UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE ROBUSTEZ DURANTE LA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE DISOLUCIÓN DE TABLETAS CONTENIENDO TRAMADOL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

VÍCTOR ALFONSO MARTÍNEZ GARCÍA

MÉXICO, D.F. **2015**

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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:	**Profesora Georgina Margarita Maya Ruiz**
VOCAL:	**Profesor Juan Manuel Rodríguez**
SECRETARIO:	**Profesora Silvia Reyes Salinas**
1er. SUPLENTE:	**Profesora Blanca Estela Rivero Cruz**
2do. SUPLENTE:	**Profesora Natividad García Escamilla**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Unidad Analítica

Laboratorio 10 del Conjunto F de la Facultad de Química de la UNAM

ASESOR DEL TEMA: _____

M. en C. Juan Manuel Rodríguez

SUPERVISOR TÉCNICO: _____

QFB Ernesto Salgado Olvera

SUSTENTANTE: _____

Víctor Alfonso Martínez García

ÍNDICE

Página

***PARTE I*. INTRODUCCIÓN** *1*

Objetivos *2*

***PARTE II*. MARCO TEÓRICO** *3*

2.1 Validación de métodos analíticos *4*

2.1.1. ¿Qué es la validación de métodos analíticos? *4*

2.1.2. Clasificación de los métodos analíticos *5*

2.1.3. Parámetros que deben validarse en un método analítico *6*

2.2 Robustez *9*

2.2.1. Identificación y selección de factores *10*

2.2.2. ¿Cómo determinar los niveles de los factores? *11*

Para factores cuantitativos *11*

Para factores cualitativos *12*

2.2.3 Selección del diseño experimental: herramientas estadísticas *12*

2.2.3.1 Diseño de experimentos tipo Placket y Burman *13*

2.2.3.2 Análisis de efectos *15*

2.3 Tabletas, disolución y prueba farmacopéica de disolución aplicada a tabletas *19*

2.3.1 Tabletas *20*

2.3.2 La disolución como fenómeno fisicoquímico aplicable en Farmacia *21*

2.3.3 Prueba farmacopéica de disolución de tabletas *23*

2.3.3.1 Equipo de disolución: el disolutor *23*

2.3.3.2 Factores que influyen en el proceso de disolución.. *24*

Página

2.4 Tramadol Clorhidrato *26*

2.4.1 Tabletas de Tramadol Clorhidrato *26*

2.4.2 Propiedades de interés farmacológico del Tramadol Clorhidrato *27*

2.4.3 Propiedades fisicoquímicas del Tramadol Clorhidrato ... *28*

2.5 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) .. *30*

2.5.1 El cromatograma: instrumento del análisis por CLAR ... *32*

2.5.2 Componentes del sistema CLAR *34*

2.5.3 Análisis cualitativo mediante CLAR *35*

2.5.4 Análisis cuantitativo mediante CLAR *36*

***PARTE III*. PROTOCOLO EXPERIMENTAL** *37*

Planteamiento *38*

3.1 Primera sección. Marbete, reactivos y materiales *39*

3.1.1 Marbete de la tableta sometida al estudio de robustez.. *39*

3.1.2 Reactivos *39*

3.1.3 Materiales *39*

3.2 Segunda sección. Metodología *41*

3.2.1 Soluciones previas *41*

3.2.2 Condiciones nominales de la prueba *42*

3.2.3 Protocolo experimental del estudio de robustez *45*

3.2.3.1 Factores elegidos y diseño de las corridas analíticas *45*

3.2.3.2 Interpretación de los cromatogramas..... *51*

3.2.3.3 Tratamiento estadístico de los datos..... *55*

3.2.3.3.1 Análisis de efectos..... *55*

Página

***PARTE IV*. RESULTADOS, ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN** *58*

Planteamiento..... *59*

4.1 Resultados generales *60*

4.1.1 Selección de cromatogramas de la corrida #1 ..... *61*

4.1.2 Adecuabilidad del sistema, factor de respuesta (FR) y muestras de la corrida #1 ..... *65*

4.1.2.1 Adecuabilidad del sistema *65*

4.1.2.2 Inyección de estándares y cálculo del Factor de Respuesta *66*

4.1.2.3 Soluciones muestra. Determinación de % de Tramadol HCl disuelto *67*

4.1.3 Resultados de las 8 corridas (% de Tramadol Clorhidrato disuelto) *68*

4.2 Análisis estadístico de resultados *71*

4.2.1 Análisis de efectos *71*

4.3 Discusión *76*

***PARTE V*. CONCLUSIONES** *79*

***PARTE VI*. Referencias bibliográficas**..... *81*

***PARTE VII*. ANEXOS**

Anexo I. Resumen de resultados (corridas 2 a 8) 83

Anexo II. Ejemplo de cálculos 95

I. INTRODUCCIÓN

Las actividades de la industria farmacéutica son fuertemente reguladas por su importancia en el contexto del mantenimiento o corrección de la salud humana. Las empresas participantes, desde sus centros de investigación hasta sus plantas de producción, deben presentar todas las etapas de sus procesos debidamente caracterizadas.

Entre dichos procesos, el análisis general (fisicoquímico, microbiológico, producto en proceso, etc), por su importancia aparece en la columna vertebral de la ciencia farmacéutica. Formalmente bajo los objetivos, necesidades y dinámicas industriales se le da el nombre de control de calidad. Como parte de las etapas mencionadas debe hacer uso de metodologías analíticas *previamente validadas* para tener absoluta certeza de su buen funcionamiento como herramientas de análisis.

La validación de un método analítico puede ser bastante extensa. Vale la pena comentar que en función del tipo de método se toman consideraciones diferentes, esto es, se evalúan unos u otros parámetros pero cada uno con una justificación detrás. Están aquellos que persiguen demostrar la precisión, la repetibilidad, la robustez, entre otras características del método.

Al evaluar la robustez se está asegurando que algún posible cambio en el proceso analítico ha sido previamente considerado y se ha verificado que el método analítico sigue siendo funcional, en otras palabras, se aseguró la validez del análisis aún habiendo pequeños cambios que fueron previstos desde la etapa de desarrollo del método.

Este estudio de robustez pretende estudiar algunos factores que pueden cambiar durante la ejecución del método y que pudieran afectar la respuesta analítica. Entonces como objetivo general tenemos que se trata de

determinar si hay efecto sobre la respuesta analítica (% de Tramadol disuelto) al hacer pequeños cambios en los factores longitud de onda del detector del cromatógrafo, velocidad de agitación en la disolución, volumen, concentración y desgasificación del medio de disolución.

Y como objetivos particulares:

- Aplicar el análisis estadístico recomendado por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos para determinar la significancia de los factores estudiados.

- Proponer nuevas condiciones para que la respuesta analítica se vea inalterada bajo los factores que resulten significativos, es decir, se comporten como si fueran robustos.

PARTE II.

Marco Teórico

2.1 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

2.1.1 ¿Qué es la validación de métodos analíticos?

El cuidado de la salud es una labor en la que por su trascendencia, no se permite cometer errores al estar en juego vidas humanas o animales. No sólo pueden ocurrir acciones sin efecto; sino efectos negativos como provocar la muerte. La industria farmacéutica se involucra en esta actividad produciendo y/o acondicionando sustancias con efectos terapéuticos. Mismas que por ley pasan un exigente proceso de producción y verificación de calidad. Es en este contexto que se debe hacer un trabajo impecable desde la concepción de un nuevo fármaco, hasta su administración en una forma farmacéutica.

Como es natural, la ciencia farmacéutica ha evolucionado buscando evitar casos como el de la Talidomida en los años 60 cuyo efecto teratogénico se descubrió tardíamente. En esa transformación nació la idea de cuidar con más rigor todos sus procesos, dando origen a la validación de procesos y métodos analíticos.

Según la *Conferencia Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano* (referida como ICH), la *validación* se entiende como la recopilación de información experimental para demostrar que un sistema, equipo, procedimiento o *método analítico*, tiene un funcionamiento óptimo, para el que fue diseñado, bajo determinadas condiciones. El *método analítico* es la manera de efectuar un análisis; en éste se describen en detalle los pasos necesarios para realizar cada prueba analítica. Esto puede incluir: la muestra, estándar de referencia, soluciones reactivo, uso de equipos, materiales, etc.[1][2] En otros términos, la validación de métodos analíticos en la industria farmacéutica sirve para otorgar credibilidad a sus pruebas, y demostrar que trabaja y produce bajo la legislación correspondiente.

Entonces, la *validación de un método analítico* corresponde al procedimiento experimental realizado para obtener una base de datos (evidencia) que demuestre científicamente que el método tiene las características adecuadas para cumplir los requerimientos del análisis pretendido. Implica determinar las fuentes de variabilidad y de error, incluso en el análisis de muestras reales. En síntesis, la validación tiene como objetivo demostrar que el método analítico es adecuado para el objetivo con que fue diseñado y concebido.[1][2]

Los métodos analíticos están sujetos a la normativa vigente, nacional e internacional. En México la entidad encargada de hacer cumplir la legislación en la materia es la Secretaría de Salud (SS) a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). Ésta se apoya en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), que es una recopilación de métodos analíticos descritos detalladamente, entre otra información.

2.1.2 Clasificación de los métodos analíticos

En función de las diferencias que radican en el objetivo que tiene un método analítico, la FEUM y a su vez la USP, los clasifican como sigue:[3][4]

Categoría	Definición
I	Métodos que cuantifican un componente específico en el producto terminado o pruebas de estabilidad.
II	Métodos para determinar impurezas (productos de degradación, sustancias relacionadas). El interés es establecer si el analito excede o no un valor límite.
III	Métodos cuyo objetivo es evaluar el desempeño del medicamento (disolución, liberación controlada, etc).
IV	Pruebas de identificación de un analito. El objetivo es establecer la presencia del analito de interés.

TABLA 1. Clasificación de los métodos analíticos, en cuatro categorías, basada en sus objetivos. Las categorías I, II y IV se aplican a fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos.

2.1.3 Parámetros que deben validarse en un método analítico[3]

Según la categoría a la que pertenece un método analítico, se recomienda incluir ciertos parámetros de desempeño en su validación:

Parámetros de desempeño	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Cuantitativas	Pruebas límite		
Verificación del sistema	*	*	*	*	✖
Precisión del sistema	✔	✔	*	***	✖
Linealidad del sistema	✔	✔	*	*	✖
Especificidad/ Selectividad	✔	✔	✔	*	✔
Exactitud del método	✔	✔	*	*	✖
Linealidad del método	✔	✔	*	*	✖
Precisión del método	✔	✔	✖	✔	✖
Límite de detección	✖	✖	✔	*	✖
Límite de cuantificación	✖	✔	✖	*	✖
Tolerancia	*	*	*	*	*
Robustez	*	*	*	*	*

TABLA 2. Parámetros a incluir en la validación de un método de acuerdo con su aplicación. Los primeros tres parámetros se aplican al sistema, el resto se aplica al método. Claves:

✔ Debe evaluarse

✖ No debe evaluarse

* Puede ser necesario dependiendo de la naturaleza del método.

*** No está especificado

Diversas fuentes indican que *se recomienda* evaluar determinados parámetros; esto se debe a que no hay una regla de seguimiento riguroso que diga cuáles incluir en la validación, por el contrario, suele decirse entre los farmacéuticos dedicados al desarrollo de métodos analíticos que eventualmente es el criterio del analista el que define los parámetros a incluir en el protocolo de validación.

Por otro lado, las mismas fuentes definen estos conceptos de manera similar. Es así que los parámetros de desempeño alistados en la tabla 2 se explican* como sigue: [1][3][4]

Con relación a las pruebas de *aptitud del sistema* o «*system suitability testing*», encuentran justificación en el hecho de que aparatos, operaciones analíticas y muestras forman un sistema integral que puede ser evaluado. Los parámetros a evaluar dependen de cada método particular (ver tabla 2). [1]

- *Verificación del sistema*: pruebas utilizadas para verificar que el sistema funciona correctamente con base en criterios establecidos previamente. Otorga confiabilidad al sistema previo al uso diario con muestras reales. [3]

- *Precisión del sistema*: el sistema origina una variabilidad inherente asociada a la respuesta analítica (absorbancia, área del pico, etc), la cual es aditiva a la del método. Se verifica que no sea una fuente importante de variabilidad. Es el grado de concordancia de la respuesta analítica de soluciones de referencia de concentración o magnitud conocida. [3]

- *Linealidad del sistema*: verificación de que la respuesta analítica y la cantidad del analito (ej: concentración de una sustancia de referencia) se comportan linealmente en un intervalo pertinente para el método. [3]

* Considerando que este trabajo es un *estudio de robustez* exclusivamente, será el parámetro que se defina con más detalle.

Para abordar las *características de desempeño del método*, sus objetivos deben ser bien definidos desde un principio (categoría a la que pertenece), para, con base en esto, elegir los parámetros que se incluirán en la validación:

- *Especificidad*: capacidad para responder ante el analito de interés aún en presencia de otros componentes (típicamente impurezas, excipientes). [1]

- *Exactitud*: concordancia absoluta entre el resultado obtenido con el método y la cantidad real del analito presente en la muestra. [3]

- *Linealidad e intervalo*: capacidad para obtener respuestas directamente proporcionales (lineales) a la cantidad del analito en la muestra, dentro de un intervalo dado. Éste se forma entre la cantidad más alta y más baja del analito en la muestra incluyendo esos valores. [1]

- *Precisión*: grado de concordancia entre los resultados obtenidos aplicando el método, bajo las mismas o diferentes condiciones analíticas (repetibilidad y reproducibilidad respectivamente), sobre una muestra homogénea. Se expresa como la desviación estándar o como el coeficiente de variación (desviación estándar relativa). [3]

- *Límite de detección*: mínima cantidad de analito, que en un análisis individual, puede detectarse pero no necesariamente cuantificarse con exactitud.[1] Las pruebas límite indican que la cantidad de analito sobrepasa o no un valor dado. Se expresa como %, ppm, ppb[†], etc. [3]

- *Límite de cuantificación*: mínima cantidad de analito, que en un análisis individual, puede ser cuantificada con precisión y exactitud. Suele evaluarse en determinación de impurezas o productos de degradación.[1]

[†] Unidades de concentración porcentual, partes por millón y partes por billón respectivamente.

✤ *Tolerancia*: grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos en el análisis de la misma muestra, bajo diferentes condiciones normales de operación (i. e. diferentes laboratorios, analistas, lotes de reactivos, días, equipos, etc).[2][3] La tolerancia estudia factores externos al método.[2]

2.2 ROBUSTEZ

Robustez: es la capacidad que tiene un método analítico para permanecer inalterado por *pequeñas pero deliberadas variaciones,* fijadas por el analista, en los parámetros normales de operación del método. Es un indicador de su fiabilidad durante el uso cotidiano.[2][5] El objetivo de hacer un estudio de robustez es conocer las fuentes de variabilidad en la respuesta del método. [5]

La pertinencia de la inclusión de la evaluación de la robustez debe definirse en la fase de desarrollo del método. Si las mediciones son afectadas por las variaciones que se prueban en el estudio de robustez, se debe hacer énfasis en el control cuidadoso de las condiciones señaladas como origen de variabilidad. Se puede llegar a una serie de parámetros de idoneidad bajo los que se garantiza la validez del método al ser usado bajo esas condiciones.[1][6] La robustez puede ser estudiada usando diseño de experimentos. [7]

Para ejecutar un estudio de robustez se pueden seguir los siguientes pasos: [5]

1) Identificación / selección de los factores que se evaluarán
2) Definición o selección de los niveles de dichos factores
3) Selección del diseño experimental
4) Elaboración del protocolo experimental
5) Definir qué respuestas analíticas se obtendrán
6) Ejecución de los experimentos

7) Cálculo de los efectos

8) Análisis estadístico de los efectos

9) Obtención de conclusiones químicamente relevantes. Y según éstas, si fuera el caso, hacer modificaciones, o advertencias en la metodología.

A continuación se profundizará únicamente en los primeros 3 pasos‡:

2.2.1 Identificación y selección de factores.

Comúnmente habrá diferentes factores candidatos a ser evaluados en un estudio de robustez pero se eligen los que pueden tener influencia en la respuesta analítica. Se *examinan en un intervalo que exceda ligeramente las variaciones cotidianas* al efectuar el análisis.[5] Los extremos del intervalo (niveles) son definidos por el analista y/o matemáticamente.

Para elegir los factores suele utilizarse el criterio del analista más que un protocolo preciso. Puede tratarse de factores instrumentales y/o no instrumentales.[3] Diversos autores califican como «típicos» o «potenciales» factores a evaluar, en función del tipo de método, a los siguientes:

- *Métodos analíticos en general*: estabilidad de soluciones analíticas, tiempo de extracción.[1] Lotes, proveedores de reactivos, temperatura de un proceso, tiempo o tipo de agitación, concentración de reactivos.[8]

- *Métodos analíticos en los que se utiliza Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)*: elución isocrática o en gradiente§, pH de la fase móvil, velocidad de flujo de la misma, columnas de diferentes proveedores y factores del detector (longitud de onda, luz UV), entre otros. [1][5][6]

‡ El resto de los pasos corresponden al método, experimentos y resultados de este trabajo.

§ Isocrática: la fase móvil mantiene su composición sin cambios durante todo el proceso. En gradiente: la composición de la fase móvil cambia durante el experimento.

Los factores elegidos pueden ser ***cuantitativos*** *o continuos* (ej: concentración de soluciones, temperaturas); o ***cualitativos*** *o discretos* (ej: diferentes proveedores de una columna o reactivo, agitación manual o mecánica); o bien, una mezcla de ambos tipos de factores. [5]

2.2.2 ¿Cómo determinar *los niveles*** de los factores? [5]

✤ *Para factores cuantitativos:*

Los niveles suelen ser simétricos respecto al nivel nominal planteado en el método. El intervalo elegido representa los límites entre los que sería posible una variación en la respuesta. Es común que el analista defina los niveles según su criterio teniendo en mente el concepto de «cambios pequeños pero deliberados» y/o puede estar basada en la incertidumbre de los propios instrumentos en conjunto con este tratamiento matemático:

Ejemplo: supóngase que la incertidumbre de un potenciómetro es pH ± 0.02. Para obtener el intervalo del estudio de robustez hay que multiplicar la incertidumbre por un factor *k.* Se propone como valor estándar, una $k = 5$, así se tiene que el intervalo para un pH = 3.0 y una k = 5, se calcula:

$$pH \pm k \times 0.02$$

$$pH \pm 5 \times 0.02$$

$$\mathbf{pH \pm 0.1}$$

Es decir, *el intervalo iría desde pH = 2.9 (nivel bajo), hasta pH = 3.1 (nivel alto)*. Si el intervalo se considera muy amplio o muy pequeño, se pueden usar otros valores para k siendo igual a 2 las condiciones más estrictas posibles. Para ser claramente diferente del valor nominal, se debe usar una $k \geq 3$.

** Nivel: hace referencia al valor numérico o cualidad que se probará en el estudio. Comúnmente se nombran niveles alto y «bajo»; al valor o cualidad original, sin modificaciones, se le conoce como «nominal»

Las conclusiones obtenidas para un factor cuantitativo serán aplicables para todos los valores posibles dentro del intervalo.

✤ *Para factores cualitativos:*

No se habla de un intervalo sino que el mínimo es una condición «A» y el máximo una condición distinta «B». Por ejemplo, diferentes columnas en un estudio por CLAR. Las conclusiones obtenidas *no serán aplicables para la población total de columnas* sino un comparativo entre las dos elegidas. Un ejemplo de conclusión es que *la condición «A»* presenta efecto significativo (o no) en la respuesta analítica. Es decir, sólo se puede afirmar que hay o no un efecto para dicha condición y no para un intervalo de valores.

2.2.3 Selección del diseño experimental: herramientas estadísticas.

El diseño de experimentos (DOE por sus siglas en inglés) está definido como un método estructurado y organizado para determinar la relación que hay entre factores que afectan al proceso y a la respuesta de ese proceso. *En nuestro contexto, el método analítico es dicho proceso. Entonces estamos diseñando un experimento acotado por la Química Analítica.* El DOE es la manera más lógica, racional y científica de obtener datos. [7]

Para elegir el diseño experimental primero habrá que saber cuántos factores se estudiarán. Un estudio sencillo incluiría sólo un factor. Hay que tener en mente que a mayor número de factores el estudio se vuelve más complejo. En un diseño rudimentario con 7 factores a evaluar, habría que ejecutar 128 experimentos cambiando un factor a la vez. En este caso la mayor desventaja es que las posibles interacciones entre factores son imperceptibles.[7] Por lo anterior es que desde la estadística han surgido diseños experimentales más complejos y al mismo tiempo más adecuados para un estudio de robustez.

2.2.3.1 Diseño de experimentos tipo Placket y Burman

Los diseños experimentales utilizados comúnmente estudian un número de factores relativamente grande en un número de experimentos relativamente pequeño. Estos diseños suelen ser *factoriales fraccionados saturados* mejor conocidos como *diseño Plackett - Burman*[5] (de aquí en adelante PB).

Éste permite investigar el efecto de *n* - 1 factores o menos, a partir de *n* experimentos (ej: es posible evaluar hasta 7 factores corriendo 8 experimentos; ver tabla 3).[3] La influencia de cada factor se calcula usando todos los datos obtenidos.[7] El diseño PB tiene dos posibles alcances[5]:

a) *Diseño mínimo*: consiste en el mínimo número de experimentos posible para un número dado de factores. La interpretación estadística es pobre.

b) *Diseño para la interpretación estadística del efecto de factores falsos*: permite el estudio de menos factores, pero arroja información estadística más detallada por el hecho de incluir en el análisis a los factores falsos.

En la siguiente tabla se muestran, para los dos incisos, algunos detalles:

No. de factores	Diseño Plackett - Burman	No. de factores falsos	No. de experimentos (N)
a) Diseño mínimo			
3 - 7	para 7 factores	4 - 0	8
8 - 11	para 11 factores	3 - 0	12
b) Diseño para la interpretación estadística del efecto de factores falsos			
3 - 4	para 7 factores	4 - 3	8
5 - 8	para 11 factores	6 - 3	12

TABLA 3. Implicaciones de elegir uno u otro diseño Plackett - Burman (mínimo o factores falsos): el número de factores que se puede evaluar y el número de experimentos de que consistiría el estudio. Comúnmente es difícil llegar o sobrepasar el estudio de 11 factores.

La Tabla 3 muestra que el diseño PB más sencillo implica realizar 8 experimentos y 3 factores a estudiar. Es posible estudiar más factores usando este diseño pero esto se considera improbable o poco práctico.

Cuando el número de factores es menor al máximo admitido por los diseños PB, se completa con un número tal de «factores falsos» que permita utilizar dicho diseño. Estos factores no tienen un significado químico, sin embargo, incluirlos resulta en un análisis estadístico más completo.

Llegando a este punto sigue definir la totalidad de experimentos o corridas analíticas, en otras palabras, obtener *el protocolo experimental* que, una vez ejecutado y con el análisis estadístico necesario, señalará los factores significativos y no significativos. Para esto se utiliza una tabla de signos que puede obtenerse de diferentes fuentes; una de ellas es la FEUM.

Para el caso del diseño que consiste en 8 experimentos la Farmacopea Mexicana sugiere utilizar la siguiente *tabla de signos*:

Corrida analítica	**Nivel del factor**						
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**
1	+	-	-	+	-	+	+
2	+	+	-	-	+	-	+
3	+	+	+	-	-	+	-
4	-	+	+	+	-	-	+
5	+	-	+	+	+	-	-
6	-	+	-	+	+	+	-
7	-	-	+	-	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-

TABLA 4. Muestra cómo se efectúan las 8 corridas analíticas. Cada «+» se refiere a que se utiliza el nivel alto del factor, y cada «-» se refiere a que se utiliza el nivel bajo del factor. El término «factor» se refiere a cada condición que se prueba en el estudio de robustez.

En la tabla 4 se muestran mediante un código de signos cómo organizar las corridas analíticas. Así se obtendrá una *matriz de tratamientos*[††]. Ésta indica detalladamente cómo efectuar cada corrida analítica para el estudio de robustez sustituyendo letras (A, B, C, ..., G) por nombres de factores y los símbolos (+ y -) por niveles altos y bajos. En el caso de esta Tesis, una vez efectuadas las corridas analíticas obtendremos en cada una de ellas 6 respuestas (% de Tramadol disuelto), mismas que no están exentas de incluir algún *dato anómalo u outlier* y, de ser el caso, procedería aplicar alguna prueba estadística para determinar si debiera excluirse. Ejemplos de estas determinaciones son la prueba de Dixon y el contraste de Grubbs.[9]

2.2.3.2. Análisis de efectos[3]

La parte final de un estudio de robustez es la determinación estadística que nos indica si un factor tiene efecto significativo o no sobre la respuesta analítica. Existen diversas metodologías para lograr esa distinción y se aplican una vez que se han descartado los posibles valores anómalos.

Un método presentado, recomendado y respaldado por una referencia farmacopéica es el *análisis de efectos*. La FEUM en su décima edición incluye el apéndice III, donde aborda recomendaciones para presentar ante sí métodos analíticos validados.

En esa sección se establece, entre otros puntos, que un estudio de robustez se deberá efectuar bajo un diseño experimental tipo Placket - Burman y contemplar la inclusión de factores falsos para estimar el error experimental. Como ya hemos expuesto, el uso de factores falsos enriquece las conclusiones estadísticas del análisis. También señala que, bajo su método sugerido y ejecutando 8 experimentos, se pueden estudiar entre 3 y 5 factores reales, siendo la elección de estos y sus niveles, responsabilidad del analista.

†† Consultar la metodología para ver un ejemplo de la obtención de la matriz (página 47, tabla 12)

Después de la obtención de la matriz de tratamientos y ejecución de los experimentos, se tendrá la serie de resultados que debe multiplicarse o «asociarse» con los + ó - que le corresponden en la tabla de signos.

Por ejemplo, supóngase que el resultado promedio para la cuantificación de determinado analito fue de 828.13 mg en la corrida número 1.

Corrida	**Factores**							**Resul-tado**
	A	B	C	D	E	F	G	
1	+	-	-	+	-	+	+	**828.13**
Después de asociar al resultado con los signos que anteceden en su corrida tenemos que:								
1	828.13	-828.1	-828.1	828.13	-828.1	828.13	828.13	***

TABLA 5. Ejemplo de cómo asociar un resultado con los signos que le anteceden. Es una parte del análisis estadístico.

Así logramos la asociación mencionada y se debe proceder del mismo modo con la totalidad de resultados, esto es, con las otras 7 corridas bajo este DOE. Al final de esto se obtendrá, para cada factor desde el A hasta el G (columnas en la tabla), una serie de valores positivos y negativos (4 de cada uno)[‡‡].

Con estos se debe *calcular el contraste de cada factor*; para esto se utiliza:

$$C_X = \sum +y_i - \sum -y_i$$

Ecuación #1

Donde:

C_X = contraste del factor X (desde A hasta G)

$\sum +y_i$ = suma de únicamente los valores positivos que aparecen en la columna del factor X (4 en total)

$\sum -y_i$ = suma de únicamente los valores negativos que aparecen en la columna del factor X (4 en total)

‡‡ Ver un ejemplo de tabla con resultados de 8 corridas asociados a los signos en la página 72 (tabla 22).

La ecuación número 1 puede leerse como «el cálculo del contraste del factor X es igual a la suma de los resultados que quedaron con signo positivo *menos* la suma total de los resultados que quedaron con signo negativo después de la asociación con el signo que le antecede en cada fila de la tabla de signos.»

Posterior a la obtención del contraste, debe calcularse la Suma de Cuadrados (SC) de cada uno de los 7 factores como sigue:

$$SC_X = \frac{C_X^2}{n}$$

Ecuación #2

Donde:

SC_X = suma de cuadrados del factor X (desde A hasta G)

C_X^2 = contraste del factor X (calculado con ecuación # 1) elevado al cuadrado

n = número de observaciones (bajo este DOE tiene un valor de 8 porque contempla 8 corridas analíticas)

Luego se debe *obtener la Media de Cuadrados (MC)* de cada factor. En este punto el método estadístico es diferente dependiendo de si se trata de factores reales o falsos. Entonces tenemos que:

✤ *Para factores reales*: en el cálculo de la MC de cada factor, se debe considerar que el número de Grados de Libertad (G.L.), mismo que se obtiene del número de niveles estudiados menos 1. Esto es 2 niveles (alto y bajo) menos 1. Por lo tanto, el número de G.L. es *siempre 1*.

$$MC_{X(reales)} = \frac{SC_X}{G.L.}; G.L. = 2 - 1 \quad \therefore \quad MC_{X(reales)} = SC_X$$

Ecuación #3

En el razonamiento anterior tenemos que la MC de cada factor real ($MC_{X\ (reales)}$) resulta ser igual a su SC, y ésta se calcula con la ecuación número 2.

✤ *Para factores falsos*: el primer paso consiste en sumar sus SC, calculadas previamente con la ecuación número 2. Esto nos lleva a obtener la Suma de Cuadrados del Error (SC_e):

$$SC_e = \sum SC_{X\ (falsos)}$$

Ecuación #4

Donde:

SC_e = suma de cuadrados del error

$SC_{X(falsos)}$ = suma de cuadrados de únicamente los factores falsos

Para obtener la MC del error (MC_e) habrá que dividir la SC_e entre el número total de factores falsos. Recordar que, bajo el diseño de experimentos indicado en FEUM, puede ser desde 2 hasta 4 factores falsos.

$$MC_e = \frac{SC_e}{n}$$

Ecuación #5

Donde:

MC_e = media de cuadrados del error

SC_e = suma de cuadrados del error (ecuación número 4)

n = número de factores falsos involucrados en el estudio (desde 2 hasta 4)

Una vez que tenemos la MC_X y la MC_e (media de cuadrados de cada factor real y media de cuadrados del error) podemos obtener la F calculada (F_{cal}) cuya comparación contra F de tablas (F_{tab}; valor crítico obtenido de la distribución F de Fisher) nos arrojará la conclusión respecto al efecto significativo o no significativo de cada factor. La F_{cal} de cada factor real se obtiene como sigue:

$$F_{cal} = \frac{MC_{X\,(reales)}}{MC_e}$$

Ecuación #6

Donde:

F_{cal} = valor F correspondiente a cada factor real

MC_X = media de cuadrados de los factores reales (ecuación número 3)

MC_e = media de cuadrados del error (ecuación número 5)

Finalmente, la F_{tab} que utiliza FEUM en este DOE (8 corridas y 5 factores reales) sería considerada al 95 % de confianza, 1 G.L. en el numerador y 2 G.L. en el denominador, así que F_{tab} = 18.351. El uso de 1 G.L. en el numerador se explica porque viene del número de niveles menos 1. Se plantean 2 G.L. en el denominador porque proviene del número de grados de libertad residuales y estos se justifican como sigue:

Ocurre que G.L. totales es igual al número de observaciones menos 1 (esto es 8 observaciones o *promedios* menos 1, por lo tanto, 7); los G.L. residuales se obtienen de los totales (7) menos 1 por cada factor real estudiado (5), entonces *queda que los residuales son 2*, o sea, G.L. en el denominador.

Considerando lo anterior, la F_{tab} puede variar su valor dependiendo del número de factores falsos y reales usados en el diseño. Aquí se ha comentado únicamente un ejemplo que involucra a 5 factores reales y 2 falsos.

2.3 TABLETAS, DISOLUCIÓN Y PRUEBA FARMACOPÉICA DE DISOLUCIÓN APLICADA A TABLETAS.

En las farmacopeas, FEUM o extranjeras (reconocidas oficialmente en México, caso de la USP) se indica la definición y requisitos o pruebas para toda forma farmacéutica.

A continuación se presenta una tabla con ejemplos de formas farmacéuticas y algunas de las pruebas rutinarias:

Forma farmacéutica	Ejemplos de pruebas
Tabletas	Identidad, uniformidad de dosis, *disolución,* valoración.
Soluciones inyectables	Color de la solución, variación de volumen, esterilidad, pirógenos.
Cápsulas	Identidad, uniformidad de dosis, humedad, disolución.

TABLA 6. Muestra algunos ejemplos de formas farmacéuticas con algunas de las pruebas farmacopéicas aplicables. Fuente: FEUM, 10ª ed.

Por el contenido de esta Tesis profundizaremos en los temas de «tabletas», «prueba de disolución», y del principio activo que nos compete: el Tramadol Clorhidrato (Tramadol HCl), además de sus métodos de cuantificación.

2.3.1 Tabletas

La administración de *tabletas* por *vía oral* es la forma más común en la que se administra un fármaco. Son preparados sólidos que contienen excipientes y una dosis por unidad de uno o más principios activos. Deben cumplir con especificaciones para sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Se obtienen por compresión uniforme de las partículas o moldeo.[3][10]

Su uso común es con fármacos cuya liberación debe ser sistémica. El principio activo debe *disolverse* en fluidos bucales, estomacales o intestinales para luego ser depositado en la sangre (absorción), ésta lo transporta hasta el sitio de acción (distribución).[10]

2.3.2 La disolución como fenómeno fisicoquímico aplicable en Farmacia

A continuación explicaremos el desarrollo histórico del fenómeno fisicoquímico de la disolución y su aparición en el área farmacéutica[10]:

Alrededor del año 1900, Noyes y Whitney mediante su artículo «Velocidad de disolución de sustancias sólidas en su propia disolución» sentaron las bases del fenómeno. Estudiaron la disolución de ácido benzoico y cloruro de plomo. Con base en esta investigación, unos años más tarde, Nernst propuso que la disolución ocurre en dos pasos principales (teoría del modelo de película):

De inicio, el sólido no disuelto se transforma en partículas de soluto al empezar a disolverse, y permanece brevemente alrededor del sólido de origen, para, en el *segundo paso*, alejarse creando «capas limítrofes» con concentraciones descendentes. El soluto se va alejando cada vez más hasta llegar a las capas más lejanas, en las que la concentración sería más o menos constante.

Según Nernst, el alejamiento es lento y el primer paso es instantáneo, por tanto, la velocidad de disolución estaría determinada por el tiempo que toma el segundo paso. La teoría de Nernst es ilustrada con la siguiente imagen:

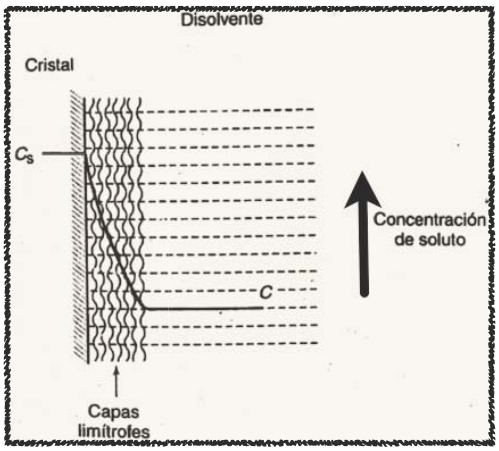


FIGURA 1. Teoría del modelo de película. Tomada de Pharmaceutics. The science of dosage form design. Aulton, M. E. 2da. Ed. Pág. 19.

Fue a mediados del siglo XX que el fenómeno se atrajo hacia la ciencia farmacéutica con Edwards, Shenoy y colaboradores, entre otros, quienes *confirmaron más allá de toda duda el efecto de la conducta de disolución de los fármacos sobre sus actividades farmacológicas.*

Con esto, las pruebas de disolución fueron tomando relevancia en la academia farmacéutica y la industria rebasando en términos de importancia a la prueba de desintegración. Si una tableta cumple la desintegración, no implica que se disuelva, y por tanto, no garantiza la disponibilidad para la absorción.[7] Carstensen afirma que *después* de la desintegración se forman gránulos que deben desagregarse (convertirse en partículas finas) para que el fármaco quede expuesto al disolvente y la disolución tenga lugar, así la sustancia tiene la facultad de llegar a la sangre para su distribución (ver Figura 2).[11]

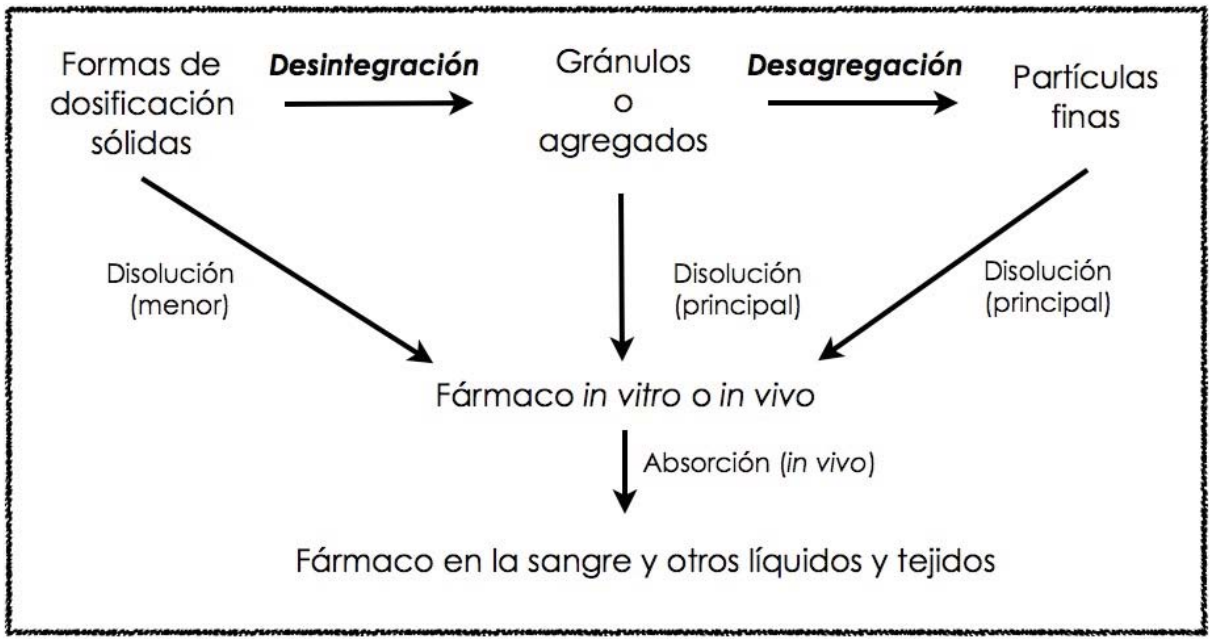


FIGURA 2. Imagen que ilustra la desintegración y desagregación de una forma farmacéutica sólida y cómo contribuyen los diferentes fenómenos para colocar al fármaco en el torrente sanguíneo. Tomada de Farmacia. Remington, 19ª ed. Tomo 1. Pág. 870.

Es en este momento cuando la prueba de disolución, se vuelve indispensable para una tableta y tiene una razón de ser.

2.3.3. Prueba farmacopéica de disolución de tabletas.

La importancia de la prueba de disolución radica en que determina la cantidad de fármaco que estará disponible para ser absorbida, que suele ser menor a la dosis declarada en el marbete. Esta prueba permite ver el comportamiento real de la tableta en un sistema *parecido* al organismo humano.[7]

En virtud de que hay la necesidad de simular el ambiente en el que se encontrará el preparado, los aspectos de la prueba de disolución tienen origen en las condiciones generales del cuerpo humano[7]: la prueba se efectúa a 37ºC y agitación para simular la temperatura corporal normal y los movimientos peristálticos intestinales respectivamente. Se hizo uso de 900 mL de disolvente para establecer la condición de sumidero (descartar que la disolución se entorpezca por saturación del medio; la idea es no rebasar el 15% de la solubilidad máxima) y se justifica en el hecho de que en la práctica el volumen de sangre (disolvente) a la que llega el fármaco es imposible de saturar con las dosis comunes. Se optó para el disolvente un pH similar al estomacal, y se eliminó el aire disuelto para no entorpecer la disolución.[10][11]

2.3.3.1. Equipo de disolución: el disolutor.

Al ir aumentando la importancia de la prueba de disolución, los métodos, técnicas y equipos usados fueron evolucionando enormemente. El diseño del aparato afecta los resultados de la disolución,[11] por lo que deben cumplir rigurosamente con ciertas características (medidas, funcionamiento, etc); las referencias farmacopéicas son muy claras en este sentido. Oficialmente se aceptan o reconocen los siguientes aparatos y métodos:

- *Métodos con vasos*: son sistemas con compartimientos cerrados con un mecanismo mezclador y agitador (por rotación u oscilación). Hay un volumen grande del medio de disolución (200 a 2 000 mL) en un vaso. Las

farmacopeas los identifican como «aparato 1» (canastillas) y «aparato 2» (paletas).[3][4][11] Estos constituyen la mayoría de los que se usan en la prueba de disolución en la industria farmacéutica.[7]

✤ *Método de las canastillas, o aparato 1:* consiste en un vaso cilíndrico cubierto, con capacidad de 1 000 mL, de vidrio o un material inerte, una canasta cilíndrica de acero inoxidable que se coloca en una varilla de rotación (vástago) y un motor de velocidad regulada. El conjunto se introduce en un baño de agua que permite que el medio mantenga una temperatura de 37 º C ± 0.5 durante la prueba. Se coloca una tableta en cada canastilla y éstas se bajan hacia los vasos que ya contienen el volumen del medio de disolución (agua destilada o HCl 0.1 N).[11] Con todo el sistema a 37 º C ± 0.5 se recogen las muestras. Es importante considerar el tiempo señalado en la monografía del preparado particular en virtud de que puede tratarse de una muestra única a un tiempo determinado (liberación inmediata), o múltiples muestras a distintos tiempos (liberación prolongada).

✤ *Método de la pala o aparato 2:* es similar al aparato 1, excepto que usa una paleta metálica cubierta por un material inerte y no una canastilla. Las tabletas caen libremente al fondo del vaso y se gira la paleta con la velocidad especificada.[11]

2.3.3.2. Factores que influyen en el proceso de disolución

Mediante evidencia experimental diversos autores y referencias farmacopéicas han señalado a los siguientes factores[7][11]:

✤ *Agitación*: la velocidad de agitación genera un flujo que continuamente modifica la interfase líquido-sólido entre el solvente y el fármaco provocando desintegración pero principalmente la desagregación de la forma farmacéutica. Según la teoría del modelo de película, la agitación

provoca el alejamiento veloz de las partículas de fármaco con respecto a la forma farmacéutica. Dichas partículas son sustituidas por medio de disolución sin soluto y están disponibles para disolver más fármaco sólido. Entonces es natural pensar que a mayor agitación, la disolución se favorece y/o aumenta su velocidad, sin embargo para tener reproducibilidad (resultados confiables) la velocidad de agitación debe mantenerse baja. Esto se consigue con el sistema mecánico y el motor del equipo disolutor.

✤ *Temperatura*: según la química básica, la solubilidad depende de la temperatura. En la mayoría de los casos, al aumentar este parámetro se favorece el proceso de disolución. Sin embargo, bajo las condiciones *in vivo,* la prueba de disolución se ejecuta a 37 ºC ± 0.5 grados; hay un control muy cuidadoso durante el proceso. Los equipos disolutores se encargan de mantener este valor mediante el uso de un baño de agua que debe cubrir íntegramente el volumen de medio de disolución. Además, a lo largo de un análisis se garantiza el cumplimiento de este requisito mediante el monitoreo constante. Los sistemas actuales mantienen este dato visible, o bien, registrado mediante tickets que sirven como evidencia.

✤ *Medio de disolución*: se elige dependiendo en gran medida de las propiedades del fármaco (solubilidad, características ácido-base), así como de motivos económicos y prácticos. La tendencia actual es la sustitución de las soluciones ácidas (comúnmente ácido clorhídrico) por agua destilada dado el daño gradual y constante sobre los componentes del disolutor. Los factores pH, tensión superficial y viscosidad son protagonistas en la velocidad de disolución dado que tienen la capacidad de entorpecer o favorecer el flujo de solutos a través del disolvente.

✤ *pH*: de inicio, en los estudios de disolución siempre se usó HCl 0.1 N o *buffers* con un pH aproximado al del jugo gástrico (pH ≈ 1.5), además de simular las condiciones estomacales, la acidez tiende a elevar la velocidad de disolución. Actualmente se prefiere el uso de soluciones neutras o

simplemente agua a menos que se indique como indispensable el uso del pH ácido para obtener datos de disolución significativos.

Cabe señalar que actualmente tenemos una *aproximación* a las condiciones reales de un organismo. Por ejemplo, el lumen gastrointestinal es altamente distinto al agua destilada o HCl 0.1 N. Contiene abundantes biomoléculas y sales además de un pH cambiante: el pH estomacal se aproxima a 1.5; centímetros adelante, en el duodeno, cambia hasta un pH igual a 6.8. [7]

Llegando a este punto, falta detallar la cuantificación del principio activo disuelto. Sin la cuantificación la prueba carece de sentido. Esa parte del análisis depende altamente de las propiedades químicas del fármaco en cuestión. Para ejemplos basta con leer alguna referencia farmacopéica donde encontraremos que se utilizan métodos volumétricos, instrumentales, etc.

En virtud de que el método de cuantificación se relaciona íntimamente con la naturaleza del analito, primero describiremos las propiedades de nuestra sustancia de interés: el Tramadol Clorhidrato.

2.4 TRAMADOL CLORHIDRATO

2.4.1. Tabletas de Tramadol Clorhidrato

En este proyecto se trabajó con *tabletas combinadas* donde uno de los componentes es el *Tramadol Clorhidrato*. A continuación se presentan datos de esta forma farmacéutica y del principio activo.

Existe gran variedad de medicamentos con Tramadol Clorhidrato como principio activo según las fuentes consultadas (PLM, Vademecum). La oferta de formas farmacéuticas es extensa (cápsulas, solución intravenosa, y principalmente tabletas). Es un fármaco que suele encontrarse combinado con otros principios activos o solo. [3][4][12]

2.4.2. Propiedades de interés farmacológico del Tramadol Clorhidrato

Es usado como un agonista del receptor opioide, inhibidor de la recaptación de noradrenalina. En otras palabras tiene efectos analgésicos.[12][13][14]

El uso de opioides es la terapia más utilizada para el tratamiento del dolor moderado a severo, agudo y crónico, en muchos padecimientos. Es además antipirético. El Clorhidrato de Tramadol ha demostrado tener afinidad por los receptores opioides Mu, Kappa y Delta, los cuales modulan el dolor a nivel central y espinal. Se combina con Acetaminofén en casos de dolor que no responde al uso de analgésicos solos. A diferencia de la morfina no produce un efecto depresor respiratorio. La motilidad gastrointestinal no se modifica. Los efectos cardiovasculares son leves.[13][15]

Tiene una biodisponibilidad media absoluta de aproximadamente 75% seguida de una dosis única de 100 mg. Después de la administración repetida, la biodisponibilidad aumenta y alcanza aproximadamente 90%. Su administración con o sin alimentos no afecta significativamente la velocidad de absorción.[15]

Aproximadamente el 30% de la dosis se excreta por orina sin cambio, el 60% de la dosis se excreta como metabolitos.[15]

Para el tratamiento farmacológico del dolor, la Organización Mundial de la Salud (OMS) propone un ascensor analgésico que inicia con agentes antiinflamatorios como el Paracetamol, los AINES, siguen los opioides menores como la Codeína y otros más potentes como el Tramadol, la Morfina y el Fentanyl.[16] Con esto vemos la importancia del Tramadol como analgésico y su ubicación en el panorama sanitario.

2.4.3. Propiedades fisicoquímicas del Tramadol Clorhidrato[14][17]

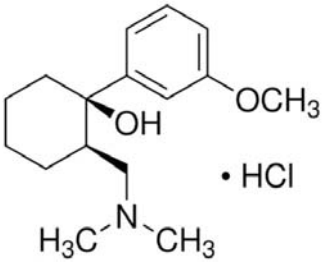


FIGURA 3. Estructura molecular del Tramadol Clorhidrato. Fuente: Sigma Aldrich[18]

- *Fórmula molecular*: $C_{16}H_{26}ClNO_2$
- Nombre IUPAC: (1*RS*,2*RS*)-2-[(dimetilamino)metil]-1-(3-metoxifenil)ciclohexanol clorhidrato; (1*RS*,2*RS*)-2-[(dimetilamino)metil]-1-(3-metoxifenil)ciclohexan-1-ol clorhidrato.
- *Peso molecular / Masa molar*: 299.8 uma / 299.8 g mol^{-1}
- *Apariencia*: polvo cristalino de color blanco.
- *Temperatura de fusión*: entre 180 ºC y 184 º C
- *Solubilidad*: fácilmente soluble en agua y en metanol, muy poco soluble en acetona.

En el tema de solubilidad hay términos que son ambiguos o poco claros. Sin embargo así se manejan en el contexto farmacéutico y farmacopéico. A estos términos les corresponde un valor numérico dado en mililitros[3] o en gramos[10] de disolvente necesario para disolver 1 gramo de soluto.

En la tabla 7 se aclara el significado de la *solubilidad* de un compuesto: se expresa en términos del peso o el volumen máximo de soluto que se disolverá en un volumen determinado de disolvente a una temperatura dada. Esto es a 25 ºC además de un tiempo de 30 minutos con agitación durante 30 segundos a intervalos de 5 minutos.[3]

Solubilidades descriptivas	
Descripción	**Partes en volumen de disolvente necesario para disolver 1 g de soluto.**
Muy soluble	Menos de 1
Fácilmente soluble	De 1 a 10
Soluble	De 11 a 30
Poco soluble	De 31 a 100
Ligeramente soluble	De 101 a 1 000
Muy ligeramente soluble	De 1 001 a 10 000
Casi insoluble	Mayor a 10 000

TABLA 7. Muestra el significado de los adjetivos que se encuentran en las referencias farmacopéicas con respecto a la descripción de la solubilidad de una sustancia. (tomado de FEUM 9na ed., pág. 15)

La predicción teórica de la solubilidad exacta es complicada aunque es posible deducirla. Las especulaciones se basan en el principio de «parecido disuelve a parecido»: un soluto se disuelve mejor en un disolvente con propiedades químicas parecidas (en términos de polaridad o no polaridad). Por esto se usan términos subjetivos que representan la información que necesita, por ejemplo, un formulador. En la tabla 7 se muestra la relación entre esos términos y las solubilidades aproximadas.[10]

La solubilidad es una propiedad de las sustancias que puede tener influencia en varias características, manejo, análisis o comportamiento de una forma farmacéutica. Por ejemplo en el procedimiento experimental para la cuantificación del principio activo. Para el caso de Tramadol Clorhidrato, según las referencias farmacopéicas, se indica su cuantificación por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).[3][4][12][17]

2.5. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) o HPLC por sus siglas en inglés[§§] es un método de separación de mezclas que actualmente se acopla al uso de otros equipos en los que recae la función de cuantificación e identificación de un analito. CLAR pertenece a un variado grupo de métodos referido por el término «cromatografía» que definimos a continuación:

Método en el que los componentes de una mezcla se transportan a través de una fase estacionaria por medio de una fase móvil que fluye; las separaciones se basan en las diferencias de velocidad de migración de los componentes de la muestra, esto es, la distribución de estos entre las dos fases. Los solutos con mayor afinidad por la fase móvil se moverán más rápidamente a través del sistema que aquellos con mayor afinidad por la fase estacionaria. Un par de requisitos que deben cumplir los componentes de la mezcla es que deben ser relativamente solubles en la fase móvil, además de interactuar con la fase estacionaria, ya sea disolviéndose, adsorbiéndose, o reaccionando con ella. Como consecuencia, durante la separación los componentes se distribuyen entre ambas fases.[19][20]

La función principal de la cromatografía es eliminar interferencias, esto es, efectuar la separación del analito del resto de los componentes de la muestra, que suelen representar el primer obstáculo en un análisis químico. La cromatografía es un grupo de técnicas muy eficiente para este propósito[19] en el que todas comparten una característica: el empleo de una fase estacionaria y una fase móvil. El estado de agregación de estas últimas permite tener una clasificación de los métodos cromatográficos.

§§ HPLC: High Performance Liquid Chromatography

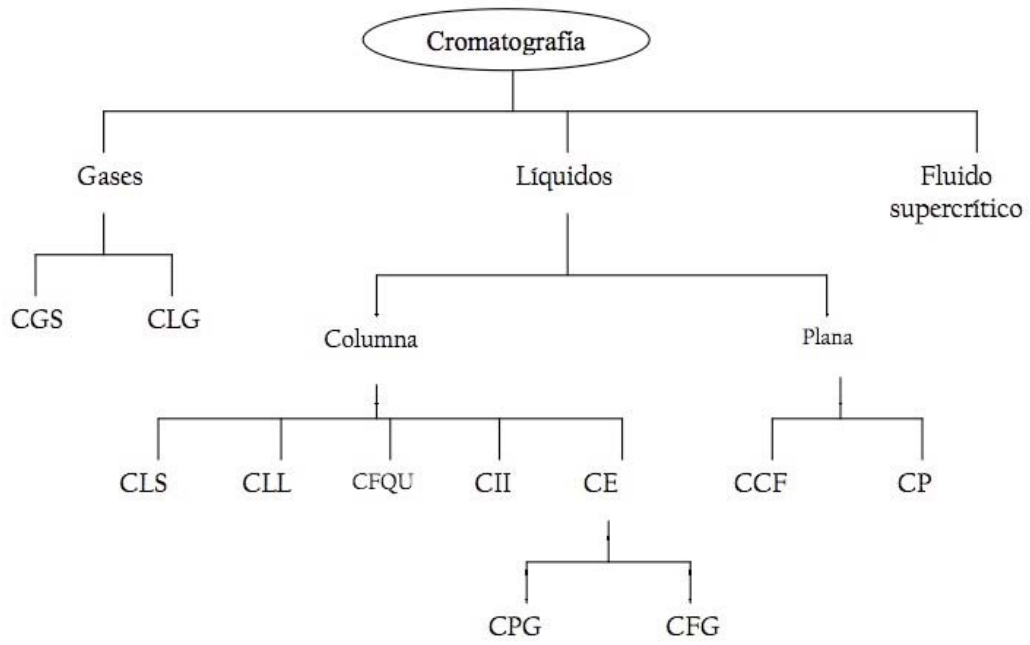


FIGURA 4. Se presenta una clasificación de métodos cromatográficos dependiendo del estado de agregación de las fases móvil y estacionaria. CGS: Cromatografía Gas-Sólido; CLG: Cromatografía Gas-Líquido; CLS: Cromatografía Líquido-Sólido; CLL: Cromatografía Líquido-Líquido; CFQU: Cromatografía de Fase Químicamente Unida; CII: Cromatografía de Intercambio Iónico; CE: Cromatografía de Exclusión; CCF: Cromatografía en Capa Fina; CP: Cromatografía en Papel; CPG: Cromatografía de Permeación en Gel; CFG: Cromatografía de Filtración en Gel. *En el caso de la cromatografía de líquidos, notar que hay dos subtipos: la hecha en columna y la de forma plana*.[19]

La primera forma de cromatografía conocida concebida fue de líquidos y en columna siendo usada para separar pigmentos haciendo pasar un extracto natural vegetal a través de una columna de vidrio con un empaque de carbonato de calcio. El resultado fue la aparición de bandas de colores en la columna; de ahí proviene el nombre del método.[19][21][22] Posteriormente evolucionaría conservando su esencia hasta llegar a toda la gama de posibles formas cromatográficas actuales (figura 4). CLAR se distingue del resto por usar presión sobre la columna y la muestra.

2.5.1. El cromatograma: instrumento del análisis por CLAR

El resultado que obtiene un analista al efectuar un análisis por CLAR, es un gráfico llamado cromatograma. Las figuras 5 y 6 muestran en qué consiste una de estas representaciones y posteriormente son explicadas:

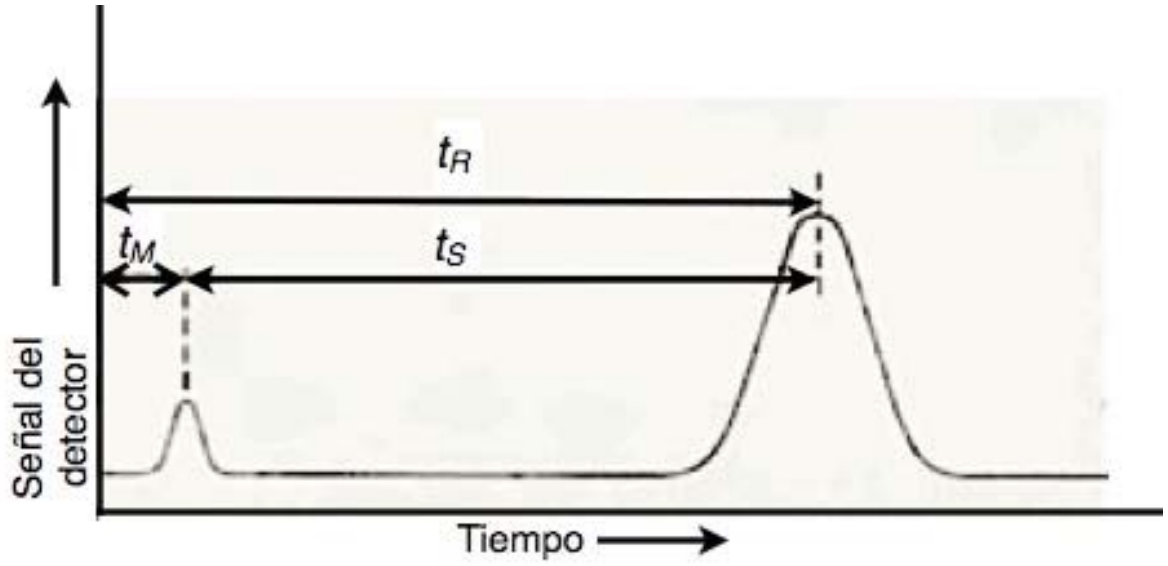


FIGURA 5. Cromatograma no real cuyo objetivo es ejemplificar la aparición de tiempo muerto (t_M), tiempo de retención (t_R) y tiempo que el analito pasa en la fase estacionaria (t_S). Tomada de Fundamentos de Química Analítica. Skoog, D. 8ª ed.

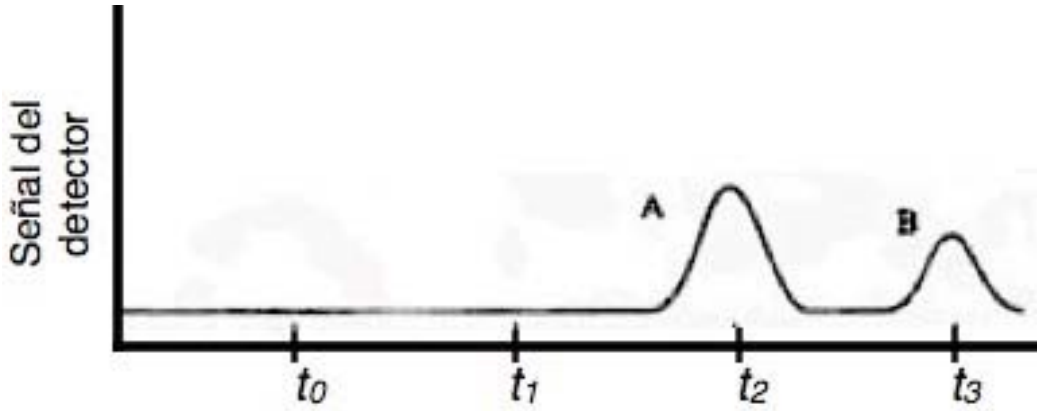


FIGURA 6. Cromatograma no real donde se observan dos picos (A y B); estos aparecen en los tiempos 2 y 3 respectivamente (t2 y t3). Representa la separación de las sustancias A y B. Tomada de Fundamentos de Química Analítica. Skoog, D. 8ª ed.

Un cromatograma común mostrará al menos dos picos. Para cada uno debemos poder identificar lo siguiente:

1) *Tiempo de retención* (t_R): es el tiempo que transcurre entre la inyección de la muestra (inicio del análisis) hasta que un soluto determinado aparece en el extremo o la columna cromatográfica.[12] En este momento la separación ya fue lograda y se representa con un pico y un t_R bien definidos. Figura 5: muestra cómo obtener un t_R. Figura 6: los picos A y B, que corresponden a sustancias distintas, tienen su propio t_R (t_2 y t_3 respectivamente), dando a entender que primero salió de la columna la sustancia A, separada de la sustancia B, quien tardó más en salir.

2) *Tiempo muerto* (t_M)***: se denomina así al tiempo que corresponde al *primer* pico, generalmente muy pequeño, que suele aparecer en todo cromatograma. Representa a una especie no retenida por la columna sin interés analítico.[19][21] Ver figura 5.

3) *Tamaño del pico* (altura o preferentemente su área por ser más confiable): el *área* del pico es la característica usada con más frecuencia en el análisis cuantitativo.[19] Es proporcional a la cantidad del analito.[21]

Se obtiene con el uso de un software que permite *integrar* los picos del cromatograma obteniendo el área con gran exactitud además de automatizar algunas etapas de la separación[23]. Figura 6: los picos presentan áreas diferentes siendo la de A mayor que la de B. En otras palabras, la muestra contiene mayor cantidad de A que de B.

En la práctica rutinaria es bastante poco habitual obtener picos técnicamente perfectos[21], aunque debieran estar libres de superposiciones u otras interferencias.[24]

*** También llamado «tiempo vacío» [21]

2.5.2. Componentes del sistema CLAR

Para terminar de comprender el significado químico de un cromatograma, conviene explicar cómo funciona y los componentes de un sistema CLAR[23]:

✤ *Sistema de bombeo*: suministra la fase móvil líquida a flujo constante con gran presión (de 41 000 a 69 000 kPa[†††]); tubería y conexiones deben soportar estas presiones. Las variaciones en la velocidad de flujo deben ser mínimas (exactitud de ± 1%). Puede tener un mecanismo para eliminar aire (purga). La bomba de pistón único es la más común.[20][23]

✤ *Inyectores*: la solución (muestra, referencias, etc) es introducida cerca de la columna usando un sistema de inyección manual (precisión pobre) o automático. Debe poder operar bajo grandes presiones.[23]

✤ *Columna cromatográfica* (fase estacionaria): comúnmente fabricadas de acero inoxidable. Hay muchos tipos de columnas. Las diferencias entre ellas radican en su posible composición[22][23]:

- Sílica, alúmina o grafito poroso: usadas en cromatografía de fase normal. La separación se basa en diferencias en la absorción y/o distribución de masas.

- Soportes preparados a partir de polímeros, sílica químicamente modificada o grafito poroso: usados en cromatografía en fase reversa. Son columnas estables usando fases móviles con pH de 2.0 a 8.0. La separación se basa en la repartición de las moléculas entre la fase móvil y la estacionaria. La mayoría de las veces CLAR se hace en fase reversa (aproximadamente 75% de los casos).[22]

---

††† Unidad de presión múltiplo del Pascal. Equivalencia: 101.325 kPa = 1 atmósfera.

Otros detalles de la columna que influyen en su eficiencia y consumo de fase móvil son su longitud y diámetro. El tamaño de partícula y calidad del empaque. El control de la temperatura puede ser crítico para una buena separación, especialmente trabajando con compuestos muy parecidos (ejemplo: separaciones quirales).[20]

- *Detector*: monitorea el avance de la separación cromatográfica mediante los picos en los cromatogramas. Permite determinar cuantitativamente cada soluto eluido.[20] Se trata comúnmente de espectrofotómetros (luz UV y visible) y detectores de diodos.[23] Por esto la fase móvil debe no absorber a la longitud de onda elegida, de lo contrario se provoca una señal de fondo (deriva) en la línea base. Idealmente resulta un espectro de todo aquello que sale de la columna y que absorbe radiación bajo la longitud de onda utilizada. Por consiguiente, el cromatograma mostrará aquellas sustancias que tengan características únicas de absorbancia.[20]

- *Adquisición de datos*: la absorbancia de un pico, relacionada a su vez con su área, puede ser transformada mediante un tratamiento matemático en una concentración dado que es proporcional a la cantidad del analito.[21] Ésta corresponde al compuesto relacionado a dicho pico.

Una vez que tenemos un cromatograma, la pregunta es ¿cómo se aplica la cromatografía en el análisis farmacéutico? El cromatograma obtenido sirve para hacer análisis cualitativo y cuantitativo.

2.5.3. Análisis cualitativo mediante CLAR

Análisis cualitativo: el cromatograma indica el tiempo de retención del analito (posición en la fase estacionaria después de cierto tiempo de elución), y se confirma su identidad mediante el uso de sustancias de referencia. Se pueden obtener datos adicionales por medio del uso de diferentes fases móviles y

estacionarias. La información cualitativa obtenida de un cromatograma es muy pobre comparada con métodos espectroscópicos. Sin embargo para poder usar esas técnicas puede requerirse una purificación previa sobre la muestra. Es así que la cromatografía tiene participación al inicio del análisis cualitativo.[19]

2.5.4. Análisis cuantitativo mediante CLAR

Análisis cuantitativo: la cuantificación se basa en la comparación del área de los picos cromatográficos debidos a los analitos *con uno o más patrones*. Si las condiciones están bien controladas, ambos parámetros (área y cantidad) varían linealmente. Es importante comentar que un cromatógrafo tiene un mínimo y máximo de detección para un analito, esto viene especificado por el fabricante. Se puede requerir tratamiento previo de la muestra (ej: diluciones), que de hecho se hace la mayoría de las veces para inyectar muestras con cantidades dentro del intervalo óptimo de funcionamiento. Naturalmente, este tratamiento previo se toma en cuenta en el cálculo de resultados.[19]

En el uso rutinario de CLAR como técnica de análisis farmacéutico se explotan ambas características, por ejemplo, en detección de impurezas, cuantificación e identificación de fármacos. Es el caso de las tabletas de Tramadol clorhidrato: en la cuantificación de principio activo en la prueba de disolución.[3]

PARTE III.

Protocolo experimental

Para un mejor manejo de la información correspondiente al protocolo experimental de este estudio de robustez, se dividirá la metodología en 2 secciones:

✦ Primera sección: trata acerca del marbete de la tableta, reactivos y materiales.

✦ Segunda sección: metodología. Describe la preparación de las soluciones previas, de las condiciones nominales a las que se efectúa la prueba de Disolución y la cuantificación por CLAR. También aborda la descripción total de nuestro estudio de robustez.

3.1 PRIMERA SECCIÓN. MARBETE, REACTIVOS Y MATERIALES

3.1.1 Marbete de la tableta sometida al estudio de robustez

Cada tableta contiene:

Tramadol Clorhidrato:	50 mg
Excipiente:	c.b.p. 1 tableta

3.1.2 Reactivos

- Ácido clorhídrico concentrado (HCl al 37.1%). Se utilizará para preparar el medio de disolución cuya concentración de HCl será 0.08 N o 0.12 N.
- Agua destilada.
- Metanol grado cromatográfico (MeOH).
- Acetonitrilo grado cromatográfico (ACN).
- Agua purificada y desionizada, apta para su uso en el sistema CLAR.
- Fosfato dibásico de sodio.
- Ácido fosfórico concentrado.
- Tramadol Clorhidrato, Sustancia de Referencia (SR).

3.1.3 Materiales

- Matraces aforados de las siguientes capacidades: 20 mL, 200 mL, 1 L y 2L
- Recipiente con capacidad de al menos 6 L
- Pipeta graduada de 10 mL
- Pipeta volumétrica de 10 mL
- Probetas de 50 mL y 1 L
- Frascos de vidrio con tapa de rosca y capacidad de 1 L

- Vaso de precipitados de 1L
- Tubos de ensaye
- Vidrio de reloj
- Pipeta Pasteur
- Jeringas con capacidad de 30 mL
- Filtros de polipropileno, tamaño de poro de 10 µm
- Balanza analítica
- Espátula de acero inoxidable
- Sistema de sonicación
- Potenciómetro
- Parrila de agitación
- Magneto para agitación
- Sistema para desgasificación Millipore (matraz Erlenmeyer de 1 L, pinzas y membranas con tamaño de poro de 0.45 µm)
- Manguera de caucho
- Sistema de vacío
- Equipo disolutor con accesorios (vasos, canastillas, vástagos, baño de agua)
- Cronómetro
- Termómetro
- Equipo CLAR con detector de diodos (UV)
- Columna cromatográfica de acero inoxidable de 15 cm de longitud y diámetro interno de 4.6 mm. Empacada con partículas de sílica porosa de 5 µm de diámetro, recubiertas con grupos octadecilsilano (C18), tipo Symmetry, marca Waters.

3.2. SEGUNDA SECCIÓN. METODOLOGÍA.

3.2.1. Soluciones previas

A continuación se describe la preparación de soluciones a utilizar en el análisis. Cuando el procedimiento haga mención de estas soluciones se deberá consultar la preparación de las mismas. Considerar que *las soluciones 3, 4 y 5, además de las muestras, son estables solamente durante 5 horas.*

1. *Medio de disolución*. Como se expone más adelante, la concentración del medio de disolución es un factor que se implementa en este estudio de robustez. Nominalmente, por cada litro de medio de disolución (HCl 0.1N), se emplean 8.5 mL de HCl concentrado. Considerando que los niveles bajo y alto respectivamente serán de 0.08 N y 0.12 N, tenemos que:

a) Para HCl 0.08 N medir 6.8 mL de HCl concentrado.
b) Para HCl 0.12 N medir 10.2 mL de HCl concentrado.

Cuando se solicite medio de disolución en el desarrollo experimental hay que colocar aproximadamente 300 mL de agua destilada en un matraz volumétrico de 1L. Medir la cantidad de HCl correspondiente según los incisos a o b para agregarlos lentamente al matraz. Agitar y llevar a volumen con agua destilada. Repetir el proceso hasta obtener 6 L de medio de disolución.

2. *Solución diluente* (metanol : agua; 80:20). Para cada litro de esta solución medir 800 mL de MeOH grado cromatográfico y verter en un frasco con tapa. Medir 200 mL de agua apta para uso en CLAR y mezclar con el metanol. Esperar a que la solución alcance la temperatura ambiente antes de su uso.

3. *Solución blanco*. Poner 10 mL de medio de disolución en un matraz volumétrico de 20 mL. Llevar al aforo con solución diluente y mezclar. En virtud de que es una «solución blanco», debe ser tratada como una muestra más.

4. *Soluciones patrón de Tramadol Clorhidrato* (preparar por duplicado y etiquetar como soluciones «A1» y «A2»). Pesar con exactitud 11.1 mg de Tramadol HCl Sustancia de Referencia. Transferir a un matraz volumétrico de 20 mL. Agregar suficiente medio de disolución para disolver, mezclar y sonicar durante 5 minutos. Completar al aforo con medio de disolución. La concentración resultante es de ± 555 µg/mL de Tramadol HCl.

5. *Soluciones de referencia* (preparar por duplicado y etiquetar como soluciones «SR1» y «SR2»). En un matraz volumétrico de 200 mL agregar 100 mL de la solución diluente. Medir una alícuota de 10 mL de la solución patrón de Tramadol Clorhidrato[‡‡‡]. Adicionarla al matraz volumétrico de 200 mL. Agregar también 80 mL de medio de disolución y atemperar. Llevar a volumen con medio de disolución. En estas soluciones la **concentración de Tramadol Clorhidrato es de ± 27.8 µg/mL**.

6. *Solución amortiguadora* (fase móvil). Pesar 7.1 g de fosfato dibásico de sodio y transferirlo a un vaso de precipitados de 1 L. Disolver con 800 mL de agua destilada; para facilitar la disolución se recomienda hacer uso de un magneto y agitación. Ajustar a un pH de 3.00 ± 0.05 con ácido fosfórico concentrado. Transferir la disolución a un matraz volumétrico de 1 L y llevar a volumen con agua destilada. Filtrar la solución amortiguadora a través de una membrana Millipore de 0.45 µm de tamaño de poro y desgasificar antes de su uso.

3.2.2 Condiciones nominales de la prueba

En este apartado se exponen las condiciones nominales o normales a las que se efectúa la prueba. El objetivo de mostrarlas es que cuando se den a conocer los factores involucrados en el estudio de robustez, se puedan comparar y distinguir con claridad los factores que habrán cambiado. La idea también es

‡‡‡ Para el primer duplicado utilizar la solución patrón A1; para el segundo, utilizar la solución patrón A2.

conocer cómo ejecutar la prueba con los factores no involucrados en virtud de que al no estar contemplados en el estudio de robustez, sus valores se mantendrán constantes.

1. *Prueba de disolución*. Se efectúa nominalmente bajo las siguientes condiciones:

Aparato 1 de disolución (método de canastillas; 6 vasos de 1 L)
Medio de disolución: HCl 0.1 N, desgasificado
Volumen de medio: 900 mL
Temperatura del medio: 37.0 ± 0.5 ºC
Velocidad de agitación: 100 rpm
Tiempo de disolución: 30 min

2. *Toma y diluciones de la muestra*. Al concluir los 30 minutos del procedimiento de disolución, tomar aproximadamente 15 mL de cada vaso. Para este propósito usar una jeringa con filtro de polipropileno cuyo tamaño de poro sea de 10 µm. Depositar cada una de las 6 muestras en tubos de ensaye etiquetados como D1, D2, D3, D4, D5 y D6. Atemperar.

De cada tubo de muestra tomar una alícuota de 10 mL y colocarla en un matraz volumétrico de 20 mL. Llevar a volumen con solución diluente. Las soluciones muestra son estables durante 5 horas. Las inyecciones cromatográficas e interpretación de cromatogramas se describirán más adelante.

3. *Condiciones cromatográficas*. El análisis por CLAR se efectúa nominalmente usando las siguientes condiciones:

Fase móvil: Solución amortiguadora de fosfatos con pH de 3.00 ± 0.05.
Solvente orgánico: Acetonitrilo (ACN) grado cromatográfico.

En la separación y cuantificación se emplea esta elución en gradiente:

Tiempo (minutos)	Buffer de fosfatos (%)	Acetonitrilo (%)	Gradiente
0 - 3	90	10	Isocrático
3 - 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

TABLA 8. Describe el gradiente de la fase móvil como sigue: del tiempo cero al minuto 3 se mantiene una proporción de 90:10 (buffer : ACN). Del minuto 3 y hasta el minuto 7, la proporción de buffer disminuye y la de ACN aumenta gradualmente hasta llegar a una proporción de 30:70. Del minuto 7 al 8 se mantiene la misma proporción de 30:70. Del minuto 8 al 10 la proporción de solución amortiguadora aumenta y la de ACN disminuye gradualmente hasta llegar a ser 90:10. Finalmente, del minuto 10 al 12, se mantiene esa misma proporción.

Velocidad de flujo: 1.5 mL/min.

Detector: U.V. a 260 nm

Volumen de inyección: 100 µL

Tiempo de retención: 6.0 minutos para Tramadol Clorhidrato.

Tiempo total de corrida: 12.0 minutos.

Al final del análisis se debe lavar el sistema cromatográfico con las siguientes mezclas programando un flujo constante de 1.5 mL/min:

Mezcla	Proporción (v/v)	Volumen
Agua / Acetonitrilo	90:10	20 mL
Agua / Acetonitrilo	50:50	20 mL
Agua / Acetonitrilo	30:70	20 mL

TABLA 9. Muestra composición de la mezcla usada para el lavado del sistema HPLC. Los solventes utilizados deben ser grado cromatográfico.

Este proceso se realiza en aproximadamente 40 minutos. Para no dañar la columna y el sistema en general, deberá liberarse la presión interna.

3.2.3. Protocolo experimental del estudio de robustez.

A continuación se abordarán las condiciones a implementar en el estudio de robustez y su metodología en general.

3.2.3.1. Factores elegidos y diseño de las corridas analíticas

En primer lugar se muestran los factores y los niveles que *han sido elegidos* para evaluar su efecto en el método de análisis. Son los siguientes:

Factores		Niveles		
		Bajo (–)	Nominal	Alto (+)
A	Concentración de HCl (medio de disolución)	0.08 N	0.1 N	0.12 N
B	Factor falso	***	***	***
C	Volumen de medio de disolución	890 mL	900 mL	910 mL
D	Desgasificación del medio de disolución	Sin desgasificación	Con desgasificación	Con desgasificación
E	Factor falso	***	***	***
F	Velocidad de agitación	95 rpm	100 rpm	105 rpm
G	Longitud de onda (λ) de detección	255 nm	260 nm	265 nm

TABLA 10: Se muestran los factores elegidos, además de los niveles bajo, alto y normal o nominal para cada uno de ellos.

Es importante notar en la tabla 10 la presencia de 2 factores falsos (B y E). Hemos planteado anteriormente que no hacen referencia a una condición química experimental (página 14). Su uso recae en el análisis estadístico que se explica más adelante.

También se señala en la misma tabla que de los otros 5 factores, 4 corresponden a condiciones del proceso de disolución. El último factor (G), es la longitud de onda que se programa en el detector del sistema cromatográfico.

Ahora debemos definir en qué condiciones se implementa cada corrida analítica, es por esto que desde el inicio se presenta el contenido de la tabla 10. Para lograr lo anterior, esto es, obtener la matriz de tratamientos, tomaremos la tabla de signos del Diseño de Experimentos tipo Placket y Burman presentado en la décima edición de la FEUM, para 5 factores reales y 2 falsos donde se ejecutan 8 corridas. Es importante recordar que dependiendo del número de factores involucrados la tabla de signos puede ser distinta, y en este estudio lo más conveniente es el uso de la señalada en la FEUM. Dicha tabla se muestra a continuación:

Corrida	Factores							Resultados
	A	*B*	C	D	*E*	F	G	
1	+	-	-	+	-	+	+	Y1
2	+	+	-	-	+	-	+	Y2
3	+	+	+	-	-	+	-	Y3
4	-	+	+	+	-	-	+	Y4
5	+	-	+	+	+	-	-	Y5
6	-	+	-	+	+	+	-	Y6
7	-	-	+	-	+	+	+	Y7
8	-	-	-	-	-	-	-	Y8

TABLA 11. Tabla de signos. Muestra cómo se distribuyen los niveles alto (+) y bajo (-), para cada factor, en las 8 corridas analíticas. Esta tabla fue obtenida de la FEUM 10ma. ed. Recordar que los factores *B* y *E* son falsos; en esta tabla aparecen sombreados.

A partir de esta tabla se define la matriz de tratamientos. Se logra como se explica a continuación: para la corrida analítica 1 se tiene que usar el factor A (según la tabla 10 es concentración de medio de disolución) en su nivel alto, esto es 0.12 N; el factor B se omite por ser un factor falso; el factor C (volumen del medio de disolución) en su nivel bajo, esto es 890 mL; el factor D (desgasificación del medio de disolución) en su nivel alto, esto es desgasificado; el factor E se omite por ser un factor falso; el factor F (velocidad de agitación) en su nivel alto, esto es 105 rpm; finalmente el factor G (longitud de onda del detector) en su nivel alto, esto es 265 nm. Se debe proseguir así para el resto de corridas analíticas.

Aplicando la instrucción para toda la tabla de signos y todas las corridas obtenemos nuestra *matriz de tratamientos*:

Corrida *i*	Factores					Resultados
	A	C	D	F	G	
	Concentra-ción (**N**) de HCl (medio de disolución)	Volumen de medio de disolución (**mL**)	Desgasificación del medio de disolución	Velocidad de agitación (**rpm**)	Longitud de onda (λ) de detección (**nm**)	
1	0.12	890	Desgasificado	105	265	Y1
2	0.12	890	Sin desgasificar	95	265	Y2
3	0.12	910	Sin desgasificar	105	255	Y3
4	0.08	910	Desgasificado	95	265	Y4
5	0.12	910	Desgasificado	95	255	Y5
6	0.08	890	Desgasificado	105	255	Y6
7	0.08	910	Sin desgasificar	105	265	Y7
8	0.08	890	Sin desgasificar	95	255	Y8

TABLA 12. Matriz de tratamientos. Obtenida de relacionar cada factor con el signo asignado en cada corrida según la tabla de signos (tabla 11). Muestra detalladamente las condiciones experimentales que se implementan en cada corrida analítica. Los factores B y E no aparecen porque son factores falsos, y como tal, no tienen un resultado experimental.

Entonces las ocho corridas analíticas deben efectuarse de la siguiente manera:

Corrida 1: Utilizar 890 mL de HCl 0.12 N como medio de disolución, desgasificado. La velocidad de agitación de la prueba es de 105 rpm. La longitud de onda del detector del cromatógrafo debe ser de 265 nm.

Corrida 2: Utilizar 890 mL de HCl 0.12 N como medio de disolución, sin desgasificar. La velocidad de agitación de la prueba es de 95 rpm. La longitud de onda del detector del cromatógrafo debe ser de 265 nm.

Corrida 3: Utilizar 910 mL de HCl 0.12 N como medio de disolución, sin desgasificar. La velocidad de agitación de la prueba es de 105 rpm. La longitud de onda del detector del cromatógrafo debe ser de 255 nm.

Corrida 4: Utilizar 910 mL de HCl 0.08 N como medio de disolución, desgasificado. La velocidad de agitación de la prueba es de 95 rpm. La longitud de onda del detector del cromatógrafo debe ser de 265 nm.

Corrida 5: Utilizar 910 mL de HCl 0.12 N como medio de disolución, desgasificado. La velocidad de agitación de la prueba es de 95 rpm. La longitud de onda del detector del cromatógrafo debe ser de 255 nm.

Corrida 6: Utilizar 890 mL de HCl 0.08 N como medio de disolución, desgasificado. La velocidad de agitación de la prueba es de 105 rpm. La longitud de onda del detector del cromatógrafo debe ser de 255 nm.

Corrida 7: Utilizar 910 mL de HCl 0.08 N como medio de disolución, sin desgasificar. La velocidad de agitación de la prueba es de 105 rpm. La longitud de onda del detector del cromatógrafo debe ser de 265 nm.

Corrida 8: Utilizar 890 mL de HCl 0.08 N como medio de disolución, sin desgasificar. La velocidad de agitación de la prueba es de 95 rpm. La longitud de onda del detector del cromatógrafo debe ser de 255 nm.

Resumiendo resulta que cada corrida analítica se efectúa como se describió. Haremos referencia a éstas como corrida analítica «*i*» y debe entenderse que se habla de la corrida 1, 2, 3 y así sucesivamente hasta la 8. *El resto de condiciones permanecen inalteradas, es decir, se ejecutan como en las condiciones nominales también ya descritas.*

Teniendo lo anterior, la metodología general para la corrida analítica *i* queda como sigue:

1) Preparar las soluciones previas.

2) Ejecutar la prueba de disolución (corrida analítica *i*) bajo las condiciones de cada corrida teniendo en cuenta las indicaciones de la tabla 12.

3) Proceder a la toma de muestra como se especificó en condiciones nominales, esto es 15 mL de cada vaso con jeringa y filtro de polipropileno (poro de 10 µm). No olvidar hacer las diluciones, esto es tomar una alícuota de 10 mL y llevar al aforo de 20 mL con solución diluente. Las muestras obtenidas se etiquetan como D1, D2, D3, D4, D5 y D6.

4) Para el análisis cromatográfico se deberán obtener todos los cromatogramas exceptuando el del primer duplicado del blanco porque se descarta.

Al programar las inyecciones tener en cuenta este orden:

➡ 100 µL de solución blanco por duplicado. Descartar el primer cromatograma.

➡ Adecuabilidad del sistema: 100 µL de la solución de referencia 1 (SR1) por quintuplicado. El coeficiente de variación entre las áreas que corresponden al Tramadol Clorhidrato no debe ser mayor a 2.0 % para aprobar la adecuabilidad del sistema.

➡ 100 µL de SR1 por duplicado.

➡ 100 µL de Solución de Referencia 2 (SR2) por duplicado.

➡ 100 µL de cada una de las 6 muestras ya diluidas (D1 hasta D6). En total se tendrá una inyección o muestra de cada vaso del disolutor.

➡ 100 µL de SR1.

➡ 100 µL de SR2.

Nota: Los cromatogramas obtenidos de las soluciones de referencia, SR1 y SR2, que se programan por duplicado (inyecciones 8 a 11 y 18 a 21), serán usados para determinar el contenido de analito en las muestras. El coeficiente de variación de estas 8 inyecciones no debe ser mayor que 2.0 %.

En la siguiente tabla se muestra un resumen de las inyecciones que deben a efectuarse:

No. Inyección	Identificación	Dato que se obtiene	No. Inyección	Identificación	Dato que se obtiene
1	Blanco 1	Descartar	12	Vaso 1	Área
2	Blanco 2	Blanco	13	Vaso 2	Área
3	SR1 (adecua)	Área	14	Vaso 3	Área
4	SR1 (adecua)	Área	15	Vaso 4	Área
5	SR1 (adecua)	Área	16	Vaso 5	Área
6	SR1 (adecua)	Área	17	Vaso 6	Área
7	SR1 (adecua)	Área	18	SR1	Área
8	SR1	Área	19	SR1	Área
9	SR1	Área	20	SR2	Área
10	SR2	Área	21	SR2	Área
11	SR2	Área	Lavado del sistema cromatográfico		

TABLA 13. Se observa de cuántas inyecciones se compone todo el análisis cromatográfico (21 en total). Nos informa también de qué solución se trata cada una y qué dato se debe obtener del cromatograma resultante.

5) Lavado del sistema cromatográfico. Implementar las condiciones establecidas en la tabla 9. Considerar que el tiempo aproximado de todo el lavado es de 40 minutos aproximadamente.

El análisis estadístico se puede hacer únicamente hasta que se tienen los resultados de las 8 corridas analíticas. Por esto se explicará más adelante.

3.2.3.2. Interpretación de los cromatogramas

Al final de cada corrida se determina la respuesta analítica (% de Tramadol Clorhidrato disuelto) basándonos en el *área de los picos* obtenidos en los cromatogramas. Considerando que hay inyecciones con unos u otros propósitos (adecuabilidad del sistema, referencias y muestras) se propone seguir el orden establecido a continuación:

✤ En primer lugar debemos comprobar la *adecuabilidad del sistema*. Para ello bastará con las áreas de las 5 réplicas de la inyección de SR1. A éstas calcular la media aritmética, desviación estándar y CV (ver ecuaciones 7, 8 y 9, pp: 51-52). El criterio de aprobación es que este último debe ser menor a 2.0 %. Si se cumple, el sistema tiene validez analítica.

✓ Para la <u>media aritmética o promedio</u>:

$$\bar{x} = \frac{\sum Área_{SR1_i}}{5}$$

Ecuación # 7

Donde:

$\bar{x}$ = media aritmética

∑ Área $_{SR1}$= suma de las áreas obtenidas para el quintuplicado de SR1

5 = corresponde al número de inyecciones de SR1

✓ Para la desviación estándar:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Ecuación #8

Donde:

SD = desviación estándar

x_i = área obtenida en cada cromatograma

$\bar{x}$ = media aritmética

n = número de repeticiones (6)

✓ Para el CV:

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

Ecuación #9

Donde:

CV = porcentaje del coeficiente de variación

SD = desviación estándar

$\bar{x}$ = media aritmética

✤ Las *8 inyecciones de soluciones de referencia (SR1 y SR2)* tienen dos usos. Servirán para comprobar que no haya acumulación ni degradación de Tramadol Clorhidrato en el sistema. Es decir, al inyectarse antes y después de la muestra, por el hecho de ser las mismas soluciones, deberíamos obtener 8 áreas bastante parecidas. Para comprobar este hecho habrá que tomar las 8 áreas y con las ecuaciones 7 a 9, calcular su media aritmética, desviación estándar y finalmente su CV, el cual también debe ser menor al 2.0 %.

El segundo uso consiste en la *obtención un Factor de Respuesta (FR)*. Las soluciones de referencia 1 y 2 presentan una concentración aproximadamente

de 27.8 µg/mL (ver 3.2.1, soluciones previas, numeral 5 en la página 45). La concentración real varía ligeramente dependiendo del peso real de la sustancia de referencia y de su pureza.

Para el cálculo del FR utilizar:

$$FR_i\ P.A. = Área\ P.A. \times \frac{20\ mL}{W.R.S\mathrm{Ref}} \times \frac{200\ mL}{10\ mL}$$

Ecuación #10

Donde:

FR_i P.A. = Factor de Respuesta del principio activo en la *i-ésima* SR.

Área P.A. = Área del principio activo en el cromatograma

W.R. SRef = Peso real de la sustancia de referencia (considera el valor leído en la balanza analítica y el % de pureza)

20 mL = corresponde al primer aforo

200 mL = corresponde al segundo aforo

10 mL = corresponde a la única alícuota

Este cálculo será aplicable para cada inyección de soluciones de referencia, o sea que para cada corrida analítica obtendremos 8 FR. Necesitamos el promedio de estos para calcular el % de Tramadol Clorhidrato disuelto; se calcula como sigue:

$$\overline{FR}_{P.A.} = \frac{\sum FR_i\ P.A.}{n}$$

Ecuación #11

Donde:

$\overline{FR}_{P.A.}$ = Factor de Respuesta promedio del principio activo

∑ FR_i P. A.= Suma de los factores de respuesta individuales de cada una de las 8 inyecciones.

n = número de inyecciones (8)

✤ Finalmente, para el caso de *las muestras* se debe proseguir como se describe a continuación. Primero habrá que verificar que el CV de los 6 vasos sea menor al 2.0 %. Una vez comprobado esto podremos calcular la cantidad de Tramadol Clorhidrato disuelto en las muestras; es importante recordar que nuestro estudio de robustez incluye modificaciones en el volumen del medio de disolución, razón por la que este puede ser 890 mL ó 910 mL según la corrida analítica que se esté ejecutando y en su caso, calculando el porcentaje de principio activo disuelto. Entonces, para calcular la cantidad disuelta de Tramadol Clorhidrato en miligramos, se utiliza:

$$m_{Tra\,dis} = \frac{área_{muestra\,i}}{\overline{FR}_{P.A.}} \times \frac{V_{Med.Dis.} \times 20\,mL}{10\,mL}$$

Ecuación #12

Donde:

$m_{Tra\ dis}$ = cantidad disuelta de Tramadol HCl expresada en miligramos (mg)

$área_{muestra\ i}$ = área obtenida en el cromatograma de cada muestra (1 hasta 6)

$\overline{FR}_{P.A.}$ = Factor de Respuesta promedio del principio activo (ecuación 11)

$V_{Med.\ Dis.}$ = Volumen de medio de disolución empleado (890 mL ó 910 mL según la corrida analítica de la que se trate)

10 mL = alícuota de la muestra tomada del vaso del disolutor

20 mL = aforo al que se lleva la muestra

Vale la pena comentar que el Volumen de medio de disolución multiplicado por 20 mL, y después dividido entre 10 mL, corresponde a lo que se conoce comúnmente como Factor de Dilución (FD).

Para obtener el % de Tramadol Clorhidrato disuelto, basta con comparar el dato obtenido en la ecuación 12, para cada muestra, contra la información del marbete.

Esto queda expresado en la siguiente ecuación:

$$\%\,Tramadol\ HCl\ disuelto = \frac{m_{Tra\ dis}}{m_{marbete}} \times 100$$

Ecuación #13

Donde:

% Tramadol HCl disuelto = porcentaje de Tramadol HCl disuelto en la prueba

$m_{Tra\ dis}$ = masa en miligramos de Tramadol HCl disuelto (ecuación 12)

$m_{marbete}$ = masa en miligramos de Tramadol HCl declarada en marbete (50 mg según sección 3.1.1, página 39)

Ejecutando esta metodología se llega al *% de Tramadol Clorhidrato disuelto* para las 8 corridas analíticas. Hay que tener en mente que cada experimento está conformado por 6 vasos, así que obtendremos un total de 48 muestras (6 por cada una de las 8 corridas).

Al llegar a este punto se efectúa el análisis estadístico contemplado cuyo objetivo es determinar la robustez de este método analítico.

3.2.3.3. Tratamiento estadístico de los datos

Se aplicará el análisis estadístico denominado análisis de efectos (respaldado por FEUM en su décima edición) para definir si los 5 factores reales incluidos en este estudio son significativos o no lo son.

3.2.3.3.1. Análisis de efectos

El análisis estadístico de este estudio de robustez está descrito en el apéndice III de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos en su décima edición, mismo que trata acerca de recomendaciones para presentar métodos analíticos validados. Este análisis fue revisado en el Marco Teórico de esta Tesis.

En el caso particular de nuestro estudio de robustez requerimos el promedio de los 6 resultados (% de Tramadol Clorhidrato disuelto) obtenidos en cada experimento (recordar que son 8 corridas analíticas con 6 vasos cada una). Son entonces 48 resultados pero usaremos los 8 promedios. También necesitamos la tabla de signos (tabla 4, página 14) en virtud de que este análisis estadístico corresponde a un diseño de experimentos tipo Placket - Burman para 5 factores reales y 2 falsos.

Para el cálculo del promedio de la respuesta:

$$Y_i = \frac{\sum_{i=1}^{n=6} \% \, Tra \, dis_{\,i}}{6}$$

Ecuación #14

Donde:

Y_i = promedio de los % de Tramadol Clorhidrato disuelto en 6 vasos para la corrida analítica *i* (desde la número 1 hasta la 8)

$\sum_{i=1}^{n=6} \% \, Tra \, dis_{\,i}$ = suma de los 6 resultados (% de Tramadol Clorhidrato disuelto)

6 = número de resultados considerados para la obtención de este promedio

Una vez obtenidos los 8 promedios procederemos como se describió en los antecedentes.

Esto es, de forma resumida§§§:

➡ *Multiplicar cada Y_i* (respuesta analítica promedio de la corrida i) por la serie de valores (+1 ó -1) que le anteceden en su respectiva fila. En la práctica, en este punto cada casilla de la tabla deberá tener un valor de Y_i con un signo positivo o negativo (4 de cada caso para cada columna).

§§§ Para ver los detalles de estos cálculos, consultar antecedentes (páginas 16 a 18 y ecuaciones 1 a 6)

➡ Entonces podemos *calcular el contraste* de cada uno de los 7 factores involucrados como se expuso en el Marco Teórico (sumar los valores positivos y a esta suma sustraerle la suma de los negativos).

➡ Posteriormente obtenemos el *cálculo de la Suma de Cuadrados (SC)* de cada uno de los 5 factores reales además de los 2 falsos (estos últimos para obtener la Suma de Cuadrados del error).

➡ Luego obtendremos la *Media de Cuadrados de cada factor*, igualmente para los 7 factores incluyendo los 2 falsos (Media de Cuadrados del error).

➡ Finalmente se obtiene el *valor de F calculada* (F_{cal}) de cada factor real para poder compararla contra una F de tablas, considerada al 95 % de confianza, 1 G.L. en el numerador y 2 G.L. en el denominador, y así poder definir la significancia de todos nuestros factores.

PARTE IV

Resultados,

análisis estadístico de resultados

y Discusión

Para efectos de un mejor orden, se organizará y presentará la información correspondiente a los resultados en 2 secciones:

✦ **Resultados generales.**

Se mostrará el cumplimiento de la adecuabilidad del sistema además del % disuelto de Tramadol HCl en cada corrida analítica. Tanto el resultado de cada vaso como el promedio de cada experimento.

✦ **Análisis estadístico de resultados y discusión de los mismos.**

Corresponde al análisis estadístico señalado en el protocolo experimental de este estudio (análisis de efectos). También se incluye la discusión del análisis estadístico que servirá como base para las conclusiones de este trabajo.

Nota*: en la presentación de resultados y análisis estadístico se hace referencia a ecuaciones que fueron explicadas y numeradas anteriormente en el Marco Teórico y en el Protocolo Experimental. Dichas ecuaciones se numeraron para su rápida y fácil localización.*

4.1. RESULTADOS GENERALES

Se ejecutaron las 8 corridas analíticas en el orden establecido (primero la corrida #1, luego la #2, y así sucesivamente hasta tener las 8); cada una de ellas en un día diferente y bajo las condiciones correspondientes de cada factor (nivel bajo o alto según lo indicara el protocolo experimental; ver tabla 12).

Según el protocolo de este estudio, cada corrida analítica se compone de 21 inyecciones. En la tabla 14 se muestra la organización de las mismas con la idea de tener un manejo más sencillo de la información a lo largo de toda esta sección. Notar que se incluye la numeración de las inyecciones ya que se hará referencia a éstas en varias ocasiones de aquí en adelante.

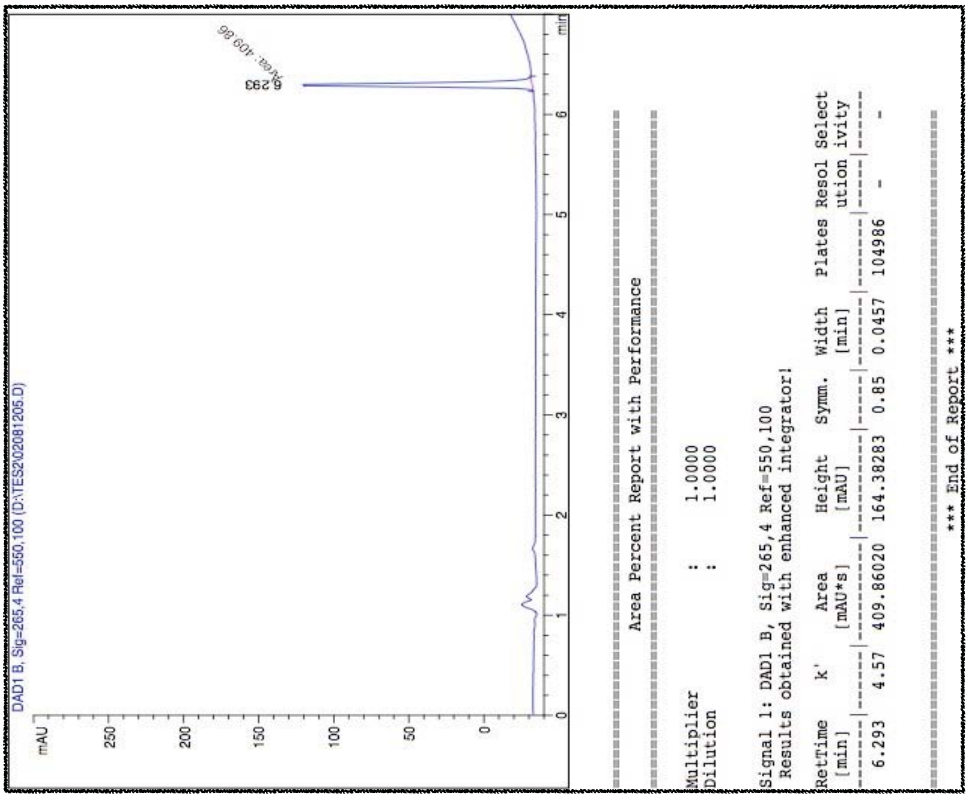
No. Inyección	Identificación	Dato que se obtiene	No. Inyección	Identificación	Dato que se obtiene
1	Blanco 1	Ninguno	12	Vaso 1	Área
2	Blanco 2	Ninguno	13	Vaso 2	Área
3	SR1 (adecua)	Área	14	Vaso 3	Área
4	SR1 (adecua)	Área	15	Vaso 4	Área
5	SR1 (adecua)	Área	16	Vaso 5	Área
6	SR1 (adecua)	Área	17	Vaso 6	Área
7	SR1 (adecua)	Área	18	SR1	Área
8	SR1	Área	19	SR1	Área
9	SR1	Área	20	SR2	Área
10	SR2	Área	21	SR2	Área
11	SR2	Área	***	***	***

TABLA 14. Muestra el total y el orden de las inyecciones para cada una de las 8 corridas analíticas. En cada caso indica qué solución se está inyectando (blanco, SR1, SR2 o muestras).

Por cada corrida analítica se obtuvieron 20 cromatogramas (recordar que *la primera inyección del blanco debe descartarse*), como son 8 corridas, se obtuvieron 160 cromatogramas en el estudio completo.

4.1.1. Selección de cromatogramas de la corrida #1

A continuación se muestra una *selección representativa* del total de los cromatogramas que corresponden a la corrida #1****.



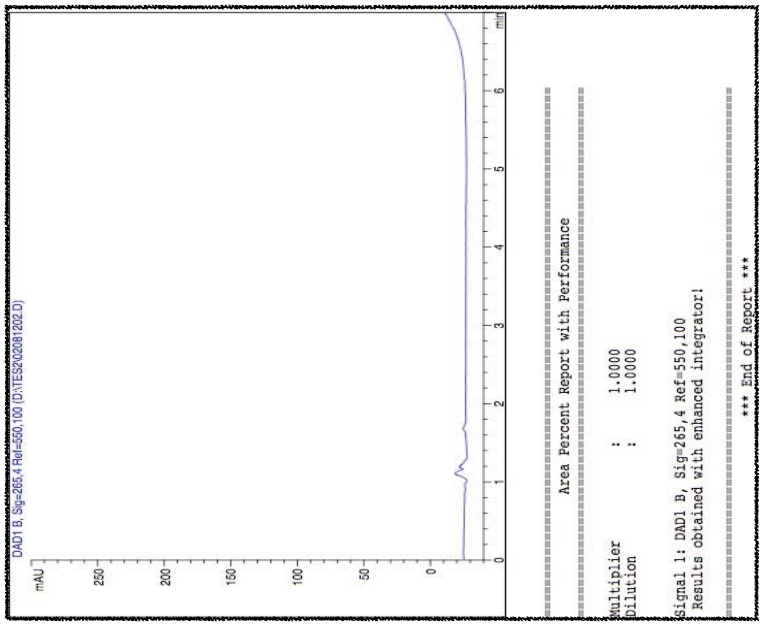
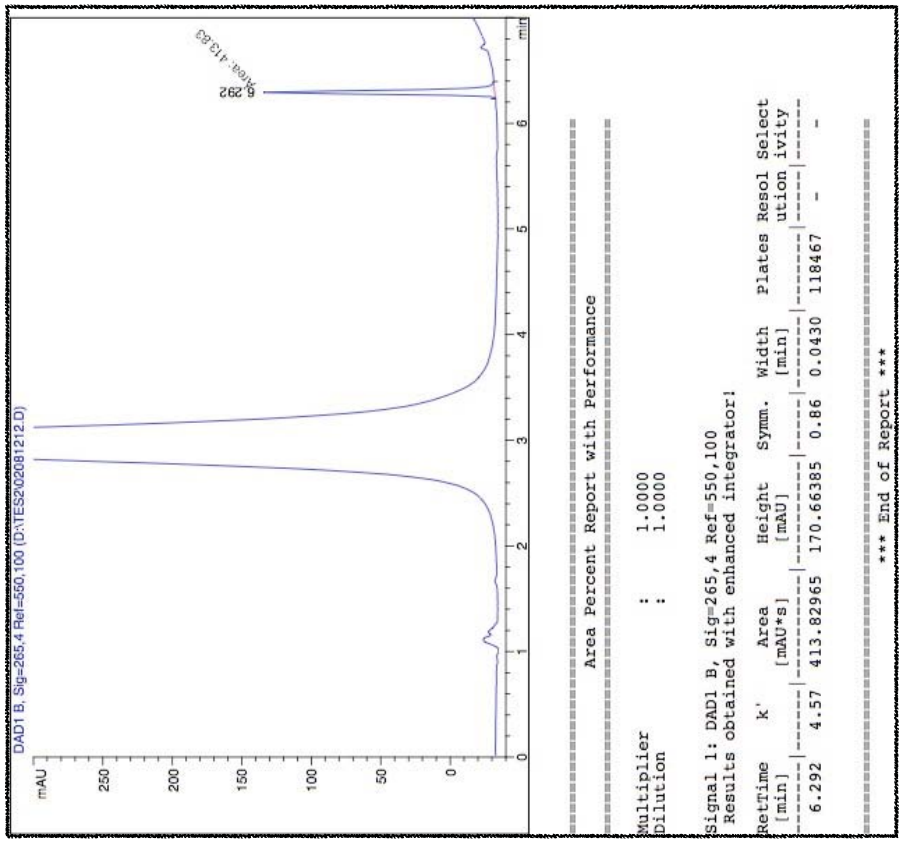


FIGURA 7. Cromatogramas correspondientes a la inyección **#2**, *blanco* (izq.); y **#5**, una de las cinco repeticiones de *SR1* para el quintuplicado de adecuabilidad del sistema (der.).

**** En el ANEXO I se presentan los *cromatogramas de las muestras* de las 7 corridas restantes.



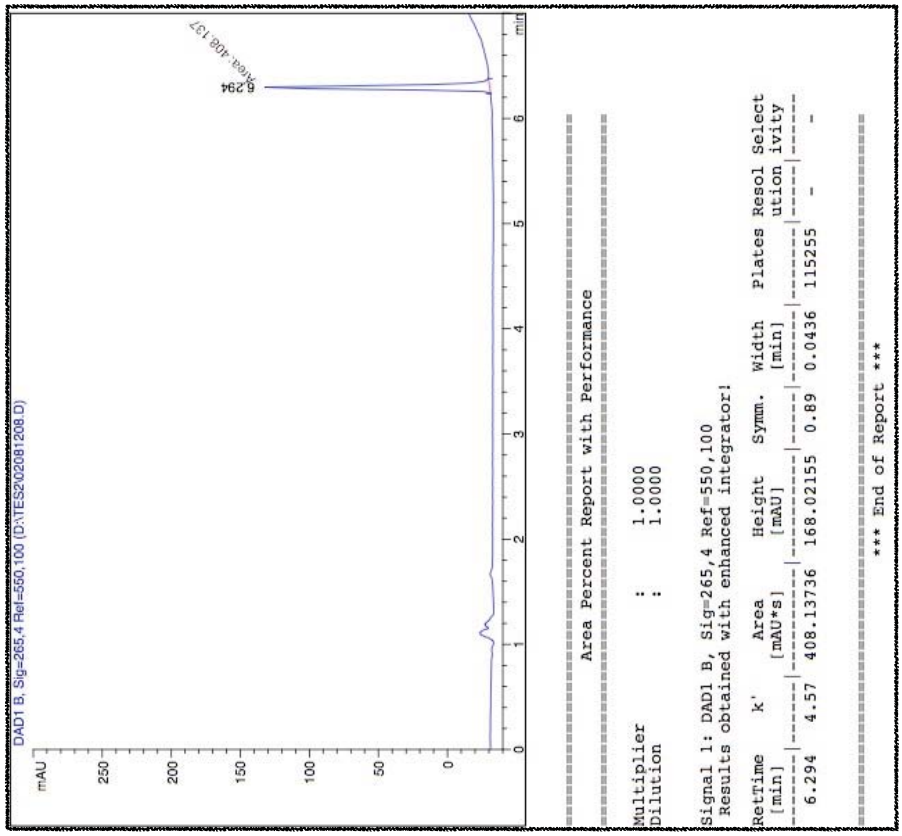


FIGURA 8. Cromatogramas correspondientes a las inyecciones **#8**, primer duplicado de *SR1 inicial* (izq.); y **#12**, *muestra* obtenida del vaso número 1 del equipo disolutor (der.).

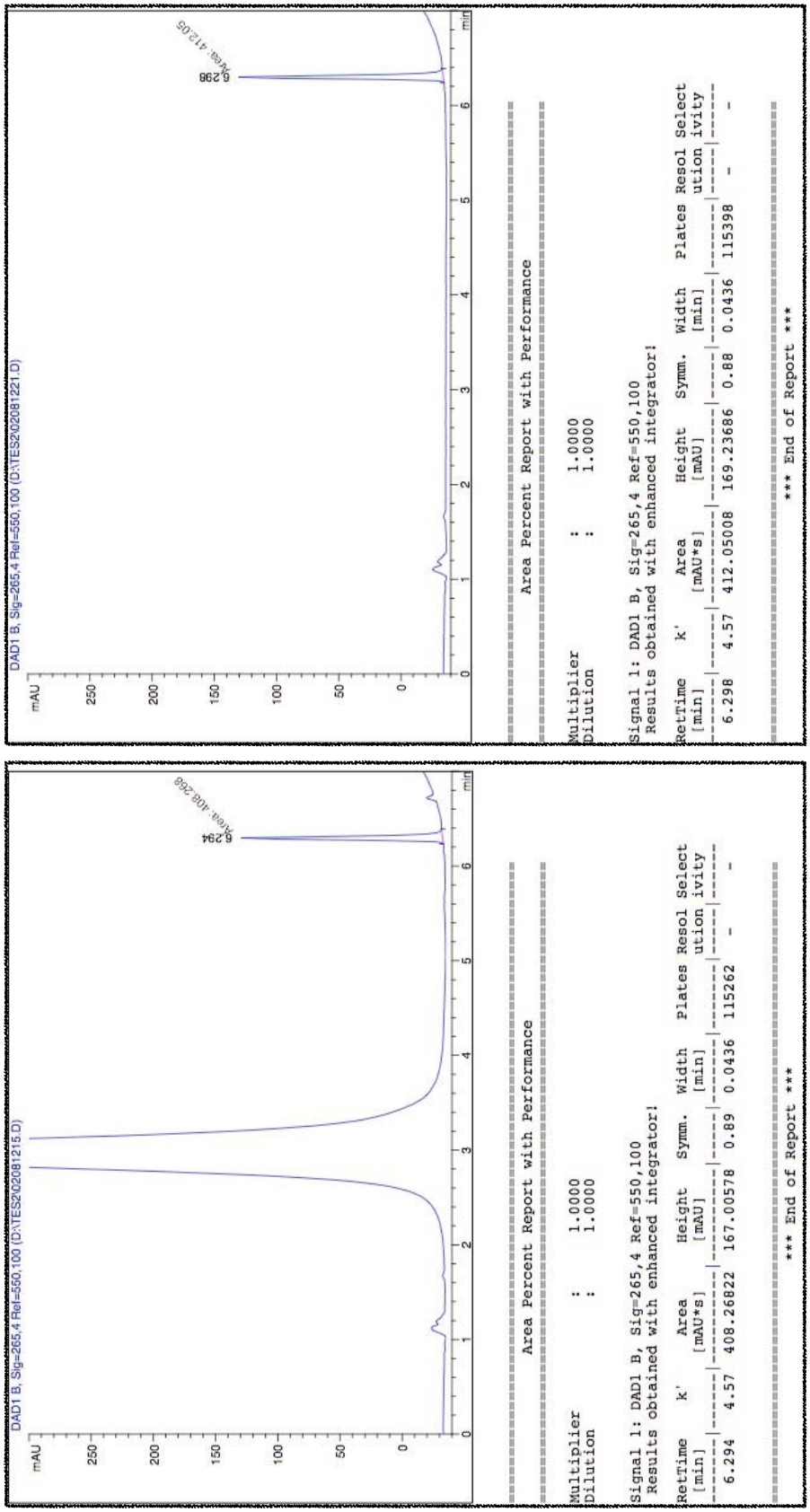


FIGURA 9. Cromatogramas correspondientes a las inyecciones **#15**, *muestra* del vaso número 4 del equipo disolutor (izq.); y **#21**, segundo duplicado de *SR2 final* (der.).

A continuación se presentan las áreas de Tramadol Clorhidrato obtenidas en la **corrida 1**:

No. Inyección	Identificación	Área	No. Inyección	Identificación	Área
1	Blanco 1	Descartado	12	Vaso 1	413.83
2	Blanco 2	Correcto	13	Vaso 2	415.65
3	SR1 (adecua)	410.95	14	Vaso 3	419.02
4	SR1 (adecua)	410.82	15	Vaso 4	408.27
5	SR1 (adecua)	409.86	16	Vaso 5	417.56
6	SR1 (adecua)	409.50	17	Vaso 6	409.81
7	SR1 (adecua)	407.76	18	SR1	410.14
8	SR1	408.14	19	SR1	410.53
9	SR1	408.75	20	SR2	411.22
10	SR2	408.37	21	SR2	412.10
11	SR2	411.14	***	***	***

TABLA 15. Resumen. Áreas de los picos de Tramadol HCl en las inyecciones de la corrida 1.

Utilizando los algoritmos de cálculo indicados en el protocolo se determinó la adecuabilidad del sistema, el factor de respuesta y las cantidades de Tramadol Clorhidrato disuelto en las muestras.

A continuación se muestra de forma resumida la obtención de dicha información. En el ANEXO II se presentan ejemplos de cálculo con más detalle.

4.1.2. Adecuabilidad del sistema, factor de respuesta (FR) y muestras de la corrida #1.

4.1.2.1. Adecuabilidad del sistema: recordar que en el protocolo experimental (página 49) se indica que se debe

«inyectar por quintuplicado 100 µL de la solución de referencia 1 (SR1) y obtener los correspondientes cromatogramas. El coeficiente de variación entre áreas que corresponden al Tramadol HCl no debe ser mayor a 2.0 %».

Para la corrida 1 (ecuaciones 7, 8 y 9; pp: 51-52) se obtuvo que:

Réplicas de SR1	Área
1	410.95
2	410.82
3	409.86
4	409.50
5	407.76
Promedio	409.78
Desviación Estándar	1.29
CV	0.00
Dictamen	**CUMPLE (CV < 2.0%)**

TABLA 16. Adecuabilidad del sistema de la corrida 1. Se observa que aprueba este requisito.

De acuerdo con la tabla 16, en la corrida 1, se aprobó la adecuabilidad del sistema, por lo tanto se puede proseguir con la corrida analítica.

4.1.2.2. Inyección de estándares y cálculo del Factor de Respuesta:

Como se indica en el protocolo, se aplicaron 8 inyecciones correspondientes a estándares. Fueron 4 de SR1 (numeradas como 8, 9, 18, y 19) y 4 de SR2 (numeradas como 10, 11, 20 y 21). Esta numeración se estableció en la tabla 15.

Estas inyecciones tienen como objetivo verificar que la respuesta analítica permanezca estadísticamente sin cambios antes y después de la inyección de las muestras. Con las 8 inyecciones de estándares (SR1 y SR2) se obtiene el Factor de Respuesta promedio. Para calcularlo se necesita el dato de las pesadas y el porcentaje de pureza de la sustancia de referencia.

Recordar que en el protocolo experimental se indica que:

«el coeficiente de variación entre las ocho inyecciones que corresponden a soluciones de referencia no debe ser mayor a 2.0 %»

En la tabla 17 se muestran los datos solicitados de la sustancia de referencia:

Identificación	Pesada (mg)	Pureza (%)	Peso Real (W.R.)
Tra HCl Std - 1	11.30	99.7	**11.27**
Tra HCl Std - 2	11.20	99.7	**11.17**

TABLA 17. Muestra las pesadas de la sustancia de referencia (Tra HCl) así como el cálculo del peso real (W.R.). Este dato es necesario para el cálculo del factor de respuesta (FR).

En la tabla 18 se presentan las áreas correspondientes a las soluciones de referencia, además del cálculo del FR (ecuaciones 10 y 11) asociado a éstas:

No. de inyección	Inyección de	Área	Factor de Respuesta
8	SR1 inicial	408.14	14485
9	SR1 inicial	408.75	14507
10	SR2 inicial	408.37	14623
11	SR2 inicial	411.14	14722
18	SR1 final	410.14	14556
19	SR1 final	410.53	14570
20	SR2 final	411.22	14725
21	SR2 final	412.10	14754
Promedio		410.05	**FR prom = 14618**
Desviación estándar		1.47	***
CV		0.40	***
Dictamen		**CUMPLE (%CV < 2.0%)**	***

TABLA 18. Muestra las áreas para las soluciones de referencia inyectadas antes y después de las soluciones muestra. Se observa que se aprobó este requisito puesto que el CV es menor a 2.0%. También se muestra el FR obtenido considerando el peso real de la tabla 17. El algoritmo de cálculo utilizado es el que se presentó en el protocolo experimental (página 53).

Con la tabla 18, se demuestra que el sistema cromatográfico se comportó adecuadamente, es decir, no hubo acumulación ni pérdida de principio activo en el análisis de las muestras, entonces la cuantificación de Tramadol HCl es confiable. De esa misma tabla se obtiene *el factor de respuesta promedio*, que es necesario para el cálculo del % de Tramadol HCl disuelto de las tabletas.

4.1.2.3. Soluciones muestra. Determinación de % Tramadol HCl disuelto:

Para el cálculo del % de Tramadol HCl disuelto se utilizó el algoritmo de cálculo presentado en el protocolo experimental (ecuaciones 12 y 13, pp: 54 y 55).

Resultó que:

Inyección de	Área	% Tra HCl disuelto
Vaso 1	413.83	100.8
Vaso 2	415.65	101.2
Vaso 3	419.02	102.0
Vaso 4	408.27	99.4
Vaso 5	417.56	101.7
Vaso 6	409.81	99.8
Promedio	414.02	100.8
Desviación estándar	4.27	1.04
CV	1.0 %	
Dictamen	CUMPLE (CV < 2.0%)	

TABLA 19. Se muestran los % de Tramadol HCl disuelto obtenidos en la corrida 1. Se observa que se cumple con el criterio de aprobación (CV menor a 2.0%).

Según la tabla 19, con el criterio de aprobación ahí mencionado, los resultados del porcentaje de Tramadol HCl disuelto en la corrida 1 son válidos.

Lo que sigue de este punto en adelante es hacer las mismas determinaciones para cada corrida analítica hasta completar los 8 experimentos. Los resultados de estos se presentan en el ANEXO I.

4.1.3. Resultados de las 8 corridas (% de Tramadol Clorhidrato disuelto)

A continuación, a modo de resumen, se presentan sólo los porcentajes de Tramadol HCl disuelto en cada uno de los vasos de las 8 corridas:

Corrida	Vasos (% disuelto de Tramadol HCl)						Promedio	SD	CV
	1	2	3	4	5	6			
1	100.8	101.2	102.0	99.4	101.7	99.8	**100.8**	*1.04*	*1.0*
2	102.0	99.1	102.0	98.1	98.6	99.9	**100.0**	*1.69*	*1.7*
3	99.3	99.1	97.6	97.7	96.5	98.5	**98.1**	*1.04*	*1.1*
4	94.1	95.6	96.4	96.1	93.9	94.2	**95.0**	*1.11*	*1.2*
5	95.9	98.9	98.6	100.1	97.3	97.5	**98.0**	*1.45*	*1.5*
6	99.9	101.4	101.7	99.1	101.3	99.0	**100.4**	*1.21*	*1.2*
7	97.8	99.4	100.2	99.1	95.9	100.3	**98.8**	*1.70*	*1.7*
8	95.0	95.9	95.2	92.6	95.5	96.8	**95.2**	*1.41*	*1.5*

TABLA 20. Porcentaje disuelto de Tramadol HCl en cada uno de los 6 vasos del disolutor. Se calculó el promedio, desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV). El promedio se utilizará más adelante, mientras que el CV es el criterio de aceptación. En todos los casos fue menor a 2.0% por lo que se consideran resultados válidos.

Hasta este momento hemos podido obtener todos los resultados que necesitamos, esto es, los 48 porcentajes de Tramadol HCl disuelto, además de los promedios que corresponden a los 6 vasos del disolutor en cada corrida.

Para cada una, como es de suponerse, se hizo el mismo tratamiento de la información, del cual se presentó un ejemplo en estas últimas páginas. Es entonces momento de hacer el *análisis estadístico*.

Para concluir la sección de *resultados generales* se presenta la tabla 21. Muestra las características de cada corrida y el resultado promedio obtenido*:*

Corrida *i*	Factores					**Resultados (% disuelto promedio)**
	A	C	D	F	G	
	Concentra-ción (**N**) de HCl (medio de disolución)	Volumen de medio de disolución **(mL)**	Desgasificación del medio de disolución	Velocidad de agitación **(rpm)**	Longitud de onda (λ) de detección **(nm)**	
1	0.12	890	Desgasificado	105	265	**100.8**
2	0.12	890	Sin desgasificar	95	265	**100.0**
3	0.12	910	Sin desgasificar	105	255	**98.1**
4	0.08	910	Desgasificado	95	265	**95.0**
5	0.12	910	Desgasificado	95	255	**98.0**
6	0.08	890	Desgasificado	105	255	**100.4**
7	0.08	910	Sin desgasificar	105	265	**98.8**
8	0.08	890	Sin desgasificar	95	255	**95.2**

TABLA 21. Presenta las condiciones de cada uno de los 8 experimentos. En la columna de la derecha se observan los promedios del % de Tramadol HCl disuelto en cada caso. Estos valores corresponden al *promedio* que resulta de considerar los seis vasos del aparato disolutor.

4.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS

En esta parte se presenta el análisis estadístico indicado en el protocolo experimental.

Este procedimiento se conoce como análisis de efectos. Se aplicó para determinar si los factores tienen efecto significativo o no sobre la respuesta analítica (% disuelto de Tramadol Clorhidrato). En otras palabras, es la parte fundamental de este estudio de robustez.

4.2.1. Análisis de efectos

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos incluye, en su décima edición, un apartado donde trata el tema de validación de métodos analíticos. En éste se halla información detallada acerca de los parámetros de desempeño que se evalúan cotidianamente en el desarrollo de un método. Aparece también una indicación de cómo evaluar la robustez. Muestra un ejemplo de aplicación que es un Diseño de Experimentos tipo Placket y Burman que, bajo la dinámica de su sugerencia, se limita a la evaluación de entre 4 y 5 factores reales.

De ese apartado se tomó la *tabla de signos* que dio origen a la matriz de tratamientos (cómo se combinaron los factores, en sus niveles superior e inferior, para originar las 8 corridas experimentales) de nuestro estudio de robustez. La manera de determinar estadísticamente si los factores presentan efecto sobre la respuesta analítica se ha detallado en los antecedentes (ecuaciones 1 a 6, páginas 16 a 18) y en el protocolo de este trabajo.

Para empezar con el análisis de efectos se necesitan:

✳ Los 8 *promedios* del % de Tramadol HCl disuelto, y
✳ La tabla de signos

Como se indica en los antecedentes, hay que asociar los resultados con los signos positivos y negativos que les anteceden en cada fila para cada corrida.

Luego, calcular el Contraste (ecuación #1, página 16) y la Suma de Cuadrados de cada factor (ecuación #2, página 17). Estos tres puntos (asociación, contraste y suma de cuadrados) se muestran en la siguiente tabla:

Corrida	Factores						
	A	B (falso)	C	D	E (falso)	F	G
1	100.8	-100.8	-100.8	100.8	-100.8	100.8	100.8
2	100.0	100.0	-100.0	-100.0	100.0	-100.0	100.0
3	98.1	98.1	98.1	-98.1	-98.1	98.1	-98.1
4	-95.0	95.0	95.0	95.0	-95.0	-95.0	95.0
5	98.0	-98.0	98.0	98.0	98.0	-98.0	-98.0
6	-100.4	100.4	-100.4	100.4	100.4	100.4	-100.4
7	-98.8	-98.8	98.8	-98.8	98.8	98.8	98.8
8	-95.2	-95.2	-95.2	-95.2	-95.2	-95.2	-95.2
∑ (+)	397.0	393.5	390.0	394.3	397.2	398.1	394.6
∑ (-)	-389.4	-392.9	-396.4	-392.1	-389.2	-388.2	-391.8
Contraste	7.5	0.7	-6.4	2.3	8.1	9.9	2.9
SC	7.07	**0.05**	5.14	0.64	**8.12**	12.29	1.03

TABLA 22. Se muestran los resultados *promedio* del % de Tramadol HCl disuelto asociados con +1 ó -1 según les corresponde en la tabla de signos.
También se observa el cálculo del contraste y de la Suma de Cuadrados (SC) de cada factor. Se enmarcaron los datos que corresponden a los factores falsos porque llevan un tratamiento distinto a los factores reales.

Después se debe realizar el cálculo de la Suma de Cuadrados del error (SC_e) con la ecuación número 4 (página 18) y la de la Media de Cuadrados del error (MC_e) con la ecuación número 5 (página 18). Es importante recordar que en el estudio se hizo uso de 2 factores falsos.

Entonces tenemos que:

Parámetro	Se obtiene de	Cálculo	Resultado
SC error (SC_e)	Sumar las SC de los factores falsos (tabla 22)	$SC_B + SC_E = 0.05 + 8.12$	8.17
MC error (MC_e)	Dividir (SC_e)entre el total de factores falsos (2)	$MC_e = 8.17/2$	4.085

TABLA 23. Muestra el cálculo de la Media de Cuadrados del error (MC_e). Dato necesario para calcular la F calculada (F_{cal}) de cada factor.

En la tabla 23 se observa que el cálculo de la media de cuadrados del error (**MC_e**) dio como resultado **4.085**.

Por otro lado, se calculó la Media de Cuadrados de cada factor (MC_X). Recordar que ésta es idéntica a la suma de cuadrados (SC) debido a que hay sólo un grado de libertad por cada factor (ecuación número 3, página 17).

Entonces se puede obtener la F_{cal} para cada factor dividiendo su media de cuadrados entre la media de cuadrados del error. Esto fue mostrado en la ecuación número 6 (página 18) y es presentado a continuación:

Factores reales	MC_X	MC_e	F_{cal} (MC_X/MC_e)
A. Concentración de HCl (medio de disolución)	7.07		1.73
C. Volumen de medio de disolución	5.14		1.26
D. Desgasificación del medio de disolución	0.64	*4.085*	0.16
F. Velocidad de agitación	12.29		3.01
G. Longitud de onda de detección	1.03		0.25

TABLA 24. Muestra el cálculo u obtención de la F calculada para cada factor real.

La media de cuadrados de cada factor (igual a su suma de cuadrados) se tomó de la tabla 22.

Finalmente se hizo la comparación con la F de tablas (en el protocolo experimental se estableció que para este diseño de experimentos tiene un valor de 18.351). Se obtuvo lo siguiente:

Factores	F_{cal}	$F_{(0.05,1,2)}$	¿S o NS?
A. Concentración de HCl (medio de disolución)	1.73	18.351	NS
C. Volumen de medio de disolución	1.26	18.351	NS
D. Desgasificación del medio de disolución	0.16	18.351	NS
F. Velocidad de agitación	3.01	18.351	NS
G. Longitud de onda de detección	0.25	18.351	NS

TABLA 25. Muestra la comparación del valor de F calculada de cada factor contra la F de tablas. Los datos de F_{cal} se tomaron de la tabla 24.
En la columna de la derecha, se muestran las conclusiones respecto a la significancia de cada factor bajo este análisis estadístico.
Clave:
S = Significativo;
NS = No Significativo

Se concluye entonces que ninguno de los factores, en los intervalos estudiados, es significativo:

Factor	En un intervalo de:	¿Robusto?
A. Concentración de HCl (medio de disolución)	0.08 N hasta 0.12 N	✔
C. Volumen de medio de disolución	890 mL hasta 910 mL	✔
D. Desgasificación del medio de disolución	95 rpm hasta 105 rpm	✔
F. Velocidad de agitación	255 nm hasta 265 nm	✔
G. Longitud de onda de detección	N/A *	✔

TABLA 26. Conclusiones respecto a los intervalos del método que fueron estudiados.
Clave:
✔ = sí es robusto para este factor;
✖ = no es robusto para este factor.
*En el caso de la desgasificación del medio de disolución no se muestra un intervalo debido a que se trata de un factor discreto.

En la tabla 26 se observan las conclusiones que arroja el análisis de efectos. Resulta que este análisis indica que:

«El método es robusto para la concentración de ácido clorhídrico en el medio de disolución en un intervalo de 0.08 N y hasta 0.12 N; también lo es para el volumen de medio de disolución en un intervalo de 890 mL y hasta 910 mL; para la velocidad a la que se efectúa la disolución en un intervalo de 95 rpm y hasta 105 rpm; para la longitud de onda programada en el detector en un intervalo que va de los 255 nm hasta los 265 nm. Finalmente, se indica para la desgasificación que el método es robusto con el medio de disolución desgasificado o sin desgasificar.»

4.3. DISCUSIÓN

La experimentación rutinaria o común conlleva la aparición de variaciones en los resultados. Esas variaciones son naturales por el simple hecho de ejecutar repetidamente una actividad, es decir, haciendo un mismo procedimiento varias veces, difícilmente obtendremos el mismo resultado exactamente.

Al estudiar la robustez de un método analítico el problema se centra en poder determinar que las variaciones observadas se deben a los cambios en los factores y no a la variación natural de la experimentación. En otras palabras, debemos tener la capacidad de distinguir las variaciones normales (por la propia experimentación) de las variaciones provocadas (por el uso de los niveles alto y bajo de los factores).

La principal ventaja del análisis de efectos sugerido por la FEUM es el uso de factores falsos. La inclusión de estos tiene como objetivo hacer la distinción o «limpieza» que se comenta en el párrafo anterior.

Las variaciones que se encuentran en la serie de resultados pueden observarse y analizarse «de manera más limpia» para definir si hay diferencias significativas estadísticamente debidas a los cambios pequeños pero deliberados que se implementaron en la ejecución de los experimentos. Si resulta que hay cambios considerables en la respuesta, entonces señalamos al factor como fuente importante de variación, es decir, significativo.

En el caso particular de los resultados obtenidos (tablas 25 y 26), ningún factor tuvo efectos significativos sobre la respuesta en los intervalos aplicados en nuestro estudio de robustez. Esto significa en primera instancia que aplicamos adecuadamente el concepto de «cambios pequeños pero deliberados» mencionado en la FEUM. En el caso contrario, o sea, aquel en el que los cambios en los factores estudiados hubiesen sido demasiado grandes,

naturalmente habríamos encontrado variaciones estadísticamente significativas sobre nuestra respuesta.

Al ser todas las F cal más pequeñas que el valor crítico que planteamos, ocurre naturalmente que el análisis estadístico señaló a todos los factores que estudiamos como ***no significativos****, bajo sus respectivos intervalos*, sobre la respuesta analítica (% de Tramadol Clorhidrato disuelto).

También podemos decir que, respaldados en los intervalos que aplicamos y la estadística, un analista entrenado adecuadamente no debería encontrar grandes variaciones en la respuesta analítica ejecutando el análisis nominalmente en virtud de que implementando cambios intencionales en los factores estudiados no se encontraron esas variaciones estadísticamente importantes.

Por otro lado los valores de F calculada de cada factor van de 0.16 hasta 3.01 (ver tabla 27). Todos son menores que la F crítica y por eso se estableció que son factores no significativos. Sin embargo también vale la pena comentar que esa variedad de valores puede tomarse como una medida de la influencia del factor correspondiente sobre la respuesta analítica.

Dicho de otro modo, con base en la tabla 27, podemos señalar a la «velocidad de agitación» como aquel que puede provocar más cambios en el % disuelto de Tramadol Clorhidrato porque su F_{cal} es la más grande de entre las 5 obtenidas, mientras que la desgasificación, al presentar el valor F_{cal} más pequeño, es el que influye menos en la respuesta. Los otros factores tendrían una influencia intermedia comparada contra el más y el menos influyente.

Factores	Valores de F_{cal} en orden descendiente
Velocidad de agitación	3.01
Concentración de HCl (medio de disolución)	1.73
Volumen de medio de disolución	1.26
Longitud de onda de detección	0.25
Desgasificación del medio de disolución	0.16

Tabla 27. Muestra los valores de Fcal obtenidos para cada factor.

Finalmente, en un estudio científico suele preferirse el uso de resultados individuales y eventualmente se desvirtúan aquellas investigaciones donde se utilizan promedios de una serie de repeticiones. El uso de los individuales tiene esa aceptación porque es más ilustrativo y nos permite ver, como en nuestro caso, muchas más mediciones que los promedios (para nosotros habrían sido 48 resultados en vez de únicamente 8), y puede resultar más enriquecedor para hacer análisis y conclusiones.

Sin embargo ¿qué consecuencia habría tenido usar las 48 observaciones en vez de 8 promedios? Ocurre que habría recaído en el uso de una F crítica mucho más pequeña que la que presentamos (18.35). Esto sería, considerada al 95 % de confianza, 1 G.L. en el numerador y 40 G.L. en el denominador ($F_{0.05,1,40}$). Recordando por supuesto que se usa 1 G.L. por ser el número de niveles (2) de cada factor menos 1, mientras que 40 G.L. se justifican en el hecho de ser los residuales, mismos que se obtienen del número de observaciones (hipotéticamente 48) menos 1, además de sustraer 7 (una unidad por cada factor).

Bajo estas condiciones se usaría una F_{tab} igual a 4.08. Si observamos la tabla 25 donde aparecen las F_{cal}, resulta que bajo estos términos, para ninguno de los factores se rebasa el valor crítico y por tanto ningún factor se consideraría significativo aún usando los 48 resultados.

PARTE V.

Conclusiones

V. CONCLUSIONES

★ El porcentaje de Tramadol Clorhidrato disuelto en la prueba farmacopéica de disolución (respuesta analítica) se mantiene sin cambios estadísticamente significativos aún bajo las siguientes variaciones:

✓ *Desgasificación:* es robusto en cualquiera de las dos condiciones, esto es, con el medio de disolución desgasificado o sin desgasificar.

✓ *Volumen del medio de disolución:* es robusto dentro del intervalo estudiado (desde 890 mL hasta 910 mL).

✓ *Concentración del medio de disolución*: es robusto dentro del intervalo estudiado (desde 0.08 N hasta 0.12 N).

✓ *Velocidad de agitación*: es robusto dentro del intervalo estudiado (desde 95 rpm hasta 105 rpm).

✓ *Longitud de onda de detección:* es robusto dentro del intervalo estudiado (desde 255 nm hasta 265 nm).

★ Por lo tanto se establece que **el método analítico es robusto** para todos los factores contemplados en nuestro estudio (desgasificación, volumen y concentración del medio de disolución, así como la velocidad de agitación y la longitud de onda de detección). Esta conclusión está respaldada por la metodología sugerida en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos en su décima edición.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] ICH. *Validation of analytical procedures: text and methodology.* Q2 (R1).

[2] *Guía de Validación de Métodos Analíticos.* Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A. C. 2002. Pp: 17 - 21.

[3] *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos,* 10ma edición. Pp: 57, 367-395, 1357, 2569 - 2579.

[4] *United States Pharmacopeia (USP) XXII.* Pp*:* 2191, 2192, 2400 - 2402.

[5] Vander - Heyden, V. et. al. *Guidance for robustness / ruggedness tests in method validation.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Elsevier, 2001. Pp: 723 - 753.

[6] Martin - Smith M., Rudd. *The importance of proper validation of the analytical methods employed in the quality control of pharmaceuticals.* Acta Pharmaceutica Jugoslavica. 1990; 40: 7-19.

[7] Gray, Vivian, et. al. *The science of USP 1 and 2 dissolution: Present challenges and future relevance.* Pharmaceutical Research, vol. 26. No. 6. Junio, 2009. Pp: 1289 - 1302.

[8] Rodríguez Sáenz, Ricardo; Rodríguez, Juan M. *Manual de laboratorio de desarrollo analítico para la carrera de QFB.* Facultad de Química, UNAM. 2007.

[9] Miller, J. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica.* Prentice Hall. 4ta. ed. 2000. Pp: 56 - 58.

[10] Aulton, M. E. *Pharmaceutics. The science of dosage form design. 2da.* Ed. 2004. Pp: 19 - 27.

[11] Gennaro, A. *Remington. Farmacia.* 20a. ed. 2003. Tomo 1. 867 - 872.

[12] *British Pharmacopoeia.* 2012. Vol III. Pag: 2400, 2403, 3358, 3359.

[13] Suárez Gonzáles, Luis, et. al. *Uso del tramadol como analgésico en el postoperatorio inmediato.* Revista de ciencias médicas. Abril de 2005.

[14] pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=24724659 (consultada el miércoles 1 de octubre de 2014)

[15] *PLM. Diccionario de especialidades farmacéuticas.* México 2011. Pp: 3525, 3872.

[16] Martin Dieppa, José M. et. al. *Tratamiento del dolor agudo posoperatorio.* Revista Cubana de Medicina Militar. Vol. 38. No. 1. 2009

[17] *European Pharmacopoeia* 5.0 Vol II, 2005. Pp: 2607 - 2608

[18] Página electrónica de Sigma Aldrich www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/uc456?lang=es&region=MX (consultada el miércoles 1 de octubre de 2014)

[19] Skoog, D. et. al. *Principios de Análisis Instrumental.* 762 -783. 6ta. ed. 2008. Cengage Learning.

[20] Cazes, Jack. *Ewing's analytical instrumentation handbook.* 3era. ed. 2005. Pp: 687 - 726

[21] Quattrocchi, O. et. al. *Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica.* Argentina, 1992. Pp: 246 - 255, 370 - 374

[22] Skoog, D. et. al. *Fundamentos de Química Analítica.* 8va. ed. Editorial Thomson. 2004. Pp: 987 - 998

[23] *European Pharmacopoeia 5.0.* Vol. I. 2004. Pp: 42 - 44.

[24] Foo-Tim Chau, et. al. *Chemometrics from basics to wavelet transform.* 2004. Pag: 8.

ANEXO I

Resumen de los resultados experimentales de las corridas analíticas #2 a #8.

En la tabla 28 se aprecian los resultados de adecuabilidad del sistema[††††] (quintuplicado de SR1; inyecciones 3 a 7), desde la segunda y hasta la octava corrida analítica. La adecuabilidad de la corrida 1 se demostró y se usó como ejemplo del manejo de datos en la presentación de resultados (tabla 16). Recordar que *el criterio de aprobación es que el CV sea menor al 2.0 %*. Cabe aclarar que en la tabla 28 se presentan áreas a simple vista muy distintas entre sí debido al uso de diferentes longitudes de onda en el detector del equipo CLAR. A su vez, hay que recordar que fue uno de los factores involucrados en el estudio de robustez.

Corrida	Inyecciones de SR1 (réplicas, quintuplicado)					$\bar{x}$	SD	CV
	1	2	3	4	5			
2	413.63	411.14	412.65	415.15	418.49	414.21	2.80	0.68
3	147.61	147.61	146.39	146.92	147.92	147.29	0.62	0.42
4	419.73	422.86	422.98	426.96	424.82	423.47	2.67	0.63
5	148.90	150.43	150.16	147.69	149.69	149.37	1.11	0.74
6	150.29	149.78	150.83	152.67	152.61	151.24	1.33	0.88
7	415.78	414.80	414.76	414.49	415.39	415.04	0.53	0.13
8	155.51	155.30	156.95	156.00	156.96	156.14	0.78	0.50

TABLA 28. Adecuabilidad del sistema para las corridas 2 a 8. Se observa que en todos los casos se aprobó este requisito.

La tabla 28 muestra que se cumplió con la adecuabilidad del sistema en todas las corridas analíticas, lo cual le confiere validez experimental a las mismas.

†††† Para adecuabilidad no se muestran los cromatogramas, únicamente las áreas de los picos obtenidos en los mismos.

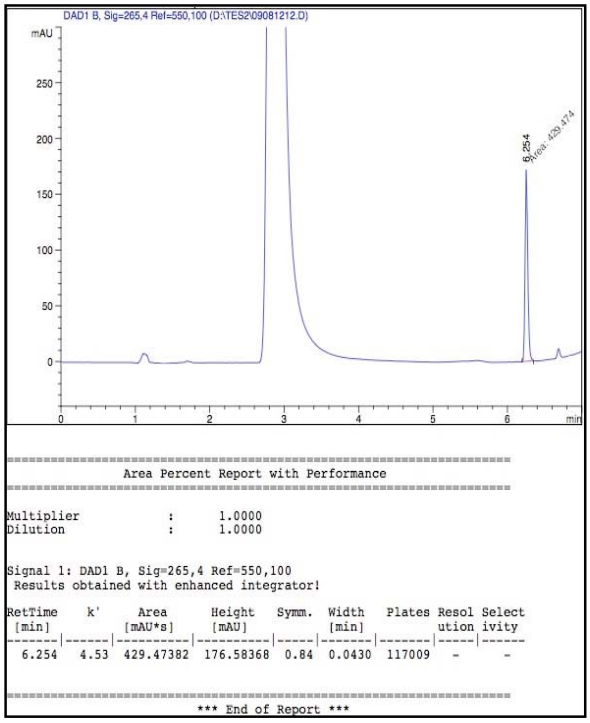
En segundo lugar se mostrará *la mayoría* de los cromatogramas obtenidos para las muestras de la prueba de disolución. Considerando que fueron 8 corridas analíticas, cada una con 6 vasos, se tienen en total 48 observaciones.

De éstas, parte de los cromatogramas de las muestras que corresponden a la corrida 1 se expusieron en la parte de resultados generales (ver figuras 8 y 9).

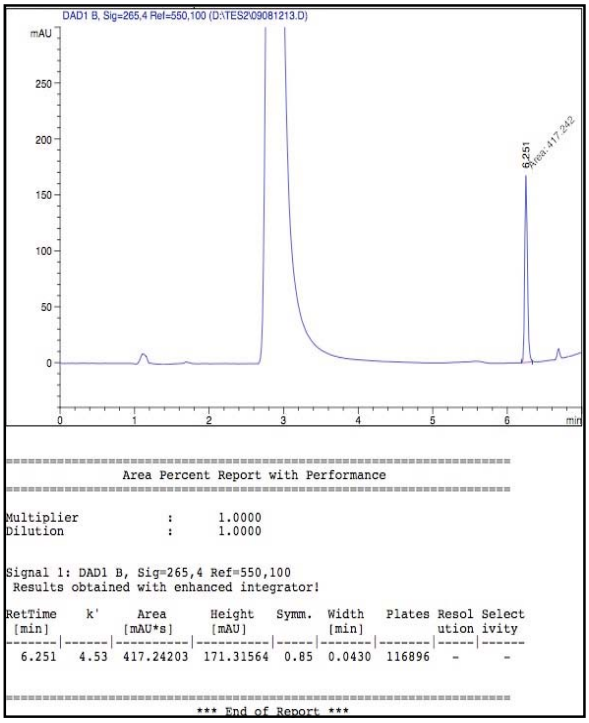
A continuación, observamos los 42 cromatogramas que corresponden a las muestras de las 7 corridas restantes. En todos los casos se ordenan como:

vaso 1, primer renglón a la izquierda; vaso 2, primer renglón a la derecha; vaso 3, segundo renglón a la izquierda; vaso 4, segundo renglón a la derecha; vaso 5, tercer renglón a la izquierda; y vaso 6, tercer renglón a la derecha.

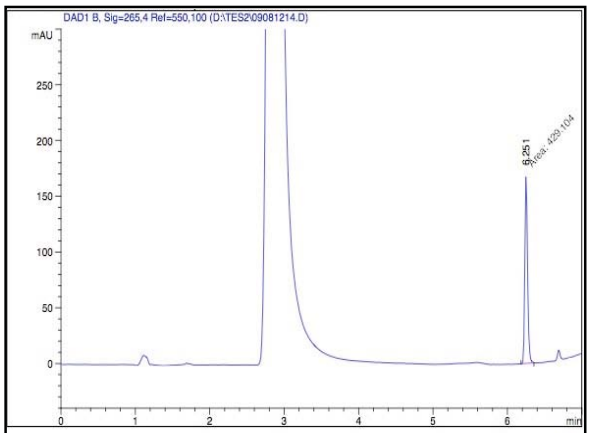
Corrida analítica # 2.



Vaso 1



Vaso 2



Area Percent Report with Performance

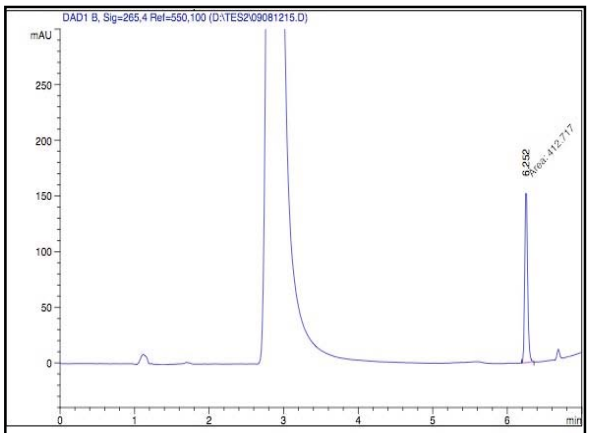
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=265,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resolution	Selectivity
6.251	4.53	429.10370	174.82608	0.82	0.0436	113670	-	-

*** End of Report ***

Vaso 3



Area Percent Report with Performance

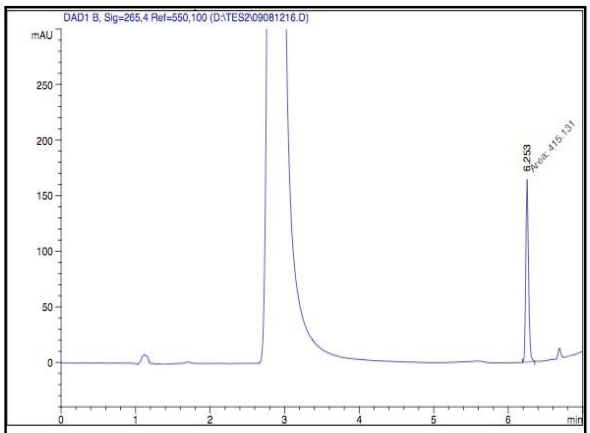
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=265,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resolution	Selectivity
6.252	4.53	412.71725	165.29039	0.83	0.0444	109625	-	-

*** End of Report ***

Vaso 4



Area Percent Report with Performance

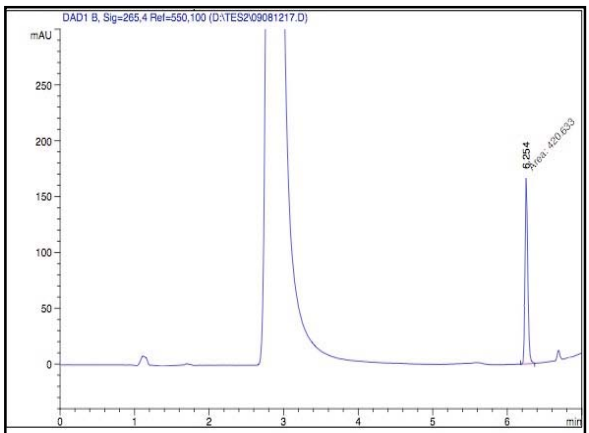
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=265,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resolution	Selectivity
6.253	4.53	415.13080	168.93365	0.87	0.0442	110650	-	-

*** End of Report ***

Vaso 5



Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

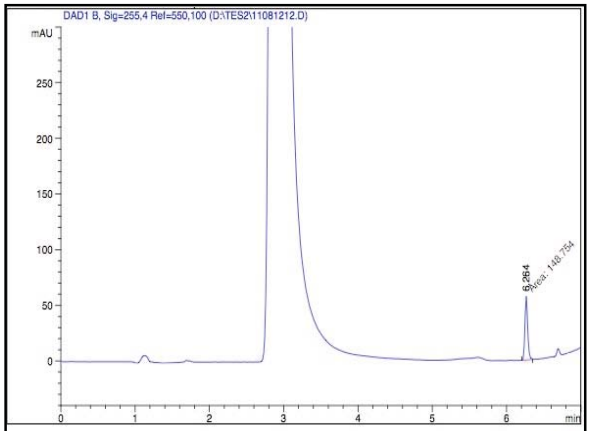
Signal 1: DAD1 B, Sig=265,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resolution	Selectivity
6.254	4.53	420.63339	171.74118	0.83	0.0436	113812	-	-

*** End of Report ***

Vaso 6

Corrida analítica # 3



Area Percent Report with Performance

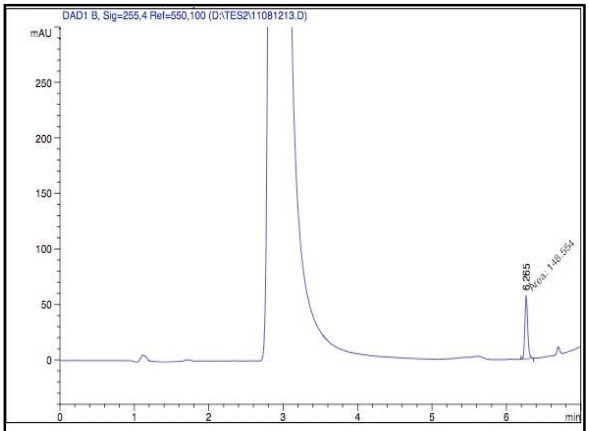
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=255,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resolution	Selectivity
6.264	4.54	148.75409	58.96017	0.87	0.0448	108087	-	-

*** End of Report ***

Vaso 1



Area Percent Report with Performance

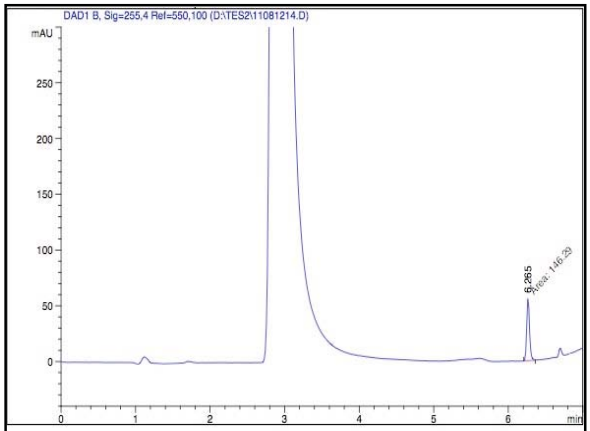
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=255,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resolution	Selectivity
6.265	4.54	148.55373	58.96095	0.84	0.0451	107019	-	-

*** End of Report ***

Vaso 2



Area Percent Report with Performance

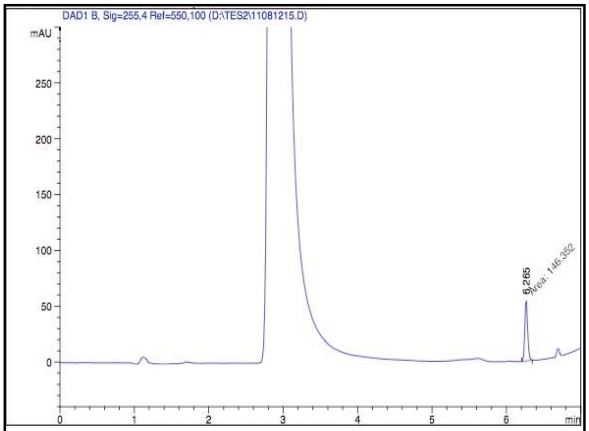
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=255,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resolution	Selectivity
6.265	4.54	146.28995	57.95273	0.83	0.0451	106991	-	-

*** End of Report ***

Vaso 3



Area Percent Report with Performance

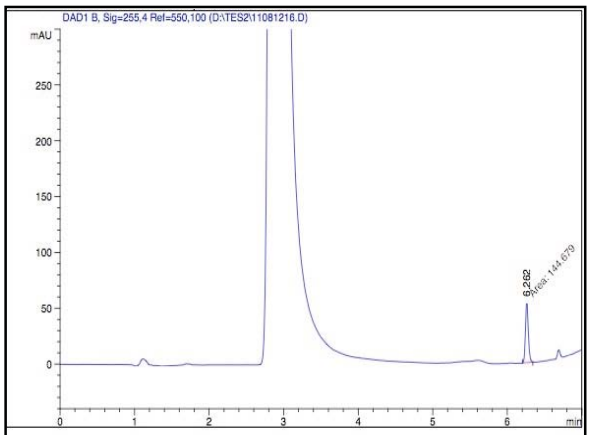
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=255,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resolution	Selectivity
6.265	4.54	146.35214	56.87121	0.87	0.0463	101222	-	-

*** End of Report ***

Vaso 4



Area Percent Report with Performance

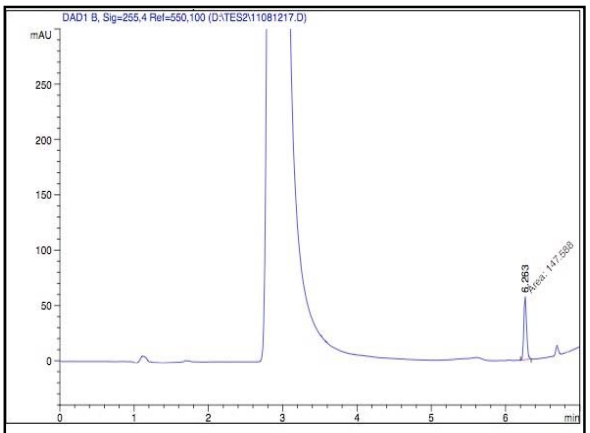
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=255,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resolution	Selectivity
6.262	4.54	144.67931	56.90942	0.85	0.0457	103952	-	-

*** End of Report ***

Vaso 5



Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

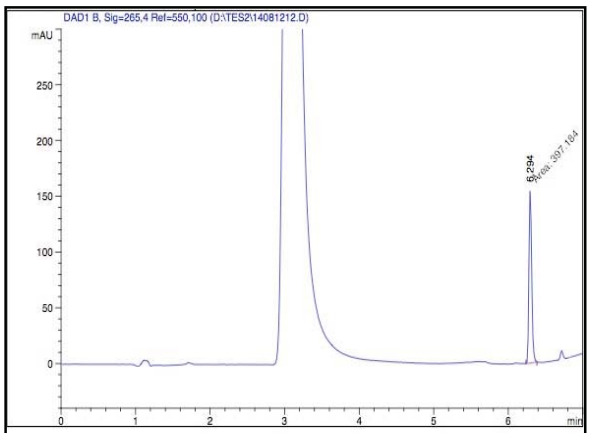
Signal 1: DAD1 B, Sig=255,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resolution	Selectivity
6.263	4.54	147.58807	58.59651	0.89	0.0455	105170	-	-

*** End of Report ***

Vaso 6

Corrida analítica # 4



Area Percent Report with Performance

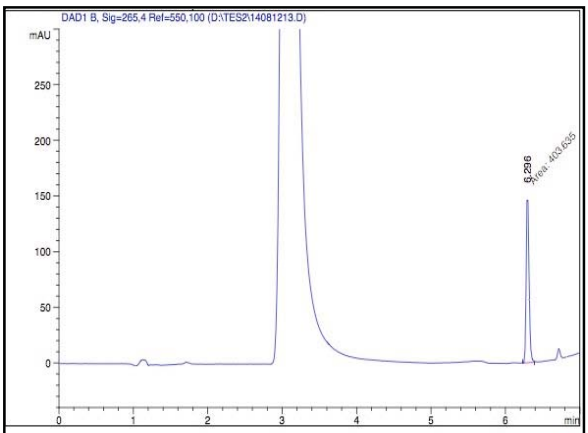
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=265,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resolution	Selectivity
6.294	4.57	397.18369	159.85101	0.82	0.0444	111101	-	-

*** End of Report ***

Vaso 1



Area Percent Report with Performance

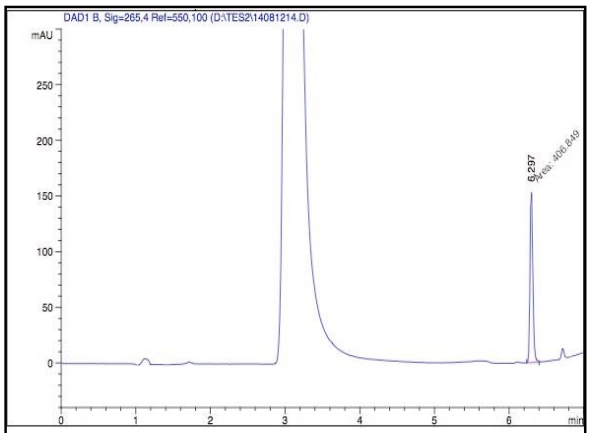
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=265,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resolution	Selectivity
6.296	4.57	403.63483	158.74731	0.82	0.0457	105087	-	-

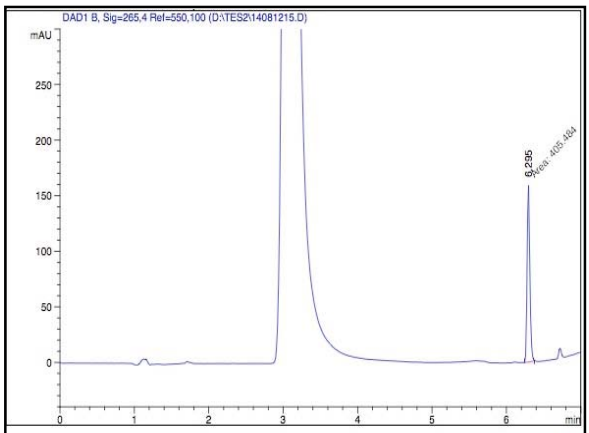
*** End of Report ***

Vaso 2



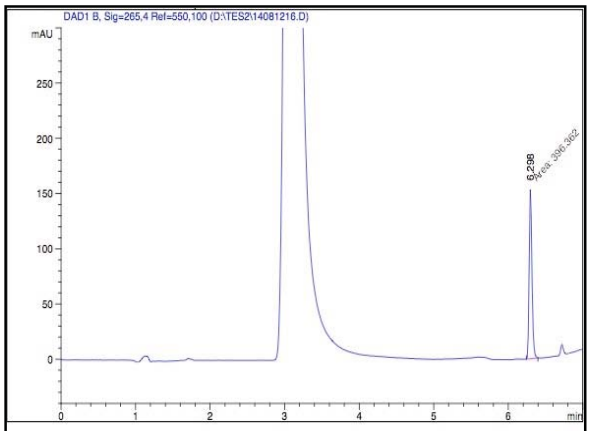

```
==========================================================================
                Area Percent Report with Performance
==========================================================================

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=265,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height   Symm.  Width   Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]     [mAU]           [min]          ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.297   4.57  406.84875  159.87152  0.86  0.0457  105115   -      -

==========================================================================
                         *** End of Report ***
```

Vaso 3



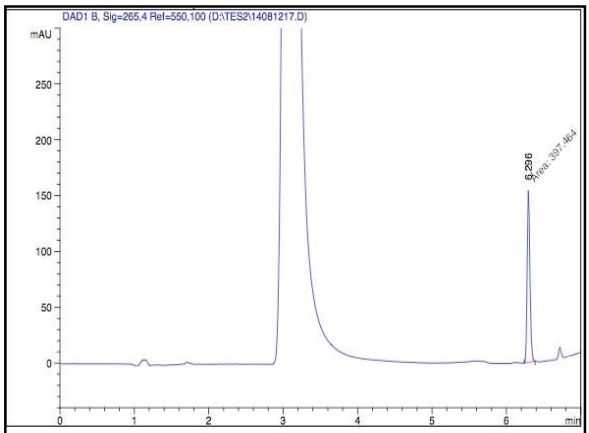

```
==========================================================================
                Area Percent Report with Performance
==========================================================================

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=265,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height   Symm.  Width   Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]     [mAU]           [min]          ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.295   4.57  405.48450  163.76720  0.86  0.0448  109161   -      -

==========================================================================
                         *** End of Report ***
```

Vaso 4




```
==========================================================================
                Area Percent Report with Performance
==========================================================================

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=265,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height   Symm.  Width   Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]     [mAU]           [min]          ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.298   4.57  396.36154  158.90982  0.82  0.0444  111232   -      -

==========================================================================
                         *** End of Report ***
```

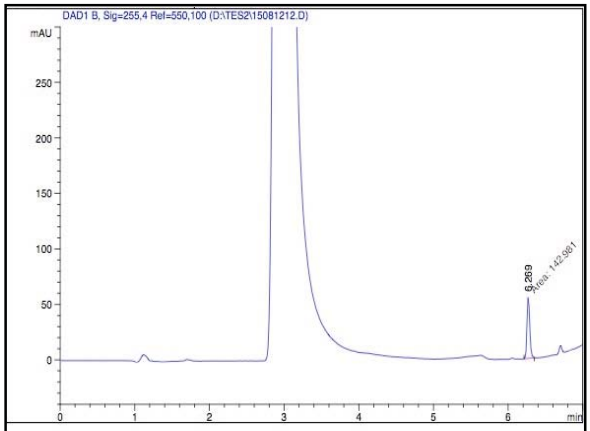
Vaso 5




```
==========================================================================
                Area Percent Report with Performance
==========================================================================

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=265,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height   Symm.  Width   Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]     [mAU]           [min]          ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.296   4.57  397.46378  160.30954  0.82  0.0444  111158   -      -

==========================================================================
                         *** End of Report ***
```

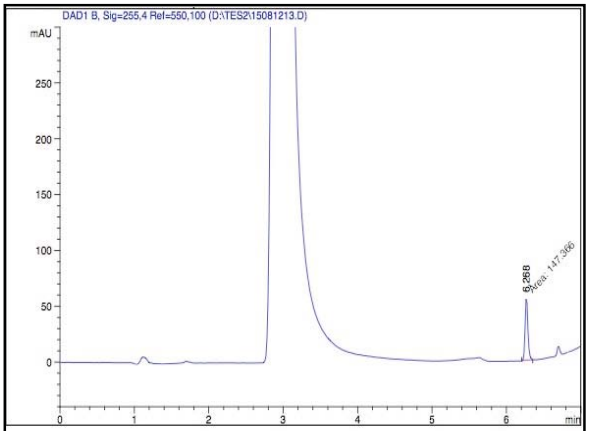
Vaso 6

Corrida analítica # 5



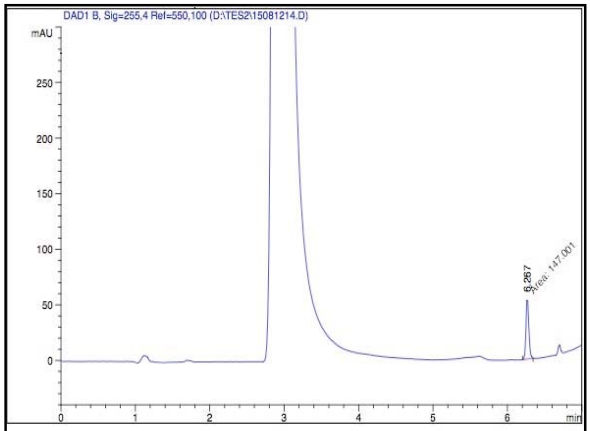

```
Area Percent Report with Performance

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=255,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height    Symm.  Width    Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]    [mAU]            [min]           ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.269   4.55  142.98065   57.43489  0.83  0.0444  110215   -      -

*** End of Report ***
```

Vaso 1



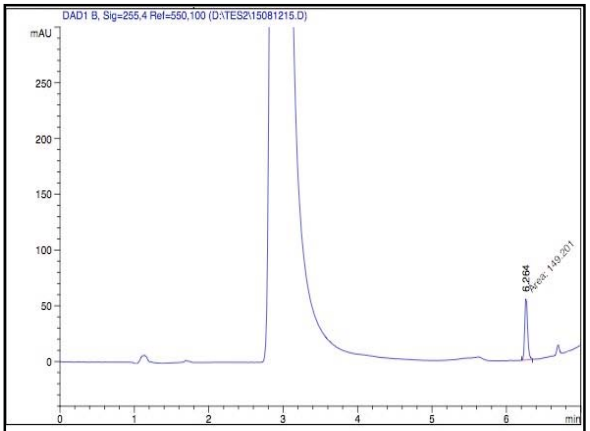

```
Area Percent Report with Performance

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=255,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height    Symm.  Width    Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]    [mAU]            [min]           ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.268   4.55  147.36562   58.25660  0.83  0.0457  104153   -      -

*** End of Report ***
```

Vaso 2



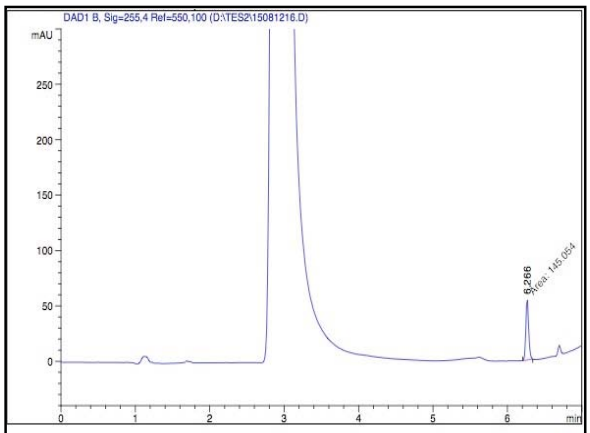

```
Area Percent Report with Performance

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=255,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height    Symm.  Width    Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]    [mAU]            [min]           ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.267   4.55  147.00111   57.57665  0.84  0.0457  104115   -      -

*** End of Report ***
```

Vaso 3



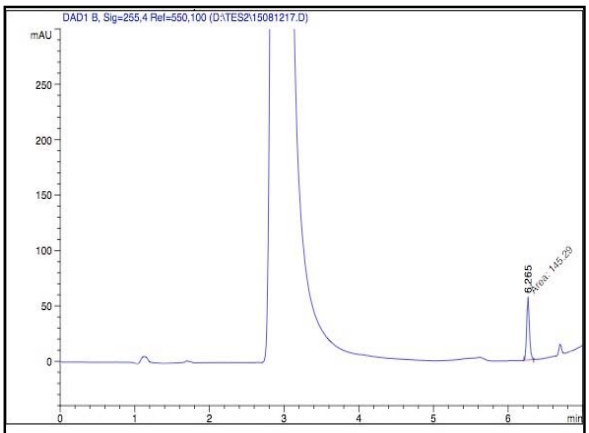

```
Area Percent Report with Performance

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=255,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height    Symm.  Width    Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]    [mAU]            [min]           ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.264   4.54  149.20094   58.61281  0.83  0.0457  104005   -      -

*** End of Report ***
```

Vaso 4




```
Area Percent Report with Performance

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=255,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height   Symm.  Width   Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]    [mAU]           [min]          ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.266   4.54  145.05434   57.10870  0.88  0.0463  101243   -      -

*** End of Report ***
```

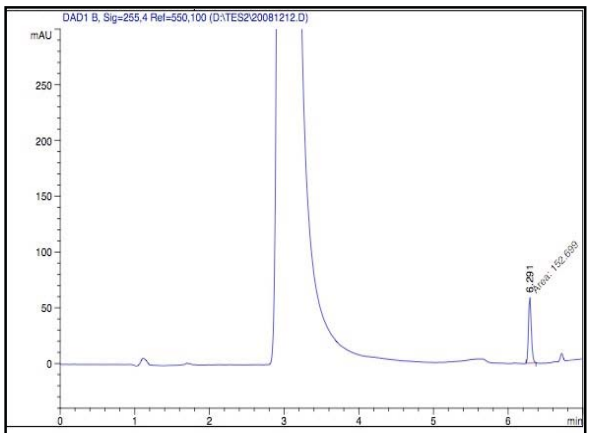
Vaso 5




```
Area Percent Report with Performance

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=255,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height   Symm.  Width   Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]    [mAU]           [min]          ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.265   4.54  145.29022   58.10518  0.86  0.0448  108118   -      -

*** End of Report ***
```

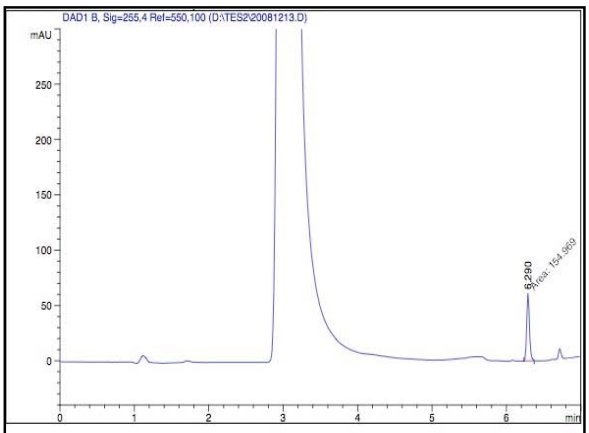
Vaso 6

Corrida analítica # 6



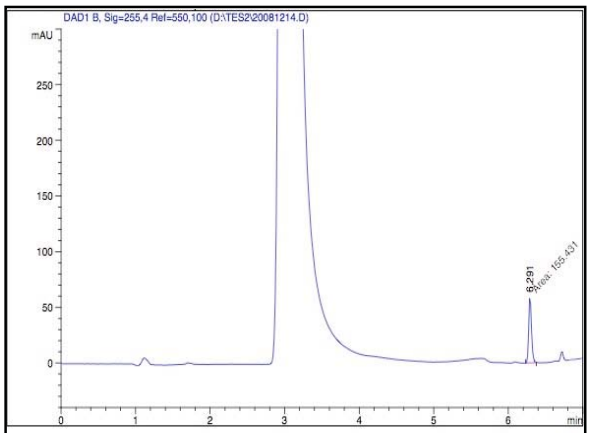

```
Area Percent Report with Performance

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=255,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height   Symm.  Width   Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]    [mAU]           [min]          ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.291   4.57  152.69896   61.06273  0.86  0.0455  106105   -      -

*** End of Report ***
```

Vaso 1



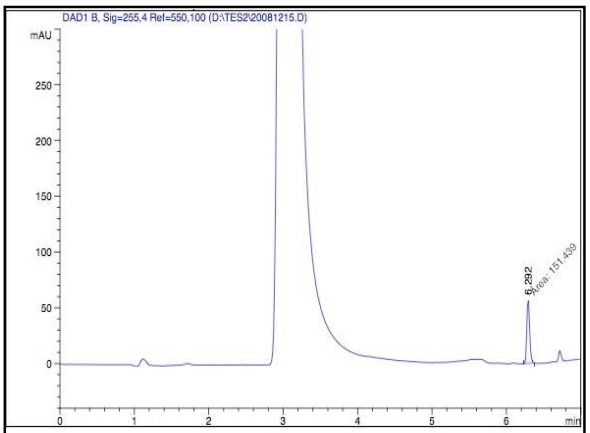

```
Area Percent Report with Performance

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=255,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height   Symm.  Width   Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]    [mAU]           [min]          ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.290   4.57  154.96912   62.46335  0.84  0.0442  111970   -      -

*** End of Report ***
```

Vaso 2



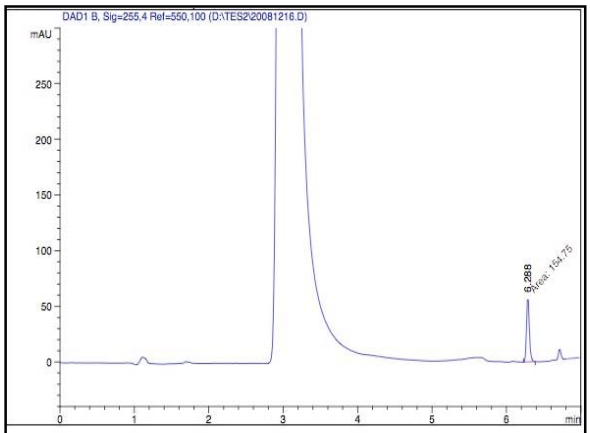

```
==================================================================
                Area Percent Report with Performance
==================================================================

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=255,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height   Symm.  Width   Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]    [mAU]           [min]          ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.291   4.57  155.43118   61.34159  0.82  0.0451  107896   -      -

==================================================================
                     *** End of Report ***
```

Vaso 3



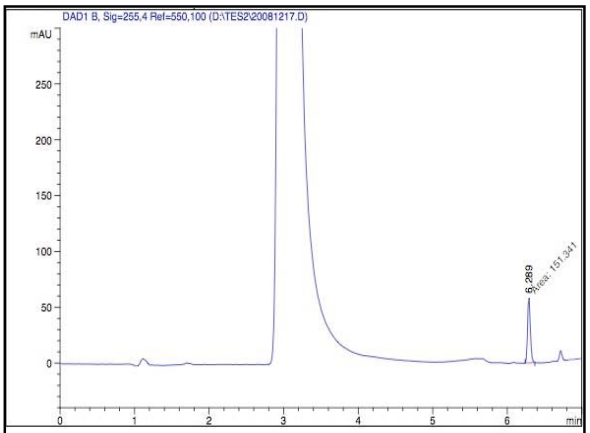

```
==================================================================
                Area Percent Report with Performance
==================================================================

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=255,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height   Symm.  Width   Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]    [mAU]           [min]          ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.292   4.57  151.43858   59.43293  0.87  0.0463  102106   -      -

==================================================================
                     *** End of Report ***
```

Vaso 4




```
==================================================================
                Area Percent Report with Performance
==================================================================

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=255,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height   Symm.  Width   Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]    [mAU]           [min]          ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.288   4.56  154.75037   60.43643  0.83  0.0463  101955   -      -

==================================================================
                     *** End of Report ***
```

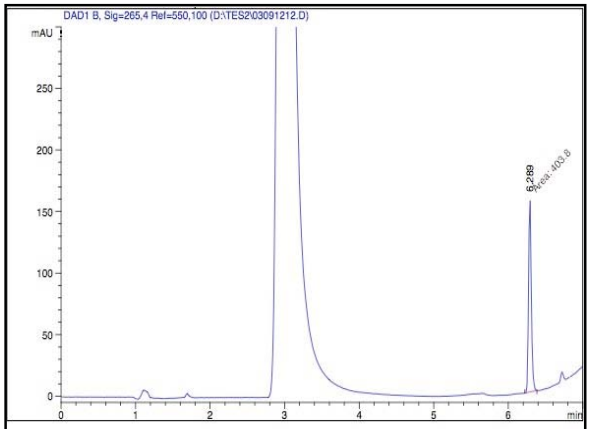
Vaso 5




```
==================================================================
                Area Percent Report with Performance
==================================================================

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=255,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height   Symm.  Width   Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]    [mAU]           [min]          ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.289   4.57  151.34068   60.41403  0.86  0.0457  104859   -      -

==================================================================
                     *** End of Report ***
```

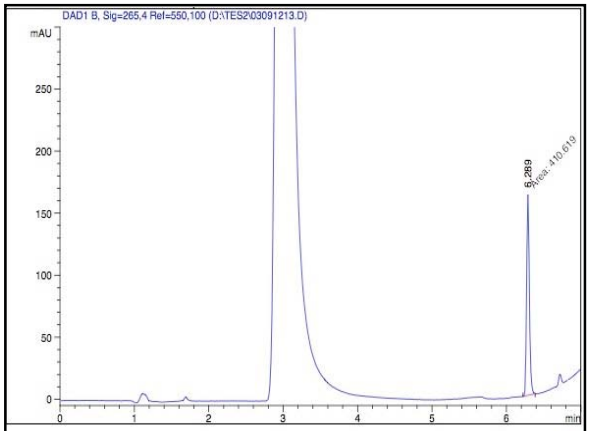
Vaso 6

Corrida analítica # 7



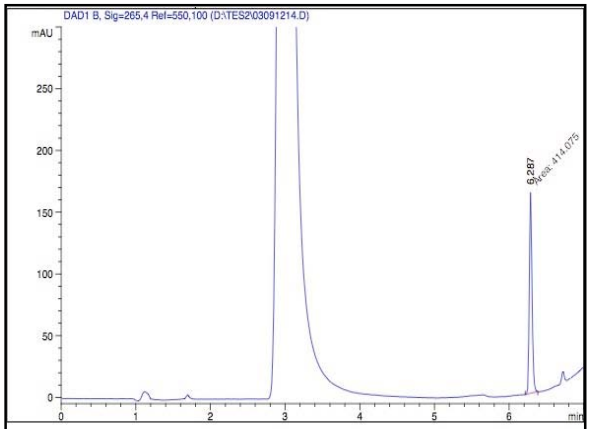

```
==================================================================
              Area Percent Report with Performance
==================================================================

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=265,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height   Symm.  Width   Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]     [mAU]           [min]          ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.289   4.57  403.79956  160.61761  0.87  0.0455  106064   -      -

==================================================================
                      *** End of Report ***
```

Vaso 1



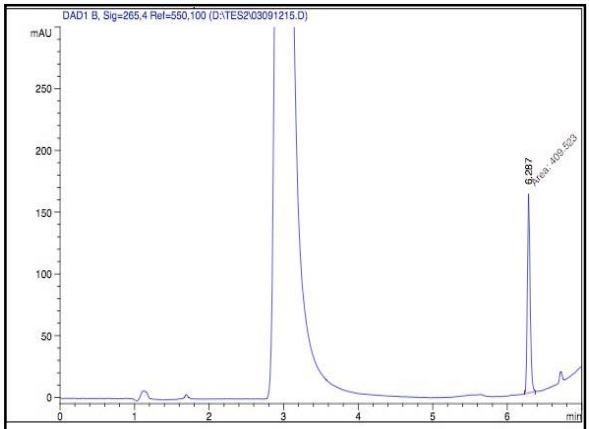

```
==================================================================
              Area Percent Report with Performance
==================================================================

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=265,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height   Symm.  Width   Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]     [mAU]           [min]          ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.289   4.56  410.61929  165.52682  0.85  0.0442  111932   -      -

==================================================================
                      *** End of Report ***
```

Vaso 2



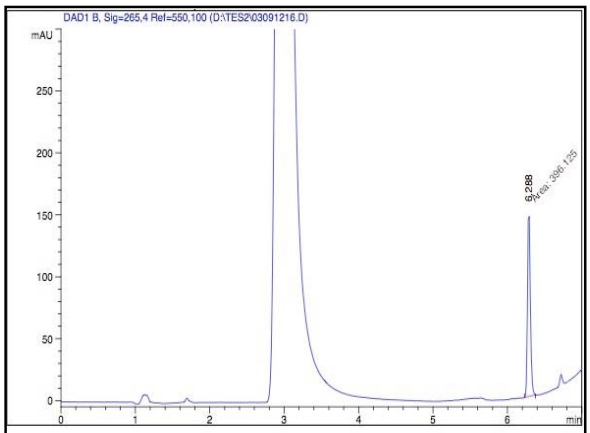

```
==================================================================
              Area Percent Report with Performance
==================================================================

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=265,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height   Symm.  Width   Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]     [mAU]           [min]          ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.287   4.56  414.07544  166.84274  0.86  0.0442  111875   -      -

==================================================================
                      *** End of Report ***
```

Vaso 3



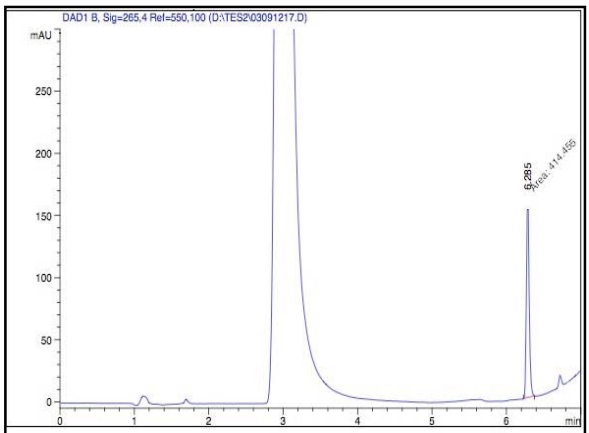

```
==================================================================
              Area Percent Report with Performance
==================================================================

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=265,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height   Symm.  Width   Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]     [mAU]           [min]          ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.287   4.56  409.52313  166.30653  0.83  0.0442  111862   -      -

==================================================================
                      *** End of Report ***
```

Vaso 4




```
Area Percent Report with Performance

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=265,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height    Symm.  Width    Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]    [mAU]            [min]           ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.288   4.56  396.12500  155.09549  0.84  0.0463  101955   -      -

*** End of Report ***
```

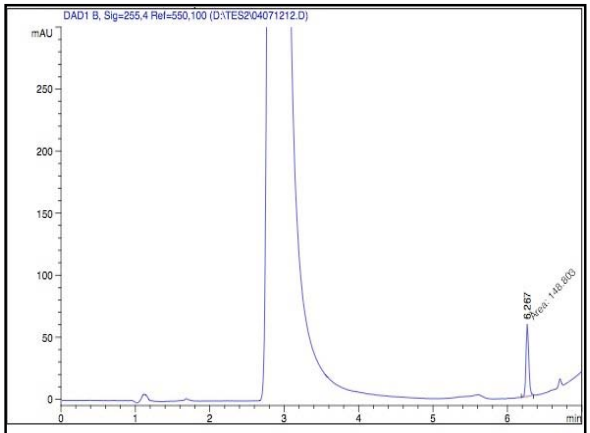
Vaso 5




```
Area Percent Report with Performance

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=265,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height    Symm.  Width    Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]    [mAU]            [min]           ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.285   4.56  414.45511  164.63565  0.83  0.0457  104730   -      -

*** End of Report ***
```

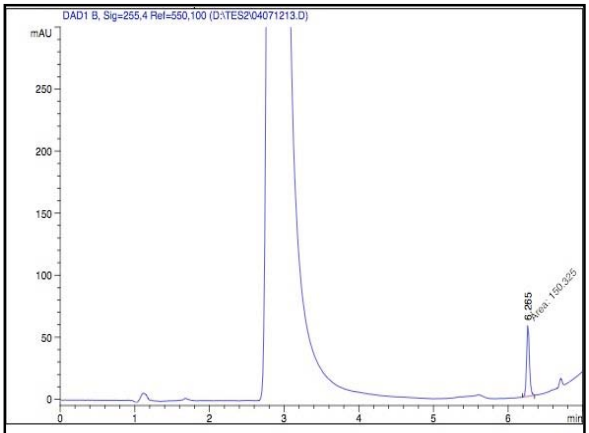
Vaso 6

Corrida analítica # 8



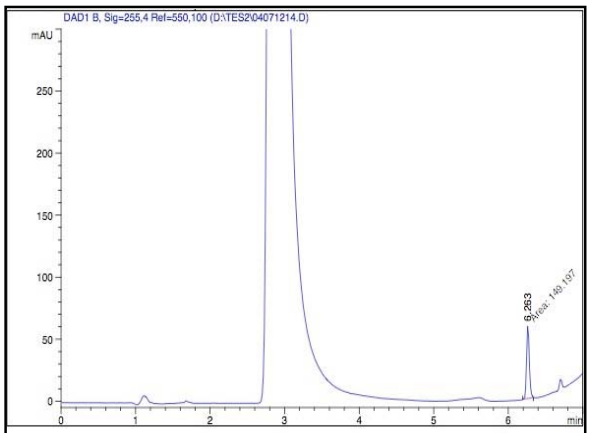

```
Area Percent Report with Performance

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=255,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height    Symm.  Width    Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]    [mAU]            [min]           ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.267   4.55  148.80251   59.65728  0.87  0.0442  111151   -      -

*** End of Report ***
```

Vaso 1



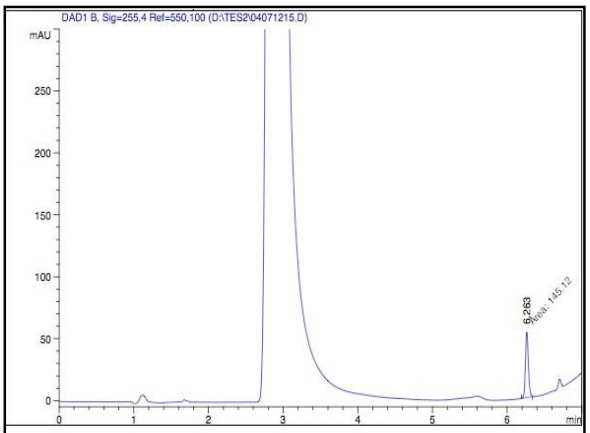

```
Area Percent Report with Performance

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=255,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height    Symm.  Width    Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]    [mAU]            [min]           ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.265   4.54  150.32471   59.42723  0.84  0.0451  106998   -      -

*** End of Report ***
```

Vaso 2



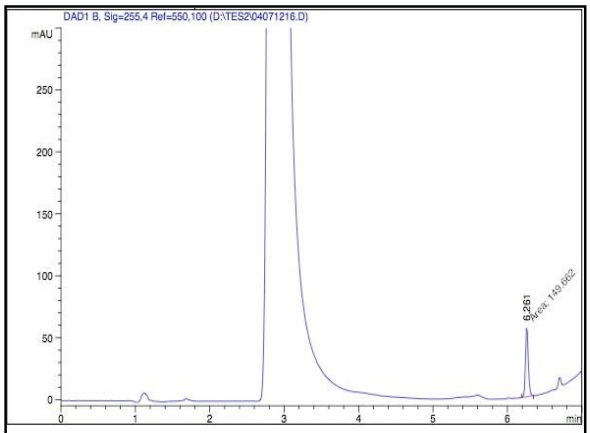

```
Area Percent Report with Performance

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=255,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height   Symm.  Width   Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]    [mAU]           [min]          ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.263   4.54  149.19727   60.40207  0.85  0.0442  111008   -      -

*** End of Report ***
```

Vaso 3



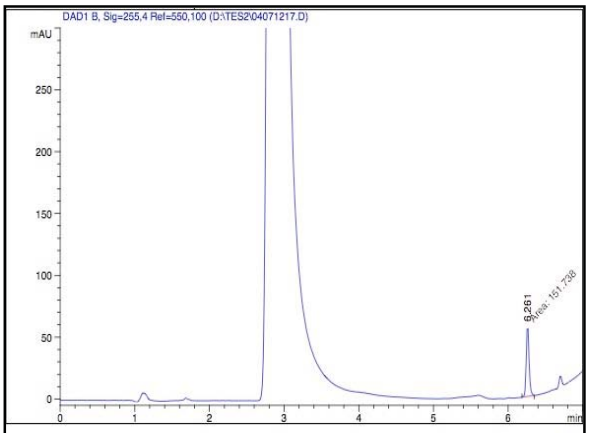

```
Area Percent Report with Performance

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=255,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height   Symm.  Width   Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]    [mAU]           [min]          ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.263   4.54  145.11975   56.84662  0.86  0.0463  101171   -      -

*** End of Report ***
```

Vaso 4




```
Area Percent Report with Performance

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=255,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height   Symm.  Width   Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]    [mAU]           [min]          ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.261   4.54  149.66235   58.97009  0.85  0.0457  103913   -      -

*** End of Report ***
```

Vaso 5




```
Area Percent Report with Performance

Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000

Signal 1: DAD1 B, Sig=255,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime    k'     Area      Height   Symm.  Width   Plates Resol Select
 [min]          [mAU*s]    [mAU]           [min]          ution ivity
-------|------|----------|----------|-----|-------|-------|-----|------
  6.261   4.54  151.73772   58.58246  0.86  0.0470   98369   -      -

*** End of Report ***
```

Vaso 6

ANEXO II

Ejemplo de aplicación de los algoritmos de cálculo presentados. Se utilizan los datos de la corrida analítica # 8.

En la parte de resultados generales se presentaron los valores obtenidos para adecuabilidad del sistema, factor de respuesta (FR) y % de Tramadol Clorhidrato disuelto o simplemente muestras.

En este anexo se presenta un ejemplo de cálculo para la obtención del factor de respuesta y del % de Tramadol Clorhidrato disuelto. Se excluye la adecuabilidad del sistema porque se trata únicamente de un promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

✤ Factor de respuesta (FR):

Es importante recordar que en cada corrida analítica se aplicaron 4 inyecciones de la solución de referencia 1 (SR1), y 4 inyecciones de la solución de referencia 2 (SR2), dando un total de 8 inyecciones involucradas. Para cada una de ellas se obtuvo un factor de respuesta *individual.* También se debe considerar que en este punto se hace uso del peso real del estándar de Tramadol Clorhidrato. Entonces tenemos que:

No. de pesada del estándar	Peso (mg)	Pureza (%)	Factor de % de pureza	Peso real o «W.R.» (mg)
1 (SR1)	11.0	99.7	0.997	10.97
2 (SR2)	11.1	99.7	0.997	11.07

Tabla 29. Muestra la obtención del dato del peso real del estándar de Tramadol Clorhidrato. Es un valor que se necesita para obtener el factor de respuesta.

El peso real se obtiene de multiplicar el peso en miligramos (segunda columna) por el factor de % de pureza (cuarta columna).

Posteriormente, para el cálculo del factor de respuesta, se hace uso de la ecuación # 10 (página 53):

$$FR_i\ P.A. = Área\ P.A. \times \frac{20\ mL}{W.R.S\mathrm{Ref}} \times \frac{200\ mL}{10\ mL}$$

Ecuación #10

Donde:

FR_i P.A. = Factor de Respuesta del principio activo en la *i-ésima* SR.

Área P.A. = Área del principio activo en el cromatograma

W.R. SRef = Peso real de la sustancia de referencia

20 mL = corresponde al primer aforo

200 mL = corresponde al segundo aforo

10 mL = corresponde a la única alícuota

En la tabla 30 se muestran las áreas obtenidas para las 8 inyecciones de soluciones de referencia en la corrida 8:

SR1		SR2	
No. inyección	Área	No. inyección	Área
8	154.35	10	150.48
9	155.55	11	150.08
18	155.47	20	154.87
19	154.67	21	153.96

Tabla 30. Se observan las áreas obtenidas para las 8 inyecciones de soluciones de referencia.

Para calcular el factor de respuesta, la ecuación número 10 nos exige el peso real del estándar (tabla 29) y las áreas del principio activo de soluciones de referencia (tabla 30).

Para el ejemplo de cálculo se utilizará el peso real del estándar utilizado en la preparación de la solución de referencia número 1, y a su vez, el área de la inyección número 8 (SR1). Entonces tenemos:

Datos:
peso real = 10.97 (tabla 29)
área = 154.35 (tabla 30)

Sustituyendo en la ecuación número 10 queda que:

$$FR_i\,P.A. = 154.35 \times \frac{20\,mL}{10.97\,mg} \times \frac{200\,mL}{10\,mL}$$

Entonces:

$$FR_i\,P.A. = 5628.1$$

Si se ejecuta el cálculo con las otras 7 áreas, se llega a la tabla 31:

SR1			SR2		
No. inyección	Área	FR	No. inyección	Área	FR
8	154.35	5628.1	10	150.48	5437.4
9	155.55	5671.8	11	150.08	5422.9
18	155.47	5668.9	20	154.87	5596.0
19	154.67	5639.3	21	153.96	5563.1
Promedio de FR = 5578.4					

Tabla 31. Muestra los factores de respuesta (FR) obtenidos para cada inyección de soluciones de referencia. Es importante recordar que el peso real es distinto para SR1 y SR2 (ver tabla 29). También se observa el promedio de los 8 factores.

De los 8 factores de respuesta obtenidos derivó la obtención del *factor de respuesta promedio*. Mismo que es utilizado en los cálculos correspondientes a las muestras.

✤ % de Tramadol Clorhidrato disuelto (muestras):

Una vez obtenido el factor de respuesta promedio se puede proceder a calcular la respuesta analítica, esto es, el % disuelto de Tramadol Clorhidrato en las muestras.

Primero habrá que obtener la cantidad de fármaco disuelto. Para ello se emplea la ecuación # 12 presentada en el protocolo experimental (página 54):

$$m_{Tra\,dis} = \frac{área_{muestra\,i}}{\overline{FR}_{P.A.}} \times \frac{V_{Med.Dis.} \times 20\,mL}{10\,mL}$$

Ecuación #12

Donde:

$m_{Tra\ dis}$ = cantidad disuelta de Tramadol HCl expresada en miligramos (mg)

$área_{muestra\ i}$ = área obtenida en el cromatograma de cada muestra (1 hasta 6)

$\overline{FR}_{P.A.}$ = Factor de Respuesta promedio del principio activo (ecuación 11)

$V_{Med.\ Dis.}$ = Volumen de medio de disolución empleado (890 mL ó 910 mL según la corrida analítica de la que se trate)

10 mL = alícuota de la muestra tomada del vaso del disolutor

20 mL = aforo al que se lleva la muestra

En la tabla 32 se muestran las áreas obtenidas para los 6 vasos de la corrida analítica número 8.

Vaso	Área	Vaso	Área
1	148.8	4	145.12
2	150.3	5	149.7
3	149.2	6	151.7

Tabla 32. Áreas obtenidas para el principio activo en los cromatogramas. Se trata de cada vaso de la octava corrida.

En virtud de que estamos ejemplificando cálculos con los datos de la octava corrida, es importante recordar que en la misma se utilizó un volumen de 890 mL. Para corroborarlo se puede consultar la matriz de tratamientos (tabla 12 en la página 47).

Si se utiliza el dato del vaso 1 de la corrida 8 queda que:

Datos:

Factor de respuesta promedio = 5578.4 (tabla 31)

Área $_{\text{vaso 1}}$ = 148.8 (tabla 32)

Volumen de medio de disolución = 890 mL

Sustituyendo en la ecuación no. 12:

$$m_{Tra\,dis} = \frac{148.8}{5578.4} \times \frac{890\,mL \times 20\,mL}{10\,mL}$$

Entonces:

$$m_{Tra\,dis} = 47.5\ mg$$

Finalmente, comparando contra la cantidad de principio activo indicada en el marbete se puede obtener el % disuelto de Tramadol Clorhidrato. Para ello se utiliza la ecuación no. 13 (página 55):

$$\%\,Tramadol\ HCl\ disuelto = \frac{m_{Tra\,dis}}{m_{marbete}} \times 100$$

Ecuación #13

Donde:

% Tramadol HCl disuelto = porcentaje de Tramadol HCl disuelto en la prueba

m $_{\text{Tra dis}}$ = masa en miligramos de Tramadol HCl disuelto (ecuación 12)

m $_{\text{marbete}}$ = masa en miligramos de Tramadol HCl declarada en marbete (50 mg según sección 3.1.1, página 39)

Sustituyendo en dicha ecuación con la cantidad de fármaco calculada para el vaso 1 de la corrida 8 tenemos:

$$\%\ Tramadol\ HCl\ disuelto = \frac{47.5\,mg}{50\,mg} \times 100$$

Entonces:

$$\%\ Tramadol\ HCl\ disuelto = 95.0\%$$

Si se ejecuta el cálculo con los otros 5 vasos se obtiene la tabla 33:

Vaso	Área	% Tra HCl dis	Vaso	Área	% Tra HCl dis
1	148.8	95.0	4	145.1	92.6
2	150.3	95.9	5	149.7	95.5
3	149.2	95.2	6	151.7	96.8
Promedio % Tra HCl disuelto = 95.2					

Tabla 33. Muestra los % de Tramadol Clorhidrato disuelto para los 6 vasos de la octava corrida analítica. También se observa el promedio de los mismos.

Los datos mostrados a modo de ejemplo pueden verificarse con los presentados en la parte de resultados generales. Para ello consultar la tabla 20 en la página 69, corrida número 8 (última fila).