



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE IMPUREZAS DE DIFERENTES PROVEEDORES
DE UN PRINCIPIO ACTIVO (TRAMADOL) MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE
LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA
QFB. MARCO ANTONIO HUERTA ORTIZ**

**TUTOR: M. EN C. JUAN MANUEL RODRÍGUEZ
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

CIUDAD DE MÉXICO, D.F. FEBRERO 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE IMPUREZAS DE DIFERENTES PROVEEDORES
DE UN PRINCIPIO ACTIVO (TRAMADOL) MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE
LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

QFB MARCO ANTONIO HUERTA ORTIZ



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme el privilegio de recibir una educación de calidad, formación cívica y humana y por permitirme continuar en la especialización de mis conocimientos.

Al Maestro en Ciencias Juan Manuel Rodríguez por su confianza, su conocimiento y tutoría en la realización del presente proyecto de investigación.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero para realizar la realización de estudios de Maestría (Número de becario 619428).

Al laboratorio de Tecnología farmacéutica de la Facultad de Química por su colaboración en el uso de su cámara de estabilidades.

A los miembros del Jurado: Dra. María del Pilar Cañizares Macías, Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero, Dra. Luz María Melgoza Contreras, Dra. Inés Fuentes Noriega y la M. en C. María del Socorro Alpizar Ramos por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y por sus valiosas aportaciones para la corrección y mejora del informe de proyecto.

A mi Flaquita hermosa Elizabeth Galeana Luna, su amor y comprensión fueron el empuje
correcto para finalizar este proyecto

A mi Madre Guadalupe Ortiz Cabrera, por su perseverancia, motivación y cariño brindado
para el cumplimiento de mis objetivos

A mi Padre José Antonio Huerta Landín, por su ejemplo de compromiso y dedicación

Lugar donde se Desarrolló el proyecto de Investigación

Laboratorio 112, Conjunto E, Departamento de Farmacia

Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México,

Ciudad de México

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	OBJETIVOS	2
3	ANTECEDENTES.....	2
3.1	Tramadol	2
3.2	Impurezas en productos genéricos	3
4	METODOLOGÍA.....	4
4.1	DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO	4
4.2	VALIDACIÓN DE METODOLOGÍA ANALITICA	7
4.2.1	Verificación de la adecuabilidad del sistema.....	7
4.2.2	Linealidad del sistema	8
4.2.3	Linealidad del método.....	8
4.2.4	Repetibilidad del Método	8
4.2.5	Exactitud.....	8
4.2.6	Precisión intermedia	8
4.2.7	Estabilidad de la muestra.....	9
4.2.8	Límite de detección y cuantificación	9
4.2.9	ROBUSTEZ.....	9
4.2.10	Especificidad	10
4.3	EVALUACIÓN DE MUESTRAS COMERCIALES	11
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
5.1	DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO	12
5.2	VALIDACIÓN DE LA MÉTODOLOGÍA ANALÍTICA	17
5.2.1	Verificación de la adecuabilidad del sistema.....	17
5.2.2	Linealidad del sistema	17
5.2.3	Linealidad del método.....	17
5.2.4	Repetibilidad del método de cuantificación de impurezas orgánicas.....	18
5.2.5	Exactitud del método de cuantificación de impurezas orgánicas	18
5.2.6	Precisión intermedia	19
5.2.7	Estabilidad de la muestra.....	19
5.2.8	Límite de Detección y cuantificación.....	20
5.2.9	Robustez	20
5.2.10	Especificidad	21
5.3	EVALUACIÓN DE MUESTRAS COMERCIALES	22
6	CONCLUSIONES	23
7	Bibliografía.....	24

Índice de abreviaturas

Abreviatura	Significado
ACN	Acetonitrilo
ANOVA	Análisis de la varianza
API	Por sus siglas en inglés “Ingrediente Activo Farmacéutico”
EMEA	Por sus siglas en Inglés “Agencia Europea de Medicamentos”
EP	Por sus siglas en inglés “Farmacopea Europea”
FDA	Por sus siglas en Inglés “Administración de Alimentos y Medicamentos”
HPLC	Por sus siglas en Inglés “Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia”
ICH	Por sus siglas en Inglés “Conferencia Internacional sobre Armonización de Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano”
LC	Límite de Cuantificación
LD	Límite de Detección
REF	Refrigeración
Rs	Resolución
TA	Temperatura ambiente
TFA	Ácido trifluoroacético
Tramadol HCl	Tramadol Clorhidrato
USP	Por sus siglas en inglés “Farmacopea de los Estados Unidos”
UV	Ultravioleta
λ	Longitud de Onda

1 INTRODUCCIÓN

Los fármacos han tenido un importante rol en el progreso de la civilización humana a través del alivio de enfermedades. La seguridad y eficacia de los principios activos son dos tópicos fundamentales en la terapia farmacológica. La seguridad de un fármaco se determina a través de su perfil tóxico-farmacológico y de los efectos adversos causados por las impurezas en la materia prima y en la forma de dosificación. La calidad y seguridad de los fármacos son aseguradas a través del monitoreo y el control de las impurezas. (Nageswara Rao, 2003)

Un perfil de impurezas se define mediante la descripción de las impurezas identificadas y no identificadas presentes en un fármaco. Se determina mediante el uso de diferentes técnicas analíticas que tienen el objetivo de detectar, identificar o elucidar la estructura y la cuantificación de las impurezas orgánicas e inorgánicas, así como los solventes residuales presentes en el principio activo. El perfil de impurezas depende de la ruta de síntesis y de otros factores presentes en la fabricación de un principio activo. Si las impurezas presentes en un principio activo son altamente tóxicas podrían contribuir al aumento en los efectos adversos del medicamento. El riesgo anterior puede ser minimizado al determinar y fijar límites estrictos de las impurezas presentes en el fármaco. (Holm & Elder , 2015)

Las organizaciones regulatorias (ICH, FDA, EMEA entre otras) han emitidos diversas directrices para el control de impurezas en fármacos y formas farmacéuticas. En México se requiere de especial atención en los requisitos de pureza e identificación de las impurezas en los principios activos farmacéuticos de origen extranjero.

Las impurezas pueden ser clasificadas en impurezas orgánicas, impurezas inorgánicas y solventes residuales. Las impurezas orgánicas constituyen el grupo más desafiante para su evaluación. Inicialmente, las impurezas orgánicas se detectan por métodos cromatográficos principalmente por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Las impurezas inorgánicas incluyen reactivos, ligandos, catalizadores, metales pesados, metales residuales, sales inorgánicas entre otros. Y en la actualidad, el análisis farmacéutico de impurezas en el fármaco y medicamentos es una de las actividades analíticas más importantes.

De tal modo, que los procedimientos analíticos deben ser capaces de separar todas las impurezas orgánicas provenientes del principio activo y posteriormente los métodos han de ser optimizados para cuantificarlas a muy bajas concentraciones en la forma farmacéutica. Tales métodos deberán ser validados demostrando su exactitud, precisión, especificidad, límite de detección y cuantificación, linealidad y robustez. Dichas metodologías analíticas pueden utilizarse en el desarrollo de un fármaco, en el control de calidad de medicamentos y como métodos indicativos de estabilidad. (ICH, 1994)

Se pueden identificar en general tres principales estadios durante el desarrollo de un método para determinar impurezas: a) Obtención de muestras adecuadas para evaluar la selectividad del método, b) Elección de un método y optimización de su selectividad y sensibilidad y finalmente, c) Validación del método. (Maggio , 2013).

En el pasado, la práctica común para desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos se realizaba desde una perspectiva de prueba y error. Este procedimiento consume mucho tiempo y puede resultar en un método poco robusto. En años recientes, se ha implementado el uso de planes de desarrollo más sistemáticos a través del uso de diseños de experimentos y herramientas estadísticas que permiten medir el efecto de cada factor en la separación cromatográfica y los resultados pueden ser usados para encontrar la mejor separación de las impurezas presentes en un fármaco o en un medicamento. (Monks, 2012).

2 OBJETIVOS

- Determinar el perfil de impurezas de productos genéricos conteniendo Clorhidrato de Tramadol.
- Definir un procedimiento para la evaluación del perfil de impurezas de productos genéricos tomando como fármaco modelo al Clorhidrato de Tramadol.
- Desarrollar y validar un método robusto para la determinación del perfil de impurezas orgánicas de diferentes productos genéricos conteniendo Tramadol.

3 ANTECEDENTES

3.1 TRAMADOL

El Clorhidrato de Tramadol (TRA); (1R,2R)-2-[(dimetilamino) metil]-1-(3-metoxifenil) ciclohexanol clorhidrato, es categorizado como un opioide débil y como analgésico de segunda etapa en el alivio del dolor moderado. (Suno, 2015).

El Tramadol tiene dos centros quirales en el anillo de ciclohexano, consecuentemente, existen diferentes estereoisómeros: (1R, 2R), (1S,2S), (1R,2S), y el (1S,2R). El producto comercial contiene la mezcla racémica (1:1) de los enantiómeros (1R,2R) y el (1S,2S). Los enantiómeros tienen los grupos hidroxil y dimetilaminometil en configuración *cis* y el grupo metoxifenil y el dimetilaminometil en configuración *trans*. (Expert Committee on Drug Dependence Thirty-sixth Meeting , 2014).

El Tramadol fue sintetizado en 1962 por Grünenthal GmbH en Alemania a través del acoplamiento del correspondiente ciclohexano con el Bromuro del 3-metoxifenilmagnesio en una reacción de Grignard. Más recientemente, la síntesis química del Tramadol ha sido descrita a través del mismo acoplamiento usando derivados de organolitio. (British Patente nº No. 997,399. Chem Abst 63: 9871f, 1965).

Se han identificado una serie de impurezas como compuestos relacionados de Tramadol (Apotex Inc). Las estructuras, nombres químicos, y clasificación de las impurezas se encuentran descritos en la sección de metodología. Todas las impurezas compendiadas son impurezas y productos de degradación potenciales durante la fabricación y el almacenamiento. Los métodos compendiados USP y EP describen los métodos para el control de las impurezas orgánicas en el principio activo y en el medicamento. (USP convention, 2000) Los niveles de impurezas no deben ser mayores al 0.2% y para impurezas desconocidas se aceptan valores no mayores al 0.1%. La completa identificación de cualquier impureza o producto presente por arriba de 0.1% es deseable para fármacos dosificados por debajo de 2g/día acorde a las guías ICH. (ICH. Q3A: Impurities in New Drug Substances, 2003).

Varios grupos de investigación han reportado la determinación de impurezas de Tramadol por cromatografía de líquidos con detección UV. La separación en general se realiza mediante cromatografía de fase reversa utilizando columnas C18 o C8 (Zecevic, 2006). Asimismo coinciden en el uso de fases móviles con aditivos que acidifiquen el medio, principalmente se enfatiza el uso de ácido trifluoroacético. Asimismo, se describen metodologías basadas en el acoplamiento con espectrometría de masas capaces de separar los enantiómeros del Tramadol. Cabe resaltar que no se describe una metodología de desarrollo del método analítico basada en el uso de diseño de experimentos.

3.2 IMPUREZAS EN PRODUCTOS GENÉRICOS

Las impurezas en productos genéricos constituyen un caso especial, cuando los medicamentos genéricos llegan al mercado, generalmente es claro a partir de los datos recogidos por el innovador si la toxicidad del ingrediente farmacéutico activo (API) y sus metabolitos o la toxicidad de las impurezas conocidas constituyen un problema importante. (Kovaleski, 59(2007)).

Del mismo modo, por distintas razones la ruta sintética del fármaco y la formulación del producto genérico puede ser diferente al producto innovador. Consecuentemente el producto genérico puede contener impurezas que no son cubiertas por la monografía en las farmacopeas o por la literatura científica.

Las fuentes y rutas de formación de impurezas en genéricos son las mismas que aquellas en el producto de referencia: Materiales de inicio, subproductos y disolventes residuales de la síntesis el API; degradantes formados durante el proceso y almacenamiento a largo plazo; contaminantes del empaque y otros productos farmacéuticos fabricados en la misma instalación. Las impurezas podrían formarse por el impacto al calor, luz y oxidantes (incluido aire) en el producto farmacéutico y podría acelerarse su formación por la presencia de impurezas metálicas, cambios en el pH de la formulación, las interacciones con los componentes del embalaje, excipientes y otros ingredientes.

El proceso de calificación de las impurezas se detalla en las guías ICH y FDA (US Food and Drug Administration, 2005). El método de calificación más común realizado para un producto genérico consiste en que las impurezas de interés se observen a un nivel comparable en el producto de patente dentro de su período de caducidad. La comparación anterior, también puede llevarse a cabo usando productos similares comercializados por fabricantes genéricos. En cualquier caso, este ejercicio demuestra que el nivel de impureza observada ha sido considerado seguro por la FDA. En ausencia de estos datos, la calificación de una impureza que no se observa en otras formulaciones comercializadas generalmente implicaría estudios toxicológicos realizados por el fabricante previsto.

En la mayoría de los análisis de pureza de las farmacopeas se desconoce la estructura de las impurezas potenciales, por lo que la cuantificación se expresa en términos del compuesto principal. Como consecuencia, la cuantificación de la impureza puede ser sobrevalorada o subestimada si la actividad espectrofotométrica de la impureza es diferente al principio activo.

En la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 11 ed. se establece un método para el control de impurezas en materia prima de Clorhidrato de Tramadol, en esta monografía se plantea el control de las impurezas orgánicas mediante un método por HPLC y la cuantificación de las impurezas se expresa en términos del compuesto principal. Asimismo no establece un método para el control de la calidad en la forma farmacéutica. De tal modo, que la presente investigación busca establecer una metodología donde se cuantifique con mayor confianza (en términos de exactitud, selectividad y precisión) la cantidad de impurezas presentes en un muestreo de productos genéricos de venta en el mercado mexicano y a su vez establecer las variables que controlan el proceso de separación de las impurezas y productos relacionados de Tramadol.

4 METODOLOGÍA

4.1 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

El desarrollo y la validación del método analítico se realizó en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Agilent Technologies Series 1050, equipado con inyector automático modelo 79855, detector de arreglo de diodos modelo G1306AX y bomba cuaternaria 79852AX acoplado a un equipo de cómputo. El control del equipo y el procesamiento de los datos se realizaron con el software Chemstations.

Estándares de referencia

El estudio se centró en las impurezas reportadas por la USP: Impureza A de Tramadol ((1RS, 2SR)-2-[(dimetilamino) metil]-1-(3-metoxifenil) ciclohexanol, Impureza B ([2-(3-metoxifenil)-ciclohex-1-enil]-N,N dimethylmetilamina), Impureza C ((1RS)-[2-(3-metoxifenil) ciclohex-2-enil]-N,Ndimethylmetilamina) e impureza D ((1RS,2RS)-2-[(dimetilamino)metil]-1-(3-hidroxifenil) ciclohexanol) adquiridas a LGC Standars y con una pureza reportada mayor a >99%.

Se utilizó como estándar secundario el Tramadol HCl con una pureza reportada mayor a 99%

Preparación de soluciones

Solución “Madre” de impurezas y Tramadol HCl.- Con los estándares mencionados se prepararon soluciones “Madre” de las impurezas A, B, C y D y de Tramadol HCl a una concentración de 100 µg/mL utilizando una mezcla de Metanol: Agua (20:80) como diluyente. La solución fue almacenada en congelación.

Solución Estándar.- La solución estándar se preparó a partir de diluciones de la solución “Madre” hasta alcanzar una concentración de 5 µg/mL para cada impureza incluyendo el Tramadol HCl. Esta solución se preparó en cada día de análisis y por duplicado.

Solución de resolución.- La solución de resolución se utilizó para evaluar la adecuabilidad del sistema cromatográfico en cada día de análisis y se preparó a partir del estándar secundario de Tramadol HCl y de las soluciones “Madre” de impurezas. La solución de resolución tiene una concentración de 2.5 mg/mL de Tramadol HCl y de 5 µg/mL de cada una de las impurezas.

Solución Muestra.- Se obtuvo a partir del análisis de las muestras comerciales de cápsulas de Tramadol HCl (50 mg), de cada uno de los lotes se obtuvo el peso promedio del contenido de 10 cápsulas, de cada cápsula se extrajo su contenido y se mezcló hasta homogeneidad.

Para cada muestra se pesó el equivalente a 50 mg de Tramadol HCl del polvo obtenido y se transfirió a un matraz volumétrico de 20 mL, se añadió 10 mL de solución diluyente y se agitó las muestras en ultrasonido durante 10 minutos. Posteriormente se agitó las muestras manualmente durante 5 minutos. Después se esperó a que las soluciones alcanzaran la temperatura ambiente y se llevó a volumen con solución diluyente. Se mezcló nuevamente las muestras y se dejó sedimentar durante 15 minutos. Las soluciones se filtraron a través de filtros Millex-HV Durapore de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0.45 µm, eliminando los primeros mililitros del filtrado y recibiendo el resto en viales.

Solución Placebo.- Se preparó para evaluar el efecto de la matriz farmacéutica y se utiliza en los diversos parámetros de validación del método. Se preparó a partir de una mezcla de los medicamentos evaluados. La mezcla se obtuvo del contenido de 10 cápsulas (Dosis 50 mg) de cada uno de los lotes de medicamento evaluado, posteriormente se homogenizó el contenido total de las cápsulas. A partir de este pool se pesó la

cantidad equivalente a 50 mg de Tramadol HCl, el polvo resultante se trató usando el mismo procedimiento de preparación de la solución muestra.

Solución Placebo cargada.- Se preparó para evaluar el % de recobro del método analítico, la solución se obtenía como lo indicado en el numeral (Solución placebo) pero adicionalmente se agregaron alícuotas de las soluciones de impurezas hasta alcanzar una concentración final de 5 µg/mL de cada una de las impurezas.

Determinación de los parámetros instrumentales

Estrategia de desarrollo del método para la determinación del perfil de impurezas orgánicas en Tramadol HCl por cromatografía de líquidos de alta resolución

El desarrollo del método instrumental siguió los principios de QbD (Quality by Design) y se dividió en 5 pasos, 1) Definición de las metas del método 2) Ensayo de riesgos 3) Diseño de experimentos con pasos de “screening” y optimización 4) Diseño del espacio que incluye construcción del modelo, verificación de puntos de trabajo y selección, seguida de la validación del método con una estrategia basada en el control del método a través del conocimiento ganado durante la validación.

Definición de las metas del método

La meta primaria del desarrollo del método indicativo de estabilidad es en general separar las impurezas del principio activo con una resolución mayor a 1.5 ($R_s \geq 1.5$). De la ecuación general de resolución $R_s = 0.25 \cdot N^{1/2} \cdot [(\alpha - 1) / \alpha] \cdot (k / 1 + k)$ se concluye que el parámetro de selectividad (α) tiene el mayor impacto sobre la resolución. La selectividad puede modificarse al cambiar la composición de la fase móvil, la química de la columna cromatográfica y la temperatura. Otros factores como la necesidad de un tiempo corto de análisis también se consideraron para el desarrollo del método.

Ensayo del riesgo

En una etapa temprana se identificaron los parámetros críticos que intervienen en la separación de los analitos mediante experimentos previos y la revisión bibliográfica de los métodos compendiados (Cai & Jianwei, 1999) (Zecevic, 2006). Los factores que pudieran afectar la extracción de los componentes de interés de la preparación de la muestra como también los ajustes en el análisis instrumental. Los espectros UV del Tramadol y de sus impurezas fueron evaluados para seleccionar la longitud de onda de detección donde la respuesta es máxima. También se identificaron los parámetros críticos de la fase estacionaria, el tiempo de gradiente y la composición de los eluentes.

Diseño de experimentos

Definición de los parámetros críticos

Como resultado del análisis de riesgo, se seleccionaron los siguientes parámetros como críticos en el desarrollo del método: composición de fase móvil (%ACN) y cantidad de ácido trifluoroacético (%TFA), volumen de inyección, tipo de fase estacionaria y posteriormente también se optimizó el tiempo de gradiente. Asimismo se estudiaron las propiedades fisicoquímicas de las impurezas disponibles como solubilidad, Log P y pka con el software Chemicalize® desarrollado por ChemAxon.

Definición de los factores

Para el presente proyecto se ha propuesto dos niveles para cada factor experimental, asignándoles un valor máximo y un valor mínimo con base al análisis de riesgo del método analítico. El rango de variación de cada uno de los factores se seleccionó con base en conocimientos previos y experimentos preliminares con el objetivo de definir un dominio experimental adecuado.

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

Factor/nivel	%ACN (V/V)	Polaridad columna	% de TFA (V/V)	Volumen de inyección (µL)
Nivel bajo (-1)	20	C8	0.2	25
Nivel alto (+1)	30	C18	0.3	50

En la tabla siguiente se describen las columnas cromatográficas que se utilizaron en el estudio:

#	Marca	Fase estacionaria	Tamaño de partícula	Longitud y Diámetro	%Carbono
1	Purospher Merck	C18	5 µm	12.5 cm *4.0 cm	18.0%
2	Agilent Zorbax	C8	3.5 µm	15 cm*4.6 cm	10.0%
3	Agilent Eclipse XDB	C8	5 µm	25.0 cm*4.6 cm	7.6%

Elaboración del diseño

Con el objetivo de obtener información con un mínimo número de experimentos, se propone aplicar un diseño de experimentos de "screening" para investigar los efectos de los parámetros críticos del proceso sobre los atributos de calidad del método en un espacio definido.

En esta fase, la respuesta considerada como crucial fue la resolución entre la impureza A y el Tramadol (Par crítico: Conjunto de analitos con la menor resolución). Cada uno de los parámetros críticos puede estudiarse en dos o tres niveles (2^n , 3^n) en diseños factoriales completos o fraccionados.

Se utilizaron los siguientes diseños experimentales creados con el Software Statgraphics® Centurion XV para determinar las condiciones del método:

Corrida	% ACN	% TFA	Volumen de inyección	Fase estacionaria
1	20	0.3	75	C8
2	30	0.3	75	C18
3	20	0.2	75	C18
4	20	0.3	50	C18
5	30	0.2	50	C18
6	30	0.3	50	C8
7	30	0.2	75	C8
8	20	0.2	50	C8

Tabla 4.- Diseño 2 (2⁴-1 media fracción) Aleatorizado, ambas columnas C8 (15 y 25 cm), para evaluar el efecto de los factores sobre la resolución de la impureza A respecto a Tramadol

Corrida	% ACN	% TFA	Volumen de inyección	Fase estacionaria
1	20	0.3	75	C8
2	30	0.3	75	C8-2
3	20	0.2	75	C8-2
4	20	0.3	50	C8-2
5	30	0.2	50	C8-2
6	30	0.3	50	C8
7	30	0.2	75	C8
8	20	0.2	50	C8

Cada diseño consta de 8 corridas analíticas, en cada una de las cuales se establece un conjunto particular de condiciones de los cuatro factores. Cada corrida analítica se ejecutó bajo las condiciones establecidas en el diseño correspondiente y en el orden establecido. Cada corrida se realizó de forma independiente, manteniendo constantes las siguientes condiciones instrumentales establecidas para el método: Flujo 1 mL/min, temperatura ambiente (22-28°C), detector UV 271 nm.

Para cada corrida analítica se determinó la adecuabilidad del sistema y se analizó por duplicado la solución de referencia y la solución de resolución. Una vez obtenido el cromatograma se registró la resolución crítica entre la impureza A y el Tramadol HCl ya que constituyeron los analitos con la separación cromatográfica más comprometida.

Fase de optimización

Durante esta fase se realizó el análisis de los diseños de "Screening" con ayuda del software Statgraphics® y se continuó con la optimización de la respuesta analítica donde los datos experimentales son analizados con el software, el cual modela y predice la separación óptima en el tiempo mínimo de análisis.

Diseño del espacio

Con el estudio de los diseños experimentales se modeló la zona de estudio y se predijeron las condiciones óptimas para la separación de las impurezas. Se realizó una comprobación de los puntos seleccionados y se estableció el uso de un gradiente de elución para la separación de dos impurezas de baja polaridad (Impureza D y B).

4.2 VALIDACIÓN DE METODOLOGÍA ANALITICA

Para la validación del sistema cromatográfico se siguieron criterios de las guías de la conferencia internacional de Armonización (ICH) "Validation of Analytical Procedures. Text and Methodology Q2 (R1) (2005). Los datos se analizaron con los programas Statgraphics Centurion XV y Microsoft Excel 2013. Los parámetros de desempeño evaluados se muestran a continuación:

4.2.1 Verificación de la adecuabilidad del sistema

La adecuabilidad del sistema es un parámetro que se evalúa al inicio de cada corrida analítica. Es una parte integral de muchos procedimientos y está basado en el concepto de verificación de los equipos debidos a

sus componentes electrónicos, así como la respuesta de reproducibilidad y resolución de la muestra en un sistema de análisis, con lo cual se indica si un sistema es adecuado para la ejecución de un análisis.

Se realizaron 6 inyecciones de la solución estándar de las impurezas de Tramadol y se registraron los datos de tiempo de retención, área, altura, ancho de pico, factor de capacidad, factor de coe, eficiencia y ruido para cada uno de los analitos presentes en la solución.

4.2.2 Linealidad del sistema

Para evaluar la linealidad del sistema de las impurezas de Tramadol HCl, se prepararon por triplicado tres curvas de calibración con cinco niveles de concentración (2, 3, 4, 5 y 6 $\mu\text{g/mL}$) del Tramadol HCl y las impurezas A, B, C y D. Cada curva se preparó con diluciones independientes de una solución stock 100 $\mu\text{g/mL}$ de los analitos. Las muestras fueron analizadas con el método cromatográfico y con la respuesta correspondiente de cada nivel de concentración se realizó un análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados.

4.2.3 Linealidad del método

Dentro de este parámetro se evaluaron muestras de placebo y muestras de materia prima de Tramadol HCl adicionadas con las impurezas A, B, C y D.

Para su análisis se preparó de manera independiente 5 niveles de concentración (2, 3, 4, 5 y 6 $\mu\text{g/mL}$) de muestras de placebo adicionadas de impurezas A, B, C y D. Cada curva se preparó adicionando al placebo diluciones independientes de una solución madre de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Las muestras fueron analizadas con el método cromatográfico. Con los datos obtenidos, se graficó la relación de la cantidad adicionada vs la cantidad recuperada y se realizó un análisis de varianza de la regresión lineal.

4.2.4 Repetibilidad del Método

La precisión expresa la proximidad de los resultados obtenidos de una serie de determinaciones derivadas de múltiples análisis de una muestra homogénea (Magnussom & Örnemark, 2° ed. 2014). Para evaluar este parámetro se preparó por sextuplicado una muestra de placebo (matriz farmacéutica) adicionado con las impurezas A, B, C y D a una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$. Una vez realizado el análisis se registró la respuesta analítica y se reportó el coeficiente de variación para cada nivel de concentración y el intervalo de confianza con un 95% de confianza.

4.2.5 Exactitud

La exactitud de un método analítico es la proximidad de los resultados obtenidos por el método en estudio en relación al valor verdadero o valor de referencia (Magnussom & Örnemark, 2° ed. 2014). Este parámetro se evalúa a través de nueve determinaciones que contemplen el intervalo lineal del método de análisis, considerando 3 concentraciones (2, 5 y 6 $\mu\text{g/mL}$) con tres muestras de placebo adicionado de impurezas por cada nivel, cada muestra se preparó de forma independiente y siguiendo las condiciones analíticas del método.

Con los datos obtenidos se determinó la exactitud del método mediante el cálculo de la concentración recuperada y se evaluó la desviación absoluta respecto al valor nominal de las concentraciones evaluadas.

4.2.6 Precisión intermedia

Con este parámetro se verifica la concordancia de los resultados obtenidos por el método de un mismo laboratorio. La precisión se estimó del análisis independiente de tres muestras de placebo adicionadas con

las impurezas A, B, C y D a una concentración de 5 µg/mL preparadas por dos analistas en dos días diferentes.

Los datos arrojados se analizaron con análisis de varianza (ANOVA) para verificar la influencia de los analistas y días.

4.2.7 Estabilidad de la muestra

Para asegurar la capacidad de la muestra analítica para permanecer inalterada a lo largo de un lapso de tiempo bajo condiciones específicas, se evaluó la estabilidad de tres soluciones muestra de placebo adicionado con las impurezas A, B, C y D a una concentración de 5 µg/mL, las muestras se reanalizaban después de ser almacenadas durante 24 y 48 horas a temperatura ambiente y en refrigeración (2-8°C).

Se cuantificó la respuesta de las soluciones muestra para cada impureza y con él % de contenido recuperado se estimó la diferencia respecto a las condiciones de almacenaje del análisis inicial.

4.2.8 Límite de detección y cuantificación

La evaluación teórica de estos límites se obtuvo con base en los parámetros de la linealidad del sistema y las siguientes ecuaciones (Colegio Nacional de Químicos Farmaceuticos Biólogos de México, 2002):

$$LC= 10 \cdot S_{b_0}/m \dots \dots \dots (\text{Límite de Cuantificación})$$

$$LD= 3 \cdot S_{b_0}/m \dots \dots \dots (\text{Límite de Detección})$$

Donde: S_{b_0} : Desviación estándar de la ordenada al origen de la regresión lineal, m: pendiente de la recta en la regresión lineal

4.2.9 ROBUSTEZ

La robustez de un procedimiento analítico, es una medida de su capacidad para permanecer inalterado por pequeñas variaciones experimentales en los parámetros del método, estos factores pueden ser evaluados en conjunto a través de modelos estadísticos como el diseño de Plackett-Burman.

Diseño de Plackett-Burman.

El Diseño experimental Plackett-Burman para ocho corridas analíticas, permite evaluar desde 3 factores a 7 factores, las variables de estudio se eligen estratégicamente dependiendo de los factores que pudieran influir de manera importante en la respuesta del método de análisis y por ende en el resultado. Las variables que se seleccionaron para evaluar su efecto en el método de análisis son los siguientes: proporción del disolvente orgánico de la fase móvil (% ACN), velocidad de flujo (mL/min), longitud de onda para la detección (nm), volumen de inyección (µL) y proporción de ácido trifluoroacético (% TFA). Se asignar las letras A, C, D, F y G para cada factor de prueba y se asignar las letras B y E a dos factores denominados factores falsos, los cuales serán utilizados para estimar el error experimental; en la tabla 5 y 6 se describen los factores y la matriz de tratamiento de las corridas a realizar.

Tabla 5.- Factores y niveles estudiados para la evaluación de la Robustez				
Letra	Factor	Nivel		
		Bajo (-)	Normal	Alto (+)
A	% de ACN	18	20	22
B	Falso	-	-	-
C	Flujo	0.8 mL/min	1 mL/min	1.2 mL/min
D	λ	268 nm	271 nm	274 nm
E	Falso	-	-	-
F	Volumen de inyección	45 μ L	50 μ L	55 μ L
G	%TFA	0.25%	0.3%	0.35

Tabla 6.- Matriz de Tratamiento del Diseño insaturado para evaluar la Robustez							
Corrida	% ACN	Falso	Flujo	λ	Falso	Vol. Inyec.	%TFA
1	22	-	0.8	274	-	55	0.35
2	22	+	0.8	268	+	45	0.35
3	22	+	1.2	268	-	55	0.25
4	18	+	1.2	274	-	45	0.35
5	22	-	1.2	274	+	45	0.25
6	18	+	0.8	274	+	55	0.25
7	18	-	1.2	268	+	55	0.35
8	18	-	0.8	268	-	45	0.25

Se ejecutaron las ocho corridas analíticas bajo el orden establecido, siendo esencial que las corridas sean independientes. Se prepararon dos muestras de placebo adicionado con impurezas A, B, C y D con una concentración de 5 μ g/mL. Se mantuvieron constantes todas las otras condiciones establecidas en el método.

Una vez obtenidos los análisis se reportó la resolución crítica para cada corrida. Se analizó el diseño experimental para evaluar si existe un efecto significativo que pueda alterar el resultado del método.

4.2.10 Especificidad

Es la habilidad para medir exactamente un analito o una mezcla de analitos en presencia de otros componentes tales como impurezas, productos de degradación o componentes de la matriz. Para determinar la identidad del pico y la selectividad del método entre compuestos de estructuras similares que pudieran estar presentes en la muestra, se analizaron las siguientes soluciones: solución blanco, soluciones en las que se encuentra el Tramadol y las impurezas A, B, C y D de manera individual, solución muestra y soluciones donde se encuentran los analitos adicionados de manera deliberada.

Del mismo modo con el fin de demostrar que la respuesta no es afectada por la presencia de las impurezas u otros productos de degradación la muestra se analizó después de ser analizada bajo las siguientes condiciones de estrés:

Tabla 7.- Condiciones de estrés para la evaluación de la especificidad	
Condición de estrés	Tiempo de exposición
Fotosensibilidad (Luz UV-C)	5 días de exposición
Fotosensibilidad (Luz UV-A)	5 días de exposición
Oxidación (H ₂ O ₂ 1%)	24 horas
Termoestabilidad (calor 105°C)	24 horas
Hidrolisis ácida (HCl 0.5 N)	24 horas
Hidrolisis básica (NaOH 0.5 N)	24 horas
Hidrolisis básica (Reflujo 1.0 N)	3 horas

Las muestras resultantes se analizaron conforme al método de análisis y una vez obtenidos los cromatogramas, se observaron en busca de interferencias en los tiempos de retención del Tramadol HCl y las impurezas A, B, C y D.

4.3 EVALUACIÓN DE MUESTRAS COMERCIALES

Para la evaluación del perfil de impurezas orgánicas en cápsulas con Tramadol HCl se procedió a someter a un estudio de estabilidad 6 muestras de productos con Tramadol HCl de venta en la Ciudad de México. Los productos fueron sometidos a condiciones de estrés de estabilidad acelerada (40°C / 75% humedad relativa) y resguardados en una cámara climática marca Binder durante 3 meses. El perfil de impurezas orgánicas fue monitoreado al inicio, al primer mes y a los tres meses de almacenamiento utilizando el método desarrollado que se validó previamente. Se reportaron la presencia de impurezas conocidas y la presencia de otras impurezas no identificadas.

Los productos evaluados se identificaron de la siguiente manera:

Tabla 8.- Identificación de Productos para el estudio de estabilidad			
Producto	Inicio	Mes 1	Mes 3
01	00014075	01014075	03014075
02	00024075	01024075	03024075
03	00034075	01034075	03034075
04	00044075	01044075	03044075
05	00054075	01054075	03054075
06	00064075	01064075	03064075

Se evaluó el cumplimiento del límite de impurezas y si hubo un aumento significativo en la presencia de impurezas a lo largo del tiempo de estabilidad.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

Considerando la información científica disponible y los métodos analíticos reportados previamente se seleccionaron los factores instrumentales iniciales y sus rangos de estudio. Previamente se ha reportado a la resolución del Tramadol HCl y su impureza A como crítica en el análisis de su perfil de impurezas orgánicas y la principal estrategia para su separación fue el uso de un par iónico como el ácido Trifluoroacético en condiciones de fase reversa para alcanzar una resolución óptima. Dado lo anterior, en una primera etapa de desarrollo se encaminaron los esfuerzos para establecer las condiciones para la separación de los analitos mencionados.

En la tabla 9 se resumen las propiedades fisicoquímicas del Tramadol y de las impurezas A, B, C y D del Tramadol calculadas con el software Chemicalize, El Tramadol y su impureza A son diastereoisómeros entre sí, tienen propiedades fisicoquímicas semejantes y su diferencia radica en la manera en que sus grupos están orientados entre sí.

Las impurezas analizadas tienen una amina terciaria en su estructura por lo que actúan como bases en solución y a pH ácido entre 1.5-2.0 todos los analitos se encuentran completamente ionizados, lo anterior sustenta el uso de un par iónico para mejorar y/o modificar la selectividad de los analitos durante una separación cromatográfica en fase reversa. (Cai & Jianwei, 1999)

	Tramadol	Impureza A	Impureza B	Impureza C	Impureza D
Log P	2.45	2.45	3.34	3.30	1.72
pka	9.23 y 13.80	9.23 y 13.80	8.90	9.73	8.97 y 9.62

En la figura 1 se observan los espectros UV de las impurezas señaladas y el Tramadol, las impurezas A, B, D y Tramadol presentan un máximo común entre 270 y 280 nm. Por otro lado, la impureza C presenta una menor absorción a dicha longitud pero suficiente para poder presentar una señal. Por lo que se decide establecer una lectura del análisis a 271 nm cercana al mínimo registrado en la impureza C.

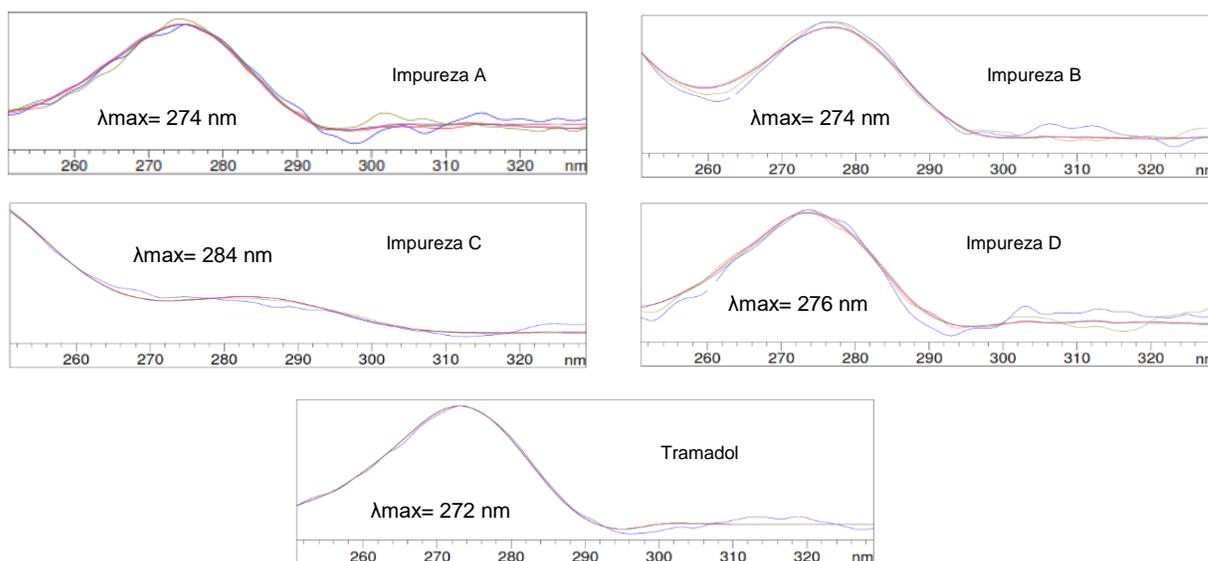


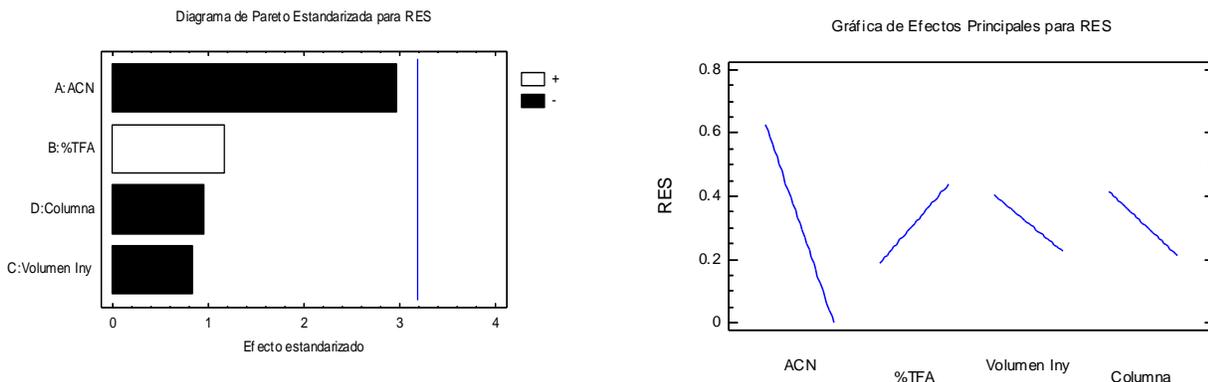
Figura 1. Espectros de absorción en la región ultravioleta visible de los analitos estudiados

A continuación se muestran los resultados del diseño 1 (Tabla 10) de los experimentos de selección para la separación de impureza A y Tramadol, en dichos experimentos los valores de resolución más altos para el par crítico se encuentran en la columna 2 con empaque C8 marca Agilent Zorbax de 15 cm*4.6 mm y tamaño de partícula de 3.2 µm.

Corrida	% ACN	% TFA	Vol inyección	Fase	Resolución par crítico
1	20	0.3	75	C8	0.9
2	30	0.3	75	C18	0.0
3	20	0.2	75	C18	0.0
4	20	0.3	50	C18	0.85
5	30	0.2	50	C18	0.0
6	30	0.3	50	C8	0.0
7	30	0.2	75	C8	0.0
8	20	0.2	50	C8	0.76

Los efectos estimados de cada uno de los factores sobre la resolución de la impureza A y el Tramadol se observan en la figura 2, ninguno de los factores tiene un efecto de significativo sobre la respuesta, pero en particular la disminución en la proporción de disolvente orgánico y el volumen de inyección mejora la resolución crítica, el aumento en la cantidad de TFA tiene un efecto positivo en la resolución. Un efecto no evaluado es el efecto en el tamaño de partícula pero que indudablemente repercute en la separación de los analitos, a menor tamaño de partícula de la fase estacionaria la resolución de las señales mejora dado el aumento en la eficiencia de la columna.

Figura 2.- Diagrama de Pareto y efectos estimados para el Diseño 1

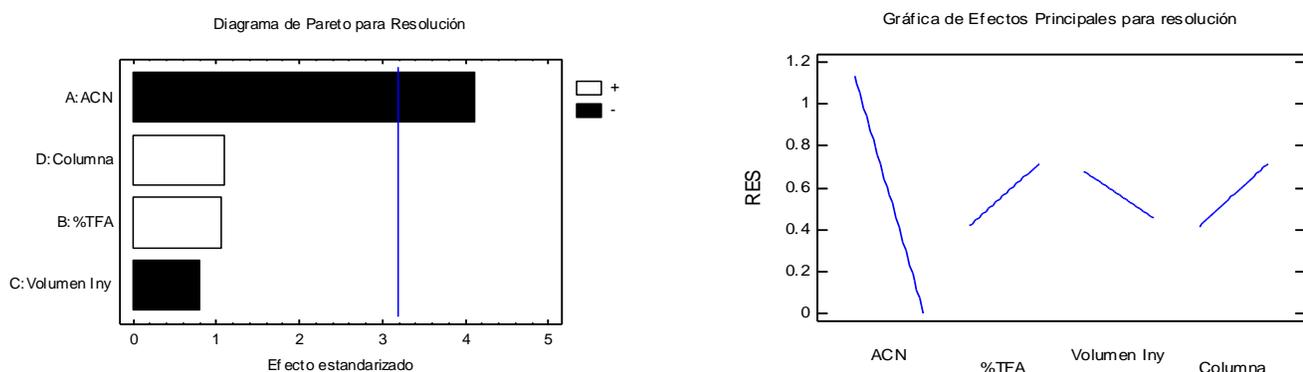


Para el Diseño 2 descartamos el uso de la columna Purosepher con empaque C18 ya que brindó los valores más bajos de resolución y procedimos a evaluar el uso de una columna de mayor longitud y conservando el empaque C8 (Agilent Eclipse XDB). Los resultados se pueden resumir en la tabla 11 y en la figura 3. Bajo estas condiciones de análisis se obtuvo un valor máximo de resolución con la columna C8-2 (Agilent Eclipse XDB 5µm, 250 mm*4.6 mm), por un lado el aumento en la longitud de la columna está relacionado con el aumento en la fase estacionaria en la columna, a mayor longitud de columna hay un aumento en el número de platos teóricos, los analitos pasan más tiempo en la columna lo que puede favorecer el aumento en la resolución.

Tabla 11.- Diseño 2 (2⁴-1 media fracción) Aleatorizado, ambas columnas c8 (15 y 25 cm)

Corrida	% ACN	% TFA	Vol de inyección	Fase estacionaria	Resolución
1	20	0.3	75	C8	0.9
2	30	0.3	75	C8-2	0.0
3	20	0.2	75	C8-2	0.92
4	20	0.3	50	C8-2	1.95
5	30	0.2	50	C8-2	0.0
6	30	0.3	50	C8	0.0
7	30	0.2	75	C8	0.0
8	20	0.2	50	C8	0.76

Figura 3.- Diagrama de Pareto y efectos estimados para el Diseño 2



Asimismo, en el diagrama de Pareto (figura 3) nos permite estimar que el factor A (% Acetonitrilo) tiene el principal efecto sobre la resolución del Tramadol respecto a la impureza A, dicho efecto tiene un efecto negativo sobre la respuesta. También nos permite confirmar que a volúmenes bajos de inyección, mayor cantidad de %TFA la resolución mejora considerablemente. El resto de las impurezas no presentaron problemas de resolución respecto al Tramadol y entre ellas.

Con base en los resultados se seleccionó la columna 3 para el método de análisis de las impurezas de Tramadol HCl ya que indica los mejores valores de resolución. En la tabla 12 se muestra el análisis después de colapsar el factor columna a un diseño factorial completo 2³. Con dichos resultados se evaluó la significancia estadística a través de un análisis de varianza (ANOVA), dicho análisis prueba cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, el factor %ACN tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%. Por otro lado el factor %TFA y volumen de inyección tiene un valor p muy cercano a 0.05 por lo que a pesar de que no tiene significancia estadística es factor que tiene un probable efecto sobre la resolución.

Tabla 12.- Diseño 3 (3 factores) se selecciona la columna C8 250 mm * 46 mm 5 um

Corrida	% ACN	% TFA	Vol. inyección	Resolución
1	30	0.3	50	0.9
2	30	0.3	75	0.0
3	20	0.2	50	1.5
4	20	0.2	75	0.92
5	20	0.3	50	1.95
6	30	0.2	50	0.0

Tabla 13.- Análisis de Varianza para Resolución crítica					
Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor P
%ACN	2.448	1	2.448	64.23	0.0152
%TFA	0.472	1	0.472	12.39	0.0721
Volumen de inyección	0.525	1	0.525	13.78	0.0655
Error Total	0.076	2	0.038		

El programa Statgraphics® nos permite estimar la ecuación de regresión que se ajusta a los datos al excluir las variables no significativas:

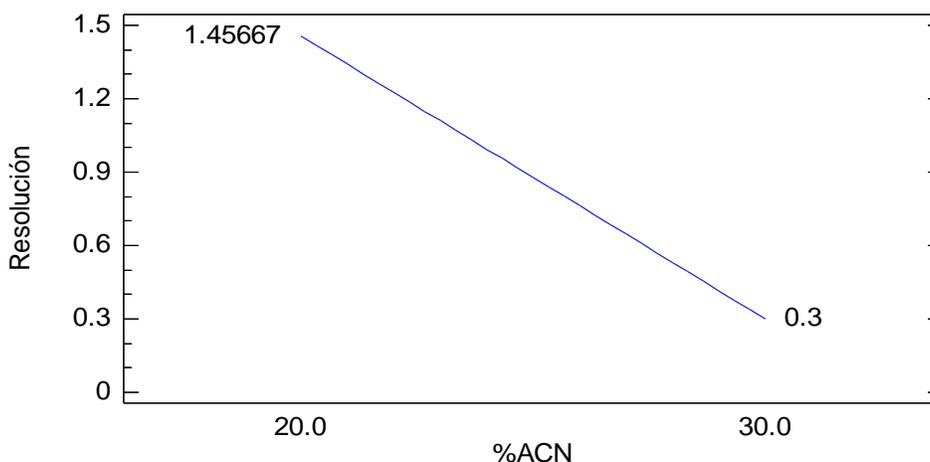
$$\text{Resolución} = 3.77 - 0.115667 \cdot \%ACN$$

Con dicha ecuación podemos estimar el espacio de diseño y modelar el comportamiento de la resolución crítica bajo diferentes combinaciones de los factores experimentales y predecir el valor de resolución en diferentes niveles de los factores estudiados. En la figura 4 se representa el efecto del ACN sobre la región experimental, modela el comportamiento de la resolución. Este gráfico nos permite localizar con las coordenadas del punto con la respuesta deseada, la zona de mayor resolución se localiza a valores de %ACN de 20%. Cabe aclarar que el gráfico solo considera las variables no significativas

De los análisis anteriores se resume que las mejores condiciones de separación de la impureza A y de Tramadol son las siguientes: Volumen de inyección de 50 uL, %ACN: 20%, %TFA: 0.3% y columna C8 de 4.6mm*250 mm (5um).

Figura 4.- Gráfico del efecto de ACN sobre la resolución de la impureza A y Tramadol HCl

Gráfica del efecto del ACN sobre la Resolución



OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN DE LAS IMPUREZAS B y C

Una vez obtenida la resolución requerida entre la impureza A y el Tramadol se procedió a verificar la separación de los demás analitos, y se encontró que las impurezas B y C tiene una mayor afinidad por la fase estacionaria y se retienen más tiempo en la columna lo que provoca un ensanchamiento de la señal al momento de salir y un tiempo de corrida mayor. De tal modo que se propone una elución por gradiente para las impurezas B y C.

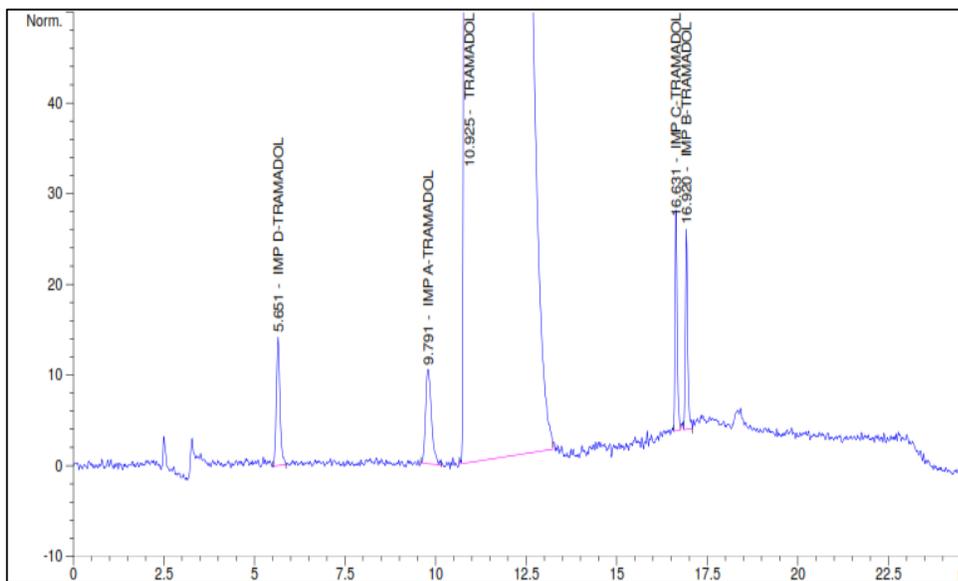
El gradiente tiene el objetivo de disminuir el tiempo de elución y mejorar la calidad de la señal cromatográfica sin comprometer la separación de las impurezas B y C. El programa de gradiente que se propone consistió en una primera etapa isocrática con las proporciones de fase acuosa y orgánica obtenidas durante el diseño de experimentos, en una segunda etapa se aumenta la proporción de fase orgánica de manera gradual hasta alcanzar una proporción donde los analitos eluyan en un tiempo considerable y con la resolución óptima, una vez eluidos todos los analitos se programó un tiempo de acondicionamiento para volver a las condiciones de elución iniciales.

Se experimentaron con distintas condiciones de tiempo de gradiente y proporciones de fases, la tabla 14 muestra las condiciones finales del método de análisis de cuantificación de las impurezas de Tramadol

Tabla 14.- Condiciones instrumentales finales del método	
Fase móvil	Línea A: Acetonitrilo Línea B: Acido Trifluoroacético 0.3%
Gradiente	Tiempo (min).....%TFA 0.3%.....%ACN 0.0-9.0 min.....80.....20 9.0-14.0 min.....50.....50 14.0-20.0 min.....50.....50 20.0-25.0 min.....80.....20
Columna	Agilent Eclipse XDB-C8 (25 mm*4.6mm) 5 µm
Temperatura	Ambiente (22-28°C)
Flujo	1.0 ml/min
Longitud de onda	271 nm
Volumen de inyección	50 µL

CROMATOGRAMA TIPO

Figura 5.- Solución de resolución Tramadol HCl 2.5 mg/mL, Impurezas A, B, C, y D 5 µg/mL



En la figura 5 se muestra un cromatograma de la solución de resolución donde se muestran las señales correspondientes a las impurezas y el Tramadol HCl.

5.2 VALIDACIÓN DE LA MÉTODOLÓGÍA ANALÍTICA

A continuación, se resumen los resultados de los diferentes parámetros de desempeño evaluados durante la validación del método de cuantificación de impurezas orgánicas de Tramadol.

5.2.1 Verificación de la adecuabilidad del sistema

Analito	Tiempo de retención	Área	Simetría	Resolución
Impureza D	5.6 (0.2)	94.2 (1.5)	0.8 (5.8)	N/A
Impureza A	9.8 (0.2)	114.0 (1.6)	0.8 (7.7)	30.9 (2.3)
Tramadol	10.9 (0.2)	39954.6 (0.1)	0.1 (5.9)	2.1 (0.7)
Impureza C	16.6 (0.0)	97.8 (1.2)	0.7 (2.2)	11.5 (1.1)
Impureza B	16.9 (0.0)	84.5 (1.4)	0.7 (2.3)	4.5 (0.5)

Para la resolución entre la impureza A y el Tramadol se observa un valor de resolución de 2.1, para obtener una separación a nivel de línea base se buscan valores mayores a 1.5. También se obtiene un valor óptimo de variación en la repetibilidad de las inyecciones respecto al área y a los tiempos de retención de las señales.

5.2.2 Linealidad del sistema

Analito	Intervalo de concentración (µg/mL)	Pendiente AU*S*mL/g (IC _{α=0.05%})	Intercepto mAU*s (IC _{α=0.05%})	Error típico Sx/y	R ²	Valor-P
Impureza D	2.00-6.00	16.72(±0.53)	1.21(±2.26)	1.35	0.997	<0.05
Impureza A	2.00-6.00	15.88(±0.79)	-1.92(±3.34)	2.00	0.994	<0.05
Tramadol	2.00-6.00	15.93(±0.90)	-3.68(±3.82)	2.28	0.992	<0.05
Impureza C	2.00-6.00	18.65(±0.39)	-1.26(±1.67)	1.00	0.999	<0.05
Impureza B	2.00-6.00	16.02(±0.46)	-0.76(±1.95)	1.17	0.998	<0.05

En todos los casos se obtiene un R² mayor a 0.98, lo que indica una fuerte relación lineal entre la concentración de los analitos y la intensidad de la respuesta obtenida, los valores de P<0.05 también indican una relación lineal estadísticamente significativa.

5.2.3 Linealidad del método

Analito	Intervalo de concentración (µg/mL)	Pendiente µg rec/µg adi (IC _{α=0.05%})	Intercepto (µg)	Error típico Sx/y	R ²	Valor-P
Impureza D	2.00-6.00	0.991(±0.02)	0.070(±0.10)	0.06	0.997	<0.05
Impureza A	2.00-6.00	0.974(±0.03)	0.126(±0.14)	0.08	0.994	<0.05
Impureza C	2.00-6.00	0.991(±0.04)	0.035(±0.18)	0.11	0.999	<0.05
Impureza B	2.00-6.00	1.050(±0.03)	-0.186(±0.11)	0.07	0.998	<0.05

En la tabla 17 se resumen los valores estimados del intercepto y la pendiente de la ecuación que describe ambos modelos y sus respectivos intervalos de confianza. Los datos confirman una tendencia lineal entre el porcentaje recuperado y el porcentaje adicionado. Los coeficientes de determinación indican que el 99% de los datos pueden explicarse a través del modelo lineal.

Por otro lado, el método no presenta efectos de matriz ya que el intercepto pasa estadísticamente a través de cero y el intervalo de confianza de la pendiente para cada uno de las impurezas es cercano a 1.0.

5.2.4 Repetibilidad del método de cuantificación de impurezas orgánicas

Tabla 18.- Resultados Repetibilidad del Método de cuantificación de impurezas orgánicas en Tramadol				
# Muestra	% Recuperado			
	Impureza A	Impureza B	Impureza C	Impureza D
1	100.4	101.0	102.3	101.0
2	99.5	99.9	101.1	101.8
3	102.5	102.6	102.9	100.7
4	102.1	99.9	101.4	100.3
5	99.2	98.2	100.6	102.2
6	98.4	102.4	100.3	101.9
Promedio	100.34	100.65	101.44	101.32
%C.V.	1.62	1.68	0.98	0.75
Límite inferior	98.8	99.1	100.5	100.6
Límite superior	101.9	102.2	102.4	102.0

En la tabla 18 se resumen los valores de los coeficientes de variación calculados para el análisis de las soluciones de placebo cargado de las impurezas de Tramadol. En todos los casos, el coeficiente obtenido es menor al 2%, dicha variación está dentro de los valores óptimos indicados para métodos cromatográficos. Respecto a la exactitud se puede observar que el % de recobro obtenido se encuentra dentro del 2% de variación, en todos los casos se puede estimar la cantidad de impurezas presente en las muestras con precisión.

5.2.5 Exactitud del método de cuantificación de impurezas orgánicas

Tabla 19.- Resultados de exactitud del método de cuantificación de impurezas orgánicas en Tramadol				
Concentración Teórica (µg/mL)	% Recuperado			
	Impureza A	Impureza B	Impureza C	Impureza D
2	101.6	101.8	99.7	98.9
	99.8	97.3	100.7	102.9
	101.7	101.0	100.3	101.6
5	101.6	97.8	100.5	102.4
	100.4	100.4	102.0	100.8
	100.0	103.5	99.2	100.5
6	100.0	99.7	98.1	97.0
	98.1	101.4	99.2	101.6
	99.4	102.8	98.5	102.7
Promedio	100.29	100.63	99.81	100.93
%C.V.	1.19	2.07	1.20	1.90
Límite inferior	99.37	99.03	98.89	99.46
Límite superior	101.21	102.23	100.74	102.40

A tres diferentes niveles de la concentración de las impurezas se evaluó el recobro en la matriz farmacéutica. Los resultados se muestran en la tabla 19, al ser los recobros obtenidos son cercanos al 100%, se demuestra exactitud para todas las impurezas. Asimismo no se garantiza totalmente la exactitud ya que los estándares de calibración no fueron totalmente independientes de la muestra ya que no se contaron con muestras estandarizadas certificadas.

5.2.6 Precisión intermedia

Tabla 20.- Resultados Precisión intermedia								
	% Recuperado							
	Impureza D		Impureza A		Impureza C		Impureza B	
	ANALISTA							
	1	2	1	2	1	2	1	2
Día 1	99.30	97.20	98.05	100.10	98.97	98.89	102.04	99.52
	98.10	102.54	98.16	100.43	98.82	99.80	99.30	101.82
	97.39	99.84	98.02	98.33	100.04	98.51	100.86	101.56
Día 2	98.34	97.58	98.47	97.37	99.40	98.42	101.32	98.46
	99.36	98.18	100.70	98.68	98.22	99.07	99.89	100.97
	98.73	97.24	99.49	98.26	100.83	98.83	99.23	101.69
Promedio	98.65		98.84		99.15		100.56	
%C.V.	1.52		1.09		0.76		1.21	

Para evaluar el efecto que tiene el cambio de analista y de días se evaluó un análisis de precisión intermedia. Los resultados de recobro se indican en la tabla 20 y muestra una variación menor al 2% entre los recobros obtenidos. Para evaluar el efecto estadístico se realizó un análisis de ANOVA de dos vías (Tabla 21) los resultados indican que no existe un efecto significativamente estadístico por el cambio de días y cambio de analistas.

Tabla 21.- Resultados de análisis de varianza para precisión intermedia ($\alpha=0.05$) valor-P				
Analito	Valor P		Efecto estadístico	
	Analista	Día	Analista	Día
Impureza D	0.8104	0.3930	Sin efecto	Sin efecto
Impureza A	0.6289	0.8868	Sin efecto	Sin efecto
Impureza C	0.9262	0.3382	Sin efecto	Sin efecto
Impureza B	0.4487	0.7645	Sin efecto	Sin efecto

5.2.7 Estabilidad de la muestra

Tabla 22.- Resultados de estabilidad de la muestra, % Recuperado					
Condición	% Recuperado	Impureza D	Impureza A	Impureza C	Impureza B
Inicio	% \pm s	101.26 \pm 0.62	100.36 \pm 1.21	100.45 \pm 1.13	100.44 \pm 1.06
24 horas (TA)	% \pm s	100.08 \pm 1.18	100.74 \pm 1.03	101.35 \pm 1.26	100.78 \pm 0.48
	di	1.18	0.52	0.09	0.49
24 horas (REF)	% \pm s	100.48 \pm 0.73	99.68 \pm 0.46	100.45 \pm 1.37	100.20 \pm 0.56
	di	0.78	1.58	0.82	1.06
48 horas (TA)	% \pm s	98.55 \pm 0.48	99.67 \pm 0.97	100.04 \pm 0.60	102.15 \pm 1.08
	di	2.71	1.59	1.22	0.88
48 horas (REF)	% \pm s	100.47 \pm 0.96	99.44 \pm 1.33	100.74 \pm 1.27	101.90 \pm 0.52
	di	0.79	1.82	0.52	0.64

En la tabla 22 se presentaron los resultados obtenidos durante la evaluación de la estabilidad de la muestra de las impurezas de Tramadol, las muestras son estables por 48 h a temperatura de refrigeración (8°C), todas las impurezas muestran una diferencia absoluta entre el inicio de la estabilidad y a las 48 h menor a 2%. A temperatura ambiente solo la impureza D muestra una disminución mayor a 2% de concentración por lo que se recomienda mantener en refrigeración las muestras previo a su análisis.

5.2.8 Límite de Detección y cuantificación

Impureza	Sb0	LD (µg/mL)	LC (µg/mL)
D	1.048	0.21	0.63
A	1.547	0.32	0.97
C	0.775	0.14	0.42
B	0.903	0.19	0.56

En la tabla 23 se muestran los límites de detección y cuantificación estimados a partir de los resultados de linealidad del método. Se muestran las concentraciones mínimas a la cual pueden cuantificarse las impurezas de Tramadol con la precisión adecuada (Límite de Cuantificación) y la concentración a la que es posible detectarlas (límite de Detección). En todos los casos se pueden cuantificar impurezas en los productos de Tramadol presentes en una cantidad inferiores a 0.05% respecto a la concentración que alcanza la solución muestra (2.5 mg/mL).

5.2.9 Robustez

La prueba de robustez nos arroja que el factor %ACN tiene un efecto significativo sobre la resolución por lo que es un factor que debe controlarse ya que una desviación en la proporción de este componente de la fase móvil puede altera la resolución entre la impureza A y el Tramadol. Respecto a los factores Flujo, longitud de onda, volumen de inyección y %TFA pueden ser variados dentro del rango evaluado que se indica en la tabla.

Corrida	1	2	3	4	5	6	7	8
Resolución crítica	1.80	2.00	0.68	1.62	1.04	1.45	1.03	2.01

	Impureza D	Impureza A	Impureza C	Impureza B	Resolución Crítica	F tablas	Decisión
Factor	9.27	0.56	0.05	0.35	1.84	18.51	Sin efecto
% ACN	2.18	0.09	0.18	0.03	44.71	18.51	Hay efecto
Flujo	0.96	7.21	2.52	0.10	0.16	18.51	Sin efecto
λ	2.38	4.76	7.55	2.56	15.72	18.51	Sin efecto
Vol inyección	10.52	0.00	4.40	4.84	8.83	18.51	Sin efecto
% TFA	9.27	0.56	0.05	0.35	1.84	18.51	Sin efecto

5.2.10 Especificidad

Tabla 26.- Resultados % Normalizado para la especificidad del método						
	Tramadol	%IMP D	%IMP A	%IMP C	%IMP B	% IMP DESCONOCIDA
Blanco	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Principio activo	99.88	0.00	0.12	0.00	0.00	0.00
Muestra	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Principio activo (oxidación)	99.56	0.07	0.17	0.00	0.00	0.21
Muestra (oxidación)	99.58	0.08	0.06	0.00	0.00	0.28
Principio activo (oxidación reflujo)	99.62	0.16	0.09	0.00	0.00	0.14
Principio activo (calor)	99.85	0.03	0.07	0.03	0.03	0.00
Muestra (calor)	98.05	0.11	0.00	0.11	0.03	1.70
Principio activo (Hidrólisis ácida)	99.68	0.03	0.27	0.02	0.00	0.00
Muestra (Hidrólisis ácida)	99.54	0.03	0.34	0.02	0.00	0.07
Principio activo (Hidrólisis Básica)	99.92	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00
Muestra (Hidrólisis Básica))	99.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.96
Principio activo (Reflujo, Hidrolisis Básica)	98.27	0.00	0.07	0.00	0.00	1.66
Principio activo (Luz UV-A)	99.90	0.03	0.07	0.00	0.00	0.00
Muestra (Luz UV- A)	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Principio activo (Luz UV-C)	99.78	0.00	0.08	0.00	0.00	0.14
Muestra (luz UV-C)	99.88	0.00	0.00	0.00	0.00	0.12

Respecto a la especificidad, el método analítico es capaz de identificar las sustancias de interés ya que las señales obtenidas durante las degradaciones no muestran interferencia con la señal de Tramadol ni con otras sustancias presentes.

La tabla 26 muestra los porcentajes de degradación obtenidos durante de la degradación de las muestras de principio activo. En general se observa un porcentaje de degradación inferior al 2%, la máxima cantidad de degradación se muestra durante la condición de reflujo en medio alcalino. También se pueden detectar la formación de otras impurezas desconocidas diferentes a las reportadas en las farmacopeas principales.

5.3 EVALUACIÓN DE MUESTRAS COMERCIALES

Tabla 27.- Formula general de cálculo del % de impureza en los productos de Tramadol

$\%IMPUREZA = \frac{A_{imp}}{A_{std}} \times [Est\acute{a}ndar] \times FD \times \frac{PP}{PM} \times \frac{100}{Dosis}$	
A imp	Área de la impureza correspondiente, para impureza desconocida se utiliza el área del estándar de Tramadol
[Estándar]	Concentración del estándar de la impureza correspondiente (mg/mL)
FD	Factor de Dilución
Dosis	50 mg
PP	Peso promedio del contenido de las cápsulas
PM	Peso de la muestra utilizado en el análisis

La tabla 27 muestra la fórmula para estimar el porcentaje de impureza presente en los productos evaluados con Tramadol HCl. La fórmula estima el % de Impureza conocida presente a partir de un estándar preparado con la misma impureza.

El % de impurezas desconocidas se estima relacionando el área de la impureza desconocida con un estándar de Tramadol preparado a la concentración límite de 5 µg/mL.

Tabla 28.- Resultados del % de Impureza en los productos de Tramadol sometidos a estabilidad acelerada

Producto	Mes	% Imp D	% Imp A	% Imp C	% Imp B	% Imp Desconocida	Total
01	Inicial	<LC	0.042	<LC	<LC	0.021	0.063
01	01	<LC	0.047	<LC	<LC	0.016	0.064
01	03	<LC	0.039	<LC	<LC	<LC	0.039
02	Inicial	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC
02	01	<LC	<LC	<LC	<LC	0.041	0.041
02	03	<LC	<LC	<LC	<LC	0.016	0.016
03	Inicial	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC
03	01	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC
03	03	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC
04	Inicial	<LC	<LC	<LC	<LC	0.028	0.028
04	01	<LC	<LC	<LC	<LC	<LD	<LC
04	03	<LC	<LC	<LC	<LC	0.022	<LC
05	Inicial	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC
05	01	<LC	<LC	<LC	<LC	0.019	0.019
05	03	<LC	<LC	<LC	<LC	0.017	0.017
06	Inicial	0.038	<LC	<LC	<LC	<LC	0.038
06	01	0.035	<LC	<LC	<LC	<LC	0.035
06	03	0.038	<LC	<LC	<LC	<LC	0.038

En la tabla 28 se resumen los resultados obtenidos después de someter a estabilidad acelerada 6 lotes de cápsulas de Tramadol de 50 mg. El lote 1 corresponde al producto innovador (Tradol ®) y el resto de los productos corresponden a lotes de productos genéricos de la misma presentación de venta en farmacias de la Ciudad de México. Los resultados obtenidos muestran que los productos de Tramadol son estables y que muestran valores límites de impurezas inferiores a los establecidos en guías internacionales y en las farmacopeas revisadas.

El producto innovador 01 muestra una presencia inicial de impureza A, el resto de los productos no muestran formación ni presencia de dicha impureza. Asimismo, se muestra la formación de impurezas desconocidas que no superan el límite de impurezas permitido (no más de 0.2%). Todos los productos genéricos muestran una cantidad controlada de impurezas inferior al producto innovador por lo que se demuestra que los niveles de impurezas observados han sido considerados seguros por lo que el consumo y administración de los medicamentos estudiados se considera seguro.

6 CONCLUSIONES

Se determinó el perfil de impurezas orgánicas del Tramadol como materia prima, del mismo modo se evaluó la presencia de impurezas orgánicas conocidas y desconocidas en productos genéricos conteniendo clorhidrato de Tramadol.

El método demostró ser exacto, preciso, selectivo para cuantificar cada una de las impurezas orgánicas y que las muestras son estables por 48 horas en refrigeración. Asimismo, el método desarrollado demostró ser robusto a pequeñas alteraciones de las condiciones.

Por otro lado, los medicamentos genéricos demostraron ser estables durante el periodo de prueba, demostrando que no existe un potencial problema de seguridad dado el nivel de impurezas presente.

Se calificó y se demostró que el nivel de impurezas de los medicamentos genéricos se encuentra a un nivel comparable con el producto de patente dentro de la caducidad.

El procedimiento presentado resultó útil para demostrar la seguridad de los medicamentos respecto al nivel de impurezas y la presente metodología puede ser escalado a diferentes formas farmacéuticas e implementar su uso en diferentes fármacos.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Apotex Inc. (s.f.). Tramadol Hydrochloride. En *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology, Volume 38*. Toronto.
- Cai , B., & Jianwei, L. (1999). Evaluation of trifluoroacetic acid as an ion-pair reagent in the separation of small ionizable molecules by reverse-phase liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 249-258.
- Colegio Nacional de Químicos Farmaceuticos Biólogos de México. (2002). *Guía de Validación de Métodos Analíticos*. México.
- Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2014). *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, undécima edición*. México.
- Expert Committee on Drug Dependence Thirty-sixth Meeting . (2014). *Tramadol Update Review Report*. Geneva: World Health Organization.
- Final Product Form and Impurities. (2012). En *Practical Process Research and Development* (págs. 365-395). Elsevier Inc.
- GmbH, C. G. (1965). *British Patente nº No. 997,399. Chem Abst 63: 9871f*.
- Gorog, S. (2000). *Identification and Determination of Impurities in Drugs*. Amsterdam: Elsevier Science B.V. Amsterdam, 2000.
- Holm, R., & Elder , D. P. (2015). Analytical advances in pharmaceutical impurity profiling. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1-17.
- ICH. (1994). *ICH Q2A: Validation of Analytical Methods, Definitions and Terminology*.
- (2003). *ICH. Q3A: Impurities in New Drug Substances*.
- (2003). *ICH. Q3B: Impurities in New Drug Products*.
- Jain, D., & Basniwal, P. (2013). Forced degradation and impurity profiling: Recent trends in analytical perspectives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 11-35.
- Kovaleski, J. (59(2007)). Impurities in generic pharmaceutical development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56-63.
- Lee, Y. (2004). Method validation for HPLC analysis of related substances in pharmaceutical Drug Products. En *Analytical Method Validation and Instrument performance Verification* (págs. 27-48). John Wiley & Sons, Inc.
- Maggio , R. (2013). Practical and regulatory considerations for stability-indicating methods. *Trends in Analytical chemistry*, 57-70.
- Magnusson, B., & Örnemark, U. (2º ed. 2014). *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods- A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. Eurachem.
- Monks, k. (2012). Quality by Design: Multidimensional exploration of the design space in high performance liquid chromatography method development for better robustness before validation. *Journal of Chromatography A*, 218-230.

-
- Nageswara Rao, R. (2003). An overview of the recent trends in development of HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 335-377.
- Pan, C., Frances , L., & Motto, M. (2011). Identification of Pharmaceutical Impurities in Formulated Dosage Forms. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 1228-1259.
- Riley, C. M., Riley, S. R., & Phelps, R. (2014). Assay and impurities. En *Specification of Drugs Substances and Products* (págs. 109-140). Elsevier.
- Secretaría de Salud. (05 de febrero de 2016). NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos. *Diaio oficial*.
- Secretaría de Salud. (07 de jun de 2016). NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de Fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios. *Diario Oficial* .
- Secretaría de Salud. (04 de febrero de 2016). NOM-164-SSA1-2015 Buenas Prácticas de Fabricación de Fármacos. *Diario Oficial* .
- Snyder, J., Kirkland, & Glajch, J. (1997). *Practical HPLC Method Development*. New York: Wiley.
- Suno, M. (2015). Photostability studies on (±)-tramadol in a liquid. *Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences*, 1-5.
- US Food and Drug Administration. (2005). *ANDAs: Impurities in drug products, Guidance for Industry*.
- USP convention. (2000). *The united States Pharmacopeia*. USA.
- Zecevic, M. (2006). Validation of a high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of Tramadol and its impurities in oral drops as a pharmaceutical formulation. *J. Chromatogr. A*, 254-256.