acuerdo con el modelo de Horváth, el tiempo de retención está en función de todos los mecanismos de interacción entre el analito, la fase estacionaria y la fase móvil. En la cromatografía de fase reversa la retención se debe a la repulsión de las regiones hidrofóbicas tanto de la molécula del analito como de la fase estacionaria hacia las regiones polares de la fase móvil, dando como resultado una asociación entre el analito y la fase estacionaria.<sup>12</sup>

### 2. Factor de retención ( $k'$ )

El factor de retención se define como el número de moléculas de analito en la fase estacionaria ( $N_s$ ) en relación con aquellas moléculas de analito en la fase móvil ( $N_m$ ).

$$k' = \frac{N_s}{N_m}$$

La medición de  $k'$  es una operación muy frecuente, ya que su valor se emplea tanto para evaluar la retención como para ajustar la separación de los analitos. Así, el valor de  $k'$  se



regula entre 2 y 10 para mezclas de pocos componentes, ó entre 0.5 y 20 si fuera necesario alojar un gran número de picos.<sup>13</sup> La ecuación que describe este parámetro también puede escribirse en función de los tiempos de retención del analito y del tiempo muerto:

$$k' = \frac{t_1 - t_0}{t_0}$$

Donde:

$t_1$ : Tiempo de retención del analito

$t_0$ : Tiempo muerto

Por lo tanto, el factor de capacidad ( $k'$ ) indica el grado de interacción del analito con la fase estacionaria y su valor puede ajustarse modificando la fuerza de elución de la fase móvil hasta que el valor del factor de capacidad ( $k'$ ) se encuentre dentro del intervalo de 2 a 10. Tenemos que:

- **En fase reversa,  $k'$**  disminuye al aumentar la proporción del compuesto orgánico (MeOH, ACN, THF) y aumenta al incrementar la proporción de agua.
- **En fase normal,  $k'$**  disminuye al aumentar la proporción de solvente polar y aumenta al incrementar la proporción del solvente no polar.

También, la variación del pH de la fase móvil puede aumentar o disminuir  $k'$  de acuerdo a las características ácido-base del analito.<sup>11</sup> Para columnas empacadas a base de sílice, el intervalo de pH recomendado es entre 2.5 y 7.5, por lo que valores por afuera de este intervalo darán como resultado la remoción de los grupos silanol, lo que originaría la degradación o destrucción del material de empaque de la columna.<sup>12</sup>

Sin embargo, la principal desventaja de utilizar  $k'$  como parámetro para describir el grado de retención radica en la dificultad de medir con exactitud a  $t_0$ . Por lo que es necesario hacer uso de sustancias que no son retenidos por la columna y que por consecuencia indican el valor aproximado de  $t_0$ , tales sustancias pueden ser acetona, uracilo o *N,N*-dimetilformamida<sup>12</sup>.



### 3. Factor de Selectividad ( $\alpha$ )

La retención relativa, es la medida de la ubicación relativa de 2 picos cromatográficos. No es necesario reportar este parámetro siempre y cuando la resolución ( $R_s$ ) se indique. La retención relativa se describe mediante la ecuación:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

Donde:

$k'_2$ : Factor de retención para la especie más fuertemente retenida.

$k'_1$ : Factor de retención para la especie que eluye con más rapidez.

Teóricamente, se puede alcanzar una alta selectividad en la cromatografía de fase reversa cuando la diferencia de polaridades entre la fase móvil y la fase estacionaria es muy grande. Los cambios en la selectividad pueden ser producidos por diferentes fases estacionarias, estos cambios se ven acentuados si las diferencias en las estructuras de los analitos están asociados con grupos funcionales polares; por ejemplo, -OH, -C=O, -COOH, -NR<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>, etc. La selectividad de los compuestos que contengan grupos funcionales no polares (-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>, -Cl<sub>2</sub>, -Br, etc.) son menos sensibles a los cambios tanto en la fase móvil como en la fase estacionaria.<sup>12</sup>

### 4. Resolución ( $R_s$ )

La resolución ( $R_s$ ) es la medida de qué tan bien están separados dos picos cromatográficos adyacentes. Este es un parámetro muy útil cuando en los cromatogramas se hallan señales que pueden llegar a causar interferencia en la determinación del analito. La resolución se describe mediante la ecuación:<sup>11</sup>

$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{0.5 (W_1 + W_2)}$$

Donde:

$t_{r1}$ : Tiempo de retención del primer analito

$W_1$ : Ancho de la base del pico 1

$t_{r2}$ : Tiempo de retención del primer analito

$W_2$ : Ancho de la base del pico 2



Entre las causas más frecuentes que dan como resultado una pobre resolución son: baja eficiencia de la columna, baja selectividad y una inadecuada retención; por tal motivo, es importante reconocer qué factor contribuye en mayor grado a una resolución deficiente; ante esto, la forma más fácil de mejorar la resolución es manipulando el factor de capacidad ( $k'$ ), el cual puede a su vez modificarse cambiando el índice de polaridad de la fase móvil; en este caso, el ajuste de la polaridad se consigue con facilidad utilizando fases móviles consistentes en mezclas de dos disolventes. Muchas veces, en las separaciones en fase inversa, se emplea una mezcla de disolventes formada por agua y un disolvente orgánico polar.<sup>14</sup>

## 5. Factor de coleo (T)

La exactitud de la cuantificación de una analito disminuye cuando se incrementa el coleo de un pico cromatográfico; luego entonces, se dificulta el cálculo del área bajo la curva del pico, debido a que el programa de integración no encuentra dónde y cuándo termina el pico, aún cuando las variables de integración sean programadas por el analista.<sup>11</sup>

El coleo de los picos se presenta a menudo con aquellos analitos de carácter básico que interactúan con los grupos silanol de las superficies hidrocarbonadas de las fases estacionarias, provocando una baja reproducibilidad en los tiempos de retención, así como picos asimétricos. En este sentido, se han propuesto distintos mecanismos que provocan este tipo de interacciones:

1. Como resultado de interacciones electrostáticas entre la forma ionizada del analito y los grupos silanol.
2. Como resultado de enlaces de hidrógeno entre el analito y la forma neutra de los grupos silanol. Esta última forma de interacción predomina con valores de pH bajos, debido a que el grupo silanol posee un valor de  $pK_a$  de entre 4 y 6 (ácido débil).

Tales interacciones pueden ser reducidas de manera efectiva al incorporar iones metálicos tales como  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  o  $Ca^{2+}$  a la fase móvil en concentraciones altas (100-500mM).<sup>12</sup>



El factor de coleo se describe como:

$$T = \frac{W_x}{2f}$$

Donde  $W$  es el ancho del pico medido al 5% de altura y  $f$  es la distancia entre el frente del pico y el pico máximo al 5 % de altura.

## 6. Número de platos teóricos ( $N$ )

El número de platos teóricos se describe con la siguiente ecuación:

$$N = 16 \left[ \frac{t_r}{t_w} \right]^2 = \frac{L}{H}$$

Donde:

$t_r$ : Tiempo de retención

$L$ : Longitud de la columna

$t_w$ : Ancho de la base del pico

$H$ : Altura equivalente a un plato teórico

Este parámetro es una medida de la eficiencia de la columna, esto es, cuantos picos pueden ser localizados por corrida-tiempo del cromatograma.<sup>11</sup>

Dentro de los factores que pueden afectar el número de platos teóricos se incluyen, el tamaño de partícula, velocidad de flujo de la fase móvil, la temperatura de la columna, viscosidad de la fase móvil y peso molecular del analito.

Se considera que los sistemas cromatográficos más convenientes son aquellos en los que emplean columnas con alta eficiencia; esto se puede lograr incrementando la longitud de la columna o disminuyendo el tamaño de partícula. Desafortunadamente, ambas aproximaciones están limitadas a la caída de la presión a través de la columna, la cual es proporcional a la longitud de la columna e inversamente proporcional al tamaño de partícula del material de empaque. En 1977 Bristow y Knox<sup>12</sup> llegaron a la conclusión que para lograr una mejor eficiencia de la columna y un tiempo de análisis adecuado, se necesita utilizar columnas relativamente cortas ( $L = 20-40$  mm) con un material de empaque que contenga un tamaño de partícula entre 1 y 2  $\mu\text{m}$ . Tales columnas pueden generar entre 5000 a 8000 platos teóricos bajo una presión de 300 psi. Comúnmente en la cromatografía de líquidos se utilizan



columnas de 10 o 15 cm de longitud con un material de empaque de 3  $\mu\text{m}$  o 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula.

**Tabla 2.** Parámetros y límites para la adecuabilidad del sistema

Parámetro	Límite o recomendación
Factor de capacidad ( $k'$ )	El pico cromatográfico del analito debe de estar bien resuelto con respecto a los demás picos; generalmente $k'$ debe ser $> 2$
Factor de selectividad ( $\alpha$ )	No es esencial siempre y cuando se indique la resolución
Resolución ( $R_s$ )	$R_s$ mayor a 2 entre el pico de interés y la señal más cercana (estándar interno, impureza, producto de degradación, excipiente, etc)
Factor de coleo ( $T$ )	$T < 2$
Platos teóricos ( $N$ )	Generalmente debe ser mayor a 2000

### 3.3.2 Factores controlables y respuestas cromatográficas.

La mayoría de los preparados farmacéuticos se analizan por HPLC o cromatografía de gases. Muchos casos de estudio de la robustez están descritos en la literatura <sup>7, 15-17</sup>. Los principales factores y respuestas que se seleccionan para las pruebas de robustez se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3.-** Factores y respuestas examinados en pruebas de Robustez

FACTOR	RESPUESTA
– Concentración de Buffer	– Concentración o % de recobro en los componentes.
– Composición de la fase móvil	– Resolución
– pH de la fase móvil o del Buffer	– Tiempo de retención
– % de aditivos básicos en la fase móvil	– Factor de retención
– Velocidad del flujo	– Selectividad
– Columna cromatográfica	– Forma del pico: factor de simetría, asimetría y de coleo
– Temperatura de la columna	– Área, altura y ancho del pico
– Pendiente en el gradiente	– Reproducibilidad
– Tiempo de equilibrio	– Número de platos teóricos
– Tiempo de inicio del gradiente	– Ruido de fondo
– Longitud de onda del detector	
– Factores en el tratamiento de la muestra	



La mayoría de los factores seleccionados están relacionados con la fase móvil, otros factores están relacionados a la columna cromatográfica (tipo, lote, fabricante), la temperatura y la longitud de onda también son evaluados. La concentración, contenido o el recobro de los compuestos son seleccionados para evaluar los aspectos cuantitativos de los métodos por HPLC. Para investigar las características cualitativas comúnmente se eligen el tiempo de retención, resolución entre los picos y los factores de retención.

La construcción y análisis del diseño puede realizarse “manualmente” en hojas de cálculo (Excel) o mediante la aplicación de paquetes computacionales como Statgraphics, SAS, Modde, Nemrod etc.

Los diseños experimentales y los métodos de interpretación más utilizados para el análisis de Robustez se resumen en la Tabla 4

**Tabla 4.-** Diseños experimentales y criterios de interpretación para el análisis de la Robustez en métodos por HPLC

Tipo de diseño experimental	Interpretación	
	Gráfica	Estadística
Diseño factorial completo $2^3$	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Gráfico de probabilidad normal</li> <li>– Gráfico de superficie de respuesta</li> <li>– Gráfico de Pareto estandarizado</li> <li>– Gráfico de probabilidad normal media</li> <li>– Gráfico de barras con valor límite</li> </ul>	Prueba de t-student
Diseño factorial completo $2^4$		ANOVA
Diseños factoriales fraccionados $2^{4-2}$		Algoritmo de Lenth
Diseños factoriales fraccionados $2^{4-1}$		Algoritmo de Dong
Diseños factoriales fraccionados $2^{6-3}$		
Diseños factoriales fraccionados $2^{7-4}$		
Diseños factoriales fraccionados $2^{5-1}$		
Diseños factoriales fraccionados $2^{9-5}$		
Diseño tipo Plackett-Burman		
Diseños factoriales asimétricos $4 \times 2^{12}$		

**Diseños Factoriales completos.-** Los efectos son estimados aplicando una regresión multivariable. Después los resultados son analizados a través de gráficos de superficie, Pareto estandarizado y análisis de ANOVA.

Los diagramas de Pareto estandarizado muestran una barra para cada efecto, ordenados del más al menos importante. La longitud de las barras es igual a los efectos





estandarizados de cada factor. Una línea vertical corresponde al valor crítico, por lo general con un nivel de significancia  $\alpha=1$ . Todas las barras que exceden esta línea son consideradas estadísticamente significativas.<sup>5</sup>

### 3.4 Robustez como parámetro de desempeño en validación de métodos analíticos

Dentro de la industria farmacéutica es de gran importancia demostrar que un método analítico es adecuado para cuantificar un analito en particular y por lo tanto, necesita ser validado con el fin de asegurar la calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos.

La ICH establece los parámetros y requerimientos que debe cumplir la validación de un método analítico en función de su aplicación analítica; dentro de tales parámetros la robustez involucra los aspectos relacionados al proceso de preparación de la muestra y al analista. En la tabla 5 se indican los parámetros necesarios en la validación de métodos analíticos.

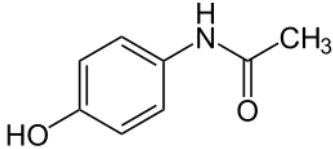
**Tabla 5.** Parámetros establecidos por la ICH con los que debe cumplir un método analítico en función de su aplicación analítica.

PARÁMETRO DE DESEMPEÑO	CONTENIDO/ POTENCIA / VALORACIÓN	PRUEBAS DE IMPUREZA		IDENTIFICACIÓN
		CONTENIDO/VALORACIÓN	LÍMITE	
<b>ESPECIFICIDAD</b>	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
<b>RANGO</b>	SÍ	SÍ	NO	NO
<b>LINEALIDAD</b>	SÍ	SÍ	NO	NO
<b>EXACTITUD</b>	SÍ	SÍ	NO	NO
<b>PRECISIÓN</b>	SÍ	SÍ	NO	NO
<b>Repetibilidad</b>	SÍ	SÍ	NO	NO
<b>Precisión intermedia</b>	SÍ	SÍ	NO	NO
<b>LÍMITE DE DETECCIÓN</b>	NO	NO	SÍ	NO
<b>LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN</b>	NO	SI	NO	NO
<b>ROBUSTEZ</b>	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ



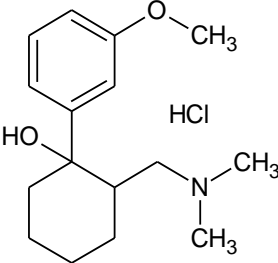
### 3.5 Propiedades de los principios activos

#### 3.5.1 Paracetamol

<b>NOMBRE</b>	Paracetamol
<b>Fórmula molecular</b>	$C_8H_9NO_2$
<b>Fórmula estructural</b>	
<b>Nombre IUPAC</b>	<i>N</i> -(4-hidroxifenil) acetamida <sup>35</sup>
<b>Peso molecular</b>	284.74 [g/mol]
<b>Descripción</b>	Polvo cristalino blanco o casi blanco
<b>Intervalo de fusión</b>	125-126°C
<b>Solubilidad</b>	Poco soluble en agua fría y muy soluble en metanol.
<b>pka</b>	9.38
<b>Farmacología</b>	El mecanismo de acción aún no está claramente entendido, aunque hay suficiente evidencia que sugiere que actúa principalmente en el SNC por medio de la inhibición de la COX-1 y COX-2, ambas enzimas involucradas en la síntesis de prostaglandinas. <sup>19</sup>
<b>Indicación terapéutica</b>	Es el analgésico no esteroideo y antipirético más utilizado en el alivio temporal de la fiebre, cefaleas y dolores comunes. <sup>19</sup>
<b>Métodos de análisis</b>	En la literatura se encuentra bastante información con respecto a los métodos analíticos para la determinación de paracetamol en formulaciones farmacéuticas, ya sean tabletas, cápsulas, y soluciones orales; entre estos métodos se incluyen a la, fluorimetría, voltametría, espectrometría infrarroja, espectrofotometría, <i>flow injection análisis</i> , quimioluminiscencia, análisis electroquímico, espectrometría de masas, cromatografía de gases, electroforesis capilar, y titulometría. <sup>20</sup> La USP establece la determinación de paracetamol mediante HPLC con una solución MeOH/Agua 3:1 en columnas C <sub>8</sub> , con detección UV a 243 nm. <sup>8</sup>



## 3.5.2 Tramadol HCl

<b>NOMBRE</b>	Tramadol HCl
<b>Fórmula molecular</b>	$C_{16}H_{26}ClNO_2$
<b>Fórmula estructural</b>	
<b>Nombre IUPAC</b>	(1R,2R)-2-[(dimetilamino)metil]-1-(3-metoxifenil)ciclohexan-1-ol clorhidrato <sup>35</sup>
<b>Peso molecular</b>	299.83614 [g/mol]
<b>Descripción</b>	Polvo cristalino blanco o casi blanco
<b>Intervalo de fusión</b>	180-184°C
<b>Solubilidad</b>	Muy soluble en agua y metanol, ligeramente soluble en acetona. <sup>8</sup>
<b>pka</b>	9.41
<b>Farmacología</b>	Analgésico central que consiste en dos enantiómeros, ambos contribuyen en la actividad analgésica por diferentes mecanismos. (+)-Tramadol es un agonista de los receptores opioides tipo $\mu$ e inhibe la recaptura de serotonina, mientras que (-)-Tramadol inhibe la recaptación de norepinefrina, aumentando los efectos inhibitorios del dolor en la espina dorsal <sup>21</sup> .
<b>Indicación terapéutica</b>	Para el tratamiento del dolor postraumático moderado a severo, y para el manejo del dolor neuropático. <sup>21-24</sup>
<b>Métodos de análisis</b>	Tramadol HCl ha sido determinado en diferentes matrices usando una variedad de técnicas analíticas incluyendo HPLC <sup>21-24</sup> , cromatografía de gases, cromatografía de capa delgada, electroforesis capilar, voltimetría entre otras. El análisis por HPLC ha involucrado el uso de diferentes fases estacionarias además de las tradicionales $C_{18}$ y de diferentes composiciones en la fase móvil.



### 3.5.3 Análisis de la mezcla de los principios activos

El tratamiento del dolor multimodal es la combinación de dos o más fármacos y/o métodos analgésicos, con el fin de potenciar la analgesia y disminuir los efectos colaterales. El concepto de analgesia multimodal a pesar de no ser nuevo, está cobrando cada día más vigencia. Distintos laboratorios farmacéuticos han formulado una serie de mezclas de medicamentos para su empleo en el tratamiento de dolor agudo y postoperatorio. Una de estas mezclas es la combinación Paracetamol-Tramadol HCl que permite el tratamiento sintomático del dolor moderado a intenso, agudo y crónico, con una amplia ventana terapéutica, permitiendo reducir la dosis de Tramadol HCl necesarias<sup>25-26</sup>. Esta combinación fármacos está indicada en el tratamiento del dolor postoperatorio, migrañas y traumatismos musculoesqueléticos y en todas aquellas condiciones que se encuentran acompañadas de contractura muscular.

Se han reportado diversos métodos analíticos para la determinación individual de los dos componentes (Paracetamol y Tramadol HCl) en distintas matrices farmacéuticas. La determinación simultánea de **Paracetamol y Tramadol HCl** ha sido publicada en algunos trabajos de investigación, en los cuales se han desarrollado diferentes métodos cromatográficos por HPLC para su cuantificación en tabletas<sup>27-28</sup>. *Belal et al.*<sup>22</sup> utiliza para su separación una fase móvil de solución amortiguadora de fosfatos 0.05M (pH 6.3) y ACN (90:10) en una columna C<sub>18</sub> (150 mm X 4.6 mm, 5 µm); mientras que *M. J. Córzar*<sup>29</sup> utiliza una fase móvil compuesta por K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.04M (pH 3.0): ACN (80:20); ambos métodos han resultado ser precisos, exactos y lineales en las condiciones planteadas.

Se han propuesto otros procedimientos de cromatografía por HPLC en fase reversa para el análisis de la combinación Paracetamol-Tramadol HCl, como se muestra en la tabla 6.

**Tabla 6.-** Condiciones cromatográficas para el análisis simultáneo de Paracetamol y Tramadol HCl

Columna	Composición de la fase móvil	Referencia
Intersil-ODS-3 (C <sub>18</sub> ) 5 µm 250mm X 4.6 mm	MeOH/K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (40:60) pH 4	[30]
Phenomenex (C18) 5 µm 250mm X 4.6 mm	ACN/ K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (45:55) pH 7.3	[31]
kromasil (C18) 5 µm 250mm X 4.6 mm	MeOH/ K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (40:60) pH 6.8	[32]



## 4. Desarrollo del estudio de robustez

### 4.1 Selección de niveles de los factores

Se evaluaron los factores potencialmente más significativos:

- A. pH de la fase móvil
- B. Longitud de la columna
- C. Tamaño de partícula de la fase estacionaria
- D. Tipo de gradiente

En la siguiente tabla se muestran los factores y sus respectivos niveles a estudiar:

**Tabla 7.-** Definición de los factores y sus niveles

Factor/nivel	(A) pH	(B) Longitud de la columna (cm)	(C) Tamaño de partícula $\mu\text{m}$	(D) Gradiente
Nivel bajo (-1)	3	5.0	1.8	1
Nivel alto (+1)	5	12.5	5	2

### 4.2 Elaboración del diseño

Se utilizó el software Statgraphics® para elaborar un diseño factorial  $2^4$ . El diseño completo consta de 16 corridas experimentales aleatorias, en cada una de las cuales se establece un conjunto particular de condiciones de los cuatro factores.

Las corridas experimentales 3, 4, 11 y 12 fueron omitidas del diseño ya que comercialmente no se pueden contar con columnas de tamaño de partícula de  $1.8 \mu\text{m}$  y de longitud de 12.5.

El diseño se reproduce a su vez en un segundo bloque. (Tabla 8)

**Tabla 8.-** Diseño experimental  $2^4$  para el estudio de robustez

Bloque	Corrida		(A) pH	(B) Longitud de la columna (cm)	(C) Tamaño de partícula $\mu\text{m}$	(D) Gradiente
1	1	-1	3	5	1.8	1
1	2	a	7	5	1.8	1
1	3	b	3	12.5	1.8	1
1	4	ab	7	12.5	1.8	1
1	5	c	3	5	5	1
1	6	ac	7	5	5	1
1	7	bc	3	12.5	5	1
1	8	abc	7	12.5	5	1
1	9	d	3	5	1.8	2
1	10	ad	7	5	1.8	2
1	11	bd	3	12.5	1.8	2
1	12	abd	7	12.5	1.8	2
1	13	cd	3	5	5	2
1	14	acd	7	5	5	2
1	15	bcd	3	12.5	5	2
1	16	abcd	7	12.5	5	2

### 4.3 Ejecución del diseño

Para la realización de las corridas se empleó el siguiente equipo:

#### 4.3.1 Equipo

- Balanza Analítica Ohaus
- Parrilla de termoagitación.
- Potenciómetro Hanna Instruments
- Fuente de agua desionizada
- Sistema cromatográfico Agilent Series 1050
  - Bomba cuaternaria
  - Automuestreador 79855<sup>a</sup>
  - Detector con arreglo de diodos



- Columnas cromatográficas:

**Tabla 9.-** Columnas cromatográficas

	Agilent ZORBAX® Eclipse XDB C18	MERCK LichroCART® C18	AGILENT ZORBAX® Extended C18
Tamaño de partícula	1.8 µm	5 µm	5 µm
Dimensiones	4.6 mm x 50 mm	4 mm x 125 mm	4.6mm x50mm
Forma de partícula	esférica	esférica	esférica
Tamaño de poro	80 A	90 A	80 A
Carga de carbono	10 %	17 %	12.5%
Rango de pH	2.0-9.0	2.0-8.0	2.0-11.5
Límite de temperatura	60 °C	60 °C	60 °C
Descripción	Resolución rápida HT	Analítica	Analítica
Aplicaciones	Compuestos básicos, ácidos y neutros desde un pH 2-9	Compuestos básicos, separaciones analíticas con fases móviles neutras	Separación de compuestos básicos, ácidos y neutros a pH alto: hasta 11.5

#### 4.3.2 Preparación de las soluciones

##### **Solución diluyente: Metanol grado cromatográfico – Agua purificada (80:20)**

Transferir a un vaso de precipitados de 1000 mL, 800 mL de metanol grado cromatográfico y 200 mL de agua purificada, medidos de forma independiente, tapar el vaso y mezclar mecánicamente durante 5 minutos, esperar a que la solución enfríe hasta alcanzar la temperatura ambiente antes de emplearla.

##### **Soluciones de referencia.**

##### **Solución de referencia de Paracetamol.**

Pesar con exactitud 40 mg de Paracetamol sustancia de referencia, y transferir de manera independiente a un matraz volumétrico de 20 mL, disolver y llevar a volumen con solución diluyente y mezclar (Soluciones R1, concentración  $\pm$  2 mg/mL de Paracetamol).



### **Solución de referencia de Tramadol HCl**

Pesar con exactitud 10 mg de Tramadol HCl sustancia de referencia, y transferir de manera independiente a un matraz volumétrico de 20 mL, disolver y llevar a volumen con solución diluyente y mezclar (Solución R2, concentración  $\pm 500 \mu\text{g/mL}$  de Tramadol HCl).

### **Soluciones de referencia de Analito 3.\***

**Solución stock de Analito 3.** Pesar con exactitud 10 mg de Analito 3 sustancia de referencia, y transferir de manera independiente a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y llevar a volumen con solución diluyente y mezclar. (1mg/mL)

Transferir una alícuota de 2 mL de la *solución stock del Analito 3* a un matraz, volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con solución diluyente y mezclar. (Solución R3, concentración  $\pm 20 \mu\text{g/mL}$  de Analito 3).

### **Solución de Referencia de Paracetamol, Tramadol HCl y Analito 3**

Pesar 40 mg de Paracetamol y 10 mg de Tramadol HCl sustancia de referencia, transferir a un matraz volumétrico de 20 mL, disolver con 10 mL de solución diluyente y adicionar una alícuota de 0.4 mL de la *Solución stock de Analito 3*; llevar a volumen con solución diluyente y mezclar. (Solución R4, concentración  $\pm 2 \text{ mg/mL}$  de Paracetamol,  $500 \mu\text{g/mL}$  de Tramadol HCl y  $20 \mu\text{g/mL}$  de Analito 3).

**\*Analito 3:** *Se reserva el nombre de la sustancia por cumplimiento de convenio de confidencialidad Facultad de Química-Industria.*





### 4.3.3 Parámetros instrumentales

**Fase móvil** (Solución amortiguadora de fosfatos): Pesar 7.1 g de fosfato de sodio dibásico y transferirlos a un matraz volumétrico de 1000 mL, adicionar aproximadamente 800 mL de agua purificada y agitar mecánicamente hasta disolución total. Ajustar el pH a un valor de  $3.00 \pm 0.05$  ó  $7.00 \pm 0.05$  con ácido fosfórico concentrado de acuerdo a las condiciones indicadas en cada corrida. Llevar a volumen con agua purificada.

**Detector:** Se seleccionaron las longitudes de onda de 273 nm y 260 nm

**Tabla 10.-**Condiciones cromatográficas

Gradiente 1	Tiempo (minutos)	Solución amortiguadora (%)	Acetonitrilo (%)	Gradiente
	0 – 1.5	90	10	Isocrático
	1.5 – 4	90 → 30	10 → 70	Gradiente lineal
	4 – 6	30	70	Isocrático
	6 – 8	30 → 90	70 → 10	Gradiente lineal
	8 – 10	90	10	Re-equilibrio

Gradiente 2	Tiempo (minutos)	Solución amortiguadora (%)	Acetonitrilo (%)	Gradiente
	0 – 3.0	90	10	Isocrático
	3.0– 7	90 → 30	10 → 70	Gradiente lineal
	7– 8	30	70	Isocrático
	8– 10	30 → 90	70 → 10	Gradiente lineal
	10–12	90	10	Re-equilibrio

### 4.4 Metodología

Se ejecutaron las corridas analíticas bajo las condiciones establecidas y en el orden indicado en la tabla 12. Cada corrida se realizó de forma independiente, manteniendo constantes todas las otras condiciones establecidas en el método (materiales, reactivos, soluciones, etc.).

Para cada corrida analítica:

**Adecuabilidad del sistema.** Se inyectó por duplicado 20  $\mu$ L de la solución blanco (Solución diluyente). Posteriormente se inyectó por quintuplicado 20  $\mu$ L de la solución de referencia (R1) y se obtuvieron los correspondientes cromatogramas.



Cumplida la adecuabilidad del sistema se inyectaron por duplicado 20 $\mu$ L de las soluciones de referencia (R2 y R3).

Una vez ajustados los parámetros de operación se inyectaron por duplicado la solución R4 y se obtuvieron los correspondientes cromatogramas.

**Tabla 11.-** Secuencia de inyecciones para cada corrida analítica

Solución	Número de inyecciones
Solución blanco	2
Solución de referencia R1	5
Solución de referencia R2	2
Solución de referencia R3	2
Solución referencia R4	2

Se hizo el registro de las siguientes respuestas para cada corrida de la solución R4:

- Tiempo de retención
- Área
- Altura
- Resolución crítica
- Número de platos teóricos
- Simetría
- Ancho



## 5. Resultados y análisis de resultados

### 5.1 Resultados

Las respuestas determinadas en la prueba de Robustez son:

- Tiempos de retención de Paracetamol ( $Tr_P$ ) y Tramadol ( $Tr_T$ ),
- Simetrías de Paracetamol (sim P) y Tramadol (sim T)
- Número de platos teóricos de Paracetamol ( $N_P$ ) y Tramadol ( $N_T$ )
- Resolución del par crítico ( $R_C$ )
- Tiempos de análisis dado por el tiempo de retención de la última sustancia ( $T_A$ )

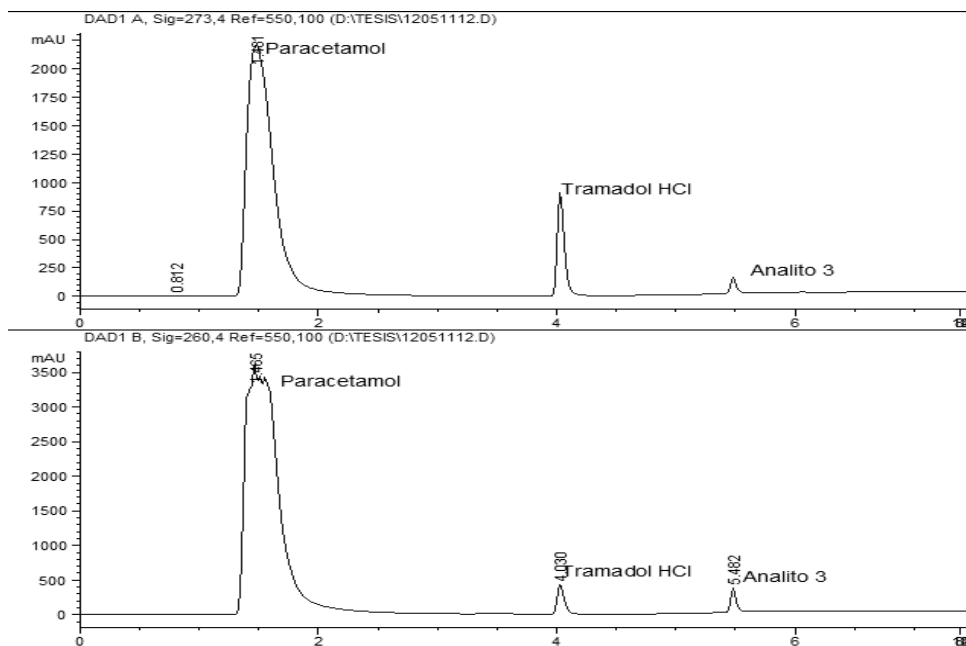
La tabla 12 resume los resultados calculados en cada una de las corridas del diseño. Los valores que se muestran son los promedios de las inyecciones de la solución mezcla R4.

Tabla 12.- Resultados promedio para cada respuesta

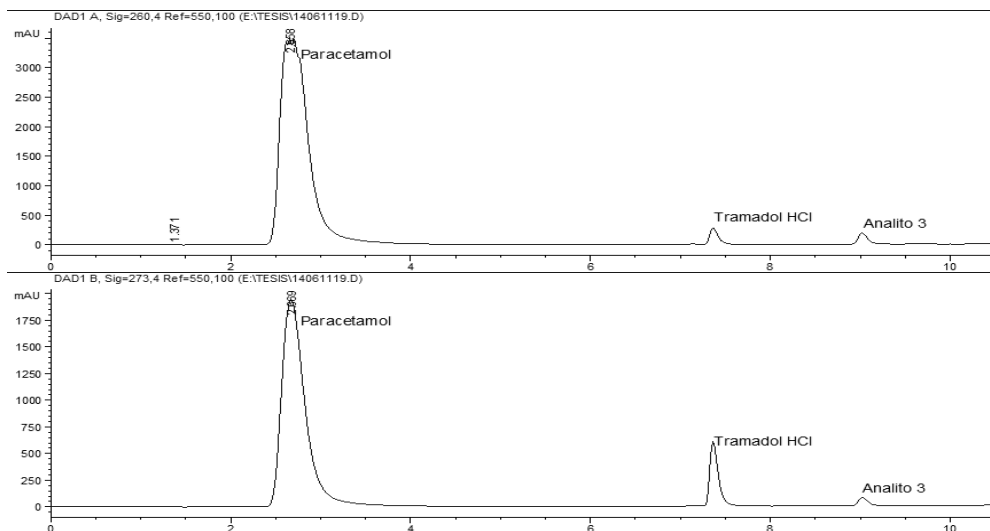
Bloque	Corrida	Factores				Respuestas							
		A: pH	B: Long. (cm)	C: Tp $\mu\text{m}$	D: Gradiente	R <sub>c</sub>	T <sub>A</sub>	sim P	sim T	N <sub>P</sub>	N <sub>T</sub>	Tr <sub>P</sub>	Tr <sub>T</sub>
1	1	3	5	1.8	1	15.14	5.47	0.58	0.53	224	21300	1.48	3.97
1	2	7	5	1.8	1	9.54	5.52	0.49	0.69	208	29468	1.57	4.54
1		3	12.5	1.8	1								
1		7	12.5	1.8	1								
1	3	3	5	5	1	9.12	5.57	0.60	0.51	176	17473	2.50	4.36
1	4	7	5	5	1	10.67	5.37	0.54	0.63	196	23357	1.59	4.26
1	5	3	12.5	5	1	11.44	6.36	0.59	0.65	546	22014.	2.58	4.66
1	6	7	12.5	5	1	19.37	11.99	0.60	0.83	516	2943	3.48	6.07
1	7	3	5	1.8	2	17.98	8.02	0.52	0.66	226	30573	1.70	5.86
1	8	7	5	1.8	2	11.17	7.95	0.60	0.37	217	15019	1.46	6.16
1		3	12.5	1.8	2								
1		7	12.5	1.8	2								
1	9	3	5	5	2	18.94	7.95	0.59	0.53	255	26469	1.52	5.61
1	10	7	5	5	2	11.14	8.23	0.53	0.81	226	21242	1.80	6.42
1	11	3	12.5	5	2	14.80	9.02	0.58	0.71	513	21979	2.69	6.38
1	12	7	12.5	5	2	9.41	9.02	0.56	0.69	232	23136	1.57	7.37
2	13	3	5	1.8	1	14.23	5.48	0.63	1.01	226	19155	1.48	4.03
2	14	7	5	1.8	1	10.64	5.49	0.5	0.69	217	22929	1.57	4.36
2		3	12.5	1.8	1								
2		7	12.5	1.8	1								
2	15	3	5	5	1	8.40	5.55	0.55	0.50	167	19450	2.64	4.45
2	16	7	5	5	1	10.67	5.43	0.54	0.63	193	24377	1.63	4.23
2	17	3	12.5	5	1	11.34	6.28	0.59	0.65	554	22009	2.63	4.66
2	18	7	12.5	5	1	27.96	12.93	0.58	0.62	494	7460	3.36	6.03
2	19	3	5	1.8	2	18.17	8.03	0.52	0.67	225	31349	1.70	5.85
2	20	7	5	1.8	2	10.03	7.93	0.61	0.39	216	14879	1.46	6.31
2		3	12.5	1.8	2								
2		7	12.5	1.8	2								
2	21	3	5	5	2	18.22	7.92	0.59	0.55	249	26021	1.54	5.65
2	22	7	5	5	2	10.94	8.27	0.53	0.83	222	20815	1.88	6.45
2	23	3	12.5	5	2	15.66	9.00	0.61	0.62	563	26251	2.59	6.33
2	24	7	12.5	5	2	8.34	8.98	0.61	0.64	598	31199	2.77	7.45



A continuación se muestran dos cromatogramas correspondientes a las corridas 1 y 12, respectivamente. El resto de los cromatogramas pueden consultarse en el Anexo 1



**Figura 4.-** Cromatogramas de la solución mezcla R4 de la corrida 1



**Figura 5.-** Cromatogramas de la solución mezcla R4 de la corrida 12



El primer compuesto en eluir es el Paracetamol seguido del Tramadol HCl, al final de la corrida se puede observar otro compuesto incluido dentro de la solución, esta último analito muestra el mayor tiempo de retención y corresponde al analito 3.

En la figura 4 y 5 se muestran el cromatogramas donde los factores han sido evaluados en su nivel inferior. Las señales se han monitoreado a 260 nm y 273 nm de longitud de onda.

La figura 5 exhibe los cromatogramas donde las condiciones de análisis han sido colocadas en su nivel superior. Se observa un desplazamiento en los tiempos de retención para los compuestos. El efecto anterior fue provocado por el aumento en el largo de la columna y el inicio del gradiente más tardío.

## 5.2 Análisis de la varianza para cada respuesta

Tabla 13.- Valores de F del efecto de los factores y sus interacciones sobre las respuestas analizadas.

Factores	Respuestas (valores de F)							
	R <sub>C</sub>	T <sub>A</sub>	Sim P	Sim T	N <sub>P</sub>	N <sub>T</sub>	Tr <sub>P</sub>	Tr <sub>T</sub>
A: pH	1.21	<b>8.66</b>	0.23	1.57	1.82	3.40	0.05	<b>68.16</b>
B: long	3.28	<b>21.80</b>	2.76	0.84	<b>69.00</b>	0.74	<b>14.99</b>	<b>89.85</b>
C: Tp	0.62	0.01	0.00	0.00	0.07	0.04	2.49	0.19
D: Gradiente	1.60	4.16	0.12	3.94	0.48	3.33	1.68	<b>284.86</b>
AB	4.28	8.39	1.13	2.06	1.35	1.17	1.36	<b>20.59</b>
AC	1.33	0.01	0.71	<b>11.11</b>	0.01	0.63	0.33	0.22
AD	<b>20.52</b>	<b>5.25</b>	2.70	0.20	0.53	0.65	0.10	1.33
BD	<b>14.35</b>	<b>8.42</b>	0.01	1.38	2.28	2.19	0.23	0.82
CD	1.27	0.01	0.06	<b>7.69</b>	0.56	0.18	1.17	0.32

Mediante un análisis de varianza (ANOVA) se estimó el efecto de los factores sobre las respuestas. La tabla 13 muestra en negritas aquellos factores que resultaron ser significativos ( $\alpha=0.05$ ,  $F_C= 4.54$ ).

Deliberadamente se optó por niveles amplios en los factores con el objetivo de optimizar el desempeño el método.



Se debe poner especial atención a los factores significativos ya que con estos se puede definir un espacio paramétrico satisfactorio donde el método analítico es robusto.

Las respuestas de mayor importancia para la mejora del método analítico deben de estar relacionadas con la calidad de la separación y el tiempo de análisis. El primero está relacionado con el desempeño del análisis, el segundo trata sobre el costo del análisis.

La resolución es un buen criterio para evaluar la calidad de la separación, el tiempo de retención del último analito está relacionado con el tiempo de análisis. Estas últimas respuestas ( $R_C$  y  $T_A$ ) son analizadas más profundamente en la siguiente sección, de tal modo que se determinan los niveles óptimos de cada factor que generan los resultados de mayor calidad.

El efecto de los factores sobre cada una de las respuestas fue analizado mediante el uso del software Statgraphics®.

### 5.3 Resolución del par crítico ( $R_C$ )

#### 5.3.1 Cálculo de los efectos

Los efectos estimados y las interacciones de los factores sobre la resolución ( $R_C$ ) se muestran en la Tabla 14. El resto de los efectos son trazados en orden decreciente de importancia en el Gráfico de Pareto estandarizado, en este último se representan los efectos divididos entre su error estándar. Los efectos que superan la línea del valor crítico son significativos.

Tabla 14.-Efectos estimados para resolución del par crítico ( $R_C$ )

<i>Efecto</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estd.</i>
<b>A:pH</b>	-1.54	1.40
<b>B:long</b>	2.53	1.40
<b>C:Tp</b>	-1.10	1.40
<b>D:Gradiente</b>	-1.76	1.40
<b>AB</b>	2.89	1.40
<b>AC</b>	1.61	1.40
<b>AD</b>	-5.16	1.40
<b>BD</b>	-5.29	1.40
<b>CD</b>	1.57	1.40
<b>bloque</b>	0.49	1.40

Errores estándar basados en el error total con 13 g.l.

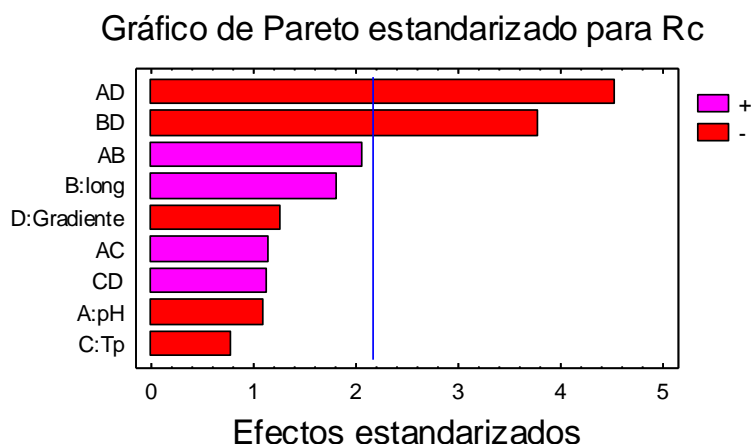


Figura 6.- Pareto estandarizado para  $R_c$

El diagrama de Pareto permite visualizar que la interacción AD de los factores pH y tipo de gradiente tiene el mayor impacto sobre la resolución del Tramadol, dicha interacción tiene un efecto negativo sobre la respuesta, esto se traduce que a valores bajos de pH en la fase móvil y de acuerdo al tipo de gradiente, la resolución aumenta de manera importante. Del mismo modo, la interacción BD afecta de manera significativa la resolución del par crítico.

Los efectos principales de los factores se representan en la Figura 6, en el eje horizontal se ubican los niveles de los factores y en el eje vertical se encuentra la media de la respuesta observada. Se aprecia que el efecto individual del largo de columna es mayor a los efectos del tamaño de partícula, gradiente y pH. Asimismo, se pueden deducir los siguientes hechos:

- una columna de mayor longitud aumenta la resolución entre los compuestos
- Un aumento en el pH disminuye la resolución
- Un tamaño de menor disminuye la resolución
- el gradiente 1 nos da una mejor separación de los analitos.

Los efectos de los factores estudiados han sido descritos ampliamente en la literatura. Por un lado la **longitud** está relacionada con el aumento de la fase estacionaria en la columna, a mayor longitud de columna hay un mayor número de platos teóricos. Un mayor número de platos teóricos mejora la separación entre los analitos.



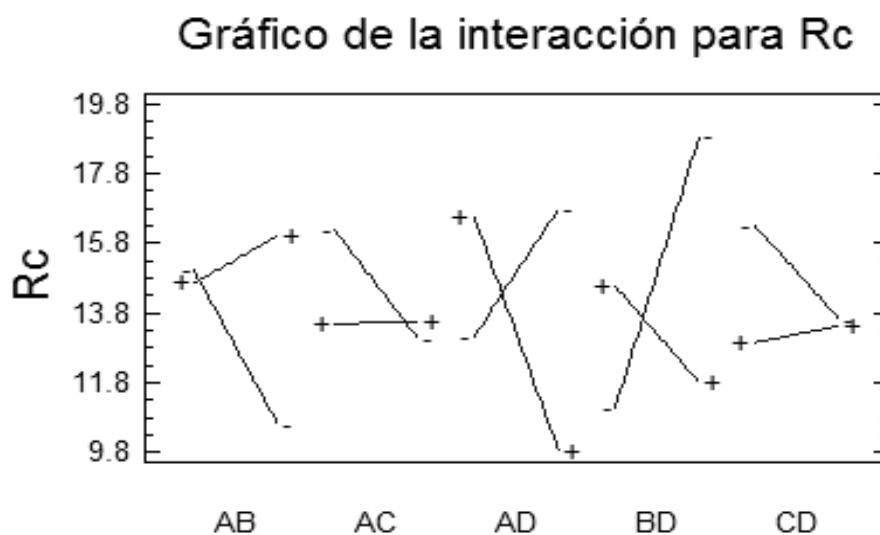


Existe una relación inversa entre el **tamaño de partícula** y el número de platos teóricos, aumentado estos cuando el tamaño de partícula es menor.

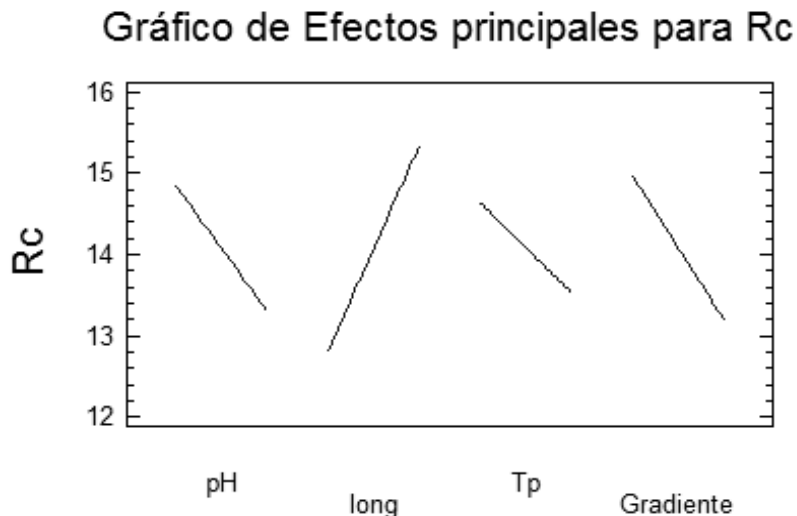
El **pH de la fase móvil**, al imponer el grado de ionización de las moléculas de los analitos en solución, tiene un efecto marcado sobre la distribución de las moléculas entre las dos fases, observándose una mayor resolución a medida en que los equilibrios iónicos de cada molécula sean diferentes.

La elución por **gradiente** disminuye la retención de los componentes que eluyen lentamente dando picos más estrechos para la mayoría de los componentes. De tal modo que es un factor que modifica la retención de los componentes al modificar la polaridad de la fase móvil.

El efecto de interacción de los factores se puede representar como en la figura 7, cuando existe interacción las líneas tienen una pendiente muy diferente, y si no hay interacción las líneas tienen pendientes muy similares. La figura 8 muestra interacción en todos los factores indicados. La interacción AD que tiene el efecto principal muestra que cuando el pH cambia su nivel inferior de 3 a 7, al aplicar el gradiente 1, la resolución ( $R_c$ ) aumenta. En otras palabras, el pH tiene un efecto positivo o negativo sobre  $R_c$ , dependiendo del tipo de gradiente que se utiliza.



**Figura 7.-** Efectos principales para la resolución crítica



**Figura 8.-** Interacciones para la resolución crítica

Del mismo modo, la interacción BD muestra que una columna de mayor longitud y el gradiente 1 mejoran la resolución entre las señales analíticas.

De esta manera, con efectos de interacción como el encontrado, si se quiere maximizar la resolución entre los analitos, no se puede modificar el pH sin tomar en cuenta que tipo de gradiente se está utilizando.

### 5.3.2 Análisis de varianza (ANOVA)

Para saber si los factores principales y las interacciones tienen un efecto estadísticamente significativo se requiere aplicar un análisis de varianza.

La tabla 15 de ANOVA divide la variabilidad de la  $R_C$  en distintos segmentos separados para cada uno de los efectos. Después se prueba la importancia estadística de cada efecto comparando la media al cuadrado contra una estimación del error experimental. En este caso, el efecto de interacción AD y BD tienen un valor F mayor al valor F crítico de tablas ( $\alpha=0.05$ ), indicando que es estadísticamente significativo sobre la variación de las observaciones.



Tabla 15.- Análisis de Varianza para Rc

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>G.L.</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>A:pH</b>	9.46	1	9.46	1.21	0.29
<b>B:long</b>	25.55	1	25.55	3.28	0.09
<b>C:Tp</b>	4.84	1	4.84	0.62	0.44
<b>D:Gradiente</b>	12.43	1	12.43	1.60	0.23
<b>AB</b>	33.35	1	33.35	4.28	0.06
<b>AC</b>	10.37	1	10.37	1.33	0.27
<b>AD</b>	159.75	1	159.75	<b>20.52</b>	<b>0.0006</b>
<b>BD</b>	111.73	1	111.73	<b>14.35</b>	<b>0.0023</b>
<b>CD</b>	9.89	1	9.89	1.27	0.28
<b>bloques</b>	1.44	1	1.44	0.19	0.67
<b>Error total</b>	101.21	13	7.79		
<b>Total (corr.)</b>	513.79	23			

### 5.3.3 Verificación de supuestos

Las suposiciones para el modelo en cuanto a la homogeneidad de las varianzas y la distribución normal, se pueden evaluar con el análisis de residuales. Los residuales son estimaciones de los errores experimentales, calculados como las diferencias entre las observaciones y las estimaciones de las medias de los tratamientos. La suposición de varianza homogénea se evalúa con una gráfica de los residuales contra la media estimada de los tratamientos. Y la suposición de la distribución mediante una gráfica de probabilidad normal.

En la figura 9 se grafican los residuos vs los valores predichos, y se observa que cumple con el supuesto de varianza constante, al no observarse ningún patrón no aleatorio en la distribución de los residuales.

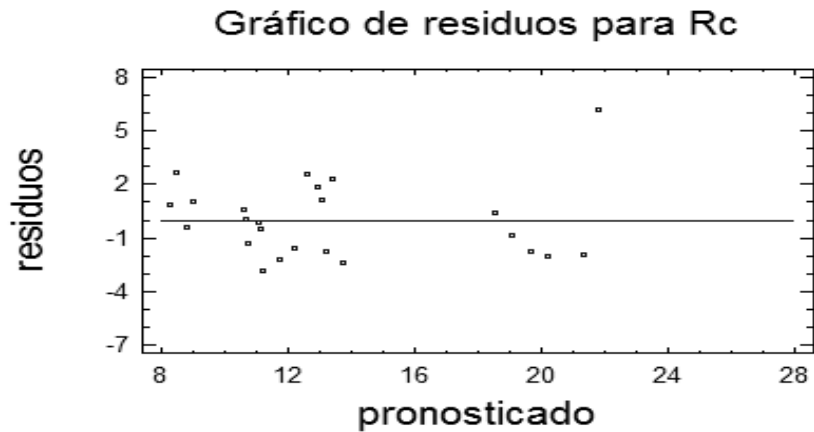


Figura 9.- Gráfico de residuos para resolución crítica

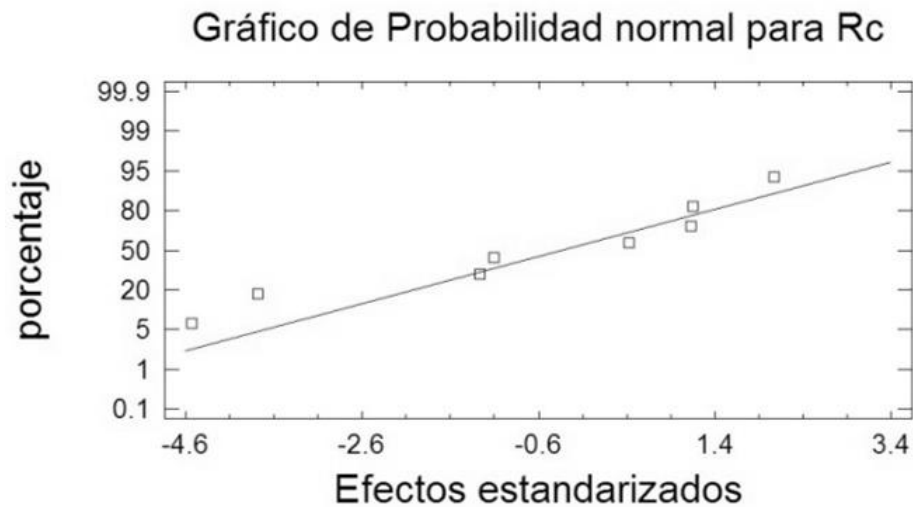


Figura 10.- Gráfica probabilidad normal para resolución crítica

En la figura 10, se visualizan los efectos que pueden ser significativos, los puntos que más se alejan de la línea tienen el efecto más importante. En el gráfico de probabilidad para  $R_c$ , existen dos puntos muy alejados de la línea de la línea recta, dichos puntos corresponden a los efectos de la interacción AD y BD. Los demás efectos que tienden a ubicarse a lo largo de la línea recta de la gráfica se distribuyen normalmente.



### 5.3.4 Robustez

Un método analítico es robusto cuando su funcionamiento es consistente al exponerse a las condiciones cambiantes. Para minimizar los factores no controlables se debe determinar la combinación de niveles de los factores donde se obtenga la menor variabilidad y los resultados de mejor calidad.

#### 5.3.4.1 Modelo de regresión

Es útil ajustar un modelo de regresión a los datos experimentales con la finalidad de predecir el valor de  $R_c$  en diferentes niveles de los factores estudiados.

La Tabla 16 muestra los coeficientes de la ecuación de regresión que se ajusta mejor a los datos.

**Tabla 16.**-Coeficientes de regresión para  $R_c$

<b>Coeficiente</b>	<b>Estimado</b>
<b>constante</b>	16
<b>A:pH</b>	-0.38
<b>B:long</b>	-2.35
<b>C:Tp</b>	-2.56
<b>D:Gradiente</b>	5.57
<b>AB</b>	0.72
<b>AC</b>	0.40
<b>AD</b>	-1.3
<b>BD</b>	-2.64
<b>CD</b>	0.79

La ecuación del modelo ajustado es:

$$R_c = 16 - 0.38 \cdot \text{pH} - 2.35 \cdot \text{long} - 2.56 \cdot \text{Tp} + 5.57 \cdot \text{Gradiente} + 0.72 \cdot \text{pH} \cdot \text{long} + 0.40 \cdot \text{pH} \cdot \text{Tp} - 1.3 \cdot \text{pH} \cdot \text{Gradiente} - 2.64 \cdot \text{long} \cdot \text{Gradiente} + 0.79 \cdot \text{Tp} \cdot \text{Gradiente}$$



## Predicción de resultados

La tabla 17 contiene información sobre los valores de  $R_c$  que se han generado usando el modelo ajustado

**Tabla 17.-** Valores de resolución estimados con el modelo de regresión lineal

	<i>Valores Observados</i>	<i>Valores Ajustados</i>	<i>Límite Inferior 95.0%</i>	<i>Límite Superior 95.0%</i>
1	15.14	12.58	8.50	16.66
2	9.54	11.71	7.62	15.79
3	*	17.51	10.88	24.13
4	*	22.41	15.78	29.03
5	9.12	8.23	4.22	12.38
6	10.67	10.64	6.56	14.72
7	11.44	13.22	9.14	17.30
8	19.37	21.34	17.26	25.42
9	17.98	19.69	15.61	23.77
10	11.17	8.50	4.41	12.58
11	*	14.05	7.42	20.67
12	*	8.63	2.00	15.25
13	18.94	18.55	14.47	22.63
14	11.14	10.58	6.50	14.66
15	14.8	12.91	8.83	16.99
16	9.41	10.71	6.63	14.79
17	14.23	13.07	8.99	17.15
18	10.64	12.20	8.11	16.28
19	*	18.00	11.37	24.62
20	*	22.90	16.27	29.52
21	8.4	8.79	4.71	12.87
22	10.67	11.13	7.05	15.21
23	11.34	13.71	9.63	17.79
24	27.96	21.83	17.75	25.91
25	18.17	20.18	16.10	24.26
26	10.03	8.99	4.90	13.07
27	*	14.54	7.91	21.16
28	*	9.12	2.49	15.74
29	18.22	19.04	14.96	23.12
30	10.94	11.07	6.99	15.15
31	15.66	13.40	9.32	17.48
32	8.34	11.20	7.12	15.28

\*Corridas experimentales omitidas del diseño.



### 5.3.4.2 Optimización de resultados

En la optimización se busca obtener la combinación de factores que maximizan la señal respuesta. Para este método en particular se investigan valores de resolución mayor a 2, la tabla 18 resume las condiciones donde se obtiene la máxima resolución.

#### Optimizar Respuesta

Meta: maximizar  $R_c$

Valor óptimo = 19.935

Tabla.18- Condiciones óptimas para  $R_c$

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
<b>pH</b>	3.0	7.0	3.0
<b>long</b>	-1.0	-1.0	-1.0
<b> Tp</b>	-1.0	1.0	-1.0
<b>Gradiente</b>	-1.0	1.0	1.0

Aunque a una longitud mayor de columna la resolución de los compuestos es la máxima, se ha optado por una longitud más corta y por el tamaño de partícula más pequeño. Estas condiciones brindan la ventaja de reducir el tiempo de acondicionamiento y el tiempo de análisis de cada corrida, lo anterior se traduce a un gasto menor de disolventes y por consiguiente una reducción en los costos. Por otro lado, en estas mismas condiciones se obtiene una menor variabilidad en los resultados de acuerdo a los datos de adecuabilidad realizados en cada corrida.

### 5.3.4.3 Gráficos de superficie

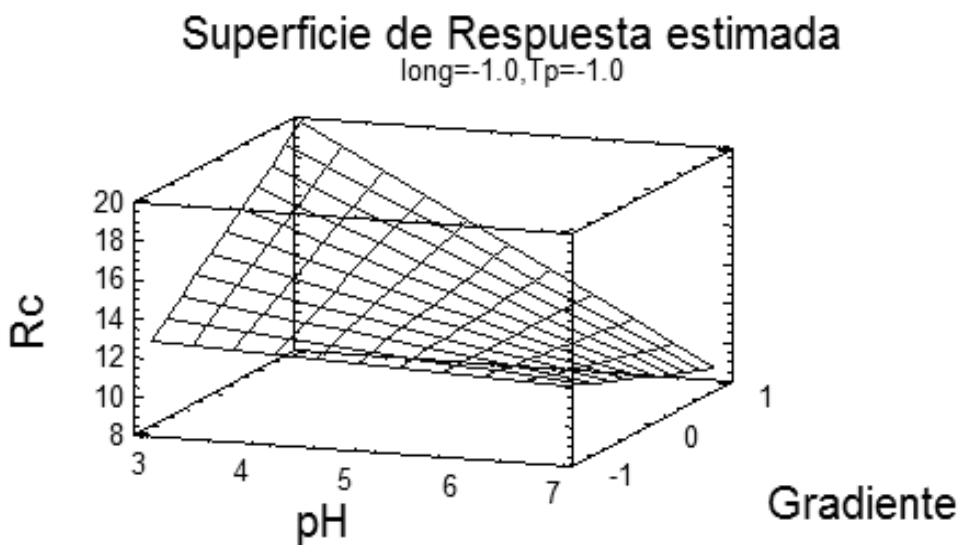
Existen dos gráficos de superficie que permiten tener una visualización de lo que significa el modelo ajustado. Uno de ellos representa una superficie de respuesta sobre la región experimental, que modela el comportamiento de la resolución. En el figura 11 se puede apreciar el plano tridimensional generado por el modelo de regresión lineal, se

aprecia visualmente las condiciones necesarias para establecer una respuesta determinada.

Los factores longitud de columna y tamaño de partícula se han mantenido constantes (fijándolos en sus niveles inferiores).

Para una mejor visualización, se utiliza la representación de los contornos (Figura 12) que permite localizar con bastante exactitud las coordenadas del punto con la respuesta deseada. En esta última figura, el dominio de estudio se encuentra dividido en 5 zonas, las zonas de mayor resolución se localizan a pH cercanos a 3 y con el gradiente tipo 2.

Por otro lado, en el gradiente de nivel -1 se puede apreciar una zona robusta a los cambios de pH. En esta zona verde se encuentran valores de resolución cercanos a 14 a largo de toda la escala de pH.



**Figura 11.-** Superficie de respuesta para Resolución ( $R_c$ ); los factores longitud de columna y tamaño de partícula se han fijado en sus niveles inferiores





## Contornos de la Superficie de Respuesta Estimada

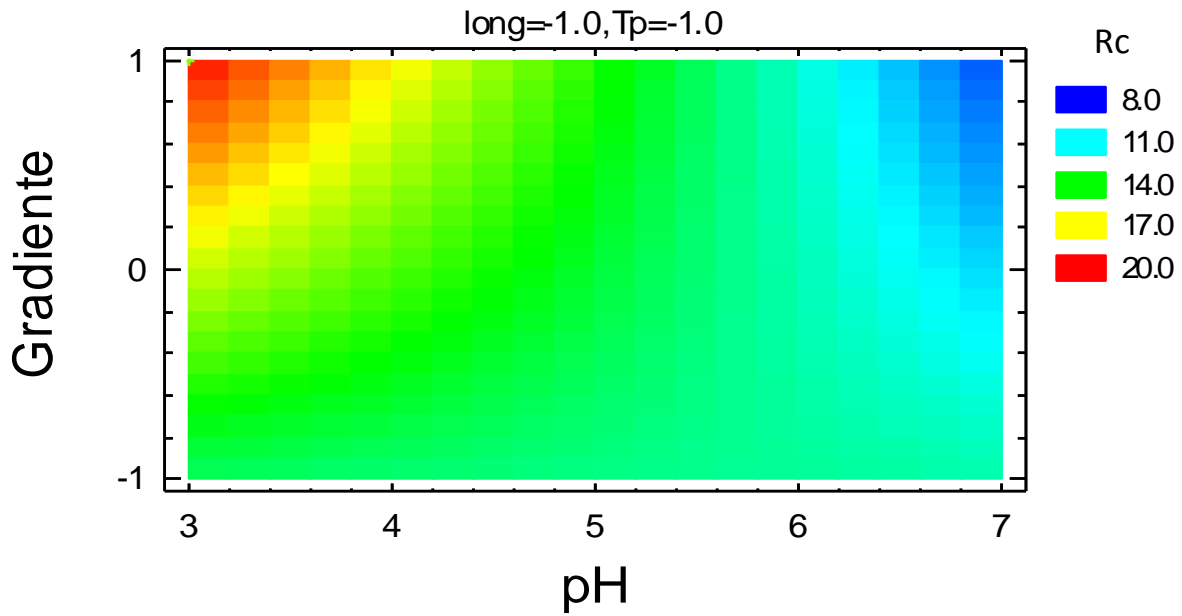


Figura 12.- Contornos de respuesta para Resolución ( $R_c$ ); los factores longitud de columna y tamaño de partícula se han fijado en sus niveles inferiores



## 5.4 Tiempo de análisis

Se ha considerado como tiempo de análisis el tiempo que requiere el último analito en eluir de la columna. En nuestra solución se ha incluido un tercer compuesto, este analito tiene el mayor tiempo de retención.

### 5.4.1 Cálculo de los efectos

La tabla 19 muestra los efectos estimados y sus interacciones, también se incluye el error estándar de muestreo. Los efectos principales se pueden visualizar en la figura 13, la longitud de la columna tiene el principal efecto en el tiempo de análisis, el pH tiene un efecto positivo sobre la respuesta y las interacciones BD, AB y AD también contribuyen de manera significativa en la rapidez del análisis.

Tabla 19.- Efectos estimados para  $T_A$

Efecto	Estimado	Error Estd.
promedio	7.97	0.26
A:pH	1.52	0.52
B:long	2.41	0.52
C:Tp	0.05	0.52
D:Gradiente	1.05	0.52
AB	1.50	0.52
AC	0.05	0.52
AD	-0.97	0.42
BD	-1.50	0.52
CD	0.06	0.52
bloque	0.07	0.42

Errores estándar basados en el error total con 13 g.l.

Gráfico de Pareto estandarizado para  $T_A$

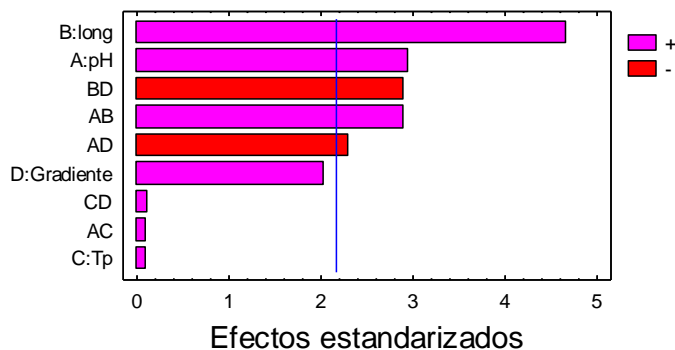


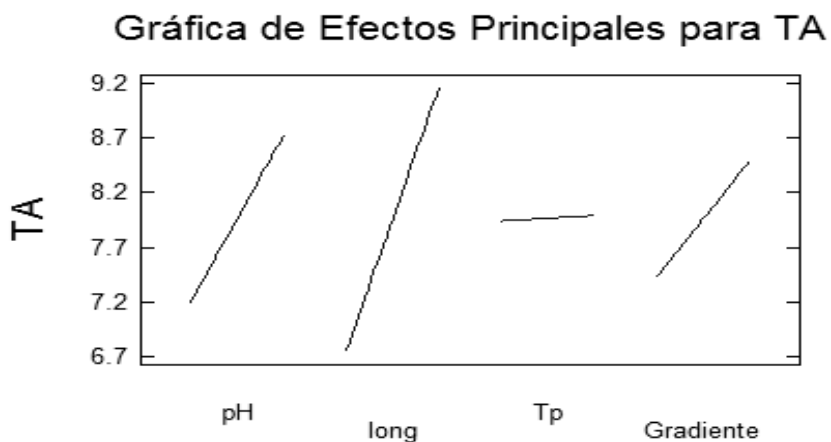
Figura 13.- Efectos estandarizados para tiempo de análisis



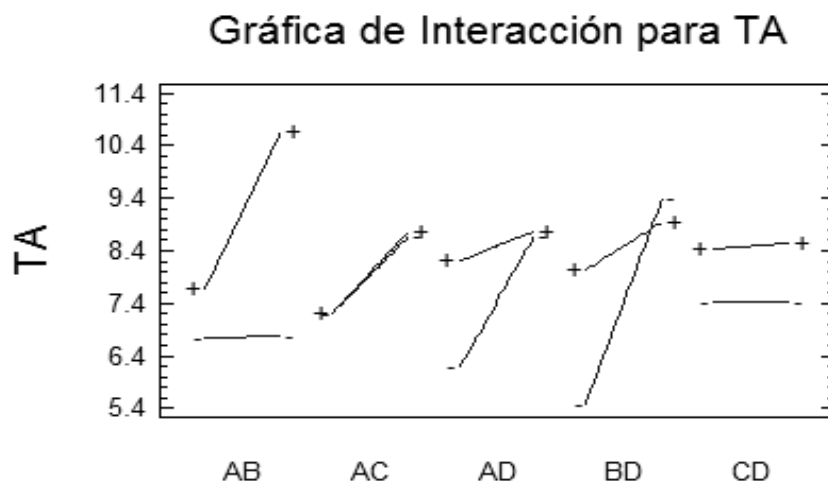
Los efectos principales se representan en la figura 14, a partir del análisis de las gráficas se puede afirmar lo siguiente:

- El pH tiene un efecto directamente proporcional al tiempo de análisis
- La longitud de la columna tiene una relación directamente proporcional con el  $T_A$
- El tamaño de partícula tiene un efecto inversamente proporcional al tiempo de análisis
- El gradiente en su nivel alto reduce el  $T_A$

Respecto a la interacción AD, cuando se mantiene un pH 3 y el tipo de gradiente 1 se disminuye de manera importante la retención del último analito. El mismo efecto se puede apreciar cuando se trabaja con la columna más corta y el gradiente 1.



**Figura 14.-** Efectos principales para el tiempo de análisis ( $T_A$ )



**Figura 15.-** Interacciones para el tiempo de análisis ( $T_A$ )

Con los efectos de interacción encontrados, se eligen las condiciones ideales para disminuir el tiempo de análisis.

Asimismo, se corroboran algunos de los efectos esperados con lo reportado en la literatura. Columnas cortas y con tamaño de partícula menor reducen el tiempo de retención de los analitos, también modificar el pH de la fase móvil altera el patrón de retención de los analitos.

Cambiar las condiciones del gradiente también altera los tiempos de retención de los analitos. Los gradientes evaluados difieren en el tiempo de inicio y en la razón de cambio de acetonitrilo por un lado el gradiente tipo 1 inicia un minuto antes y alcanza la mayor cantidad de acetonitrilo en un menor tiempo.

#### 5.4.2 Análisis de varianza (ANOVA)

En la tabla de ANOVA se observa que 5 de los efectos tienen un efecto significativo, los factores son:

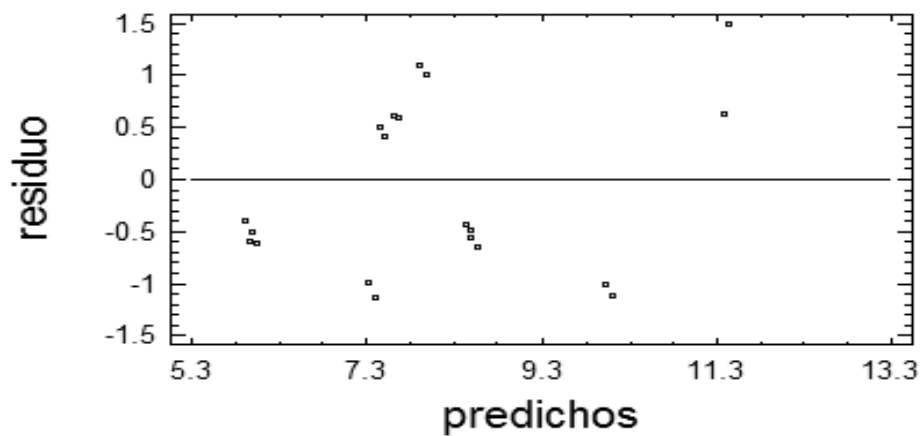
- a) pH
- b) Longitud de columna
- c) Las interacciones AB, AD y BD.

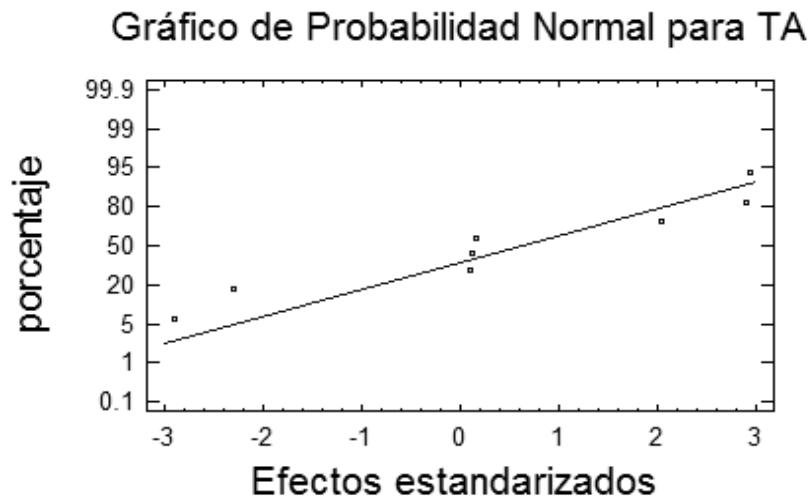
Tabla 20- Análisis de Varianza para T<sub>A</sub>

Fuente	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:pH	9.24	1	9.24	<b>8.66</b>	<b>0.01</b>
B:long	23.26	1	23.26	<b>21.80</b>	<b>0.0004</b>
C:Tp	0.01	1	0.01	0.01	0.92
D:Gradiente	4.44	1	4.44	4.16	0.06
AB	8.95	1	8.95	<b>8.39</b>	<b>0.01</b>
AC	0.01	1	0.01	0.01	0.92
AD	5.60	1	5.60	<b>5.25</b>	<b>0.04</b>
BD	8.98	1	8.98	<b>8.42</b>	<b>0.01</b>
CD	0.01	1	0.015	0.01	0.91
bloques	0.03	1	0.028	0.03	0.87
Error total	13.87	13	1.07		
Total (corr.)	96.37	23			

## 5.4.3 Verificación de supuestos

Gráfica de Residuos para TA

Figura 16.- Gráfico de residuos para tiempo de análisis (T<sub>A</sub>)



**Figura 17.-** Gráfico de Probabilidad Normal para el tiempo de análisis ( $T_A$ )

Los efectos que no siguen una distribución normal se alejan de la línea central del gráfico de probabilidad normal de la figura 17. Estos efectos son provocados por los factores e interacciones significativos.

La verificación de supuestos debe hacerse para el modelo ajustado al ANOVA, en la figura 16 se observa que el supuesto de varianza constante se cumple, ya que no se nota un patrón de distribución en los residuos. Al no violar este último supuesto la probabilidad de dar conclusiones incorrectas disminuyen.

#### 5.4.4 Robustez

En este punto se propondrán la combinación de factores que brinden un tiempo de análisis corto y la menor variabilidad en los resultados.



#### 5.4.4.1 Modelo de regresión

Tabla 21.- Coeficientes de regresión para  $T_A$

<b>Coeficiente</b>	<b>Estimado</b>
<b>Constante</b>	6.07
<b>A:pH</b>	0.38
<b>B:long</b>	-0.66
<b>C:Tp</b>	-0.04
<b>D:Gradiente</b>	1.73
<b>AB</b>	0.37
<b>AC</b>	0.01
<b>AD</b>	-0.24
<b>BD</b>	-0.75
<b>CD</b>	0.03

La ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos es:

$$T_A = 6.07 + 0.38 \cdot \text{pH} - 0.66 \cdot \text{long} - 0.04 \cdot \text{Tp} + 1.73 \cdot \text{Gradiente} + 0.37 \cdot \text{pH} \cdot \text{long} + 0.01 \cdot \text{pH} \cdot \text{Tp} - 0.24 \cdot \text{pH} \cdot \text{Gradiente} - 0.75 \cdot \text{long} \cdot \text{Gradiente} + 0.03 \cdot \text{Tp} \cdot \text{Gradiente}$$

Los valores de las variables se encuentran especificados en sus unidades originales, excepto para los factores discretos que toman valores de -1 para el nivel bajo y +1 para el nivel alto.

#### 5.4.4.2 Predicción de resultados

La tabla 22 contiene información sobre los valores de  $T_A$  que se han generado usando el modelo ajustado

Tabla 22.- Valores de resolución estimados con el modelo de regresión lineal

<b>Fila</b>	<b>Valor Observado</b>	<b>Valor Ajustado</b>	<b>Límite Inferior 95.0%</b>	<b>Límite Superior 95.0%</b>
1	5.47	4.99	3.48	6.50
2	5.52	5.92	4.41	7.44
3	*	7.40	4.95	9.85
4	*	11.33	8.88	13.78
5	5.57	4.92	3.41	6.44
6	5.37	5.97	4.46	7.48



<i>Continuación...</i>				
<b>Fila</b>	<b>Valor Observado</b>	<b>Valor Ajustado</b>	<b>Límite Inferior 95.0%</b>	<b>Límite Superior 95.0%</b>
7	6.36	7.34	5.83	8.85
8	11.99	11.37	9.86	12.88
9	8.02	8.44	6.93	9.96
10	7.95	7.45	5.94	8.96
11	*	7.86	5.41	10.31
12	*	9.86	7.41	12.31
13	7.95	8.50	6.99	10.01
14	8.23	7.61	6.10	9.12
15	9.02	7.92	6.41	9.43
16	9.02	10.02	8.51	11.53
17	5.48	5.06	3.54	6.57
18	5.49	5.99	4.48	7.50
19	*	7.47	5.01	9.92
20	*	11.40	8.95	13.85
21	5.55	4.99	3.48	6.50
22	5.43	6.03	4.52	7.54
23	6.28	7.41	5.90	8.92
24	12.93	11.44	9.93	12.95
25	8.03	8.51	7.00	10.02
26	7.93	7.52	6.01	9.03
27	*	7.93	5.48	10.38
28	*	9.93	7.47	12.38
29	7.92	8.57	7.06	10.08
30	8.27	7.68	6.17	9.19
31	9.00	7.99	6.48	9.50
32	8.98	10.09	8.58	11.60

#### 5.4.4.3 Optimización de resultados

En este caso el objetivo es minimizar la respuesta ( $T_A$ ), para tales efectos se ha propuesto la columna con las siguientes especificaciones: longitud de 5 cm, tamaño de partícula de 1.8  $\mu\text{m}$ , esta columna tiene las bondades de ofrecer un menor tiempo de acondicionamiento y por lo tanto un menor gasto de recursos. Para las condiciones pH y gradiente la mejor condición se encontró en sus niveles bajos.

**Tabla 23.-** Condiciones óptimas para  $T_A$

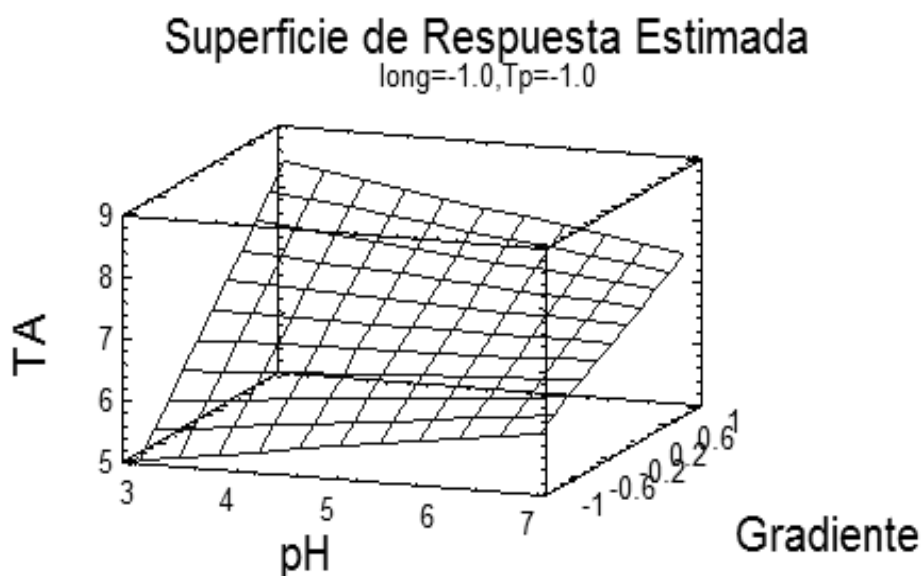
Valor óptimo = 5.02

<b>Factor</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Óptimo</b>
<b>pH</b>	3.0	7.0	3.0
<b>long</b>	-1.0	1.0	-1.0
<b>TP</b>	-1.0	-1.0	-1.0
<b>Gradiente</b>	-1.0	1.0	-1.0



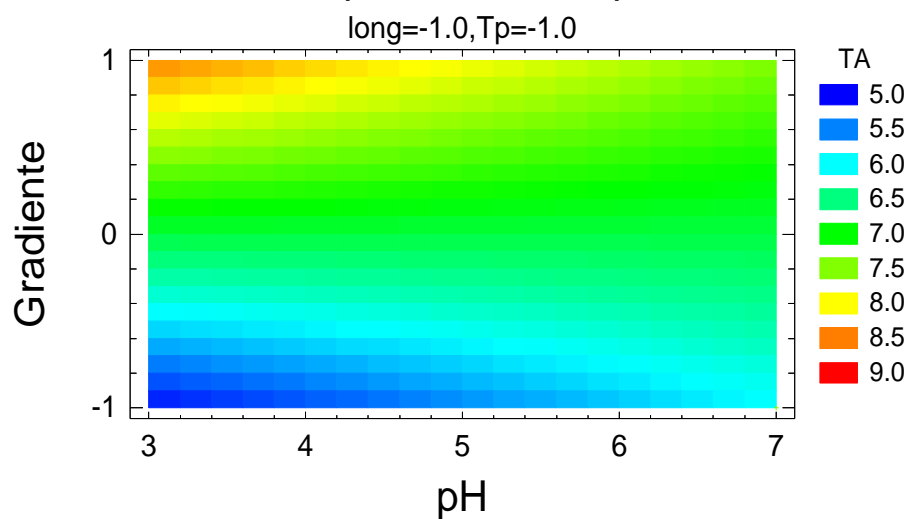
#### 5.4.4.4 Gráficos de superficie

Para tomar una mejor decisión en cuanto a los niveles óptimos de pH y tipo de gradiente se ha representado en un gráfico de superficie, la región experimental que modela el comportamiento de tiempo de análisis.



**Figura 18.-** Superficie de respuesta para  $T_A$ , los factores longitud de columna y tamaño de partícula se han fijado en sus niveles inferiores

#### Contornos de la Superficie de Respuesta Estimada



**Figura 19.-** Contornos de respuesta para  $T_A$ , los factores longitud de columna y tamaño de partícula se han fijado en sus niveles inferiores



Mediante el análisis de los gráficos de superficie se puede establecer que el gradiente -1 y a cualquier pH se pueden obtener tiempos de análisis alrededor de 5 minutos. Los tiempos más largos están ubicados en la zona de gradiente tipo 2.

### 5.5 Predicción de respuestas (Resolución del par crítico- Tiempo de análisis)

El análisis individual de la resolución ( $R_c$ ) y tiempo de análisis ( $T_A$ ) permite establecer los factores que influyen principalmente en cada respuesta y la combinación de factores que brinda una resolución mayor a 2 y tiempo de análisis entre 5-10 minutos. A continuación, se presentan las zonas donde los factores proporcionan estos resultados.

Para localizar los puntos de optimización se sobreponen los contornos de cada respuesta en un mismo gráfico, de este modo podemos ubicar los puntos de intersección con las condiciones más favorables.

Contornos de la Superficie de Respuesta Estimada

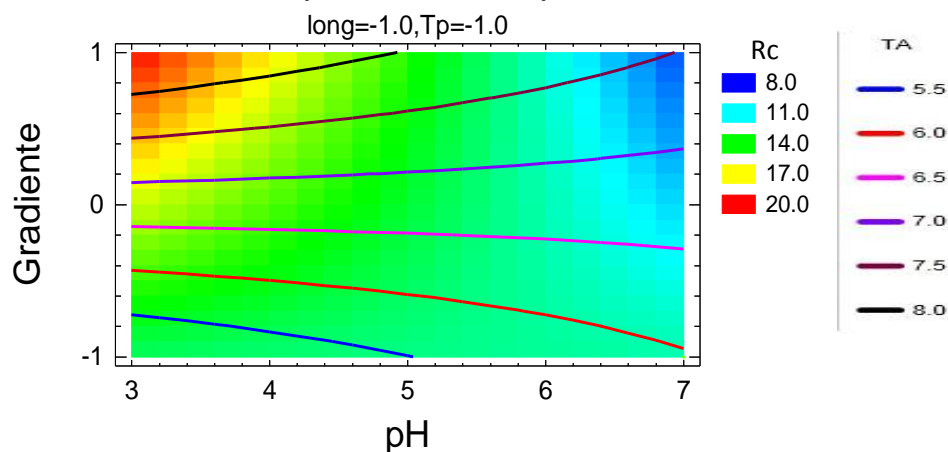


Figura 20.- Contornos superpuestos sobre la superficie de resolución

En la figura 20, cuando el gradiente es el tipo 2 y el pH se acerca a 3 se esperan tiempos de análisis tardíos y picos más resueltos, por el contrario los tiempos de análisis más cortos se ubican en el gradiente tipo 1 mientras que la resolución se mantiene con variaciones mínimas a lo largo del intervalo de pH.



Dependiendo de las necesidades analíticas y de las características de la matriz se puede modificar libremente las condiciones de los factores gradiente y/o pH. La tabla 24 resume algunas de las conclusiones obtenidas de la figura 20.

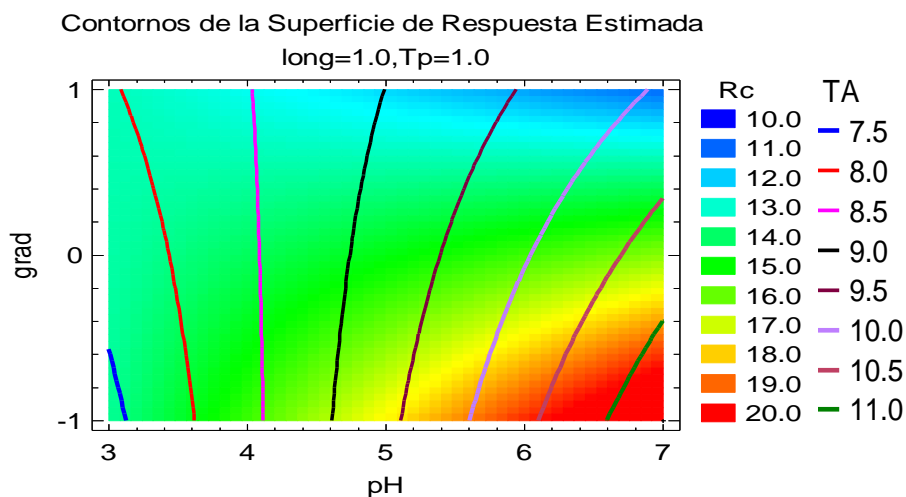
**Tabla 24.-** Resumen de los puntos de intersección de las gráficas de contornos sobrepuestos de  $R_c$  y  $T_A$

Resolución crítica ( $R_c$ )	Tiempo de análisis ( $T_A$ )	A: pH	B: longitud de columna (cm)	C: Tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ )	D: Gradiente
12.8	5.0	3	5	1.8	1
12.4	5.5	5	5	1.8	1
12	5.7	6	5	1.8	1
12	6	7	5	1.8	1
20	8.5	3	5	1.8	2
25	8	5	5	1.8	2
11.5	7.7	6	5	1.8	2
8.75	7.5	7	5	1.8	2

De la tabla 24 se puede mencionar que los valores de resolución no se ven alterados al utilizar una columna de 5 cm de longitud con 1.8  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula y aplicando el gradiente 1. Recomendamos el uso de un pH de 5 ya que bajo esta condición el sistema permanece inalterado a variaciones de este último factor. Asimismo se cumplen con los prerrequisitos de resolución mayor a 2 y tiempo de análisis entre 5 y 10 minutos.

Por otro lado, si la matriz exige condiciones de resolución más amplias por motivo de interferencia de otros analitos, se podría optar por una columna más larga y por lo tanto un tamaño de partícula mayor. Ante esto, se evaluó el efecto de los factores sobre  $R_c$  y  $T_A$ , poniendo especial atención en aquellas condiciones que representen una aplicación útil.

En la figura 21 se modela el comportamiento de la resolución ( $R_c$ ) y se han sobrepuesto las líneas de contorno correspondientes al tiempo de análisis, los factores longitud y tamaño de partícula se han establecido en sus niveles altos (12.5 cm x 5  $\mu\text{m}$ ). En este caso ambos gradientes brindan resoluciones mayores a 2, pero los tiempos de análisis aumentan respecto a los obtenidos con la columna de 5 cm X 1.8  $\mu\text{m}$ .



**Figura 21.-** Contornos superpuestos sobre la superficie de resolución

Algunas combinaciones de factores se resumen en la tabla 25, las intersecciones han sido obtenidas a partir del gráfico anterior.

**Tabla 25.-** Resumen de los puntos de intersección de las gráficas de contornos superpuestos de  $R_c$  y  $T_A$

Resolución crítica ( $R_c$ )	Tiempo de análisis ( $T_A$ )	A: pH	B: longitud de columna (cm)	C: Tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ )	D: Gradiente
13.5	7.4	3	12.5	5	1
17.5	9.4	5	12.5	5	1
19.6	10.4	6	12.5	5	1
21.6	11.4	7	12.5	5	1
13.2	8	3	12.5	5	2
12.1	9	5	12.5	5	2
11.5	9.5	6	12.5	5	2
11	10	7	12.5	5	2

De acuerdo al análisis de las tablas 24 y 25, resulta más conveniente trabajar con la columna más corta ya que se obtiene resoluciones semejantes a la columna de mayor longitud pero en con tiempos de análisis menores.



## 6. Conclusiones

- Las mejores condiciones de trabajo para la separación de las señales de interés dentro de la superficie de respuesta estudiada son las siguientes:
  - pH: 3
  - longitud de la columna: 5 cm
  - Tamaño de partícula: 1.8  $\mu\text{m}$
  - Tipo de gradiente: 1
- Cuando las condiciones de análisis se establecen en el gradiente tipo 1, columna de 5 cm y tamaño de partícula de 1.8  $\mu\text{m}$ . El método es robusto al efecto del pH entre 3-7 sobre la resolución del par crítico con tiempos de análisis entre 5-6 minutos y resoluciones mayores a 2.
- La interacción de los factores longitud de columna, tipo de gradiente y pH de la fase móvil tienen un efecto significativo sobre la resolución crítica del método y el tiempo de análisis. Cualquier modificación en dichos factores repercute en la calidad de la separación.
- Es altamente recomendable estimar la robustez durante la optimización del procedimiento. Esto permite definir las regiones donde el método es robusto. Del mismo modo, se pueden definir las condiciones óptimas, conforme a los siguientes tres criterios: la calidad de la separación, el tiempo de análisis y la robustez.



## 7. Bibliografía

- 1 J. Pennington, T. Masiuk, Z. Wang, H. Zhang, K. DeBoyace, P. Mehta, B. Donovan, *Quality by Design Systematic Chromatographic Method Development*, Schering-Plough Research Institute, available on [<http://www.ipacrs.com>]
- 2 I. Molnár\*, H.-J. Rieger, K.E. Monks, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 3193–3200
- 3 Lynn D. Torbeck, *Pharmaceutical and medical device validation by experimental design*, informa Healthcare, London, UK, 2007, p. 3-7, 18-29
- 4 J. Ermer, J. H. McB. Miller, *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*, Wiley-VCH, Germany, (2005), p. 120-159
- 5 H. Pulido, *Análisis y diseño de experimentos*, Mc Graw Hill, México, (2008)
- 6 Y. Vander Heyden, Bieke Dejaegher, *J. Chromatogr. A* 1158 (2007) 138-157.
- 7 Y. Vander Heyden, A. Nijhuis, J. Smeyers-Verbeke, B.G.M. Vandeginste, D.L. Massart, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2001) 723.
- 8 United States Pharmacopoeia, 30th ed., National Formulary, 25<sup>th</sup> ed., United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD, USA, 2007.
- 9 Guidelines prepared within the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), *Validation of Analytical Procedures, Q2A Definitions and Terminology*, Geneva, 1995, p. 1, <http://www.ich.org/>.
- 10 S. Ahuja, H. Rasmussen, *HPLC method development for pharmaceuticals*, vol. 8, Elsevier Academic Press, Italy, 2007, pág. 2, 14
- 11 Center for Drug Evaluation and Research (CDER) “Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods” CMC 3, 1994
- 12 LOUGH W.J. and WAINER W.I., “High Performance liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice”. Blackie Academic & Professional. London, 1996
- 13 QUATTROCCHI, “Introducción al HPLC”, Laboratorios Gador, Buenos Aires, 1992, pág 39-62



- 14 SKOOG, D. and LEARY J. "Análisis Instrumental" McGraw-Hill, 4a Ed. España, 1994
- 15 E. Hund, Y. Vander Heyden, D.L. Massart, J. Smeyers-Verbeke, J. Pharm. Biomed. Anal. 30 (2002) 1197.
- 16 C.A. Beasley, J. Shaw, Z. Zhao, R.A. Reed, J. Pharm. Biomed. Anal. 37 (2005) 559.
- 17 E. Destandau, J. Vial, A. Jardy, M.C. Hennion, D. Bonet, P. Lancelin, Anal. Chim. Acta 572 (2006) 102.
- 18 S. Kromidas, HPLC Made to Measure: A Practical Handbook for Optimization, Wiley-VCH, Germany, (2006)
- 19 E. Rozet *et al.* J. Chromatogr. A. 1158 (2007) 111-125
- 20 A.D. McNaught, A. Wilkinson, IUPAC Compendium of Chemical Terminology, second ed., Blackwell, Oxford, 1997.
- 21 G.A. Shabir, J. Chromatogr. A. 987 (2003) 55-66
- 22 P. Araujo, J. Chromatogr. B. 877 (2009) 2224-2243
- 23 Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos (CNQFB), Guía de Validación de Métodos Analíticos, México, (2002) pág 17-39
- 24 Food and Drug Administration (FDA) "Guide to Inspections of Pharmaceutical Quality Control Laboratories". USA, 2001
- 25 B.D. Raffa., J. Clin. Pharm. Therapeut. 27 (2001) 257-254
- 26 R. Nageswara., N. Narasaraju., Anal. Scie. 22 (2006) 287-292
- 27 S. Grons and A. Sablotzki. Clinical Pharmacology of Tramadol, Clin. Pharmacokinet. 43(13):879-923 (2004)
- 28 Tarek Belal, Tamer Awad, C. Randall Clark, Journal of Chromatographic Science, 47(2009), 849-854
- 29 A. Küçük, Y. Kadioglu, Il farmaco 60(2005) 163-169



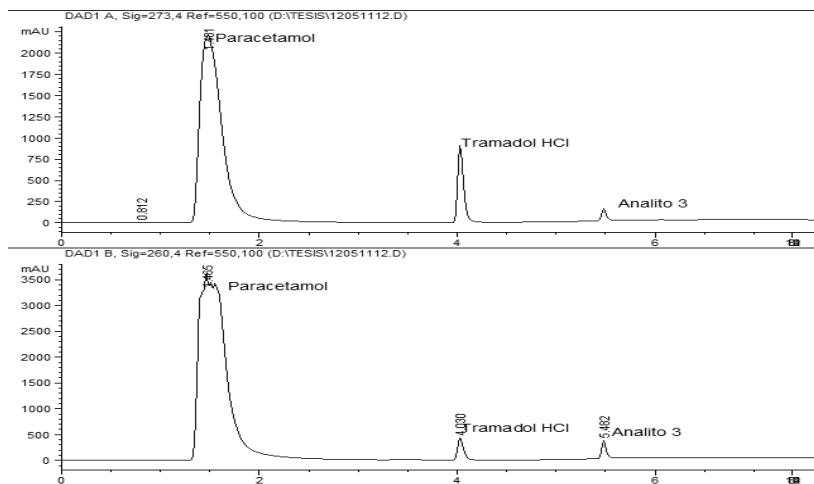
- 30 W. Kartinasari, T. Palupi, *J of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 27(4):737-744 (2005)
- 31 N. González de Mejía, *Rev. Soc. Esp. Dolor*.12 (2005) 112-118
- 32 W.E. Mullican, J.R. Lacy, *Clin. Ther*; 23 (2001) 1429-1445
- 33 X. Liu, J. Shi, Y. Liu, and Z. He, *Shenyang Yaoke Daxue Xuebao* **21(2)**: 111–113 (2004).
- 34 L. Hong and J. Li, *Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi* **36(5)**: 293–95 (2005).
- 35 M.J. Córzar-Bernal “Desarrollo y validación de un método de cuantificación simultáneo por HPLC de paracetamol y Tramadol”. Póster, IX Congreso de la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica. Universidad de Navarra. Pamplona, España. Febrero 2009.
- 36 Jain, Deepti , Kachave, Raman N. and Bhadane, Rajendra N. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33: 6, 786-792 (2010)
- 37 Arunadevi S. Birajdar, S. N. Meyyanathan, B. Suresh, *International Journal of Pharma Research and Development*, 1, (2010)
- 38 Kapil Kalra\*, Sharmistha Naik, Garima Jarmal and Neeti Mishra, *International Journal of Applied Chemistry*. Volume 5, Number 2 (2009) pp. 73–76  
ISSN 0973-1792
- 39 A. Küçük, Y. Kadioglu, *Il farmaco* 60(2005) 163-169
- 40 W. Kartinasari, T. Palupi, *J. of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 27(4):737-744 (2005)
- 41 Martindale, *The Extra Pharmacopoeia*, 30th ed, Royal Pharmaceutical Society, London
- 42 Rodríguez Juan Manuel, Rodríguez Sáenz Ricardo, *Manual de Desarrollo Analítico para la carrera de QFB*, , Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, México, D.F., 2006



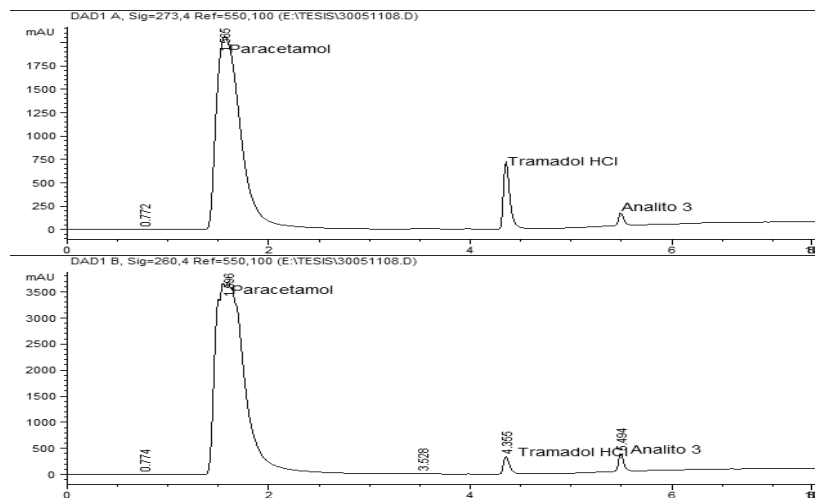
## 8. Anexos

### 8.1 Anexo 1

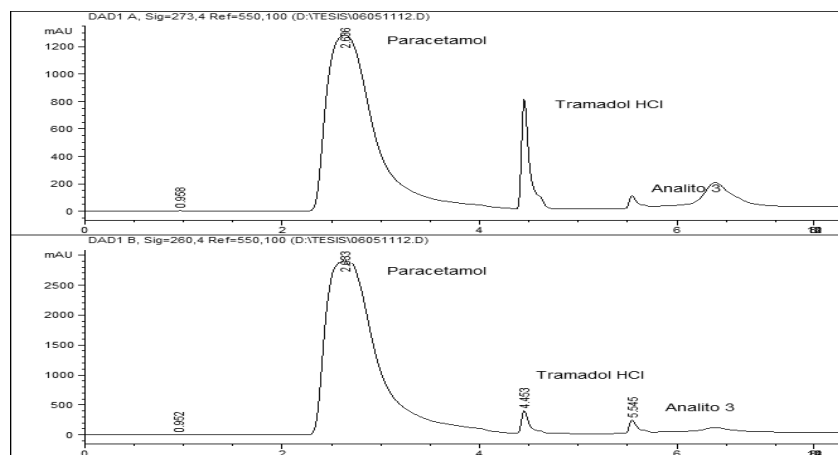
Corrida 1 (pH:3, longitud 5cm, Tp 1.8μ, gradiente 1)



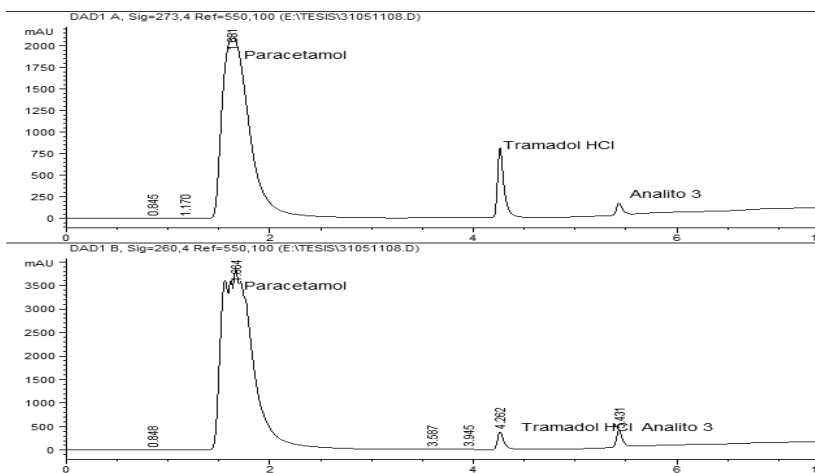
Corrida 2 (pH:7, longitud 5cm, Tp 1.8μ, gradiente 1)



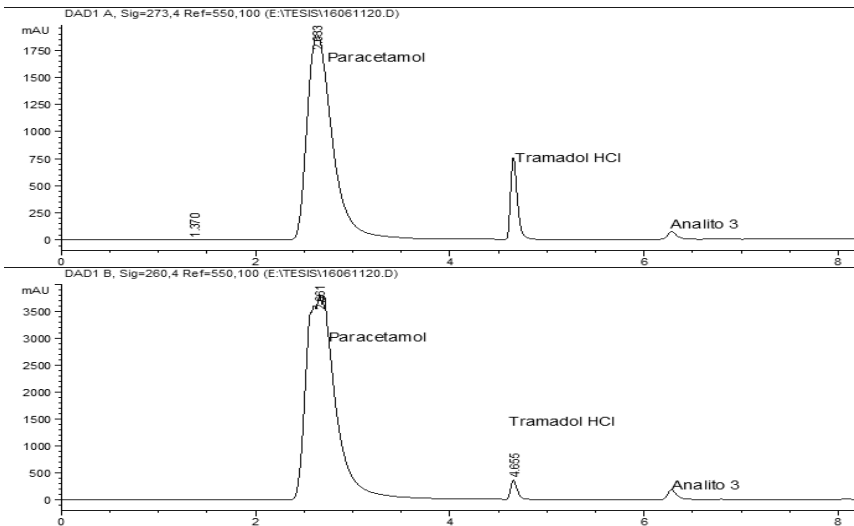
Corrida 3 (pH:3, longitud 5cm, Tp 5μ, gradiente 1)



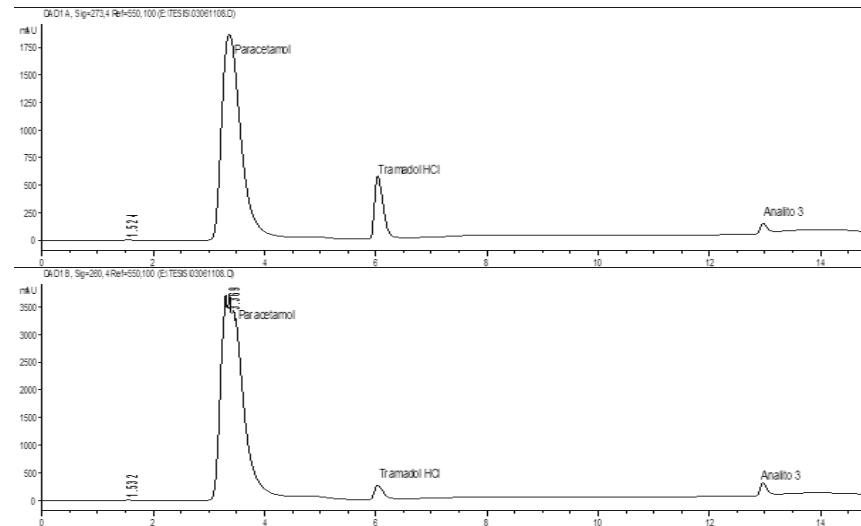
Corrida 4 (pH:7, longitud 5cm, Tp 5μ, gradiente 1)



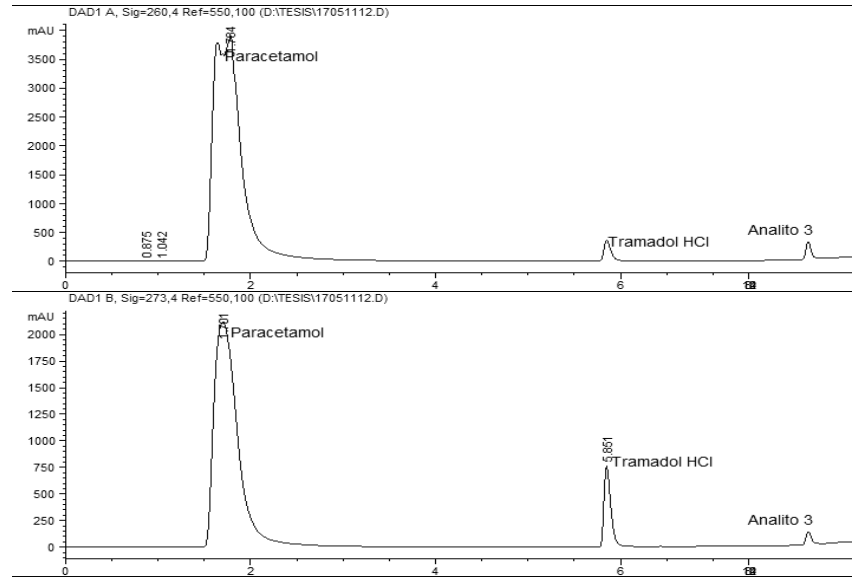
**Corrida 5 (pH:3, longitud 12.5cm, Tp 5μ, gradiente 1)**



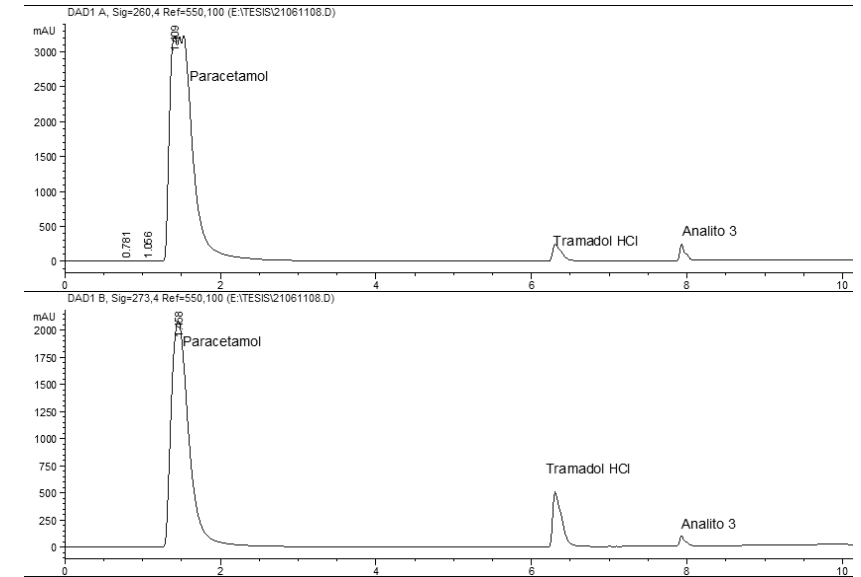
**Corrida 6 (pH:7, longitud 12.5cm, Tp 5μ, gradiente 1)**



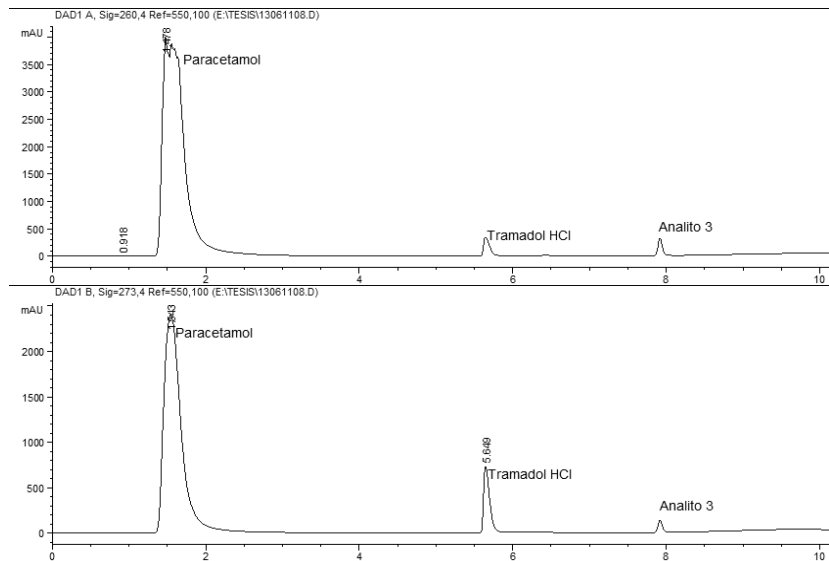
**Corrida 7 (pH:3, longitud 5cm, Tp 1.8μ, gradiente 2)**



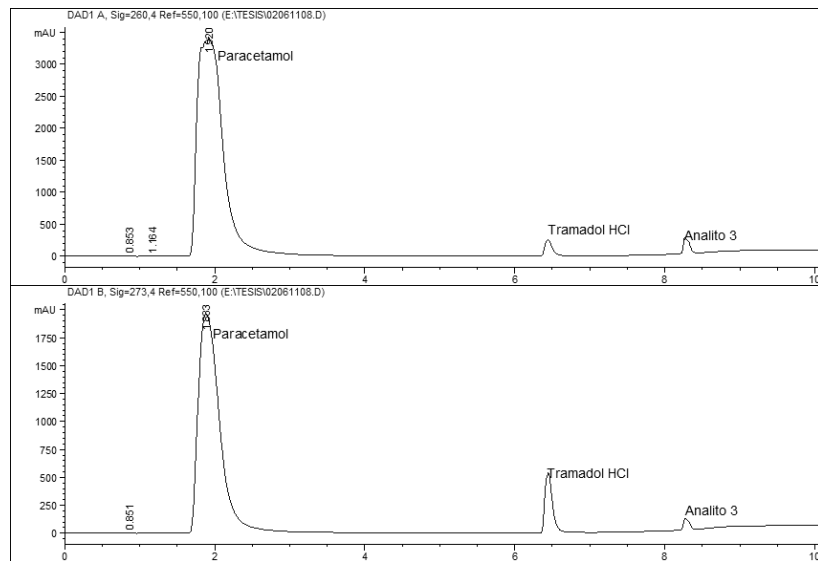
**Corrida 8 (pH:7, longitud 5cm, Tp 1.8μ, gradiente 2)**



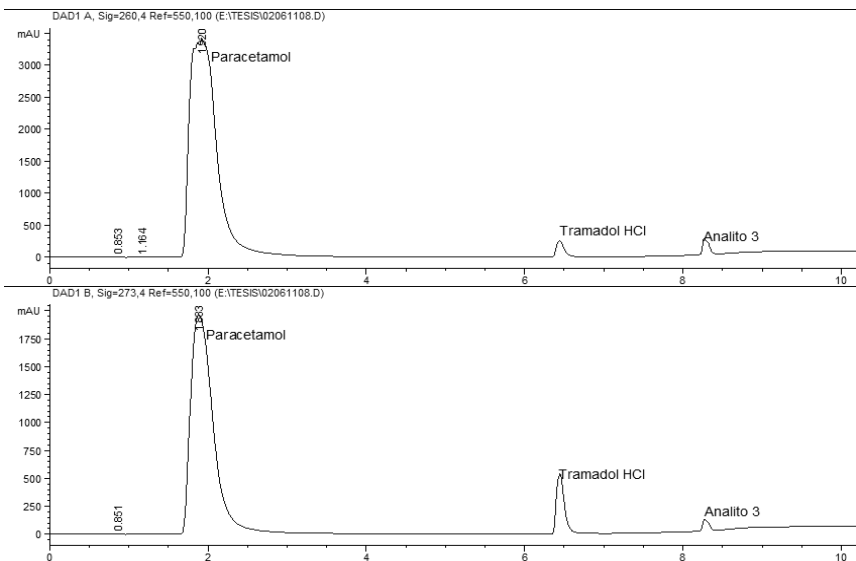
**Corrida 9 (pH:3, longitud 5cm, Tp 5µ, gradiente 2)**



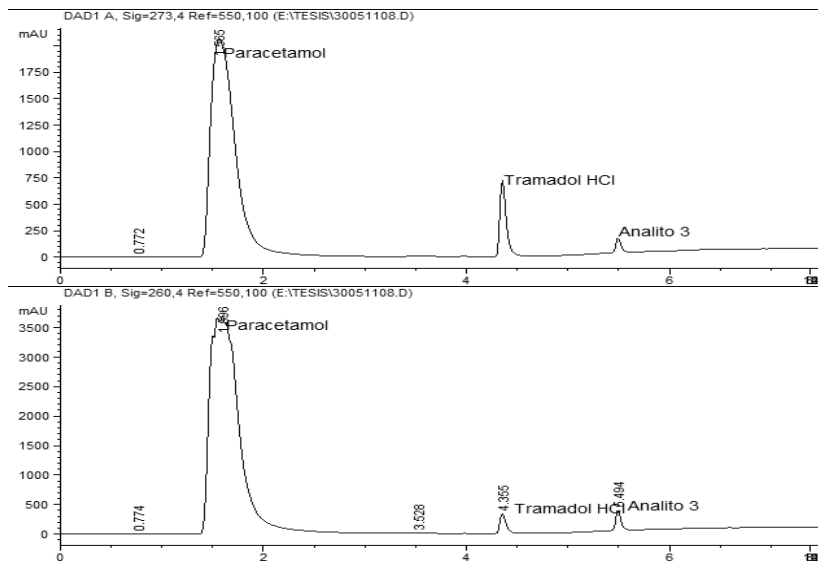
**Corrida 10 (pH:7, longitud 5cm, Tp 5µ, gradiente 2)**



**Corrida 11 (pH:3, longitud 12.5cm, Tp 5µ, gradiente 2)**



**Corrida 12 (pH:7, longitud 12.5cm, Tp 5µ, gradiente 2)**





## 8.2 Anexo 2

## Simetría del Paracetamol y simetría del Tramadol HCl

## Cálculo de los efectos

Tabla 26. Efectos estimados para la simetría de Paracetamol y Tramadol HCl

Efectos estimados para simetría Paracetamol			Efectos estimados para simetría Tramadol HCl		
promedio+bloque	=	0.573375 +/- 0.00962677	promedio+bloque	=	0.65125 +/- 0.0289704
A:pH	=	-0.00925 +/- 0.0192535	A:pH	=	-0.0725 +/- 0.0579408
B:long+bloque	=	0.032 +/- 0.0192535	B:long+bloque	=	0.053125 +/- 0.0579408
C:Tp+bloque	=	0.00125 +/- 0.0192535	C:Tp+bloque	=	-0.003125 +/- 0.0579408
D:Gradiente	=	0.00675 +/- 0.0192535	D:Gradiente	=	-0.115 +/- 0.0579408
AB	=	0.0205 +/- 0.0192535	AB	=	-0.083125 +/- 0.0579408
AC	=	-0.01625 +/- 0.0192535	AC	=	0.193125 +/- 0.0579408
AD	=	0.0258333 +/- 0.0157204	AD	=	-0.02125 +/- 0.0473085
BD	=	-0.002 +/- 0.0192535	BD	=	-0.068125 +/- 0.0579408
CD	=	-0.00475 +/- 0.0192535	CD	=	0.160625 +/- 0.0579408
bloque	=	0.007 +/- 0.0157204	bloque	=	0.0155833 +/- 0.0473085

Los errores estándar están basados en un error total con 13 g.l.

(a)

(b)

Gráfico de Pareto estandarizado para simetría Paracetamol

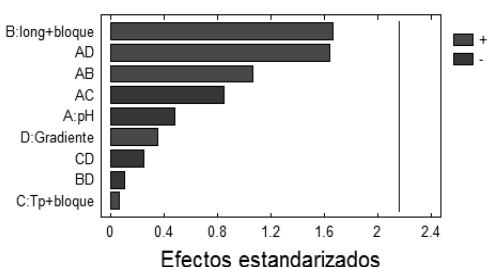


Gráfico de Pareto estandarizado para simetría Tramadol HCl

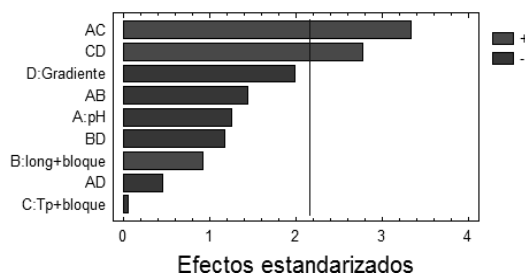


Figura 22. Efectos estandarizados para la simetría de (a) Paracetamol y; (b) Tramadol HCl

La tabla 26 y los diagramas de Pareto (Figura 22(a) y 22(b)) para las simetrías del Paracetamol y Tramadol HCl, sugieren que en ambas moléculas **ningún factor principal** tiene influencia sobre las respuestas. Sin embargo, es evidente la importancia del efecto generado por **las interacciones AC (pH-tamaño de partícula) y CD (tamaño de partícula-gradiente)** sobre la simetría del Tramadol HCl, en este sentido, es interesante mencionar que estas mismas interacciones ejercen un efecto positivo sobre la simetría del Tramadol HCl. Cabe resaltar que ninguna interacción de los factores tiene influencia sobre la simetría del Paracetamol. No obstante, en ambas moléculas se tendrá que comprobar de manera formal si las interacciones tienen o no influencia significativa sobre la respuesta.



## Efectos principales

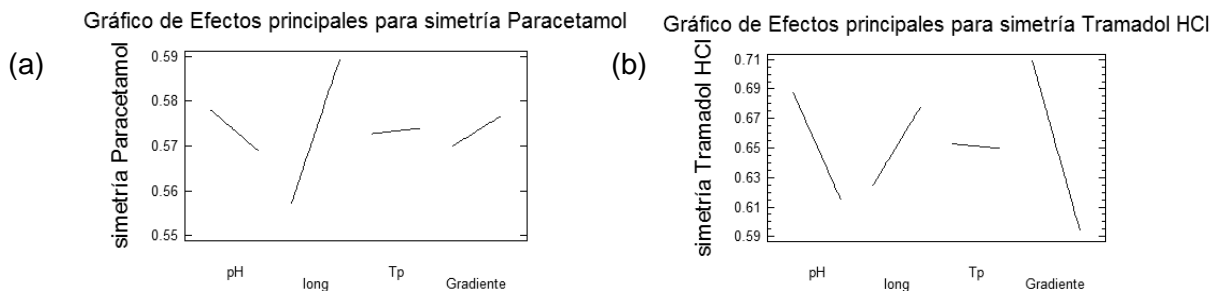


Figura 23. Efectos principales sobre la simetría de (a) Paracetamol y; (b) Tramadol HCl.

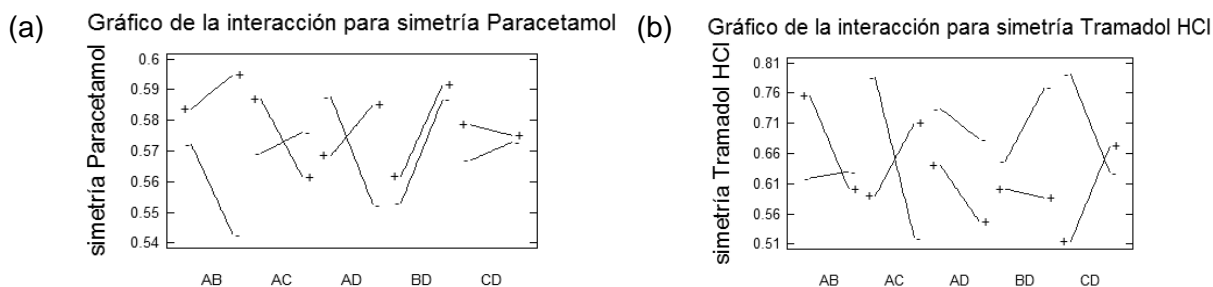


Figura 24. Gráfico de interacciones para simetría de (a) Paracetamol y; (b) Tramadol HCl.

Las figuras 23 y 24 muestran que las interacciones con mayor efecto sobre la simetría del Tramadol HCl son AC (pH-Longitud de columna) y CD (Longitud de columna-Gradiente); en el caso de la interacción AC, el pH tiene un efecto considerable sobre la simetría en ambos niveles de Tp; sin embargo, podemos obtener una mayor simetría cuando se mantiene un nivel bajo tanto de pH como de tamaño de partícula (A<sup>-</sup>C<sup>-</sup>).

Por su parte, en la interacción CD (Longitud de columna-Gradiente) podemos mencionar que cuando el tamaño de partícula se encuentra en su nivel alto, el tipo de gradiente no afecta de manera considerable la simetría del Tramadol HCl. Sin embargo, para obtener una simetría mayor, tenemos que ubicar tanto al tamaño de partícula como al gradiente en sus niveles bajos (C<sup>-</sup>D<sup>-</sup>); ***Esta interacción se debe a que el gradiente 1 presenta una mayor rapidez de cambio en la polaridad de la fase móvil (o bien, el***



*componente orgánico aumenta en una menor cantidad de tiempo que en el gradiente 2), por lo que las moléculas de Tramadol HCl tendrán menos tiempo para establecer un equilibrio entre la fase estacionaria y la fase móvil, lo que genera menor contacto con la fase estacionaria, picos más uniformes y por ende mayor simetría; a su vez, un tamaño de partícula de 1.8  $\mu\text{m}$  ofrece menos espacios por los cuales las moléculas puedan dispersarse y también una menor resistencia a la transferencia de masa.*

Por último, cuando el pH está en su nivel alto, ambas moléculas presentan el mismo grado de ionización (no ionizada), por eso interaccionan en mayor medida con la fase estacionaria provocando mayor retención, mayor difusión longitudinal, y menor simetría (efecto negativo), lo que sucede de manera contraria cuando el pH se establece en su nivel más bajo (pH 3)



## Análisis de varianza

De acuerdo con las tablas de análisis de varianza (Tablas 27 y 28) para las simetrías del Paracetamol y Tramadol HCl podemos confirmar que **ningún factor principal así como sus interacciones** ejerce un efecto significativo **sobre la simetría del paracetamol**.

Por otro lado, sólo las interacciones AC (pH-Longitud de columna) y CD (Longitud de columna-Gradiente) ejercen un efecto estadísticamente significativo sobre la variación de la respuesta para Tramadol; los factores individuales pH, Longitud de columna y Gradiente no ejercen ningún efecto significativo sobre la simetría del Tramadol HCl, comprobando así, el análisis sugerido por el diagrama de Pareto. Así pues, la optimización de la respuesta deberá enfocarse sobre las interacciones AC (pH-Longitud de columna) y CD (Longitud de columna-Gradiente).

**Tabla 27.** Análisis de la Varianza para simetría del Paracetamol

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:pH	0.00034225	1	0.00034225	0.23	0.6389
B:long	0.004096	1	0.004096	2.76	0.1204
C:Tp	0.00000625	1	0.00000625	0.00	0.9492
D:Gradiente	0.00018225	1	0.00018225	0.12	0.7315
AB	0.001681	1	0.001681	1.13	0.3064
AC	0.00105625	1	0.00105625	0.71	0.4139
AD	0.00400417	1	0.00400417	2.70	0.1243
BD	0.000016	1	0.000016	0.01	0.9189
CD	0.00009025	1	0.00009025	0.06	0.8090
bloques	0.000294	1	0.000294	0.20	0.6634
Error Total	0.0192763	13	0.00148279		
Total (corr.)	0.0343005	23			

R-cuadrado = 43.8016 por ciento

**Tabla 28.** Análisis de la Varianza para simetría del Tramadol HCl

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:pH	0.021025	1	0.021025	1.57	0.2329
B:long	0.0112891	1	0.0112891	0.84	0.3759
C:Tp	0.0000390625	1	0.0000390625	0.00	0.9578
D:Gradiente	0.0529	1	0.0529	3.94	0.0687
AB	0.0276391	1	0.0276391	2.06	0.1750
<b>AC</b>	0.149189	1	0.149189	<b>11.11</b>	0.0054
AD	0.00270938	1	0.00270938	0.20	0.6607
BD	0.0185641	1	0.0185641	1.38	0.2608
<b>CD</b>	0.103202	1	0.103202	<b>7.69</b>	0.0159
bloques	0.00145704	1	0.00145704	0.11	0.7471
Error Total	0.174571	13	0.0134286		
Total (corr.)	0.458413	23			

R-cuadrado = 61.9183 por ciento



## Verificación de supuestos

Gráfico de Probabilidad normal para simetría Paracetamo

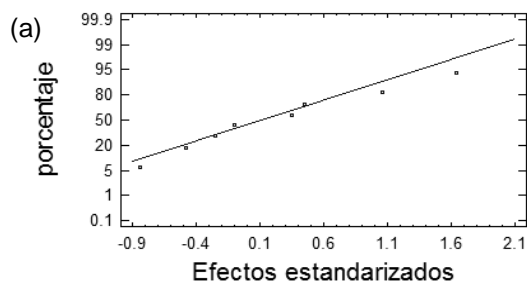
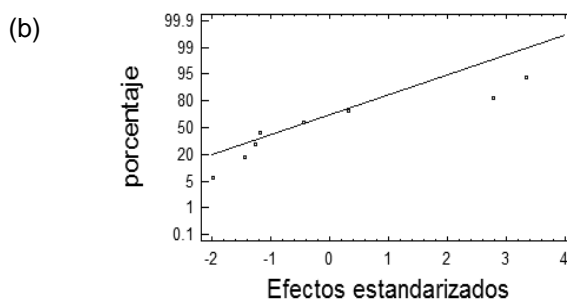


Gráfico de Probabilidad normal para simetría Tramadol HCl



**Figura 25.** Probabilidades normales para la simetría de a) Paracetamol y b) Tramadol HCl

En la figura 25(b) de probabilidad normal para la simetría del Tramadol HCl, podemos observar que existen cuatro puntos que se alejan de la recta (errores fuera de la normalidad), dichos puntos corresponden a las interacciones AC (pH-Longitud de columna) y CD (Longitud de columna-Gradiente), las cuales influyen significativamente sobre la simetría del Tramadol HCl, mientras que la gráfica de probabilidad normal para la simetría del Paracetamol muestra que todos los puntos están normalmente distribuidos sobre la línea. En ambos casos, no existe evidencia alguna de no-normalidad ni residuos inusitados.

Gráfico de residuos para simetría Paracetamol

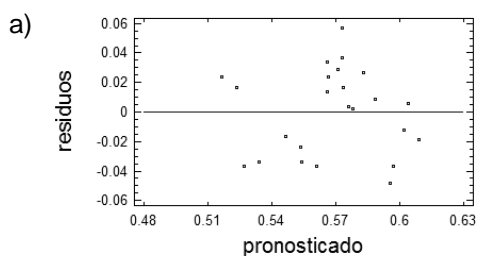
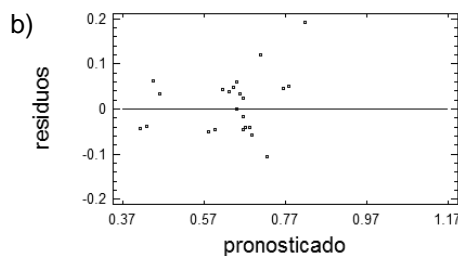


Gráfico de residuos para simetría Tramadol HCl



**Figura 26** Residuos para la simetría de a) Paracetamol y b) Tramadol HCl

En las figuras 26(a) y 26(b), observamos que todos los puntos mostrados caen de manera aleatoria y dentro de una banda horizontal, lo que sugiere que los residuos son independientes y que no hay un patrón evidente de los residuos con respecto a los valores ajustados mediante la ecuación que describe al modelo, cumpliendo así con el supuesto de varianza constante.





Debido a que la verificación de supuestos se realiza para el modelo ajustado al análisis de varianza, podemos considerar que el modelo explica apropiadamente los datos obtenidos, y por lo tanto disminuye la probabilidad de dar conclusiones incorrectas

## ROBUSTEZ

### MODELO DE REGRESIÓN

**Tabla 29.** Coeficientes de regresión para la simetría de Paracetamol y Tramadol HCl

Coef. de regresión para simetría Paracetamol		Coef. de regresión para simetría Tramadol HCl	
constante	= 0.584937	constante	= 0.741875
A:pH	= -0.0023125	A:pH	= -0.018125
B:long	= -0.009625	B:long	= 0.130469
C:Tp	= 0.0209375	C:Tp	= -0.242969
D:Gradiente	= -0.0289167	D:Gradiente	= -0.0309375
AB	= 0.005125	AB	= -0.0207813
AC	= -0.0040625	AC	= 0.0482812
AD	= 0.00645833	AD	= -0.0053125
BD	= -0.001	BD	= -0.0340625
CD	= -0.002375	CD	= 0.0803125

Los valores de las variables se especifican en sus unidades originales

La tabla 29 muestra los valores de los coeficientes de regresión para la simetría del Paracetamol y Tramadol HCl, tales coeficientes corresponden a la ecuación que mejor se ajusta a los datos de cada respuesta. Las ecuaciones son:

$$\begin{aligned} \text{Simetría Paracetamol} = & 0.584937 - 0.0023125 \cdot \text{pH} - 0.009625 \cdot \text{long} + 0.0209375 \cdot \text{Tp} - \\ & 0.0289167 \cdot \text{Gradiente} + 0.005125 \cdot \text{pH} \cdot \text{long} - 0.0040625 \cdot \text{pH} \cdot \text{Tp} + \\ & 0.00645833 \cdot \text{pH} \cdot \text{Gradiente} - 0.001 \cdot \text{long} \cdot \text{Gradiente} - \\ & 0.002375 \cdot \text{Tp} \cdot \text{Gradiente} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Simetría Tramadol HCL} = & 0.741875 - 0.018125 \cdot \text{pH} + 0.130469 \cdot \text{long} - 0.242969 \cdot \text{Tp} - \\ & 0.0309375 \cdot \text{Gradiente} - 0.0207813 \cdot \text{pH} \cdot \text{long} + 0.0482812 \cdot \text{pH} \cdot \text{Tp} - \\ & 0.0053125 \cdot \text{pH} \cdot \text{Gradiente} - 0.0340625 \cdot \text{long} \cdot \text{Gradiente} + \\ & 0.0803125 \cdot \text{Tp} \cdot \text{Gradiente} \end{aligned}$$

### PREDICCIÓN DE RESULTADOS

Las tablas 30 y 31 contienen información sobre los valores de simetría tanto de Paracetamol como de Tramadol HCl que se han generado usando el modelo ajustado, con base a esto, se puede calcular el valor de la simetría bajo ciertas condiciones de trabajo.

**Tabla 30** Resultados de la Estimación para simetría del Paracetamol

Fila	Observados Valor	Ajustados Valor	Inf. para la Media	95.0% CL para la Media	Sup. para la Media	95.0% CL para la Media
1	0.58	0.566167	0.509847	0.622486	0.509847	0.622486
2	0.49	0.526833	0.470514	0.583153	0.470514	0.583153
3		0.579667	0.488221	0.671112	0.488221	0.671112
4		0.581333	0.489888	0.672779	0.489888	0.672779
5	0.597	0.588417	0.532097	0.644736	0.532097	0.644736
6	0.54	0.516583	0.460264	0.572903	0.460264	0.572903
7	0.59	0.601917	0.545597	0.658236	0.545597	0.658236
8	0.6	0.571083	0.514764	0.627403	0.514764	0.627403
9	0.52	0.553833	0.497514	0.610153	0.497514	0.610153
10	0.6	0.566167	0.509847	0.622486	0.509847	0.622486
11		0.563333	0.471888	0.654779	0.471888	0.654779
12		0.616667	0.525221	0.708112	0.525221	0.708112
13	0.59	0.566583	0.510264	0.622903	0.510264	0.622903
14	0.53	0.546417	0.490097	0.602736	0.490097	0.602736
15	0.58	0.576083	0.519764	0.632403	0.519764	0.632403
16	0.56	0.596917	0.540597	0.653236	0.540597	0.653236
17	0.63	0.573167	0.516847	0.629486	0.516847	0.629486
18	0.5	0.533833	0.477514	0.590153	0.477514	0.590153
19		0.586667	0.495221	0.678112	0.495221	0.678112
20		0.588333	0.496888	0.679779	0.496888	0.679779
21	0.547	0.595417	0.539097	0.651736	0.539097	0.651736
22	0.54	0.523583	0.467264	0.579903	0.467264	0.579903
23	0.59	0.608917	0.552597	0.665236	0.552597	0.665236
24	0.58	0.578083	0.521764	0.634403	0.521764	0.634403
25	0.524	0.560833	0.504514	0.617153	0.504514	0.617153
26	0.61	0.573167	0.516847	0.629486	0.516847	0.629486
27		0.570333	0.478888	0.661779	0.478888	0.661779
28		0.623667	0.532221	0.715112	0.532221	0.715112
29	0.59	0.573583	0.517264	0.629903	0.517264	0.629903
30	0.53	0.553417	0.497097	0.609736	0.497097	0.609736
31	0.61	0.583083	0.526764	0.639403	0.526764	0.639403
32	0.61	0.603917	0.547597	0.660236	0.547597	0.660236

La tabla contiene: 1) El valor observado de Simetría. 2) La predicción del valor de simetría utilizando el modelo ajustado. 3) Los límites de confianza (CL) al 95% para la respuesta media ajustada.

**Tabla 31** Resultados de la Estimación para simetría del Tramadol HCI

Fila	Observados Valor	Ajustados Valor	Inf. para la Media	95.0% CL para la Media	Sup. para la Media	95.0% CL para la Media
1	0.53	0.802833	0.633347	0.972319	0.633347	0.972319
2	0.69	0.641583	0.472097	0.811069	0.472097	0.811069
3		1.00721	0.732016	1.2824	0.732016	1.2824
4		0.679708	0.404516	0.954901	0.404516	0.954901
5	0.509	0.445958	0.276472	0.615444	0.276472	0.615444
6	0.63	0.670958	0.501472	0.840444	0.501472	0.840444
7	0.65	0.650333	0.480847	0.819819	0.480847	0.819819
8	0.83	0.709083	0.539597	0.878569	0.539597	0.878569
9	0.66	0.616583	0.447097	0.786069	0.447097	0.786069
10	0.37	0.412833	0.243347	0.582319	0.243347	0.582319
11		0.684708	0.409516	0.959901	0.409516	0.959901
12		0.314708	0.0395157	0.589901	0.0395157	0.589901
13	0.53	0.580958	0.411472	0.750444	0.411472	0.750444
14	0.81	0.763458	0.593972	0.932944	0.593972	0.932944
15	0.71	0.649083	0.479597	0.818569	0.479597	0.818569
16	0.69	0.665333	0.495847	0.834819	0.495847	0.834819
17	1.01	0.818417	0.648931	0.987903	0.648931	0.987903
18	0.69	0.657167	0.487681	0.826653	0.487681	0.826653
19		1.02279	0.747599	1.29798	0.747599	1.29798
20		0.695292	0.420099	0.970484	0.420099	0.970484
21	0.496	0.461542	0.292056	0.631028	0.292056	0.631028
22	0.63	0.686542	0.517056	0.856028	0.517056	0.856028
23	0.65	0.665917	0.496431	0.835403	0.496431	0.835403
24	0.62	0.724667	0.555181	0.894153	0.555181	0.894153
25	0.67	0.632167	0.462681	0.801653	0.462681	0.801653
26	0.39	0.428417	0.258931	0.597903	0.258931	0.597903
27		0.700292	0.425099	0.975484	0.425099	0.975484
28		0.330292	0.055099	0.605484	0.055099	0.605484
29	0.55	0.596542	0.427056	0.766028	0.427056	0.766028
30	0.83	0.779042	0.609556	0.948528	0.609556	0.948528
31	0.62	0.664667	0.495181	0.834153	0.495181	0.834153
32	0.64	0.680917	0.511431	0.850403	0.511431	0.850403

La tabla contiene: 1) El valor observado de Simetría. 2) La predicción del valor de simetría utilizando el modelo ajustado. 3) Los límites de confianza (CL) al 95% para la respuesta media ajustada.



## OPTIMIZACIÓN DE RESULTADOS

En este apartado, buscamos maximizar la respuesta, es decir, obtener valores de simetría cercanos a 1 para ambos analitos, con el objetivo de evitar el coleo y obtener picos más uniformes.

Respuesta Optimizada para simetría del Paracetamol

Meta: maximizar la simetría del Paracetamol

Valor Óptimo = 0.605417

Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
pH	3.0	7.0	3.0
long	-1.0	1.0	1.0
Tp	-1.0	1.0	1.0
Gradiente	-1.0	1.0	-1.0

Respuesta Optimizada para simetría de Tramadol HCl

Meta: maximizar la simetría del Tramadol HCl

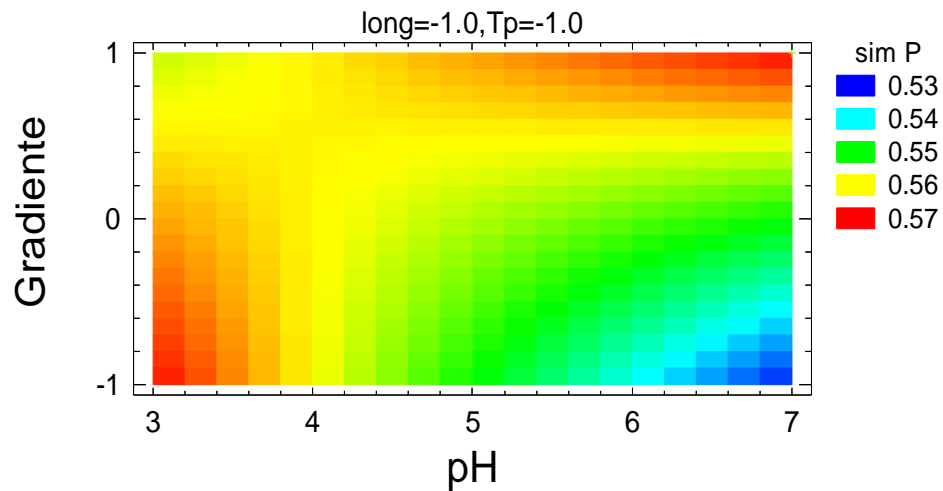
Valor Óptimo = 0.99338

Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
pH	3.0	7.0	3.0
long	-1.0	1.0	1.0
Tp	-1.0	1.0	-1.0
Gradiente	-1.0	1.0	-1.0

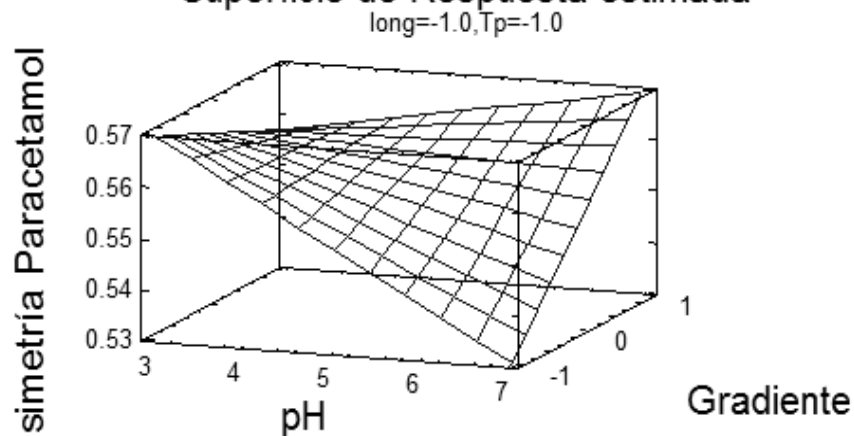
Como podemos observar, las condiciones óptimas no son las mismas para las simetrías de ambas moléculas (valores opuestos de longitud de columna y de tamaño de partícula), aún así, los datos generados concuerdan con la teoría para maximizar la simetría de Tramadol, esto es, mantener a niveles bajos al pH, tamaño de partícula y al gradiente.

## SUPERFICIES DE RESPUESTA

(a) Contornos de la Superficie de Respuesta Estimada



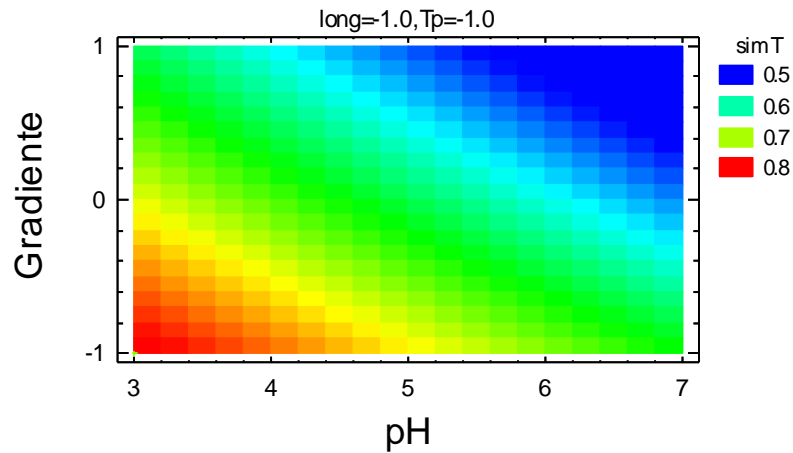
(b) Superficie de Respuesta estimada



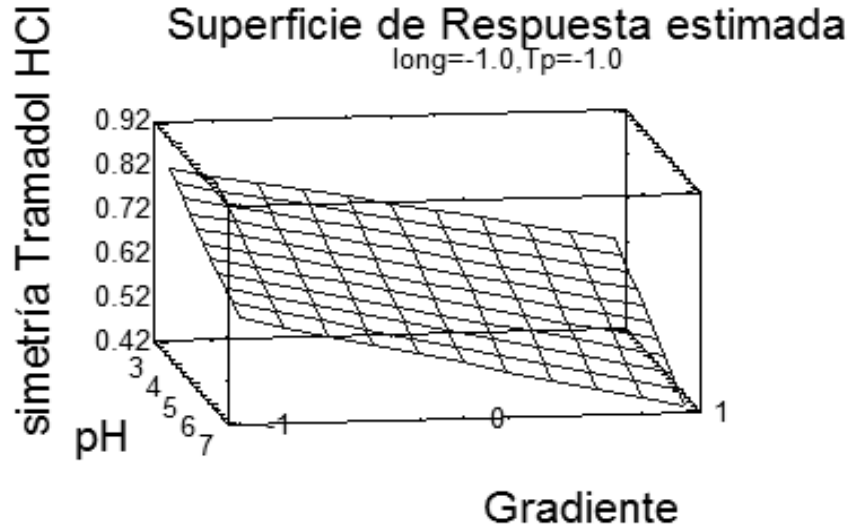
**Figura 27.** a) Superficie y; b) contornos de respuesta para la simetría del Paracetamol, los factores longitud de columna y tamaño de partícula se han fijado en sus niveles inferiores.



(a) Contornos de la Superficie de Respuesta Estimada



(b)



**Figura 28.** a) Superficie y; b) contornos de respuesta para la simetría del Paracetamol, los factores longitud de columna y tamaño de partícula se han fijado en sus niveles inferiores.

En las gráficas de contornos para las simetrías del Paracetamol y Tramadol HCl (Figuras 27(a) y 28(a)), se puede observar que en ambas moléculas se obtienen mejores valores de simetría (valores cercanos a 1) cuando el pH y el gradiente están en su nivel más bajo.



### 8.3 Anexo 3

## Número de platos teóricos de Paracetamol (N\_P) y Tramadol HCl (N\_T) CÁLCULO DE LOS EFECTOS

Tabla 32. Efectos estimados para N\_P y N\_T

Efectos estimados para N_P			Efectos estimados para N_T		
promedio	=	360.938 +/- 17.546	promedio	=	21353.9 +/- 1613.88
A:pH	=	-47.375 +/- 35.0919	A:pH	=	-5949.63 +/- 3227.75
B:long	=	291.5 +/- 35.0919	B:long	=	-2776.62 +/- 3227.75
C:Tp	=	-9.375 +/- 35.0919	C:Tp	=	-683.5 +/- 3227.75
D:Gradiente	=	-24.375 +/- 35.0919	D:Gradiente	=	5888.38 +/- 3227.75
AB	=	-40.75 +/- 35.0919	AB	=	-3486.63 +/- 3227.75
AC	=	4.125 +/- 35.0919	AC	=	2557.5 +/- 3227.75
AD	=	-20.9167 +/- 28.6524	AD	=	-2123.75 +/- 2635.45
BD	=	-53.0 +/- 35.0919	BD	=	4781.13 +/- 3227.75
CD	=	26.375 +/- 35.0919	CD	=	1365.25 +/- 3227.75
bloque	=	32.4167 +/- 28.6524	bloque	=	910.083 +/- 2635.45

Los errores estándar están basados en un error total con 13 g.l.

Gráfico de Pareto estandarizado para N\_P

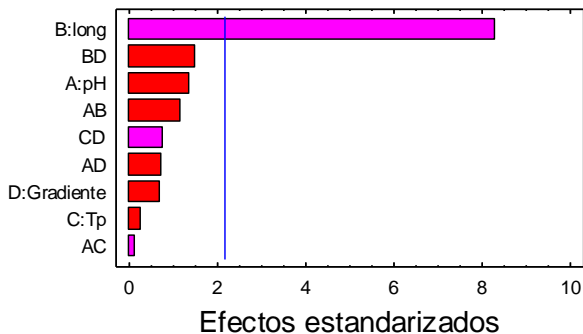


Gráfico de Pareto estandarizado para N\_T

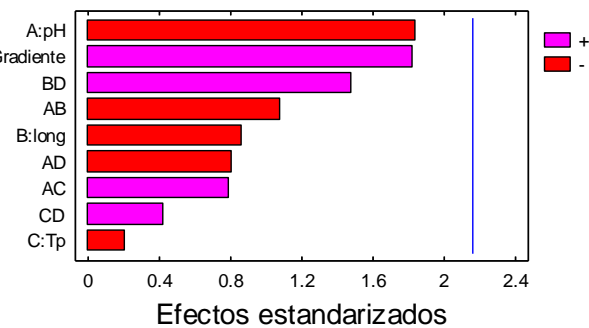


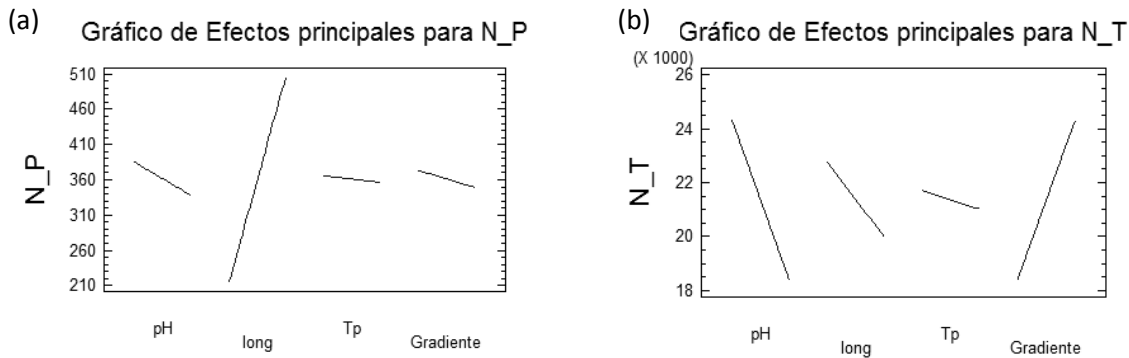
Figura 29. Efectos estandarizados para el número de platos teóricos de a) Paracetamol y; b) Tramadol HCl

De acuerdo con los diagramas de Pareto (Figuras 28(a) y 28(b)), podemos observar que en el caso del Paracetamol, el único factor principal que presenta una mayor influencia sobre la respuesta es la longitud de columna, mientras que los demás factores principales (pH, tamaño de partícula y gradiente), así como sus interacciones entre los cuatro factores, tienen efectos poco relevantes.

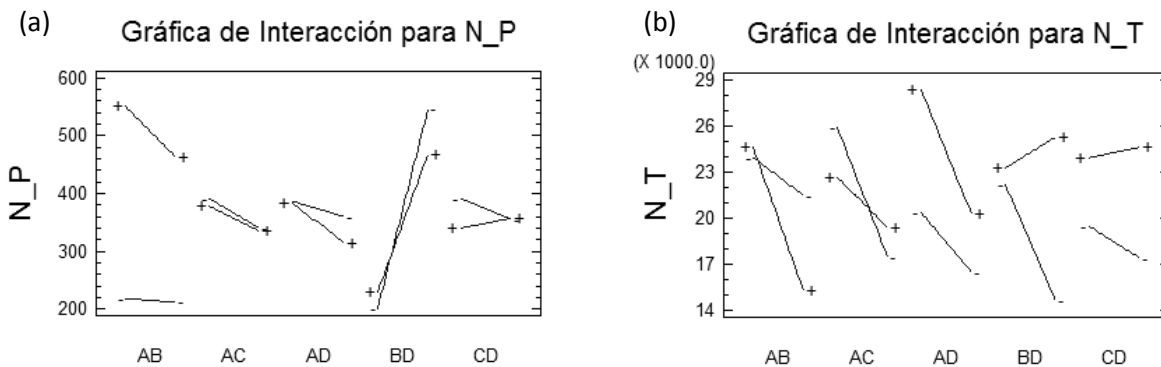
Por otro lado, ningún factor principal así como sus interacciones, ejerce alguna influencia importante sobre N\_T. Sin embargo, es de particular importancia que en ambos casos, el factor C (tamaño de partícula) influye de manera negativa y en menor grado sobre la respuesta, incluso por debajo de las demás interacciones. De cualquier modo, se tendrá que comprobar de manera formal, a través de un análisis de varianza, lo observado por los diagramas de Pareto.



## Efectos principales



**Figura 30.** Efectos principales sobre el número de platos teóricos de a) Paracetamol y b) Tramadol HCl



**Figura 31.** Gráfica de las interacciones sobre el número de platos teóricos de (a) Paracetamol y; (b) Tramadol HCl

Dado que  $N$  es casi constante para cada pico de un cromatograma bajo un conjunto de condiciones de operación fijo y de acuerdo con las gráficas de efectos principales y de las interacciones (Figuras 30 y 31), podemos sugerir que la diferencia tanto en el comportamiento de los efectos como en el orden de magnitud entre los valores de  $N_P$  y  $N_T$ , es debido al cambio en la composición de la fase móvil, esto es, mientras que el paracetamol eluye en función de una composición constante de la fase móvil, el Tramadol HCl lo hace bajo una composición variable. Este efecto debido al gradiente es similar al encontrado en el análisis de los efectos sobre la simetría.

Aún así, podemos confirmar la teoría de que a mayor longitud de columna mayor será el valor de  $N$ , como sucede en el caso del Paracetamol, no así para el Tramadol HCl, por lo que se puede inferir que la respuesta  $N_T$ , debida a la longitud de la columna, esté asociada a alguna interacción con otros factores, como lo puede ser con el gradiente y/o el tamaño de partícula.



El pH, aunque sin alguna influencia importante sobre la respuesta N, podemos observar que en ambos casos tiene un efecto negativo, indicando que entre más ionizadas estén ambas moléculas, mayor eficiencia se obtendrá.

### Análisis de varianza

De acuerdo con las tablas de análisis de varianza para N\_P y N\_T (tablas 33 y 34), podemos confirmar que el único factor principal que ejerce un efecto sobre la eficiencia de la columna en el caso de

**Tabla 33.** Análisis de la Varianza para N\_P

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:pH	8977.56	1	8977.56	1.82	0.2000
<b>B:long</b>	<b>339889.0</b>	<b>1</b>	<b>339889.0</b>	<b>69.00</b>	<b>0.0000</b>
C:Tp	351.563	1	351.563	0.07	0.7935
D:Gradiente	2376.56	1	2376.56	0.48	0.4995
AB	6642.25	1	6642.25	1.35	0.2664
AC	68.0625	1	68.0625	0.01	0.9082
AD	2625.04	1	2625.04	0.53	0.4783
BD	11236.0	1	11236.0	2.28	0.1549
CD	2782.56	1	2782.56	0.56	0.4657
bloques	6305.04	1	6305.04	1.28	0.2783
Error Total	64035.0	13	4925.77		
Total (corr.)	537662.0	23			

R-cuadrado = 88.0901 por ciento

**Tabla 34.** Análisis de la Varianza para N\_T

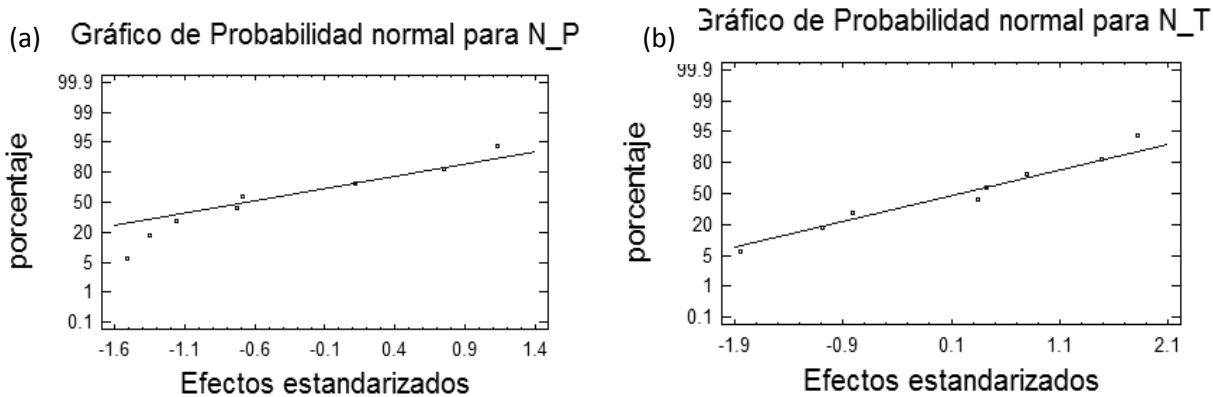
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:pH	1.41592E8	1	1.41592E8	3.40	0.0882
B:long	3.08386E7	1	3.08386E7	0.74	0.4052
C:Tp	1.86869E6	1	1.86869E6	0.04	0.8356
D:Gradiente	1.38692E8	1	1.38692E8	3.33	0.0912
AB	4.86262E7	1	4.86262E7	1.17	0.2997
AC	2.61632E7	1	2.61632E7	0.63	0.4424
AD	2.70619E7	1	2.70619E7	0.65	0.4348
BD	9.14366E7	1	9.14366E7	2.19	0.1624
CD	7.45563E6	1	7.45563E6	0.18	0.6792
bloques	4.96951E6	1	4.96951E6	0.12	0.7354
Error Total	5.41757E8	13	4.16736E7		
Total (corr.)	1.07461E9	23			

R-cuadrado = 49.5859 por ciento





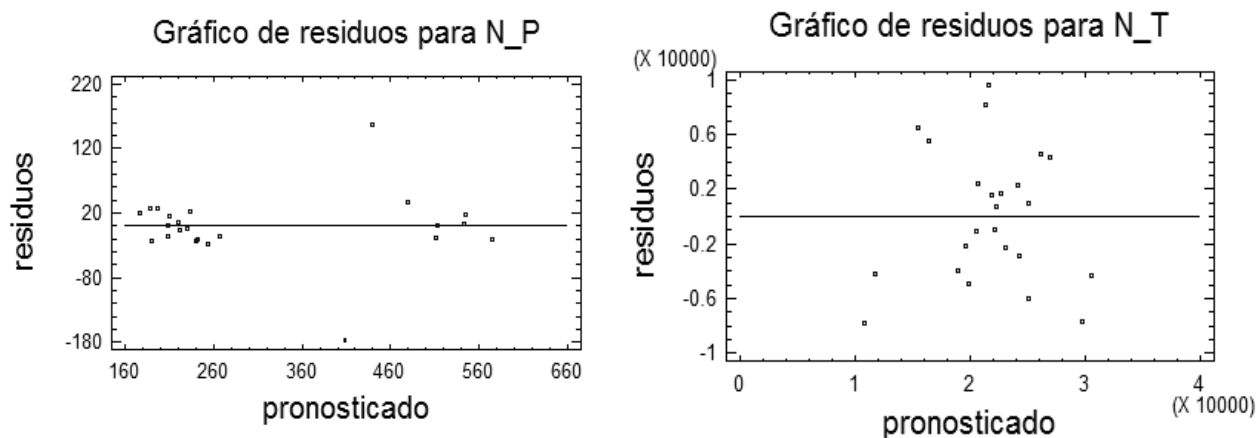
## Verificación de supuestos



**Figura 32.** Probabilidades normales para (a) N<sub>P</sub> y; (b) N<sub>T</sub>.

En las gráficas de probabilidad normal para N<sub>P</sub> y N<sub>T</sub> (Figuras 32(a) y 32(b)), podemos observar que en ambos casos los errores insignificantes están normalmente distribuidos sobre la línea; sin embargo podemos notar que hay un efecto que influye de manera significativa sobre la respuesta y está representado como un punto que se aleja más allá de la línea y por debajo de ella, siendo este producido por la longitud de la columna.

En ambos casos, no existe evidencia alguna de no-normalidad ni residuos inusitados.



**Figura 33.** Residuos y valores ajustados para (a) N<sub>P</sub> y; (b) N<sub>T</sub>.

En las gráficas de residuos para N<sub>P</sub> y N<sub>T</sub> (Figuras 33(a) y 33(b)), observamos que todos los puntos mostrados caen de manera aleatoria y dentro de una banda horizontal, lo que sugiere que los residuos son independientes y que no hay un patrón evidente de



los residuos con respecto a los valores ajustados mediante la ecuación que describe al modelo, cumpliendo así con el supuesto de varianza constante.

Debido a que la verificación de supuestos se realiza para el modelo ajustado al análisis de varianza, podemos entonces mencionar que el modelo explica apropiadamente los datos obtenidos, y por lo tanto disminuye la probabilidad de dar conclusiones incorrectas.

## ROBUSTEZ

### MODELO DE REGRESIÓN

**Tabla 35** Coeficientes de regresión para N\_P y N\_T

Coef. de regresión para N_P		Coef. de regresión para N_T	
constante	= 420.156	constante	= 28791.0
A:pH	= -11.8437	A:pH	= -1487.41
B:long	= 196.688	B:long	= 2969.97
C:Tp	= -9.84375	C:Tp	= -3538.62
D:Gradiente	= 13.9583	D:Gradiente	= 5598.87
AB	= -10.1875	AB	= -871.656
AC	= 1.03125	AC	= 639.375
AD	= -5.22917	AD	= -530.937
BD	= -26.5	BD	= 2390.56
CD	= 13.1875	CD	= 682.625

Los valores de las variables se especifican en sus unidades originales

La tabla 35 muestra los valores de los coeficientes de regresión para N\_P y N\_T, tales coeficientes corresponden a la ecuación que mejor se ajusta a los datos de cada respuesta. Las ecuaciones son:

$$N_P = 420.156 - 11.8437 \cdot \text{pH} + 196.688 \cdot \text{long} - 9.84375 \cdot \text{Tp} + 13.9583 \cdot \text{Gradiente} - 10.1875 \cdot \text{pH} \cdot \text{long} + 1.03125 \cdot \text{pH} \cdot \text{Tp} - 5.22917 \cdot \text{pH} \cdot \text{Gradiente} - 26.5 \cdot \text{long} \cdot \text{Gradiente} + 13.1875 \cdot \text{Tp} \cdot \text{Gradiente}$$

$$N_T = 28791.0 - 1487.41 \cdot \text{pH} + 2969.97 \cdot \text{long} - 3538.62 \cdot \text{Tp} + 5598.87 \cdot \text{Gradiente} - 871.656 \cdot \text{pH} \cdot \text{long} + 639.375 \cdot \text{pH} \cdot \text{Tp} - 530.937 \cdot \text{pH} \cdot \text{Gradiente} + 2390.56 \cdot \text{long} \cdot \text{Gradiente} + 682.625 \cdot \text{Tp} \cdot \text{Gradiente}$$

### PREDICCIÓN DE RESULTADOS

Las tablas 36 y 37 contienen información sobre los valores de N\_P y N\_T que se han generado usando el modelo ajustado, en base a esto, se puede calcular el valor de la simetría bajo ciertas condiciones de trabajo.



**Tabla 36** Resultados de la Estimación para N<sub>P</sub>

Fila	Observados Valor	Ajustados Valor	Inf. 95.0% CL para la Media	Sup. 95.0% CL para la Media
1	224.0	197.458	94.8089	300.108
2	208.0	207.625	104.976	310.274
3		582.708	416.038	749.379
4		511.375	344.704	678.046
5	176.0	157.583	54.9339	260.233
6	196.0	176.0	73.3505	278.649
7	546.0	542.833	440.184	645.483
8	516.0	479.75	377.101	582.399
9	226.0	220.625	117.976	323.274
10	217.0	188.958	86.3089	291.608
11		499.875	333.204	666.546
12		386.708	220.038	553.379
13	255.0	233.5	130.851	336.149
14	226.0	210.083	107.434	312.733
15	513.0	512.75	410.101	615.399
16	232.0	407.833	305.184	510.483
17	226.0	229.875	127.226	332.524
18	217.0	240.042	137.392	342.691
19		615.125	448.454	781.796
20		543.792	377.121	710.462
21	167.0	190.0	87.3505	292.649
22	193.0	208.417	105.767	311.066
23	554.0	575.25	472.601	677.899
24	494.0	512.167	409.517	614.816
25	225.0	253.042	150.392	355.691
26	216.0	221.375	118.726	324.024
27		532.292	365.621	698.962
28		419.125	252.454	585.796
29	249.0	265.917	163.267	368.566
30	222.0	242.5	139.851	345.149
31	563.0	545.167	442.517	647.816
32	598.0	440.25	337.601	542.899

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

**Tabla 37** Resultados de la Estimación para N<sub>T</sub>

Fila	Observados Valor	Ajustados Valor	Inf. 95.0% CL para la Media	Sup. 95.0% CL para la Media
1	21300.0	24206.3	14764.6	33648.0
2	29468.0	21309.6	11867.9	30751.3
3		20135.2	4804.83	35465.6
4		10265.2	-5065.17	25595.6
5	17473.0	19600.1	10158.4	29041.8
6	23357.0	21818.3	12376.6	31260.0
7	22014.0	15529.0	6087.26	24970.7
8	2943.0	10774.0	1332.26	20215.7
9	30573.0	26072.1	16630.4	35513.8
10	15019.0	18927.8	9486.14	28369.5
11		31563.2	16232.8	46893.6
12		17445.7	2115.33	32776.1
13	26469.0	24196.3	14754.6	33638.0
14	21242.0	22167.1	12725.4	31608.8
15	21979.0	29687.5	20245.8	39129.2
16	23136.0	20685.0	11243.3	30126.7
17	19155.0	25116.4	15674.7	34558.1
18	22929.0	22219.7	12778.0	31661.4
19		21045.3	5714.92	36375.7
20		11175.3	-4155.08	26505.7
21	19450.0	20510.2	11068.5	29951.9
22	24377.0	22728.4	13286.7	32170.1
23	22009.0	16439.0	6997.34	25880.7
24	7460.0	11684.0	2242.34	21125.7
25	31349.0	26982.2	17540.5	36423.9
26	14879.0	19837.9	10396.2	29279.6
27		32473.3	17142.9	47803.7
28		18355.8	3025.42	33686.2
29	26021.0	25106.4	15664.7	34548.1
30	20815.0	23077.2	13635.5	32518.9
31	26251.0	30597.5	21155.8	40039.2
32	31199.0	21595.0	12153.3	31036.7

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



## OPTIMIZACIÓN DE RESULTADOS

En este apartado, buscamos optimizar la eficiencia de la columna, por medio de predecir las condiciones óptimas para obtener mejores valores de N.

Respuesta Optimizada

-----  
Meta: maximizar N\_P

Valor Óptimo = 597.318

Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
pH	3.0	7.0	3.0
long	-1.0	1.0	1.0
Tp	-1.0	1.0	-1.0
Gradiente	-1.0	1.0	-1.0

Respuesta Optimizada

-----  
Meta: maximizar N\_T

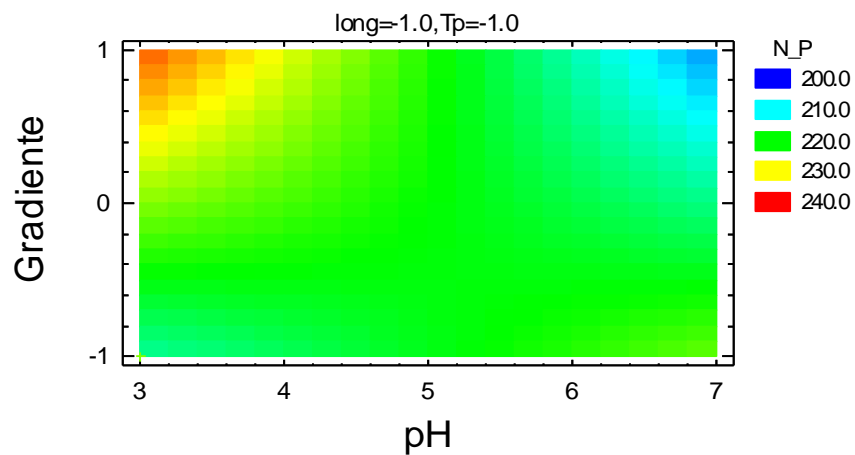
Valor Óptimo = 31991.1

Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
pH	3.0	7.0	3.0
long	-1.0	1.0	1.0
Tp	-1.0	1.0	-1.0
Gradiente	-1.0	1.0	1.0

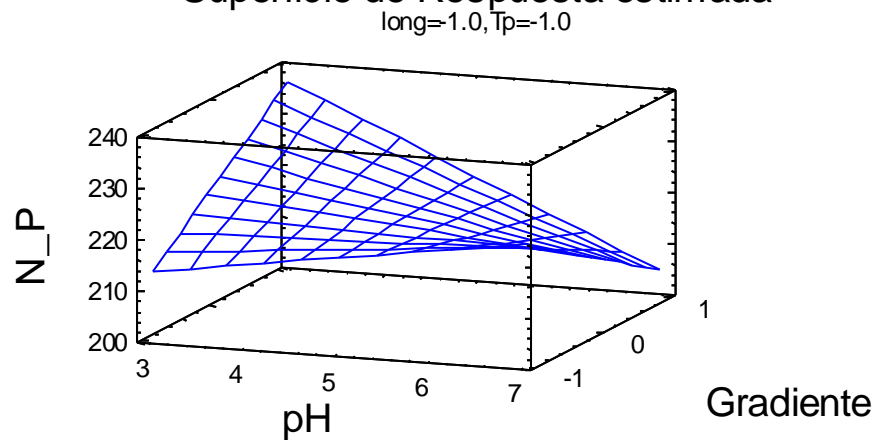
Como podemos observar, las condiciones óptimas sugeridas por el análisis estadístico, no son las adecuadas para llevar a cabo un análisis cromatográficas, debido a que una columna de longitud mayor a 5 cm y con tamaño de partícula de 1.8  $\mu\text{m}$  elevaría la presión del sistema a grado tal que sería muy complicado establecer un flujo apropiado para la fase móvil, corriendo el riesgo de provocar un daño severo al sistema de bombeo, aunado a las fugas que pudieran estar presentes en todo el equipo. Es por esta razón, que para fines de operación, se ha decidido fijar los valores de longitud de la columna y de tamaño de partícula en sus niveles más bajos.

## SUPERFICIES DE RESPUESTA

(a) Contornos de la Superficie de Respuesta Estimada



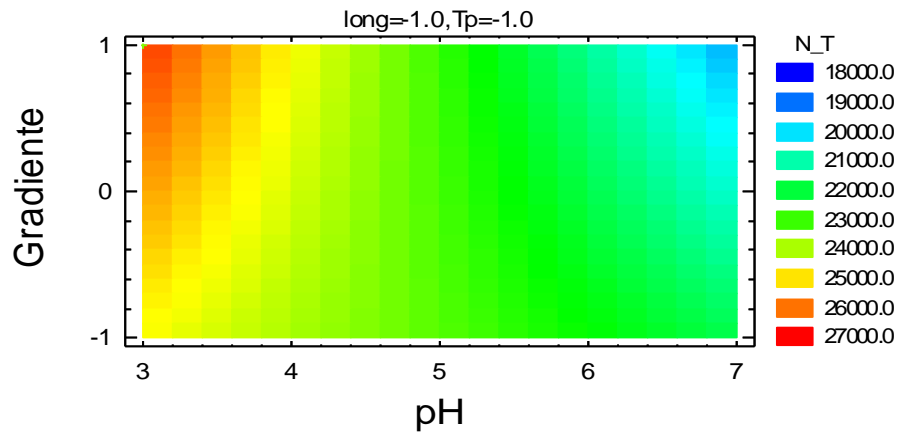
(b) Superficie de Respuesta estimada



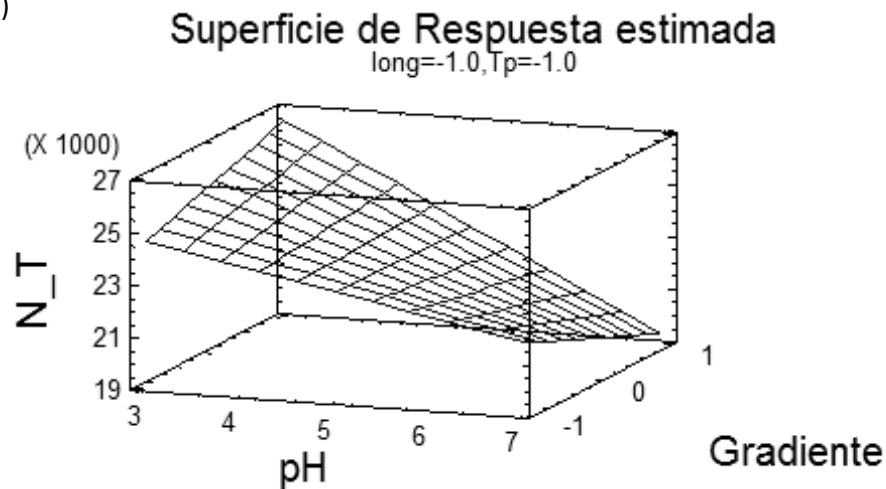
**Figura 34.** (a) Superficie y; (b) contornos de respuesta para N\_P, los factores longitud de columna y tamaño de partícula se han fijado en sus niveles inferiores



## (a) Contornos de la Superficie de Respuesta Estimada



## (b)



**Figura 35.** (a) Superficie y; (b) contornos de respuesta para  $N_T$ , los factores longitud de columna y tamaño de partícula se han fijado en sus niveles inferiores

Con base a las gráficas de contornos para  $N_P$  y  $N_T$  (Figura 34 (a) y 35(a)), podemos observar que en ambos casos, se obtienen mayores valores de  $N$  cuando el gradiente está en su nivel alto y el pH está en su nivel más bajo.



## 8.4 Anexo 4

Proyección del diseño  $2^4$ 

*Proyectar un diseño* consiste en eliminar completamente del análisis a un factor, con lo que el diseño factorial  $2^4$  original se convierte en un diseño completo con un factor menos ( $2^{4-1}$ ).

En este análisis en particular se ha eliminado el factor longitud de la columna, de esta forma se obtiene un mejor ajuste en el modelo para el cálculo de la resolución crítica.

Tabla 38.- Proyección del diseño  $2^4$ 

FACTORES							
A: pH	B:Tp	C:Gradiente	bloque	pH	Tp	Gradiente	Rc
-1	-1	-1	1	3	1.8	1	15.14
1	-1	-1	1	7	1.8	1	9.54
-1	1	-1	1	3	5.0	1	9.12
1	1	-1	1	7	5.0	1	10.67
-1	-1	1	1	3	1.8	2	17.98
1	-1	1	1	7	1.8	2	11.17
-1	1	1	1	3	5.0	2	18.94
1	1	1	1	7	5.0	2	11.14
-1	-1	-1	2	3	1.8	1	14.23
1	-1	-1	2	7	1.8	1	10.64
-1	1	-1	2	3	5.0	1	8.4
1	1	-1	2	7	5.0	1	10.67
-1	-1	1	2	3	1.8	2	18.17
1	-1	1	2	7	1.8	2	10.03
-1	1	1	2	3	5.0	2	18.22
1	1	1	2	7	5.0	2	10.94

Tabla 39.- Efectos estimados para la resolución crítica

Efecto	Estimado	Error Estd.
A:pH	-4.43	0.63
B:Tp	-1.1	0.63
C:Gradiente	3.52	0.63
AB	1.61	0.63
AC	-3.08	0.63
BC	1.57	0.63
bloque	-0.3	0.63



Gráfico de Pareto estandarizado para Rc

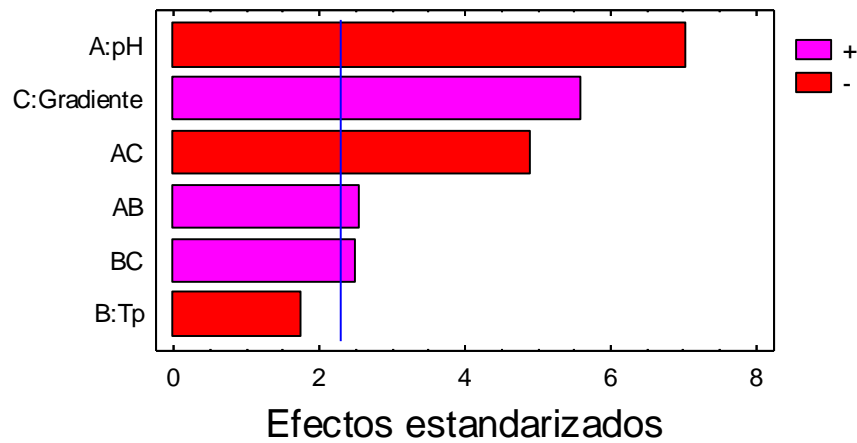


Figura 36.- Gráfico de Pareto estandarizado para Rc

Tabla 40.- Análisis de varianza para la resolución crítica (Rc)

Fuente	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:pH	78.32	1	78.32	49.51	0.0001
B:Tp	4.84	1	4.84	3.06	0.1184
C:Gradiente	49.63	1	49.63	31.37	0.0005
AB	10.37	1	10.37	6.55	0.0336
AC	38.00	1	38.00	24.02	0.0012
BC	9.89	1	9.89	<b>6.25</b>	<b>0.0369</b>
bloques	0.36	1	0.36	0.23	0.6461
Error total	12.66	8	1.58		

Gráfico de Efectos principales para Rc

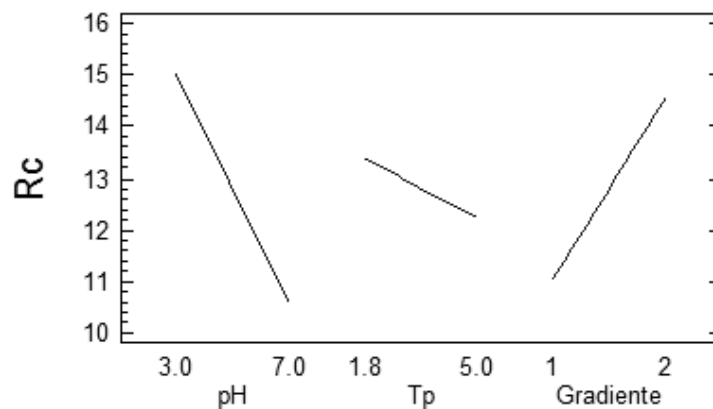


Figura 37.- Gráfico de efectos principales para Rc





**Tabla 41.-** Coeficientes del modelo ajustado para el cálculo de la resolución

Coeficiente	Estimado
Constante	18.34
A:pH	-1.11
B:Tp	-2.56
C:Gradiente	5.61
AB	0.40
AC	-0.77
BC	0.79

La ecuación del modelo ajustado es:

$$R_c = 18.34 - 1.11 \cdot \text{pH} - 2.56 \cdot \text{Tp} + 5.61 \cdot \text{Gradiente} + 0.40 \cdot \text{pH} \cdot \text{Tp} - 0.77 \cdot \text{pH} \cdot \text{Gradiente} + 0.79 \cdot \text{Tp} \cdot \text{Gradiente}$$

Gráfico de la interacción para  $R_c$

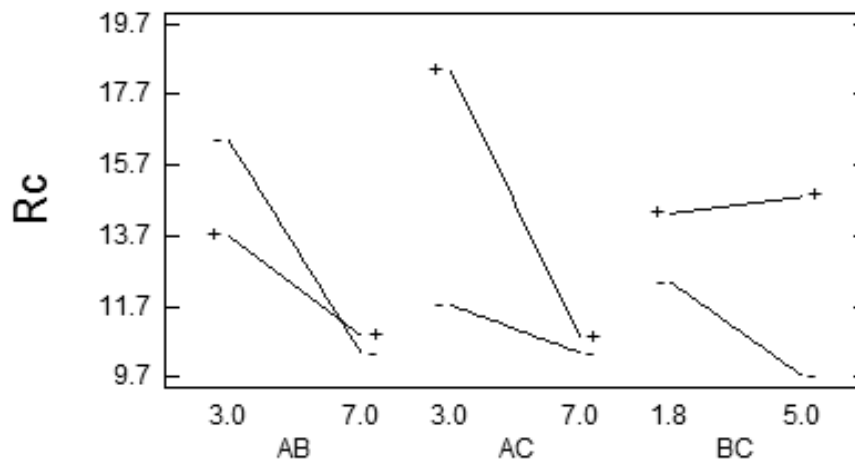
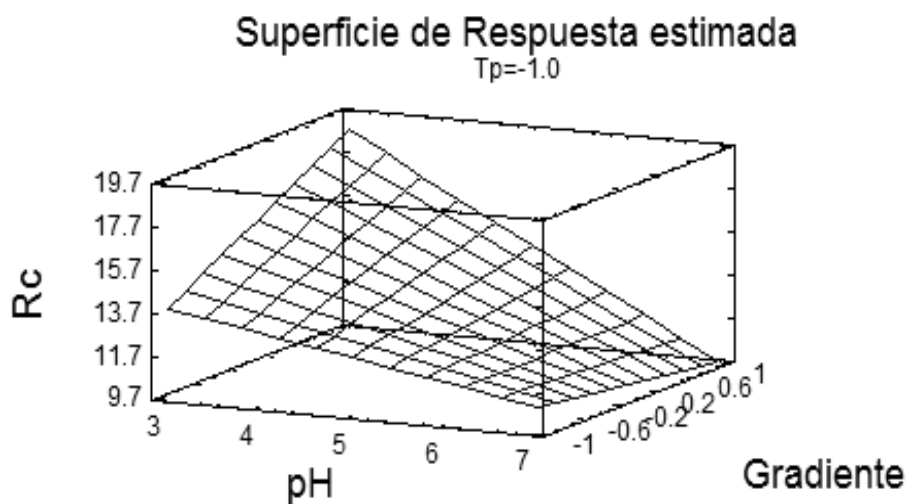


Figura 38.-Gráfico de la interacción para  $R_c$

**Tabla 42.-** Valores de resolución estimados con el modelo de regresión lineal

Fila	Valores experimental	Valores ajustados	Límite inferior 95.0%	Límite superior 95.0%
1	15.14	14.01	11.96	16.06
2	9.54	11.06	9.01	13.11
3	9.12	9.73	7.68	11.78
4	10.67	10.00	7.95	12.05
5	17.98	19.04	17.00	21.09
6	11.17	9.93	7.88	11.98
7	18.94	17.91	15.86	19.96
8	11.14	12.01	9.96	14.06
9	14.23	13.71	11.66	15.76
10	10.64	10.76	8.71	12.81
11	8.4	9.43	7.38	11.48
12	10.67	9.70	7.64	11.75
13	18.17	18.75	16.70	20.80
14	10.03	9.63	7.58	11.68
15	18.22	17.61	15.56	19.66
16	10.940	11.71	9.66	13.76

**Figura 39.-** Gráfico de superficie de respuesta para Rc