



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE INGENIERÍA, CIENCIAS SOCIALES Y
ADMINISTRATIVAS**

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**PROPUESTA DE MEJORA UTILIZANDO DISEÑO DE EXPERIMENTOS EN EL DESARROLLO DE
TÉCNICAS ANALÍTICAS EN UN LABORATORIO FARMACÉUTICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN

INGENIERÍA INDUSTRIAL

PRESENTA:

C. NANCY BARAJAS GONZÁLEZ

DIRECTORES DE TESIS:

DR. MIGUEL ÁNGEL LÓPEZ FLORES

M. EN I. JUAN JOSÉ HURTADO MORENO

MÉXICO, DF.

AÑO 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 14:30 horas del día 09 del mes de marzo del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIICSA

para examinar la tesis titulada:

"PROPUESTA DE MEJORA UTILIZANDO DISEÑO DE EXPERIMENTOS EN EL DESARROLLO DE TÉCNICAS ANALÍTICAS EN UN LABORATORIO FARMACÉUTICO"

Presentada por el alumno:

BARAJAS

GONZÁLEZ

NANCY

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Con registro:

B	0	8	1	9	1	0
---	---	---	---	---	---	---

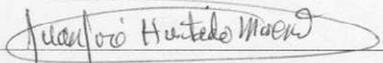
aspirante de:

MAESTRO EN INGENIERÍA INDUSTRIAL

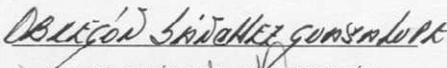
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

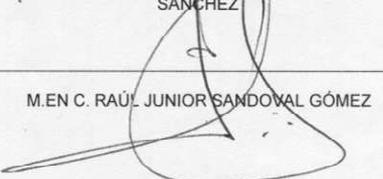
Directores de tesis


M. EN I. JUAN JOSÉ HURTADO MORENO

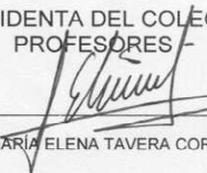

DR. MIGUEL ÁNGEL LÓPEZ FLORES


M. EN C. MARÍA GUADALUPE OBREGÓN SÁNCHEZ


M. EN C. JUAN CARLOS GUTIÉRREZ MATUS


M. EN C. RAÚL JUNIOR SANDOVAL GÓMEZ

LA PRESIDENTA DEL COLEGIO DE PROFESORES


DRA. MARÍA ELENA TAVERA CORTÉS







INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE INGENIERÍA Y CIENCIAS
SOCIALES Y ADMINISTRATIVAS

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 09 de marzo del 2011, el que suscribe Nancy Barajas González, siendo alumna del programa de maestría en ingeniería industrial, con número de registro B081910 adscrito a la sección de estudios de posgrado de la UPIICSA-IPN, manifiesta que el autor intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección del Dr. Miguel Ángel López Flores y el M. en I. Juan José Hurtado Moreno, y cede los derechos del trabajo titulado "Propuesta de mejora utilizando diseño de experimentos en el desarrollo de técnicas analíticas en un laboratorio farmacéutico", al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben de reproducir el contenido textual, gráfico y de datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores de la tesis. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección de correo electrónico nancy_barajas2000@hotmail.com. Si el permiso fuera otorgado, el usuario deberá dar el seguimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Nancy Barajas González

Nombre y firma

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que de alguna manera han sido partícipes de en el desarrollo de la presente Tesis:

A mis directores de tesis Dr. Miguel Ángel Flores López, y M en I Juan José Hurtado; quienes fueron pieza clave para concluir mis estudios de maestría, gracias por su amistad y su confianza.

A mis profesores M en C. María Guadalupe Obregón Sánchez, M en C Carlos Gutiérrez, M en C Junior Sandoval por su colaboración desinteresada.

A mi esposo Edgar por su amor y apoyo incondicional, que ha sido mi fortaleza para seguir adelante.

A mi familia, por estar a mi lado en esta etapa de mi vida

A UPIICSA por brindarme la oportunidad de seguir superándome.

ÍNDICE

RESUMEN.....	VII
ABSTRACT	VIII
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO 1

GENERALIDADES Y SITUACIÓN ACTUAL DE LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA.....	3
1.1. ANTECEDENTES.....	3
1.2. FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS.....	5
1.3. TÉCNICAS INSTRUMENTALES.....	7
1.4. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LAS TÉCNICAS INSTRUMENTALES	10
1.5. INTERÉS FARMACÉUTICO EN LAS TÉCNICAS INSTRUMENTALES	12
1.6. CLASIFICACIÓN DE LAS TÉCNICAS INSTRUMENTALES.....	14

CAPÍTULO 2

SEPARACIONES CROMATOGRÁFICAS.....	16
2.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA CROMATOGRAFÍA	16
2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	18
2.2.1. TIPOS DE CROMATOGRAFÍA	18
2.2.2. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.....	21
2.3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EN COLUMNA.....	23
2.3.1. CROMATOGRAMA.....	26
2.3.2. RELACIONES DE TIEMPO.....	27
2.3.3. RELACIONES DE VOLUMEN.....	28
2.3.4. FACTOR DE SELECTIVIDAD	29
2.4. EFICIENCIA DE LA COLUMNA	31
2.4.1. ALTURA DE PLATO	31
2.4.2. ENSANCHAMIENTO DE BANDA.....	33
2.5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	38
2.5.1. INSTRUMENTACIÓN EN HPLC	39
2.5.2. BOMBAS.....	40
2.5.3. INYECTORES	42

2.5.4. COLUMNAS	43
2.5.5. FASE ESTACIONARIA	45
2.5.6. FASES MÓVILES	47
2.5.7. DETECTORES	48

CAPÍTULO 3

DISEÑO DE EXPERIMENTOS.....	50
3.1 PLANEACIÓN DE UN EXPERIMENTO.....	50
3.2 EL CONCEPTO DE ROBUSTEZ	52
3.3 FACTORES DE CONTROL, RUIDO Y DE SEÑAL	53
3.4 ARREGLOS ORTOGONALES	57
3.5 RAZÓN SEÑAL/RUIDO.....	58

CAPÍTULO 4

APLICACIÓN DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS EN EL DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO .	61
4.1. DESARROLLO DEL EXPERIMENTO.....	61
4.2. DETERMINACIÓN DE FACTORES	62
4.3. METODOLOGÍA	64
4.4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	74
CONCLUSIONES	78
REFERENCIAS.....	80
BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Primera Farmacopea Mexicana.....	6
Figura 1.2. Componentes básicos de un instrumento analítico	10
Figura 1.3 Clasificación de los métodos instrumentales.....	15
Figura 2.1 Tipos de separación cromatográfica.....	20
Figura 2.2 Separación cromatográfica.	24
Figura 2.3 Perfiles de concentración del soluto A y B a dos tiempos diferentes.	25
Figura 2.4. Cromatograma	27
Figura 2.5. Efecto de la selectividad con en cambio de la composición de fase móvil.....	30
Figura 2.6 Curva típica de la Van Deemter.....	35
Figura 2.7 Contribuciones al ensanchamiento de banda.....	37
Figura 2.8 Equipo de HPLC modelo HP1200.....	40
Figura 2.9 Bomba de dos pistones en serie.....	41
Figura 2.10 Válvula de inyección utilizada en HPLC.....	43
Figura 2.11 Columna de acero.....	45
Figura 2.12 Estructura del gel de sílice para cromatografía.....	46
Figura 3.1 Clases de factores ortogonales de acuerdo a su efecto sobre la media (eje X) y/o variabilidad (eje Y).	54
Figura 3.2 Arreglos ortogonales más frecuentes.....	58
Figura 4.1 Metodología analítica para la determinación de la concentración de Dinitrato de isosorbida.	61
Figura 4.2 Diagrama básico de un sistema de HPLC.	62
Figura 4.3 Cromatogramas del Corrida 1	66
Figura 4.4 Cromatogramas del Corrida 2	67
Figura 4.5 Cromatogramas del Corrida 3	68
Figura 4.6 Cromatogramas del Corrida 4	69
Figura 4.7 Cromatogramas del Corrida 5	70
Figura 4.8 Cromatogramas del Corrida 6	71
Figura 4.9 Cromatogramas del Corrida 7	72
Figura 4.10 Cromatogramas del Corrida 8	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Técnicas instrumentales utilizadas en la identificación y determinación de estructura química.....	13
Tabla 2.1 Clasificación de los métodos cromatográficos	22
Tabla 2.2 Métodos utilizados para el cálculo de N.	33
Tabla 2.3 Características generales de las columnas cromatográficas empleadas en HPLC.....	44
Tabla 3.1 Razón señal/ruido para las diferentes tipos de variables de respuesta	60
Tabla 4.1 Descripción de los factores a combinar en el experimento.	63
Tabla 4.2 Descripción de los factores a combinar en el experimento.	63
Tabla 4.3 Factor A. pH de la solución de sulfato de amonio	64
Tabla 4.4 Factor B. pH de la solución de sulfato de amonio	64
Tabla 4.5 Factores C y D. Flujo de la bomba y temperatura de la columna cromatográfica	65
Tabla 4.6 Descripción de los factores a combinar en el experimento.	66
Tabla 4.7 Condiciones experimentales de la corrida 1.	66
Tabla 4.8 Condiciones experimentales de la corrida 2.	67
Tabla 4.9 Condiciones experimentales de la corrida 3.	68
Tabla 4.10 Condiciones experimentales de la corrida 4	69
Tabla 4.11 Condiciones experimentales de la corrida 5.	70
Tabla 4.12 Condiciones experimentales de la corrida 6.	71
Tabla 4.13 Condiciones experimentales de la corrida 7.	72
Tabla 4.14 Condiciones experimentales de la corrida 8.	73
Tabla 4.15 Factores y niveles del experimento	75
Tabla 4.16 Tabla ANOVA para el experimento.....	76
Tabla 4. 17 Corrida final	76
Tabla 4.18 Comparación del método actual con el método propuesto.	77
Tabla 4.19 Resultados obtenidos con el método propuesto	77

Abreviaturas y unidades

CFS: Cromatografía de fluidos supercríticos

CGL: Cromatografía Gas-Líquido

CGS: Cromatografía Gas-Sólido

CLAE: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

CLAR: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

CLL: Cromatografía Líquido-Líquido

CLS: Cromatografía Líquido-Sólido

COFEPRIS: Comisión Federal para la Protección contra Riesgos

FEUM: Farmacopea de los estados Unidos Mexicanos

HPLC: Cromatografía líquida de alta presión (High Performance Liquid Chromatographic)

ODS: Octadecilsilano

pH: potencial de hidrógeno

RMN: Resonancia magnética nuclear

USP: Farmacopea de los Estados Unidos (United States Pharmacopeia)

µm: micrómetros

cm: centímetros

mL/min: mililitros/minuto

mm: milímetros

ppm: partes por millón

psi: libras de presión

RESUMEN

El presente trabajo surge de la necesidad del laboratorio de control de calidad de optimizar las técnicas de análisis instrumental en la elaboración de medicamentos en una empresa farmacéutica para reducir el tiempo de análisis de las muestras proponiendo por medio del diseño de experimentos una nueva metodología de análisis para optimizar el proceso de control y liberación del producto cumpliendo con la normas establecidas.

Para lograrlo se realizó una serie de experimentos en donde se utilizó un equipo de cromatografía de alta resolución (HPLC) para la determinación de la concentración del compuesto dinitrato de isosorbida en presentación de tabletas, cambiando la longitud de columna cromatográfica que utiliza actualmente y modificando algunos de los factores que influyen en el proceso cromatográfico para mejorar los tiempos de análisis y poder utilizar esta técnica mejorada en productos similares.

Se analizaron los diferentes factores que influyen en el proceso cromatográfico para la modificación de los factores a utilizar, por medio del diseño de experimentos permitió establecer la combinación de factores que nos permitiría reducir el tiempo de retención del compuesto. Al reducir el tiempo de retención del compuesto, se reduce en general el tiempo del análisis, así como el consumo de solventes utilizados en la cromatografía, haciendo más eficiente el proceso. La técnica mejorada podrá implementarse en otras pruebas con características similares.

ABSTRACT

This work arises from the need for quality control laboratory to optimize the instrumental analysis techniques in the development of drugs in a pharmaceutical company to reduce the analysis time of samples proposed by designing experiments a new method of analysis to optimize the process control and product release in compliance with the standards.

To achieve this, made a series of experiments where we used a team of high resolution chromatography (HPLC) to determine the concentration of compound isosorbide dinitrate tablets presentation, changing the length of chromatographic column is currently using and modifying some factors influencing the chromatographic process to improve analysis times and improved use this technique in similar products.

We analyzed the different factors influencing the chromatographic process for the modification of the factors to be used, by design of experiments allowed to determine the combination of factors that enable us to reduce the retention time of the compound. By reducing the compound retention time, reducing overall analysis time and consumption of solvents used in chromatography, making the process more efficient. Improved technique can be implemented in other similar tests.

INTRODUCCIÓN

En un ambiente tan competitivo como lo es la industria farmacéutica, surge la necesidad de desarrollar técnicas analíticas más eficientes, con resultados rápidos y fiables durante el proceso de fabricación para una pronta liberación de los medicamentos al mercado. Uno de los objetivos del laboratorio de control de calidad es el desarrollo y mejora de las técnicas de análisis haciéndolas mucho más eficientes y rápidas. La industria farmacéutica se ha caracterizado desde sus inicios; por la necesidad de alcanzar altos niveles de calidad, para lo cual fue desarrollando procedimientos que han evolucionado con una reglamentación estricta; para ello se buscan alternativas para mejorar y hacer más eficientes los procesos, una de estas alternativas es la modificación de las técnicas instrumentales.

En México la Secretaría de Salud ejerce las atribuciones de regulación, control y fomento sanitario a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), siendo una de sus funciones realizar el control de los medicamentos y los insumos relacionados al mismo. La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), es el documento expedido por la Secretaría de Salud que consigna los métodos generales de análisis y los requisitos sobre identidad, pureza y calidad de los fármacos, aditivos, medicamentos, productos biológicos y biotecnológicos.

El objetivo de este trabajo es disminuir el tiempo de análisis en la prueba de valoración de dinitrato de isosorbida 10 mg tabletas por Cromatografía Líquida en Columna de Alta Resolución utilizando diseño de experimentos, en un laboratorio farmacéutico de Control de Calidad, cambiando la longitud de la columna cromatográfica de 25 cm a 5 cm. Para lograrlo se identificaran las condiciones que influyen durante el proceso cromatográfico y por medio del diseño de experimentos realizar la combinación de factores para disminuir el tiempo el tiempo de retención del compuesto.

En el capítulo 1 del presente trabajo se realiza una descripción del panorama general de la industria farmacéutica, así como la reglamentación que existe en relación a la regulación y control

de medicamentos, se revisa la importancia y la incursión de las técnicas instrumentales de análisis en la industria farmacéutica, su clasificación, ventajas y desventajas.

En el capítulo 2 se revisan los conceptos relacionados con la técnica de separación cromatográfica por HPLC utilizada en el laboratorio de control de calidad para evaluar características como identidad y pureza de un fármaco. Se describen los factores que intervienen durante las separaciones cromatográficas que nos ayudaran a la realización de los experimentos posteriores.

En el capítulo 3 se realiza una descripción general de los fundamentos del diseño factorial de experimentos, que nos servirán para planear y realizar los experimentos. Los principios que se presentan en este capítulo constituyen la base para la estructura del estudio de investigación del presente trabajo.

En el capítulo 4 se presenta el desarrollo de los experimentos, con los factores seleccionados utilizando un arreglo factorial L8, se realiza el análisis de resultados Para finalizar, al final del capítulo se presentan las principales conclusiones obtenidas y se definen posibles futuras líneas de investigación.

CAPÍTULO 1

GENERALIDADES Y SITUACIÓN ACTUAL DE LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

1.1. ANTECEDENTES

En la industria farmacéutica, el análisis instrumental es una herramienta importante para la fabricación de medicamentos, por su efecto en la salud, los medicamentos alcanzan una importancia social mayor que los productos de otras industrias. El secretario de Salud de México definió dicha importancia: “Es incuestionable que la salud es un requisito primordial para lograr el bienestar de la sociedad. No puede haber desarrollo económico pleno, ni disfrute de la libertad en su significado más amplio, si no se tiene salud” (Secretaría de Salud 2005).

La industria farmacéutica es un elemento importante en el sistema de atención a la salud. Está constituida por numerosas organizaciones públicas y privadas dedicadas a la investigación, desarrollo, fabricación y comercialización de medicamentos para la salud humana y animal (Gennaro 1990). Los principios activos utilizados en los medicamentos presentan grandes actividades farmacológicas y toxicológicas, las inversiones de la industria farmacéutica en investigación y desarrollo, así como los modernos avances científicos y tecnológicos aceleran el descubrimiento y desarrollo de productos farmacéuticos innovadores con una mejor actividad terapéutica y menos efectos secundarios para los pacientes.

Los adelantos en el genoma humano y otros avances tecnológicos comenzaron a dar resultados a partir del 2005, los laboratorios farmacéuticos y biotecnológicos están desarrollando medicamentos para enfermedades como cáncer, enfermedades neumológicas, así como enfermedades cardíacas y vacunas para el SIDA (VIH) entre otros. La industria farmacéutica requiere la inversión de grandes capitales debido a los gastos asociados a la Investigación y desarrollo, la autorización de comercialización, la fabricación, la garantía y el control de calidad, la comercialización y las ventas (Spilker 1994).

A mediados de siglo XIX La farmacopea, había sido obtenida recopilando la sustancias simples de la medicina antigua, era una mezcla de medicina vernácula y mágica, la medicina científica se desarrollo a partir de la segunda mitad de ese siglo, debido a los avances vinculados con este campo del conocimiento (Gómez 2008). Empiezan a ver avances en las áreas científicas ligadas a la química, biología y medicina, posteriormente un proceso de convergencia de conocimientos procedente de estas disciplinas, que hizo posible el surgimiento de la farmacología y el inicio del aprovechamiento de la industria farmacéutica en la acumulación de conocimientos técnicos y productivos de otras industrias como la química en la elaboración de pigmentos y colorantes. Estos tres elementos formaron la base científica y técnica que hizo posible el nacimiento de la industria farmacéutica.

La evolución del conocimiento se inicio antes, pero el hecho que cambio definitivamente el modo de concebir la medicina y la investigación farmacéutica fue la publicación de Darwin, en 1859, de la teoría de la evolución por selección natural, este hecho rompió con el paradigma establecido en la investigación científica y dio pauta al establecimiento de las teorías de la medicina moderna y la industria farmacéutica.

El desarrollo de los antibióticos, en especial el descubrimiento de la penicilina, es el detonador de la industria farmacéutica, descubierta por Fleming en 1928, no es hasta la década de los cuarenta cuando se industrializa comercialmente. La producción a gran escala se logro en empresas estadounidenses como Glaxo y Pfizer, dando lugar a la investigación de nuevos antibióticos. A principios de los sesenta ya se fabricaban una gran cantidad de medicamentos para numerosas enfermedades sin embargo el principal problema eran los efectos secundarios en los pacientes(Gómez 2008). Esto dio origen a un cambio a fondo de las normas de producción de fármacos.

Un novedoso enfoque se dio gracias al avance en las áreas de fisiología, farmacología, enzimología y biología celular. Con este nuevo conocimiento se logro identificar a cada célula como una estructura anatómico-fisiológica y bioquímica muy específica, lo cual permitió diseñar fármacos capaces de interferir en la estructura celular y por ende afectar el proceso vital de las bacterias, virus y células cancerosas. Bajo este esquema las primeras en competir fueron las

compañías estadounidenses, inglesas y suizas en tanto que las europeas y suizas se quedaron rezagadas.

La biotecnología a tomado importancia en los últimos 30 años debido a la acumulación de los conocimientos de los mecanismos de la vida misma: El desciframiento de la estructura y la función del código genético (Corona y Jiménez 2003). La evolución de las ciencias biológicas dio origen a desarrollo de la ingeniería genética la cual tuvo una rápida aplicación en la industria y el comercio. De hecho la producción de nuevas sustancias biotecnológicas ha superado los compuestos de base tradicional. El centro mundial de estos desarrollos se encuentra en Estados Unidos país líder en la producción de medicamentos de origen biotecnológico.

En general la evolución de la industria farmacéutica está vinculada al conocimiento científico. El desarrollo de las capacidades presentes y futuras dependen de la formación de sólidos equipos de investigación en ciencias básica, si ello todo intento por aumentar las capacidades científicas y tecnológicas no será real. Los gobiernos y el sector privado deben de coordinar sus esfuerzos en centros de investigación de alto nivel así como de Investigación y desarrollo.

1.2. FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

En el contexto nacional, de acuerdo al Reglamento de Insumos para la Salud en su título primero, artículo 2, fracción IX, la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) se define como:

“al documento expedido por la Secretaría que consigna los métodos generales de análisis y los requisitos sobre identidad, pureza y calidad de los fármacos, aditivos, medicamentos, productos biológicos y demás insumos para la salud”.

En América el desarrollo de las tecnologías enfocadas a la cuantificación de los principios activos inicio a partir de la segunda mitad del siglo XIX en Estados Unidos, la primera farmacopea que se publico en este país fue en al año de 1820, siendo la primera en el continente americano, estaba constituida por cinco secciones y en ella se enumeraban los metales, plantas y otros ingredientes para uso medicinal. Proporcionaba las recetas para la mezcla de medicamentos, sufrió muchas revisiones a lo largo de los siglos XIX y XX. Hoy en día contiene las normas para la potencia, pureza, envasado y etiquetado de los medicamentos en los Estados Unidos.

La Farmacopea Mexicana fue publicada por primera vez en 1846 y estaba constituida de tres partes: la primera dedicada a las sustancias simples de origen natural, la segunda a preparaciones químicas y la última a las preparaciones farmacéuticas. En la primera sección aparecen 495 productos de origen vegetal, 28 provenientes del reino animal y 51 de origen mineral. En los apartados dedicados a cada uno ellos se incluye el nombre vulgar seguido del científico, las partes que se utilizan del mismo y su aplicación terapéutica.

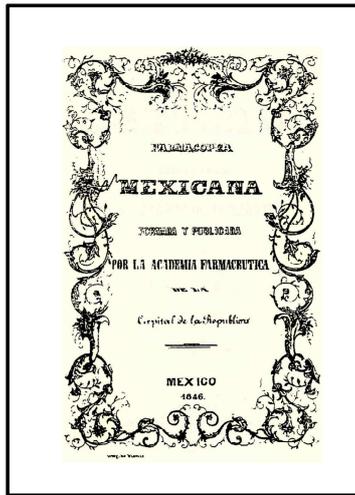


Figura 1.1 Primera Farmacopea Mexicana

Fuente: (Academia farmacéutica 1846)

Durante el transcurso del siglo XX tuvo varias modificaciones, las páginas del texto oficial incluyeron a los nuevos fármacos que iban sintetizándose en los laboratorios nacionales y transnacionales, destacan los antibióticos, anestésicos y hormonas. En la edición del año 1952 incluyó por primera vez la célebre penicilina, la sal de sodio de Pentobarbital y la Testosterona. También incluía una sección dedicada específicamente a los métodos oficiales para llevar a cabo determinaciones físicas y químicas, así como las características del equipo y material para llevarlas a cabo.

En la actualidad la Comisión permanente de la Farmacopea Mexicana forma parte de un proyecto de armonización que incluye a la USP, La Farmacopea Argentina y la Brasileña. Este grupo creado en el año 2000, se reúne varias veces al año con la premisa de armonizar los formatos, contenidos y criterios de las cuatro farmacopeas activas en el continente americano.

Su enfoque es claramente industrial y el principal objetivo es el de facilitar las relaciones comerciales de importación y exportación de materias primas y formas farmacéuticas. Las técnicas analíticas utilizadas para la evaluación de estos productos es prioritaria en la agenda, sin embargo existen dificultades derivadas de las diferencias en el grado de desarrollo tecnológico en la región.

En el caso de México se busca cumplir con lo estipulado en la USP, que son más estrictos, antes que los de la Farmacopea Mexicana, esto con el fin de exportar productos a Canadá y Estados Unidos. Los costos derivados del equipo e instrumental para realizar las pruebas de calidad, son en la mayoría de los casos prohibitivos para los pequeños y medianos laboratorios nacionales, que son los principales usuarios del código nacional, más apegado a la realidad tecnológica del país.

1.3. TÉCNICAS INSTRUMENTALES

La aplicación de las técnicas instrumentales se inicio en el siglo XIX con Kuster y Gruters, los cuales sentaron las bases de las valoraciones conductimétricas, posteriormente se desarrollaron las valoraciones potenciométricas con aplicadas a las reacciones de oxido reducción y de precipitación. En 1922 Heyrovsky descubrió la polarografía constituyendo un avance en el análisis. En la década d los treinta se el descubrimiento de los electrodos de vidrio sensibles a los iones de H^+ (hidrógeno), constituyo un avance importante ya que hacía posible la determinación de pH de forma rápida y continua, el suceso dio paso al desarrollo de técnicas volumétricas ácido-base.

Durante el primer tercio del siglo había la necesidad de analizar componentes trazas, a concentraciones inferiores a 0.01% en un numero grande de muestras y en tiempos relativamente cortos, esto provocó un gran desarrollo de las técnicas instrumentales. En países como Estados Unidos el desarrollo de los métodos instrumentales se utilizaba ya de forma rutinaria al comenzar la década de los cuarenta utilizaban espectrofotómetros de luz ultravioleta e infrarroja, los espectros de emisión, los fluorímetros, los polarógrafos, entre otros.

En la primera mitad de la década de los cuarenta, el proyecto Manhattan, que estaba relacionado con la construcción de la bomba atómica, impulsó de manera considerable los métodos instrumentales como el de intercambio iónico, microanálisis y análisis de trazas entre otros. En el campo de química inorgánica las *técnicas cromatográficas* especialmente la cromatografía de

gases y de capa fina experimentaron un desarrollo continuo a partir de mediados de los años cincuenta, aunado a los avances en espectroscopia infrarroja, posteriormente a la espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear.

Con el desarrollo de la absorción atómica se consiguió mejorar los resultados que se obtenían por la técnica de fotometría de llama, esta nueva técnica se hizo casi insustituible para el análisis de metales a nivel de trazas, finalmente durante los años ochenta con la entrada de las tecnologías de información, modificó profundamente las técnicas analíticas instrumentales, tanto en utilización de computadoras controladoras de los instrumentos como en el manejo de mucha información obtenida de las medidas experimentales, esto les permitió a los analistas evaluar los resultados estadísticos y comparar los resultados analíticos con los datos almacenados, así como comparar las señales obtenidas en los equipos.

El análisis instrumental es una ciencia que durante los últimos años ha tomado gran interés en cuanto al análisis e investigación farmacéutica, hoy en día forma parte de los controles que realizan los laboratorios farmacéuticos (Oriol y Del Castillo 1998). Las técnicas instrumentales han llegado a ser una práctica habitual del analista farmacéutico con el uso de instrumentos tales como el espectrofotómetro ultravioleta-visible, el potenciómetro para determinación del pH o el cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

El concepto de técnicas instrumentales abarca una idea mucho más amplia que la analítica ya que estas técnicas suelen usarse en el proceso de elaboración de medicamentos para efectuar ajustes en el pH, viscosidad, densidad, transparencia y color, entre otros a fin de que los medicamentos cumplan con las especificaciones establecidas, debido a esto las técnicas instrumentales son necesarias para el desarrollo de nuevos fármacos.

Los métodos químicos para la identificación y cuantificación de las formas farmacéuticas en el siglo XIX eran muy reducidos. El instrumental con el que se contaba y los fundamentos detrás de su diseño no eran lo suficiente robustos para hacer determinaciones precisas y repetibles, no se conocían lo suficiente los fundamentos cualitativos y cuantitativos de las técnicas de análisis. Conforme avanza el siglo XIX aumentan los conocimientos en la materia y empiezan a desarrollarse en gran medida las técnicas de análisis de las formas farmacéuticas así junto con

como las novedosas técnicas de aseguramiento de la calidad e identidad de los compuestos contenidos en los medicamentos, como era de esperarse se empezaron a unificar criterios en cuanto a las metodologías quedando asentados en códigos oficiales. Las *farmacopeas* se convirtieron en requisitos indispensables para asegurar la calidad e identidad de los medicamentos así también como para su comercio y distribución

Instrumentos analíticos

Los instrumentos analíticos ayuda a la química analítica a caracterizar la materia, para esto se utilizan ciertas propiedades analíticas de la materia que nos pueden ayudar a establecer de una manera más clara su composición ya sea cualitativa o cuantitativa. Estas propiedades la podemos observar directamente de la materia, y en el caso más general pueden ser provocadas mediante un proceso físico o mediante una reacción química. Así puede considerarse a un instrumento analítico como un dispositivo que convierte una señal, que no puede ser detectable directamente por el ser humano, en una forma que si lo es (Hernández y Claudio 2002). En la figura 1.1 se muestra los componentes de los que consta un instrumento analítico: generador de señales, detector, procesador de señales y dispositivo de lectura.

El generador de señales produce una señal generalmente relacionada con la concentración del analito, se utilizad dos métodos generales en la generación de señales, la aplicación de una señal externa en la muestra, , un ejemplo de este tipo de señal se puede observar en la espectroscopia de absorción, la otra forma es la creación de un ambiente sobre la muestra que permite al analito producir una señal, este tipo de señal la observamos en las mediciones potenciométricas, hay que tomar en cuenta las características físicas del instrumento tanto como las propiedades fisicoquímicas de la muestra.

El detector es un dispositivo que convierte un tipo de señal en otro, en la medición de pH, el detector es el electrodo de vidrio que trasforma la actividad de iones H^+ en un potencial eléctrico, mientras que en espectrofotometría ultravioleta o visible, el detector es un tubo fotomultiplicador que trasforma la señal radiante en una corriente eléctrica. La señal que proviene del detector se modifica en un procesador de señales, adaptándose al dispositivo de lectura, en muchas de las ocasiones se produce únicamente una amplificación, finalmente el dispositivo de salida trasforma

la señal procesada en otra señal intangible para el observador. Este puede ser un desplazamiento de la aguja en alguna escala, una serie de números o un trozo de papel.

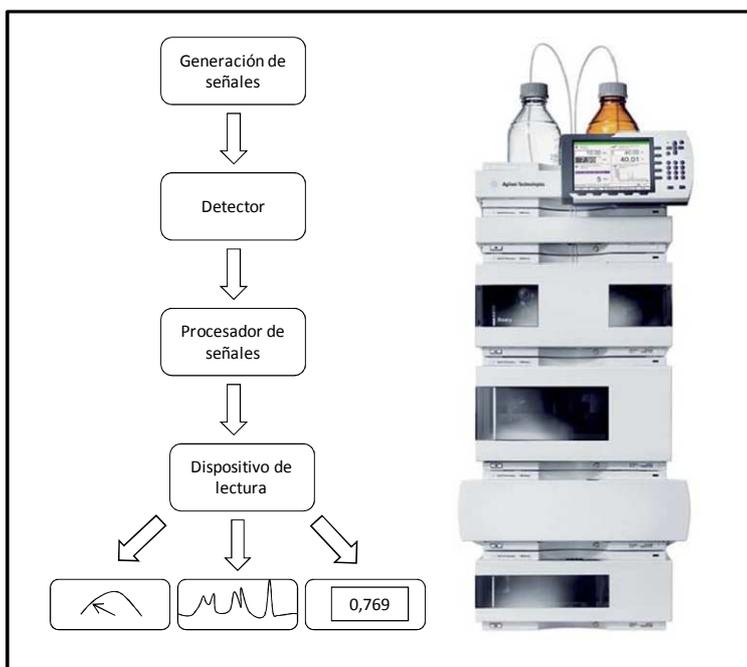


Figura 1.2. Componentes básicos de un instrumento analítico

Fuente: (Hernández y Claudio 2002)

1.4. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LAS TÉCNICAS INSTRUMENTALES

Los métodos instrumentales reúnen una serie de características que los distinguen de otros métodos empleados en la química clásica, dentro de las ventajas de los métodos instrumentales se encuentran las siguientes:

Los métodos químicos, están normalmente sujetos a precisiones subjetivas del observador, como por ejemplo al momento del vire de un indicador, en cambio las técnicas instrumentales son métodos más objetivos en este sentido ya que nos proporcionan información exacta de la composición de las muestras.

Son normalmente métodos más precisos, presentando menor oscilación entre medidas sucesivas y una mayor reproducibilidad en los resultados que los métodos químicos.

Suelen ser más sensibles, algunas de estas técnicas como por ejemplo la absorción atómica alcanza una sensibilidad asombrosa en el campo de investigación de trazas de metales a concentraciones del orden de 0.1 ppm, lo que difícilmente podría asegurarse con un método químico.

Una característica muy interesante de los métodos instrumentales es que permiten efectuar determinaciones de *mucho menor duración* que otros métodos empleados en de manera clásica. Un operador bien entrenado puede realizar análisis con gran rapidez. Esto explica la gran difusión que han adquirido los métodos instrumentales en la industria farmacéutica.

En mucho de los casos no se altera la muestra, esto es interesante en el caso de productos biológicos ya que se cuenta pequeñas cantidades de muestra para realizar un serie de ensayos y proceder a la recuperación de la misma si se considera conveniente.

Los métodos instrumentales en general son métodos más selectivos y no requieren de una separación previa, los métodos químicos normalmente responden a radicales químicos que pueden estar presentes en muchas sustancias similares como por ejemplo los grupos ácido, aminas, sulfúricos entre otros, o bien en grupos de átomos de valencia y otras características similares. Los métodos instrumentales responden a la totalidad de la molécula o bien dan resultados propios y diferenciados para cada átomo o ión. Como por ejemplo podemos citar la cromatografía líquida de alta resolución en donde obtenemos resultados cualitativos y cuantitativos de la muestra o bien la espectrofotometría infrarroja que es tan característica de cada molécula que se a dado en llamar la "huella dactilar de las moléculas".

Finalmente los métodos instrumentales permiten una fácil adaptación a aparatos de registro gráfico y a instrumentos de cálculo que facilitan las operaciones que podrían resultar engorrosas posteriores a cualquier determinación analítica y restarían tiempo al tiempo de análisis total, esto resulta particularmente interesante debido a que en los centros se realizan una gran cantidad de

mediciones y se desea evaluar las medidas sucesivas por procedimientos estadísticos o cuando interesa guardar y comparar los resultados con diferentes métodos.

Asimismo las técnicas instrumentales presentan una serie de desventajas entre los que podemos mencionar:

Representan elevados costos, la mayor parte de estos métodos requieren de instrumentos con un elevado valor que no suelen estar al alcance de los pequeños laboratorios, sin embargo en la actualidad, debido a la gran difusión que han adquirido las técnicas analíticas, los fabricantes de instrumentos ofrecen sus instrumentos a precios cada vez más asequibles, si bien no suelen ser adecuados para la investigación, tienen un gran interés en la utilización en el control de calidad.

Otro de los inconvenientes que puede representar el uso de técnicas instrumentales es el de requerir técnicos expertos en el manejo de los instrumentos. Sin embargo en el manejo de instrumentos salvo que sea muy complejo, el período de aprendizaje no es superior al requerido para adquirir práctica con cualquier método químico de análisis.

La mayoría de los instrumentos requieren de una *calibración* previa con un patrón de calidad que debe de haberse controlado previamente por un procedimiento químico o con otro aparato controlado correctamente, aunado a la calibración periódica de los instrumentos estos deben de tener una calificación de instalación y operación al momento de su adquisición y posteriormente una validación (en ciertos casos), esto representa costos a las compañías.

1.5. INTERÉS FARMACÉUTICO EN LAS TÉCNICAS INSTRUMENTALES

Las técnicas instrumentales desempeñan un papel muy importante en el área farmacéutica utilizándose en cada una de las etapas de la existencia de un fármaco, es decir, en la investigación y desarrollo de un nuevo compuesto, en la formulación galénica del mismo, en las etapas de producción y control (Oriol y Del Castillo 1998). Los métodos nos proporcionan una información precisa y completa de las propiedades físico-químicas de los medicamentos. La obtención de la información necesaria se puede obtener de distintas formas:

Identificación y determinación de la estructura química. La información estructural de un medicamento hace tiempo estaba condicionada a la degradación de la sustancia y a los estudios de los productos de la degradación, actualmente la información se obtiene principalmente de la molécula intacta con métodos instrumentales físico-químicos, con lo que se obtuvo un gran ahorro en tiempo y una mayor objetividad de los resultados obtenidos. En la tabla 1.1 se resumen los principales métodos instrumentales utilizados para la determinación de la estructura química de los medicamentos.

Método instrumental	Principal información que suministra
Potenciometría	Identificación de los grupos ionizable
Voltametrías	Identificación de cationes, bases orgánicas y otras funciones
Electroforesis	Identificación de compuestos ionizables por comparación
Espectroscopia de emisión	Identificación de trazas de metales y cationes metálicos
Espectroscopia de ultravioleta-	Identificación de grupos cromóforos
Espectroscopia infrarroja	Identificación de grupos funcionales por comparación de
Espectroscopia de RMN	Identificación de carbono e hidrógeno y su entorno
Espectroscopia de rayos X	Identificación de los elementos, caracterización de los
Dispersión rotatorio óptica	Determinación de la estereoquímica de los compuestos con

Tabla 1.1 Técnicas instrumentales utilizadas en la identificación y determinación de estructura química

Fuente: Basado en (Oriol y Del Castillo 1998)

Determinación de la homogeneidad y pureza de los medicamentos La técnica ideal para esta finalidad es la que explicaremos con mayor amplitud en el capítulo 2, es la cromatografía, también la electroforesis y la espectrometría de masas, proporción abundante información al respecto, se

suelen utilizar las técnicas combinadas. Las técnicas analíticas empleadas para esta finalidad son: cromatografía de HPLC, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en gel, cromatografía plana, cromatografía de gases, electroforesis de zona, electroforesis capilar, espectroscopia de masas, entre otros.

Valoración cuantitativa, esta aplicación es quizás la más importante en la industria farmacéutica, numerosos métodos se utilizan frecuentemente para esta finalidad, algunas de técnicas utilizadas deben de combinarse con otras técnicas por ejemplo cuando se emplea cromatografía en capa fina o electroforesis se puede combinar con técnicas de espectrofotometría UV-Visible para logra una evaluación cuantitativa de suficiente precisión.

Algunas de las técnicas como la cromatografía en HPLC y la fluorimetría proporcionan una gran sensibilidad que las hace particularmente adecuadas para la cuantificación de trazas en los medicamentos ya sea en líquidos biológicos o en órganos de animales, por lo que resultan auxiliares eficaces en estudios farmacocinéticas y de biodisponibilidad. Entre las técnicas más usadas se encuentran: la espectroscopia de absorción atómica, espectroscopia de emisión de plasma, espectroscopia UV-Visible, fluorimetría, conductimetría, potenciometría, cromatografía de HPLC , técnicas radioquímicas.

Determinación de constantes físicas y físico-químicas de los medicamentos, estas constantes características y propias de los productos farmacéuticos tales como el punto de fusión, peso específico, viscosidad, dureza, índice de refracción, rotación óptica, pH, humedad, etc. Estas técnicas son relativamente sencillas pero de uso frecuente en el proceso de fabricación y control de medicamentos.

1.6. CLASIFICACIÓN DE LAS TÉCNICAS INSTRUMENTALES

Los métodos analíticos utilizados en la química analítica se clasifican en métodos químicos e instrumentales, los métodos químicos se basan en las reacciones químicas y los métodos instrumentales surgen de la revolución tecnológica e industrial en la cual surgen una gran cantidad de técnicas instrumentales basadas en las interacciones materia-energía para los cuales no es

esencial una reacción química. Los métodos instrumentales se clasifican en: espectroscopía, electroquímica y cromatografía.

Los métodos instrumentales constituyen una herramienta importante para la evaluación de los productos farmacéuticos en los diferentes controles que existen durante el proceso de fabricación de un medicamento, permite conocer con precisión la composición de las materias primas, principios activos, excipientes entre otros.

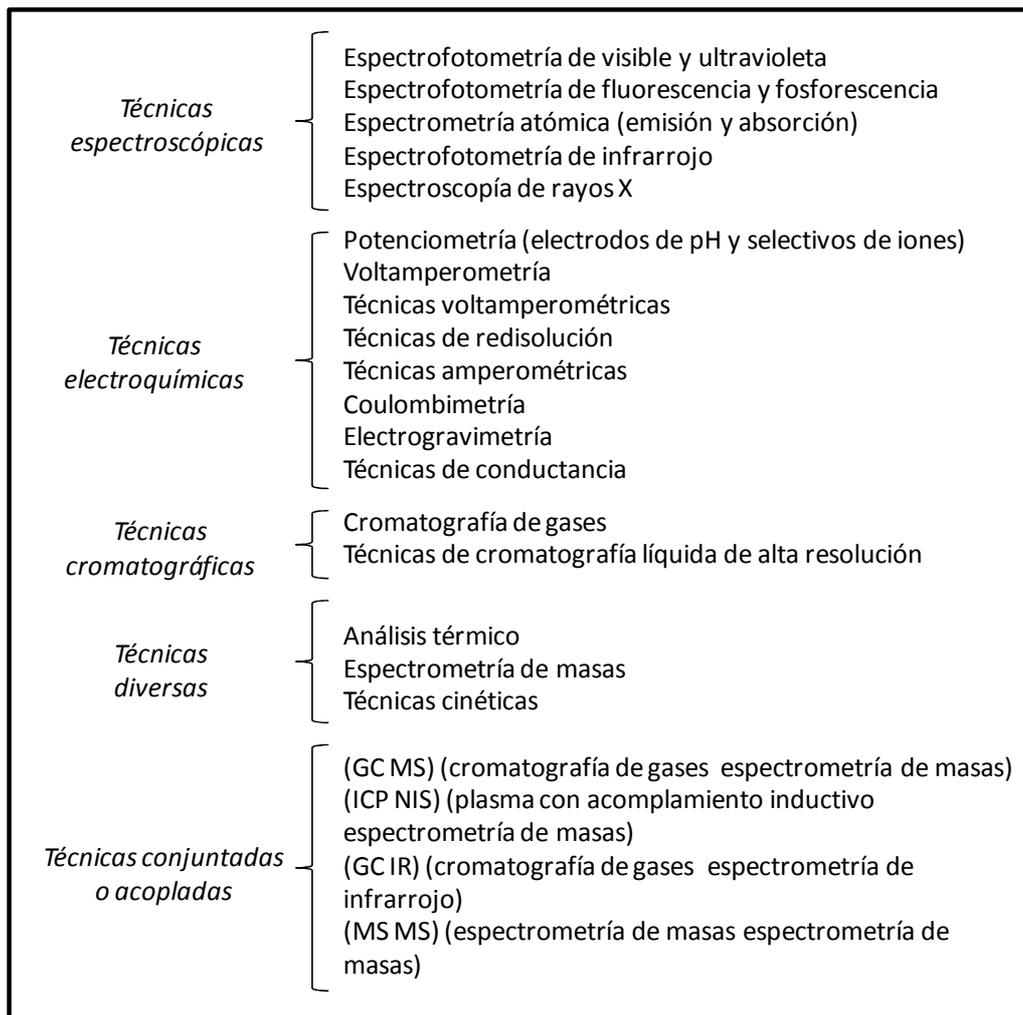


Figura 1.3 Clasificación de los métodos instrumentales

Fuente: Elaboración propia

CAPÍTULO 2

SEPARACIONES CROMATOGRÁFICAS

2.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA CROMATOGRAFÍA

La cromatografía es un método en el cual los componentes de una mezcla son separados en una columna adsorbente en una fase móvil (Weston y Brown 1997). La técnica fue desarrollada por el botánico ruso M.S Tswett en sus experimentos para la separación de pigmentos en plantas. La primera descripción del método se realizó en una publicación suya de 1903, posteriormente en 1906 publicó una descripción más detallada. El nombre de cromatografía que Tswett utilizó para describir esta técnica se deriva del griego *escribir en color* debido a que observó anillos (bandas) en sus columnas de carbonato de calcio, aunque puntualizó que no solo se podían separar sustancias coloreadas (Cela, Lorenzo et al. 2002).

Durante los siguientes 20 años, de acuerdo con (Cela, Lorenzo et al. 2002) la cromatografía no fue apenas del objeto de interés y solo existen algunos artículos hacia 1915, los trabajos de Lederer y Kunh en la separación de carotenoides coinciden con el inicio de esta nueva época. En 1936 se publica el primer libro dedicado a la cromatografía, dos años más tarde aparece la primera descripción de cromatografía en capa fina sobre un vidrio. En 1939 Brown utilizó la cromatografía circular en papel, en 1941 Martin y Synge introducen la cromatografía por partición en columna. En 1944 Consden, Gordon, y Martin publican los primeros artículos de cromatografía en papel. En 1947 Boyd, Tompkins, Spedding, Rieman, y otros trabajan con cromatografías de intercambio iónico para problemas analíticos.

Durante esos 20 años se conocieron prácticamente todas las variantes de la cromatografía, tal y como las conocemos hoy en día. En 1952 James y Martin desarrollaron de la cromatografía de gases. En 1959 aparece el primer artículo relativo a cromatografía en gel. A partir de la década de los sesenta nace el HPLC que ha jugado un papel fundamental en los laboratorios analíticos como de química orgánica y bioquímica. HPLC son las iniciales de High Performance Liquid Chromatography que ha sido traducido en formas diversas al castellano: Cromatografía Líquida de

alta resolución (CLAR), Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE), Cromatografía líquida de alta presión, etc. En este trabajo utilizaremos el acrónimo en inglés HPLC para designar la técnica.

La cromatografía es un método muy utilizado que permite la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas. Ningún otro método es tan potente y de aplicación tan general como la cromatografía (Skoog, West et al. 2005). Es difícil describir rigurosamente al término cromatografía, ya que se ha aplicado ese nombre a varios sistemas y técnicas. Sin embargo todos los métodos tienen en común el uso de la fase estacionaria y una fase móvil. Los componentes de una mezcla son transportados a través de una fase estacionaria por el flujo de una fase móvil, y las separaciones se basan en las diferencias de velocidad de migración entre los distintos componentes de la mezcla.

La característica que distingue a la cromatografía de la mayoría de los métodos físicos y químicos de separación, es que se ponen en contacto dos fases mutuamente inmiscibles. Una fase es estacionaria y la otra móvil. Una muestra que se introduce en la fase móvil es transportada a lo largo de la columna que contiene una fase estacionaria distribuida (Ferreira González y Universidad de Zaragoza. Servicio de Publicaciones 2007). Las especies de la muestra experimentan interacciones repetidas (repartos) entre la fase móvil y la fase estacionaria. Cuando ambas fases se han escogido en forma apropiada los componentes de la muestra se separan gradualmente en bandas en la fase móvil. Al final del proceso los componentes separados emergen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria. El componente menos retardado emerge primero, el retenido más fuertemente eluye al último. El reparto entre las fases aprovecha las diferencias entre las propiedades físicas y/o químicas de los componentes de la muestra.

Para explicar mejor el fenómeno cromatográfico nos basaremos en dos fundamentos; el primero se refiere a las propiedades físico-químicas de los analitos: solubilidad (tendencia a disolverse), adsorción (tendencia a ser retenidos en sólidos finamente divididos), volatilidad (tendencia a pasar a un estado gaseoso), tamaño, carga, reactividad química o bioquímica, etc. La mezcla a separar se coloca en una situación experimental donde observamos la solubilidad de los componentes en dos líquidos diferentes, como ocurre en cromatografía de líquidos, se debe de cumplir con las siguientes condiciones: Los componentes del sistema empleado deben de estar en íntimo contacto entre sí, y el equilibrio establecido entre estos componentes debe ser lo más completo posible.

El segundo fundamento se basa en el hecho de que es muy improbable que dos especies presenten cuantitativamente el mismo par de propiedades físico-químicas frente a un sistema cromatográfico dado, debido a estas diferencias, que pueden ser muy pequeñas, se basa la separación cromatográfica. Si transformamos la idea de un equilibrio estático establecido entre las fases, en un equilibrio dinámico, se tiene la realidad del fenómeno cromatográfico. La fase móvil fluye a través de la fase estacionaria.

Las propiedades de los componentes de una mezcla determinan su “movilidad” entre sí respecto a la fase móvil. Se eligen las condiciones experimentales y las fases cromatográficas para que los componentes de la mezcla se muevan a distinta velocidad. La base de la separación cromatográfica será la diferencia de velocidad de migración de los mismos. La cromatografía se puede aplicar a cualquier mezcla soluble o volátil, de hecho, algunos autores suelen dividir las técnicas de separación en cromatográficas y no cromatográficas. La elección de una técnica específica dependerá de la naturaleza y cantidad de muestra, del objetivo de la separación, la limitación del tiempo y equipo disponible.

Una primera distinción en cuanto a las técnicas cromatográficas se refiere a la integración continua o no de un sistema de detección, cualquier cromatógrafo ya sea de líquidos o gases lleva incorporado dicho sistema, en cambio en cromatografía plana no conlleva a un sistema de detección.

2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Para clasificar los métodos cromatográficos se deben de atender dos criterios básicos: el fundamento del proceso cromatográfico y lo que nos conduce a los **tipos de cromatografías**, y la forma en que se realiza el proceso cromatográfico, es decir, lo que constituye las distintas **técnicas cromatográficas** (Valcárcel y Gómez 2003).

2.2.1. TIPOS DE CROMATOGRAFÍA

Según el fundamento de separación los distintos tipos de cromatografía pueden clasificarse de acuerdo a la naturaleza de la fase estacionaria y la fase móvil.

1. Según la naturaleza de la fase estacionaria

1.a. Si es un sólido, cabe distinguir entre:

Cromatografía de adsorción: La fase estacionaria sólida absorbe al componente que inicialmente se encontraba en la fase móvil (líquida o gaseosa).

Cromatografía de intercambio iónico: En este tipo de cromatografía existen aniones como $-\text{SO}_3^-$ o cationes como el $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$, covalentemente unidos a la fase estacionaria sólida. Los iones en disolución de carga opuesta son atraídos por fuerzas electrostáticas.

Cromatografía de exclusión(o de geles): La fase estacionaria es un gel formado por polímeros no iónicos que separa moléculas por su tamaño, las moléculas de mayor tamaño pasan más rápidamente que las de menor tamaño.

Cromatografía de afinidad: Es un tipo especial de cromatografía, emplea interacciones específicas entre una clase de moléculas de soluto y una segunda molécula que esta covalentemente unida en la fase estacionaria.

1.b. Si es un líquido que se encuentra soportado por un sólido inerte se trata de *cromatografía de partición*

En la *cromatografía de partición o de reparto* utiliza una fase estacionaria (líquido o gas) sobre un superficie de soporte sólido, el soluto está en equilibrio entre el líquido estacionario y la fase móvil.

En la figura 2.1 se muestran los diferentes tipos de separación cromatográfica antes descritos. (a) Cromatografía de adsorción, (b) Cromatografía de intercambio iónico, (c) Cromatografía de exclusión molecular, (d) Cromatografía de afinidad, y (e) Cromatografía de partición o reparto.

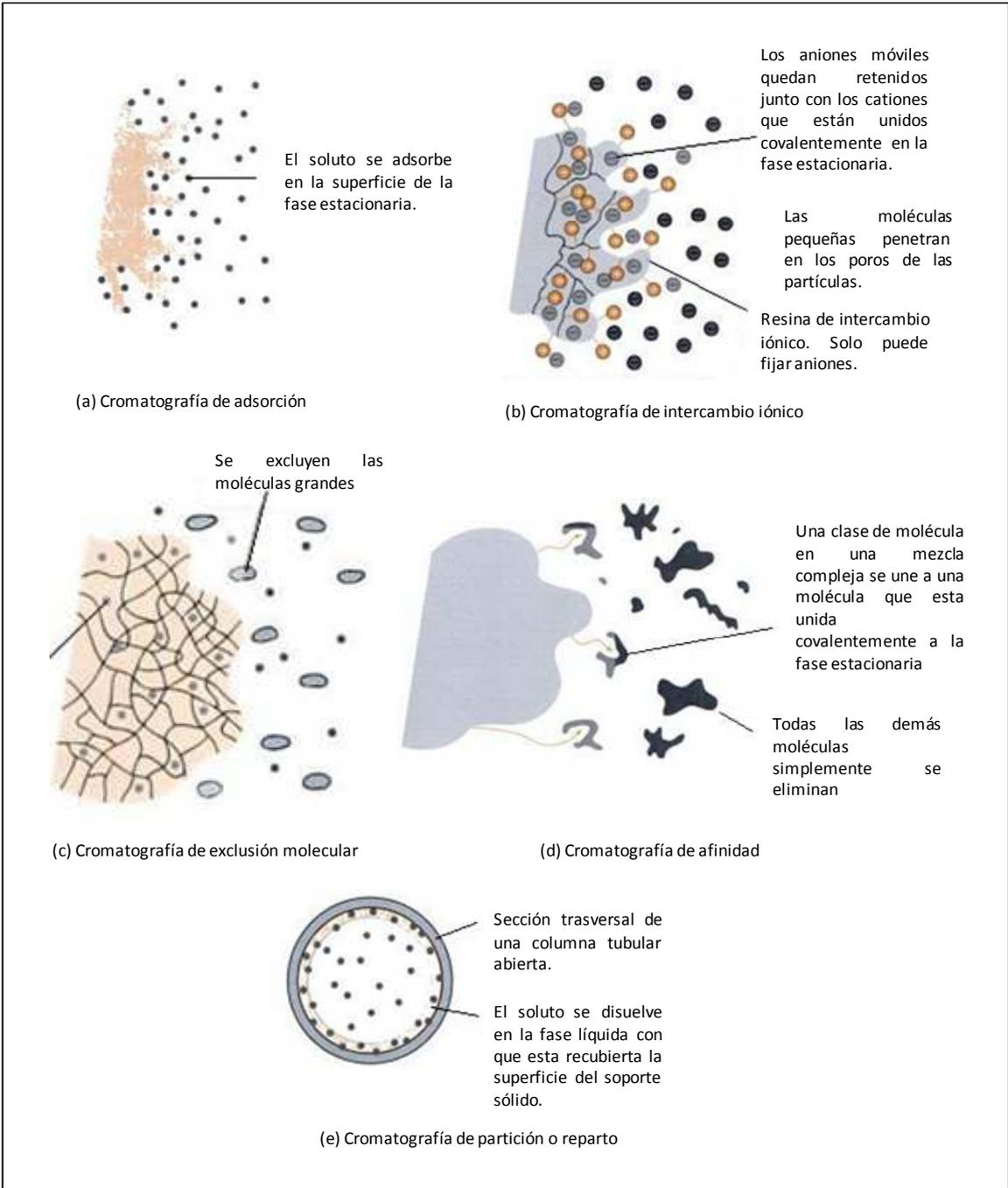


Figura 2.1 Tipos de separación cromatográfica.

Fuente: (Harris 2007)

2. Basado en el método de operación o el mecanismo por el cual una muestra es removida a través de una columna dependiendo de la naturaleza de la fase móvil líquido

2.a. Si es un líquido, cromatografía líquida, cabe distinguir:

Cromatografía líquido-líquido (CLL), ambas fases son líquidas por tanto se trata de una cromatografía de partición.

Cromatografía líquido-sólido (CLS), en la fase estacionaria es sólida (cromatografía de adsorción, intercambio iónico, exclusión, afinidad).

2.b. Si es un gas, cromatografía de gases:

Cromatografía gas-líquido (CGL), es un tipo de cromatografía de partición.

Cromatografía gas-líquido (CGS), es una cromatografía de adsorción.

2.c. Si es un fluido supercrítico (fluido calentado a una temperatura superior a una temperatura crítica, simultáneamente comprimido a una presión mayor a su presión crítica), se trata de *cromatografía de fluidos supercríticos (CFS)*, que puede ser de partición o adsorción.

En la figura 2.2. Se resume la clasificación de los tipos de cromatografía según la naturaleza de la fase móvil.

2.2.2. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Según la forma de llevar a cabo la separación cromatográfica, según el dispositivo o forma de obtener el contacto entre la fase móvil y la fase estacionaria, cabe distinguir dos grandes tipos de técnicas cromatográficas: en **columna** y **plana**.

Cromatografía en columna: En este tipo de cromatografía se utiliza un tubo cilíndrico, en el interior se coloca la fase estacionaria y a través de ella se hace pasar la fase móvil. El flujo de la fase móvil (líquido o gas) a través de la fase estacionaria se puede conseguir por presión, capilaridad o por gravedad.

Clasificación general	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía de gases	Gas-Líquido (GLC)	Líquido absorbido o unido a una	Reparto entre gas y líquido
Cromatografía líquida	Gas-Sólido	Sólido	Adsorción
	Líquido-líquido o	Líquido absorbido o unido a una	
	Líquido-sólido o	Sólido	Adsorción
	intercambio	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por	Líquido en los intersticios de un	Reparto/tamizado
	Afinidad	Líquido con un grupo específico	Reparto entre líquido
Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC)		Especie orgánica unida a una superficie sólida	Reparto entre fluido supercrítico y superficie unida

Tabla 2.1 Clasificación de los métodos cromatográficos

Fuente: (Skoog, Turiel Trujillo et al. 2005)

Cromatografía plana: La fase estacionaria se coloca en una superficie plana y se distinguen dos tipos de cromatografía plana:

- *Cromatografía en papel*, en la que el papel actúa como soporte de la fase estacionaria (cromatografía de partición).
- *Cromatografía en capa fina*, un sólido actúa como fase estacionaria, o como soporte de la fase estacionaria se extiende en una capa delgada sobre una placa, generalmente de vidrio, en la cromatografía plana está excluido el uso de un gas como fase móvil, por lo que ésta siempre es líquida.

2.3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EN COLUMNA

La cromatografía líquida en columna es una variedad de la cromatografía en la que la fase móvil es líquida y pasa a través de la fase estacionaria, sólida o líquida, que esta retenida en un recinto cilíndrico, la modalidad clásica de la cromatografía líquida en columna consiste en hacer pasar mediante gravedad la fase líquida sobre un soporte sólido (de diámetro de partícula grande), retenido en una columna recta, generalmente de vidrio de dimensiones considerables, varios centímetros de diámetro y una altura de 5 a 10 veces el diámetro y recogida del eluido en fracciones. El experimento de Twett fue de este tipo en 1903 aunque la cromatografía líquida en columna fue propiamente descrita por Kunh y Lederer en 1930.

La configuración clásica o a baja presión presenta varios inconvenientes desde el punto de vista clásico, es lenta y poco eficaz tanto en la capacidad de discriminar entre solutos así como el número de solutos que pueden separarse, es tediosa por la necesidad de la intervención de un operador a menos que se tenga un colector automático de las fracciones y no proporciona directamente un cromatograma, debido a estas razones las aplicaciones de la cromatografía líquida en columna fueron restringidas, en contraste con el desarrollo de la cromatografía de gases, que hacia los años setenta ya existían cromatógrafos de gases comercializados.

El la figura 2.2 muestra como se resuelven mediante elución dos componentes de una muestra, A y B, en una columna empaquetada. La columna consiste de un tubo de diámetro estrecho empaquetada con un sólido inerte finamente dividido que contiene la fase estacionaria sobre su superficie. La fase móvil ocupa los espacios abiertos entre las partículas de empaquetamiento. Inicialmente a t_0 , una disolución de muestra que contiene la mezcla A y B en la fase móvil se introduce en la cabeza de una columna como una porción estrecha, aquí los dos componentes se distribuyen entre la fase móvil y la fase estacionaria. Entonces se produce la elución, forzando a los componentes de la muestra a pasar a través de la columna mediante la adición continua de nueva fase móvil.

Con la primera introducción de nueva fase móvil, el eluyente (la porción de la muestra contenida en la fase móvil) desciende a lo largo de la columna, donde tiene lugar nuevos repartos entre la

fase móvil y la fase estacionaria (tiempo t_1). El reparto entre la nueva fase móvil y la fase estacionaria tiene lugar simultáneamente en el sitio original de la muestra.

La adición de más disolvente hace que las moléculas de soluto descendan por la columna en una serie continua de transferencias entre las dos fases. Dado que el movimiento del soluto solo puede ocurrir en la fase móvil, la velocidad media a la que el soluto se mueve depende de la fracción de tiempo que pase en la fase móvil. Esta fracción es pequeña para los solutos que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria (componente B en las figura 2.1 y grande cuando la retención en la fase móvil es más probable (componente A). En el caso ideal las diferencias resultantes en la velocidad hacen que los componentes de una mezcla se separen en bandas o zonas a lo largo de la columna, en la figura 2.2. se muestra la separación de una mezcla A y B por cromatografía de elución en columna (a) y la señal del detector a las distintas etapas de elución (b).

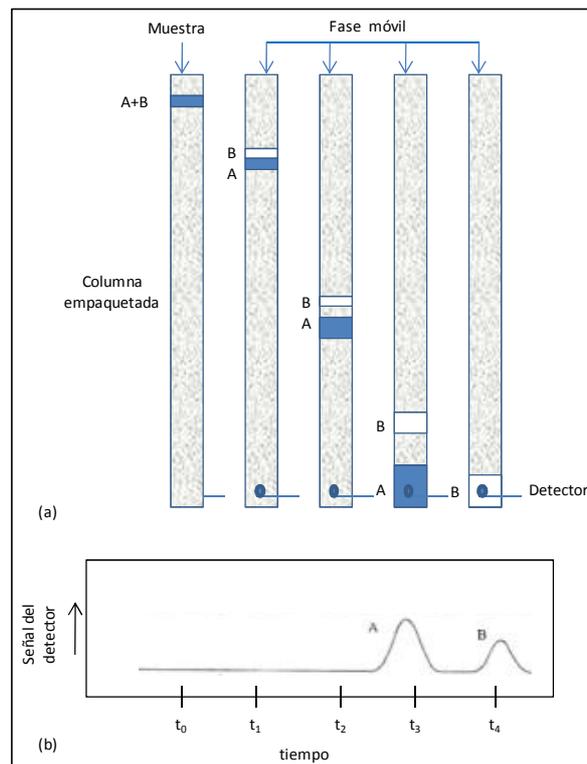


Figura 2.2 Separación cromatográfica.

Fuente: Elaboración propia, basado en (Skoog, Turiel Trujillo et al. 2005)

El aislamiento de las especie separada se consigue entonces haciendo pasar a través de la columna una cantidad suficiente de fase móvil para que las bandas individuales lleguen al extremo final sean eluidas de la columna), donde pueden ser recogidas o detectadas tiempos t_3 y t_4 como se puede observar en la Figura 2.3.

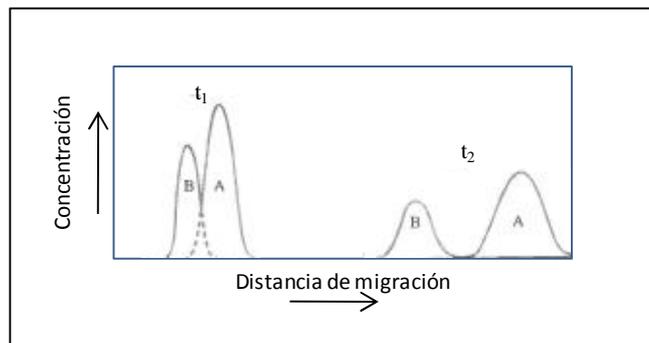
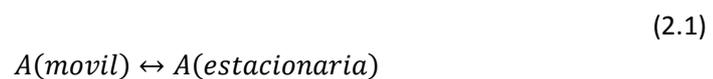


Figura 2.3 Perfiles de concentración del soluto A y B a dos tiempos diferentes.

Fuente: (Skoog, Turiel Trujillo et al. 2005)

Constante de distribución

Todas las separaciones cromatográficas se basan en las diferencias en el grado en que los solutos se distribuyen entre la fase móvil y la fase estacionaria. Para la especie de soluto a el equilibrio implicado se describe con la ecuación



La contante de equilibrio K_c de esta reacción se conoce como la constante de distribución, la cual se define como:

$$K_c = \frac{(a_A)_s}{(a_A)_M} \quad (2.2)$$

Donde a_A es la actividad del soluto A en la fase estacionaria y $(a_A)_M$ es la actividad en la fase móvil. A menudo se sustituye c_s , la concentración analítica molar del soluto en la fase estacionaria,

por $(a_A)_S$ y c_M por su concentración analítica molar en la fase móvil, $(a_A)_M$. Por lo tanto, la ecuación 2 suele escribirse como:

$$K_C = \frac{C_S}{C_M} \quad (2.3)$$

La constante de distribución, en el caso ideal es constante en un amplio intervalo de las concentraciones del soluto; es decir, C_S directamente proporcional a C_M . En la figura 2.5 el pico pequeño de la izquierda representa un soluto que no está retenido en la columna y, por lo tanto llega al detector inmediatamente después de iniciada la elución. Así su tiempo de retención t_M . Es aproximadamente igual al tiempo que requiere una molécula de la fase móvil para pasar a través de la columna.

2.3.1. CROMATOGRAMA

Un cromatograma representa la respuesta o señal del sistema de detección que se traduce visualmente en una pantalla o en un papel, la evolución de un parámetro que depende de la concentración instantánea del soluto a la salida de la columna, en función del tiempo, volumen de eluyente o distancia en el lecho cromatográfico. El cromatograma contiene la información analítica relativa a la muestra (número de picos, detección cualitativa o cuantitativa de uno o varios componentes) o del funcionamiento del sistema cromatográfico. Los aspectos termodinámicos y cinéticos de la separación cromatográfica quedan reflejados en el cromatograma, es decir, en la situación y forma del pico correspondiente a cada soluto analito.

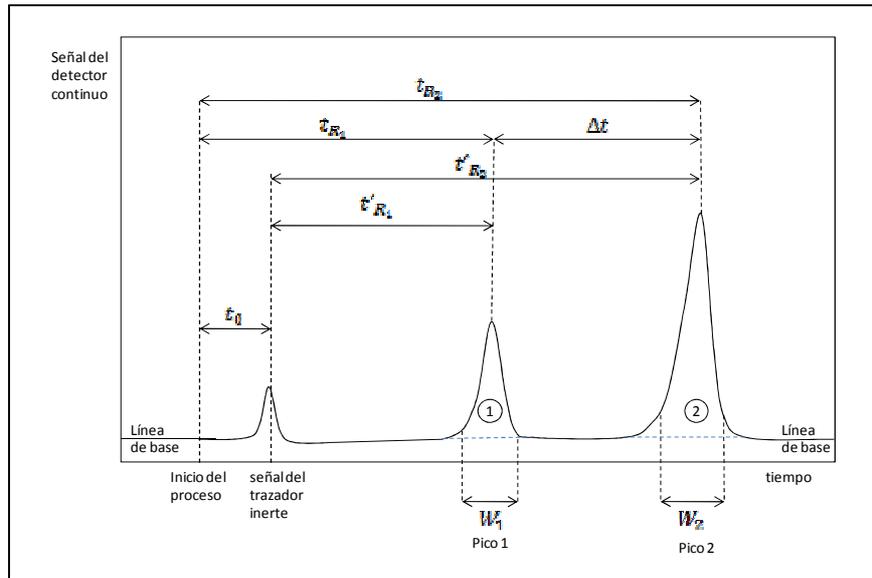


Figura 2.4. Cromatograma

Fuente: (Valcárcel y Gómez 2003)

2.3.2. RELACIONES DE TIEMPO

La situación de un pico esta especificada por la *retención* que se define como el retraso que sufre un analito en la columna cromatográfica en relación con una sustancia inerte(trazador), no retenida, que está sometida a las mismas condiciones de la muestra introducida en el sistema. Se denomina *tiempo muerto* (t_0) al intervalo de tiempo que transcurre desde que el trazador es insertado al principio del lecho cromatográfico hasta que sale del mismo, este tiempo se puede calcular si se conoce la velocidad media de la fase móvil (U) y la longitud de la columna (L), entonces $t_0=L/U$.

El tiempo de retención absoluto (t_R) de un soluto es el tiempo que transcurre desde la introducción hasta su salida y es siempre mayor que t_0 . Debido a la dificultad de marcar con precisión el instante en el que inicia el proceso es frecuente utilizar como origen de las abscisas del cromatograma, el momento en el que aparece el pico del trazador, que de manera general se incorpora previamente a la muestra, así se define el tiempo de retención ajustado t_R para un analito, este es el tiempo que transcurre desde que aparece el pico del trazador y el analito, entonces tenemos que:

(2.4)

$$t_R = t'_R + t_0$$

Uno de los parámetros de importancia es el *factor de capacidad o de retención* que nos sirve para caracterizar a un soluto en sistema cromatográfico, es adimensional y se define como:

(2.5)

$$K = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} = \frac{t'_R}{t_0}$$

El tiempo de retención absoluto queda:

(2.6)

$$t_R = t_0(1 + K)$$

2.3.3. RELACIONES DE VOLUMEN

En cromatografía en columna, la retención de un soluto puede evaluarse en función del volumen en lugar de tiempo ya que tienen mayor significancia práctica, las relaciones de volumen adquieren un significado físico químico. La cromatografía líquida la compresibilidad de la fase móvil puede despreciarse, por lo que los volúmenes de retención se calculan mediante el producto de sus correspondientes tiempos (minutos) por el flujo (F, expresado generalmente en mL/min).

(2.7)

$$V = tF$$

Así puede definirse, el *volumen muerto* de la columna (V_0), que es el volumen que ocupa la misma fase móvil:

(2.8)

$$V_0 = t_0F$$

El volumen de retención (V_R) que es el volumen de fase móvil necesario para que se realice la elución del soluto:

(2.9)

$$V_R = t_r F$$

El volumen de retención ajustado será:

(2.10)

$$V'_R = t'_r F$$

El factor de capacidad o retención es el mismo, por lo que los resultados entre si son:

(2.11)

$$K = \frac{t'_r F}{t_0 F} = \frac{V'_R}{V_0}; V_R = V'_R + V_0; V_0 (1 + K)$$

2.3.4. FACTOR DE SELECTIVIDAD

El factor de selectividad en un sistema cromatográfico es la medida de la diferencia de los tiempos de retención (o volúmenes) entre dos picos y describe que tan efectiva es la separación de dos compuestos. La selectividad es usualmente definida en términos de α como:

(2.12)

$$\alpha = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0} = \frac{V_2 - V_0}{V_1 - V_0} = \frac{k'_2}{k'_1}$$

La selectividad de una columna está en función principal del material de empacamiento, aunque también se puede obtener algo de control con el cromatógrafo usando la fase móvil y la temperatura. El valor de α puede estar alrededor de la unidad (1), cuando el tiempo de retención de dos componentes es idéntico ($t_1=t_2$), ∞ si el primer componente de interés es eluido en el

volumen muerto. Si α es aproximadamente 1, sin tomar en cuenta el número de platos teóricos o el tiempo en que los picos están en la columna, pueden no estar separados.

Para incrementar α se debe de cambiar la composición de la fase móvil, no es suficiente cambiar la concentración de la fase móvil, si alteramos la naturaleza de uno de los componentes puede ser suficiente. Por ejemplo en la figura 2.5 muestra el efecto de la separación de acetonaftaleno y dinitronaftaleno cambiando la fase móvil de 23% de diclorometano/77% pentano a 5% de piridina/95% pentano, el valor de α cambia de 1.05 cuando se utiliza diclorometano a 2.04 cuando se usa piridina.

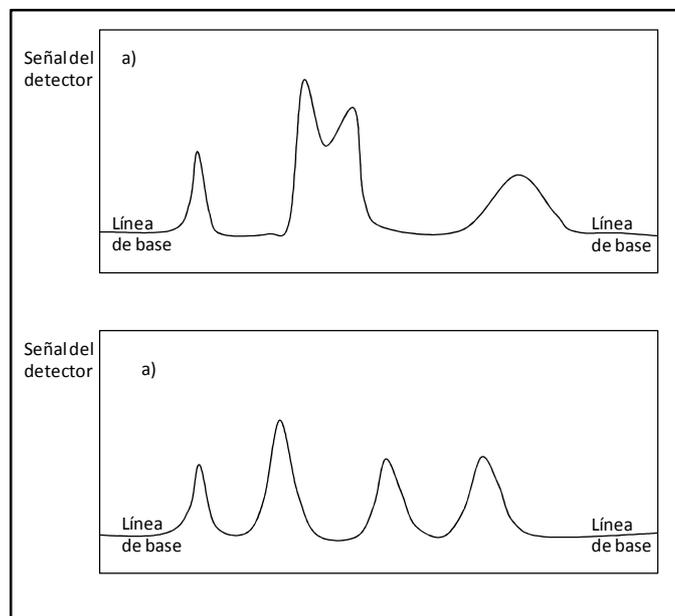


Figura 2.5. Efecto de la selectividad con en cambio de la composición de fase móvil.

Fuente: Basado en(Weston y Brown 1997)

La capacidad y la selectividad de la columna son variables que pueden ser controladas por el fabricante de columnas, la eficiencia y la resolución pueden ser controladas por el equipo de cromatografía, para obtener una mejor separación, la eficiencia cromatográfica puede ser mejorada si se minimiza el ensanchamiento de banda. La columna puede tener la capacidad de retener los solutos y una adecuada selectividad para resolver los analitos de interés (Weston y Brown 1997).

2.4. EFICIENCIA DE LA COLUMNA

Las características termodinámicas del comportamiento de un soluto, son las que determinan la situación de la zona, mancha o pico a través de las relaciones de tiempo, espacio o volumen, otro de los aspectos fundamentales que observamos en el cromatograma se denomina ensanchamiento de banda, que se puede definir como el área, zona o el ancho del pico cromatográfico. Este fenómeno ocurre porque al moverse la mezcla a través de la columna, los diferentes componentes interactúan y son retenidos varios grados por la fase estacionaria, esta interacción aunada al camino que deben atravesar los componentes a través del material de empaque, causa un incremento en el ancho de banda.

La eficiencia de la columna, es el número que describe ensanchamiento de los picos como una función de retención y es descrita en términos del número de platos teóricos. Una columna cromatográfica es más eficaz cuando menos son los ensanchamientos de banda que origina. Dos teorías fueron desarrolladas para describir la eficiencia de la columna, ambas son usadas en la cromatografía moderna. La teoría de platos propuesta por Martín y Synge provee una simple y conveniente ruta para medir el desempeño y eficiencia, mientras que la teoría desarrollada por Deemter et. al., provee un significado de las contribuciones del ensanchamiento de banda de modo que se optimiza la eficiencia.

2.4.1. ALTURA DE PLATO

La expresión empírica derivada en la teoría de plato teórico es generalmente aplicable a todos los tipos de columnas cromatográficas, aunque las relaciones solo son validas únicamente para picos gaussianos, por conveniencia son también aplicados a picos no simétricos. El mejor supuesto en la teoría de plato teórico es que existe un equilibrio instantáneo establecido por el soluto entre la fase estacionaria y la fase móvil. La desventaja de la teoría de plato teórico es que no considera los efectos del ensanchamiento de banda en la separación, ni la influencia de variables como el tamaño de partícula de la fase estacionaria, viscosidad del eluyente y el caudal en el rendimiento de la columna.

El modelo propuesto en la teoría de platos, la columna cromatográfica es considerada como un número consistente de laminas o "platos" que permite el equilibrio entre la fase estacionaria y la

fase móvil. Mientras más grande sea el número de platos teóricos (N), la columna es más eficiente. El movimiento del soluto a través de la columna es considerado como una transferencia gradual de un plato teórico al siguiente. Cuando más fino es el plato teórico mayor es número, esto puede ser previsto a una determinada longitud de la columna.

(2.13)

$$H = \frac{L}{N}$$

Donde L es la longitud de la columna (en milímetros). Así mientras menor sea la altura de un plato teórico (H), mayor es la eficiencia de la columna. En general el valor de H es pequeño para fases estacionarias de tamaño de partícula pequeño, flujos bajos de fase móvil, baja viscosidad de la fase móvil, altas temperaturas de separación y moléculas pequeñas de soluto.

La eficiencia N, está definida en términos del tiempo de retención (t_R) del soluto, medido en la base del pico, y la desviación estándar, σ , de la población del soluto como:

(2.14)

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 = \frac{t_R^2}{\sigma^2}$$

Donde la σ para un pico gaussiano esta dad por:

(2.15)

$$\sigma = \frac{W_{50}}{2.345} = \frac{W_T}{4} = \frac{W_{4.4}}{5}$$

Como se muestra en la figura 2.6 W es el ancho del pico a diferentes alturas en la curva, N puede ser calculado de diferentes maneras dependiendo de donde se mida el ancho. La más comúnmente usada para el cálculo de N es el método de la tangente debido a su relativa simplicidad, pero el método de 5σ provee de una gran sensibilidad de la colección del pico. En la tabla 2.2 se muestran los diferentes métodos para calcular N.

Método	Fórmula
Altura media del pico	$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{50}} \right)^2$
Tangente	$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_T} \right)^2$
5 σ	$N = 25 \left(\frac{t_R}{W_{4.4}} \right)^2$

Tabla 2.2 Métodos utilizados para el cálculo de N.

Fuente: (Weston y Brown 1997)

La eficiencia puede variar de acuerdo a los parámetros físicos de la columna como la longitud, el diámetro, el material de construcción de la columna, también se puede variar cambiando los parámetros químicos como el tamaño de partícula del material de empacamiento o la velocidad de la fase móvil.

2.4.2. ENSANCHAMIENTO DE BANDA

Existen tres mecanismos predominantes para el transporte del soluto a través de la columna cromatográfica (1) transporte convectivo de la fase móvil a medida que fluye entre las partículas de la columna, (2) transporte difusivo a través de la fase móvil estancada en la columna empaquetada y (3) transporte perfusivo a través de los poros de las partículas. La teoría desarrollada por Van Demmter y posteriormente modificada, considera los factores de difusión que contribuyen al ensanchamiento de banda en la columna (varianza de la columna, σ^2_{col}).

Ecuación general de Van Demmter:

(2.16)

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu$$

Donde H representa la eficiencia de la columna y μ el promedio de la velocidad lineal de la fase móvil, el término de A representa la contribución del ensanchamiento de banda por difusión de remolinos, el término B representa la contribución de la difusión longitudinal y C representa la contribución para la resistencia a la transferencia de masa. La difusión no está restringida al transporte de soluto a través de la fase móvil estancadas, sin embargo también ocurre que el soluto es llevado por transporte convectivo entre las partículas en la columna. Huber encontró que existen al menos cuatro términos que deben de ser considerados para definir adecuadamente la eficiencia de una columna, y la contribución de estos factores a la eficiencia son descritos en la ecuación modificada de Van Deemter:

(2.17)

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C_s \mu + C_m \mu$$

En la ecuación C representa la contribución del ensanchamiento de zona para la resistencia a la transferencia de masa en la fase estacionaria y la fase móvil respectivamente.

Debido a que H representa la varianza de la columna o el ensanchamiento de banda, el valor de H puede mantenerse en el mínimo. Una forma de determinar las condiciones experimentales que puedan minimizar la zona de dispersión y maximizar la eficiencia es proporcionado por el uso de la curva de Van Deemter es una gráfica que muestra la altura del plato en función de la velocidad lineal de la fase móvil (Figura 2.6). Los datos son determinados experimentalmente usando medidas del tiempo de retención, volumen vacío o volumen muerto, y el ancho de pico para determinar N, y por lo tanto, H a diferentes caudales. De acuerdo con la curva a flujos por debajo del óptimo, la eficiencia depende de los efectos de difusión (término B). A flujos altos la eficiencia disminuye a causa de la transferencia de masa, o C, término cada vez más importante, en la figura 2.6 el término de A es una constante independiente del flujo.

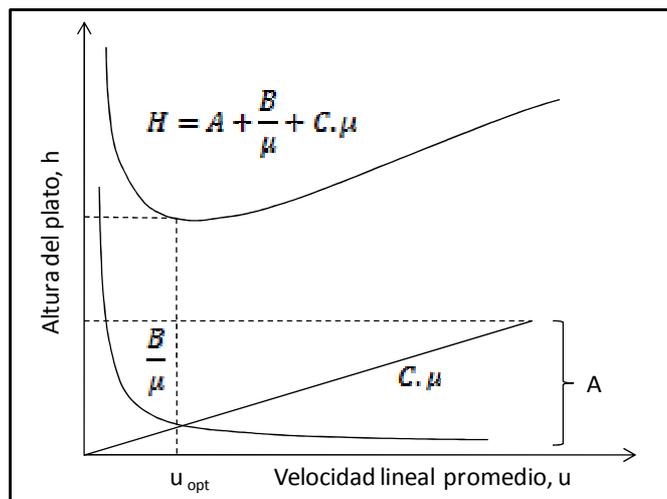


Figura 2.6 Curva típica de la Van Deemter

Fuente: (García de Marina y Castillo 1988)

A pesar de la reducción de la eficiencia a caudales altos, es común operar el sistema a flujos altos para ahorrar tiempo y costos de operación, por lo tanto, la curva puede ser usada para determinar las mejores condiciones para minimizar el tiempo de análisis consistente con un valor de H aceptable.

Difusión por remolinos.

La no homogeneidad en las velocidades de flujo y en la longitud de los caminos alrededor de las partículas del empaque es el primero de los factores. Deben existir caminos de flujo de longitud desigual a través de cualquier empaçado que no sea perfecto. Algunas moléculas de soluto de una especie única pueden ser barridas a través de la columna cerca de la pared, donde la densidad del empaçado es comparativamente baja, en particular en columnas de diámetro pequeño. Otras moléculas del soluto pasan por el centro de la columna, con un empaçado más compacto y a una correspondiente menor velocidad. Las moléculas que siguen un camino más corto eluyen antes que aquellas que siguen caminos más erráticos (y largos). Esto provoca para cada soluto un ensanchamiento de la banda de elución.

Para minimizar el efecto, las partículas del empaque deben tener un diámetro promedio tan pequeño y deben ser empacadas tan uniformemente como sea posible. Por supuesto, conforme

las partículas son más pequeñas, la presión necesaria para impulsar la fase móvil a través de la columna será mayor y más difícil será empacar la columna de manera uniforme. De todas formas, debido a la mayor eficiencia que se obtiene con partículas de menor diámetro, la longitud de la columna puede reducirse en alguna medida. Debe establecerse un compromiso entre el tamaño de las partículas, la longitud de la columna y la presión requerida. En cromatografía gas líquido, cuando se utilizan películas en el interior de las columnas capilares el término es despreciable.

Difusión longitudinal

La difusión longitudinal, o axial es el movimiento molecular aleatorio dentro de la fase móvil, es un segundo proceso que produce ensanchamiento del pico. La contribución de la difusión longitudinal a la altura del plato es significativa sólo a velocidades bajas de fase móvil. Entonces, las velocidades altas de difusión del soluto en la fase móvil pueden causar que las moléculas se dispersen axialmente mientras emigran lentamente a través de la columna. Si esto pasa se produce ensanchamiento del pico.

Transferencia de masa

La resistencia a la transferencia de masa del soluto en la superficie de la fase estacionaria figura 2.7 (b) es otro factor que contribuye al ensanchamiento del pico. El movimiento molecular lento dentro de la fase estacionaria significa un mayor tiempo de residencia en esta fase de una molécula de soluto, mientras que otras moléculas avanzan con la fase móvil. Conforme la fase móvil se mueva más rápidamente a través de la columna y más lenta sea la transferencia de masa, más ancha será la banda del soluto que eluye de la columna. Se deben escoger líquidos no viscosos para la fase estacionaria de manera que el coeficiente de difusión no sea indebidamente pequeño. Es benéfico reducir el espesor de la fase estacionaria, aunque disminuye la capacidad de la columna.

Otro término que afecta a la anchura de banda es el correspondiente a la resistencia a la transferencia de masa radialmente entre líneas de corriente de fase móvil adyacentes. (Figura 2.7) Disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria siempre es útil para reducir la altura del plato. En cromatografía líquida en columna, en contraste con la cromatografía gas líquido, las

mayores diferencias provienen de (1) la disminución en un factor de 10000 en el valor del coeficiente de difusión del soluto en la fase móvil cuando la fase móvil está constituida por un líquido en lugar de un gas y (2) la presencia de zonas de fase móvil estancada, atrapada dentro de los poros y canales de la fase estacionaria. Las moléculas de soluto se mueven por difusión hacia dentro y hacia afuera de estos poros, figura 2.7. Estas moléculas se retrasan en su movimiento hacia adelante, relativo a la banda principal de un soluto dado, y nuevamente se produce un aumento en la dispersión molecular.

También la velocidad de la fase móvil difiere entre un punto y otro debido a las perturbaciones provocadas por las partículas de soporte. Las líneas de corriente del líquido de la fase móvil cercanas a los límites de las partículas se mueven lentamente, mientras que las líneas de corriente cercanas al centro entre partículas se mueven más rápidamente. Por difusión lateral las moléculas de soluto se transfieren constantemente a una línea de corriente diferente. Por lo tanto, la obstrucción del camino de una molécula de soluto se debe tanto a la difusión entre líneas de corriente, como a la necesidad de viajar alrededor de las partículas de la fase estacionaria.

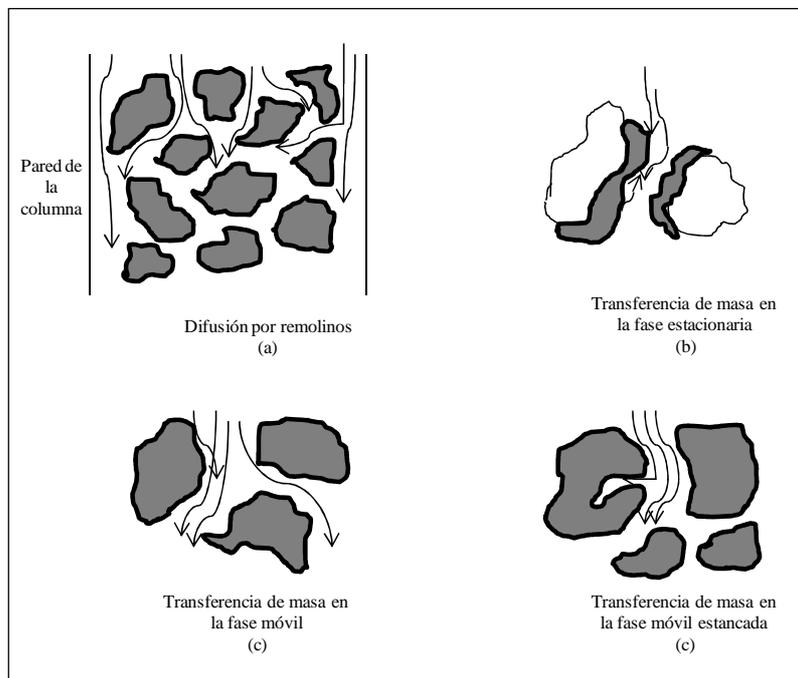


Figura 2.7 Contribuciones al ensanchamiento de banda.

Fuente: (Katz, Eksteen et al. 1998)

El efecto de zonas estancadas se puede minimizar de varias formas. La estructura interna del empaque se puede hacer impenetrable; un ejemplo son los empaques peliculares con un núcleo sólido y la superficie recubierta. La reducción del diámetro de las partículas es muy efectiva. También se puede elegir soportes que tengan poros muy amplios, de forma que el líquido fluya fácilmente hacia dentro y hacia afuera y aun a través de los canales de los poros.

2.5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

Para que la cromatografía líquida en columna sea una modalidad competitiva en comparación a la cromatografía de gases, se necesita trabajar a elevadas presiones en lugar de utilizar solo la fuerza de gravedad para hacer pasar la fase móvil a través de la fase estacionaria. Así lo predijo Giddings en 1965 y se desarrollaron las primeras aplicaciones con Kirkland, Huber y Holvach hacia 1967.

Una presión entre 500 y 5000psi de fase móvil permite reducir el tamaño de partícula de la fase estacionaria, que aunque muy empaquetada, deja que la fase móvil atraviese, de esta manera se aumenta la eficiencia de separación, también se reduce drásticamente el tiempo de separación de 5 a 50 veces en comparación con la modalidad de baja presión. Esta nueva modalidad permitió también la detección continua del eluido, es decir un instrumento que separa y suministra la información cualitativa y cuantitativa.

Entre las técnicas cromatográficas más conocidas cuya fase móvil es un líquido, la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es la más conocida y la que trataremos en este trabajo, el éxito de esta técnica cromatográfica se debe a la posibilidad de actuar de forma muy precisa sobre la selectividad de los compuestos a través de la elección de la columna y de la composición del eluyente, es decir, aprovechar las interacciones disolución/fase móvil/fase estacionaria, el intercambio de iones o las de interacción hidrofóbica aumenta aun más las posibilidades del HPLC.

La técnica por HPLC constituye una técnica analítica de uso muy generalizado, deriva de una evolución de la cromatografía preparativa en columna, cuyos resultados, en términos de selectividad y resolución, han mejorado mucho por la miniaturización y la utilización de fases estacionarias muy elaboradas. Estas fases constituidas generalmente por partículas esféricas cuyo diámetro se encuentra de entre 2 y 5 μ m, provocan una pérdida de presión importante en la

columna. Por lo tanto, es necesario aplicar una fuerte presión a la fase para obtener un caudal conveniente.

2.5.1. INSTRUMENTACIÓN EN HPLC

La cromatografía líquida en columna, se desarrolla en instrumentos llamados cromatógrafos, el cual proporciona información sobre la composición al tener un detector continuo integrado en el sistema hidrodinámico cromatográfico. En la figura 2.7 se muestra un diagrama esquemático de los componentes de un cromatógrafo de líquidos

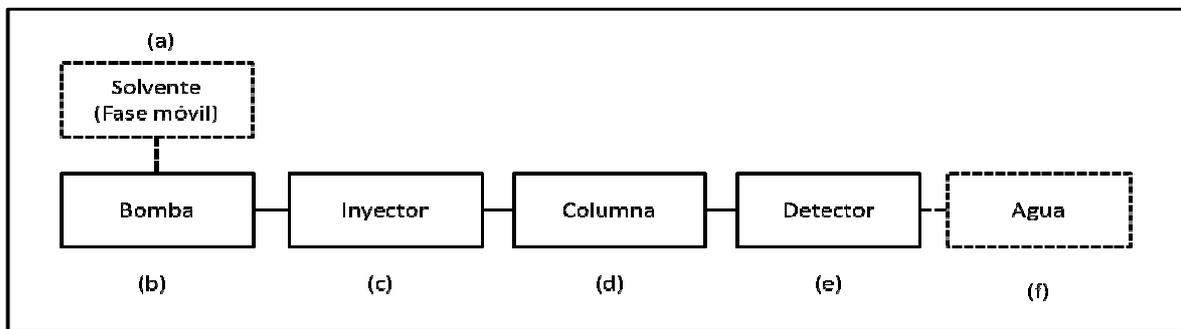


Figura 2.7 Diagrama básico de un sistema de HPLC

Fuente: (Weston y Brown 1997)

El cromatógrafo consiste de un contenedor del disolvente (Fase móvil), (b) una bomba que mueve el eluyente y la muestra a través del sistema, (c) un inyector de la muestra, (d) una columna que provee el soluto de separación, (e) un detector que nos permite visualizar la separación de los componentes y (f) un recipiente de residuos. En la figura 2.8 se puede observar un equipo de HPLC , es un ejemplo de una instalación modular, aquí se muestra un equipo modelo HP1200 que incluye un inyector automático que, que permite el funcionamiento continuo, un controlador de temperatura de la columna, los compuestos que son eluidos , después de su paso por el detector UV .

En la actualidad existen una gran cantidad de cromatógrafos en el mercado, existen dos grandes opciones según la concepción instrumental, la más económica y versátil responde a un diseño modular como el ejemplo de la figura 2.8, de tal manera que sobre el diseño básico puedan ir

acoplándose o sustituyéndose, diversos módulos o sustituir los detectores, cada vez es más frecuente en el mercado la opción integral que tiene la ventaja de control único a través de un microprocesador, lo que sin duda reduce la intervención humana y eleva la seguridad del proceso analítico , pero tiene los inconvenientes de la falta de flexibilidad (los módulos no pueden operar independientemente) y su elevado costo.

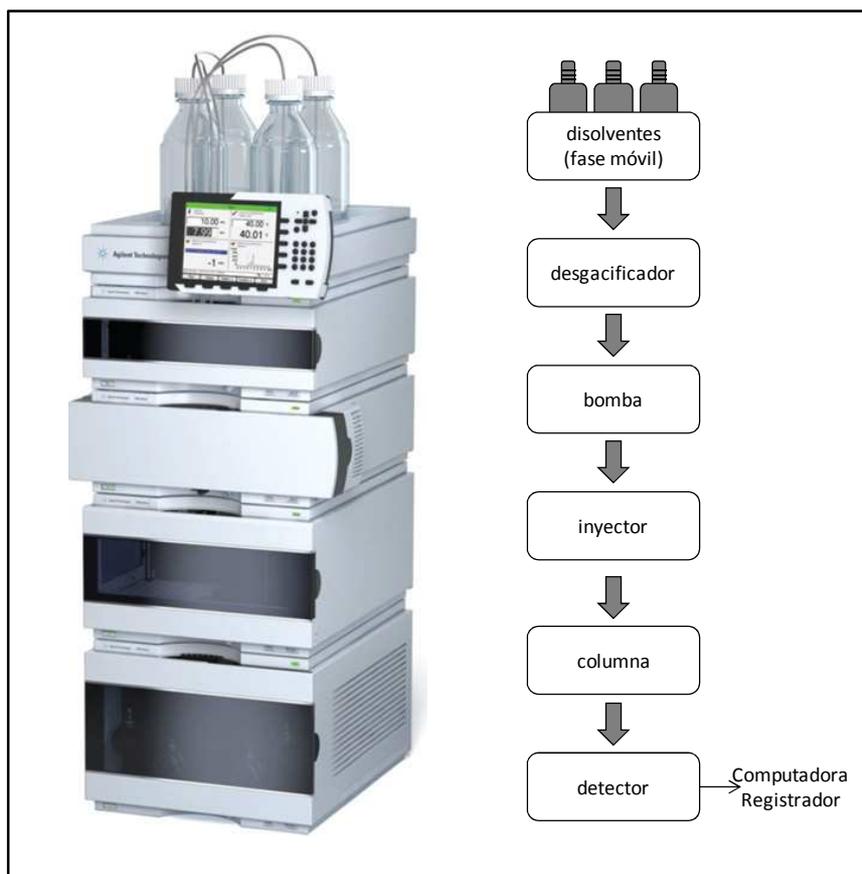


Figura 2.8 Equipo de HPLC modelo HP1200

Fuente: Elaboración propia

2.5.2. BOMBAS

Los equipos de HPLC utilizan al menos una bomba para forzar el paso de la fase móvil a través de la columna cuyo relleno, muy compacto, es responsable de una sobrepresión muy importante a nivel del inyector, esta presión puede alcanzar 20,000 KPa (200 bares) según el caudal de la fase

móvil, su viscosidad y el tamaño de partículas en la fase móvil. Se utilizan bombas de alta presión diseñadas para mantener un caudal sin pulsos y estable, incluso cuando la composición de la fase móvil varía, estas bombas pueden ser de un solo pistón o bien llevar dos pistones que funcionan en oposición y situados en serie para evitar las interrupciones de caudal que resultan de la fase de relleno. Para regular el caudal, el desplazamiento de los pistones se controla por un motor de pasos asociado a una leva de forma particular.

En la figura 2.8 podemos observar el funcionamiento de dos pistones en serie el embolo que se encuentra en la parte de abajo expulsa una cantidad de disolvente del doble a la del embolo de arriba, debido a que su diámetro es mayor, (a) y (b). En (a) El volumen del eluyente almacenado en el cilindro corresponde al embolo B y es enviado a la columna, mientras tanto el embolo A aspira una nueva cantidad del eluyente, en (b) cuando el embolo expulsa el eluyente, la mitad de este rellena el cilindro del embolo B, y de esta manera regula el caudal. En (c) se tienen dos émbolos de igual diámetro pero uno de ellos tiene un recorrido y una velocidad del doble de la del otro. En el grafico se observa las variaciones del flujo en función del movimiento de los émbolos.

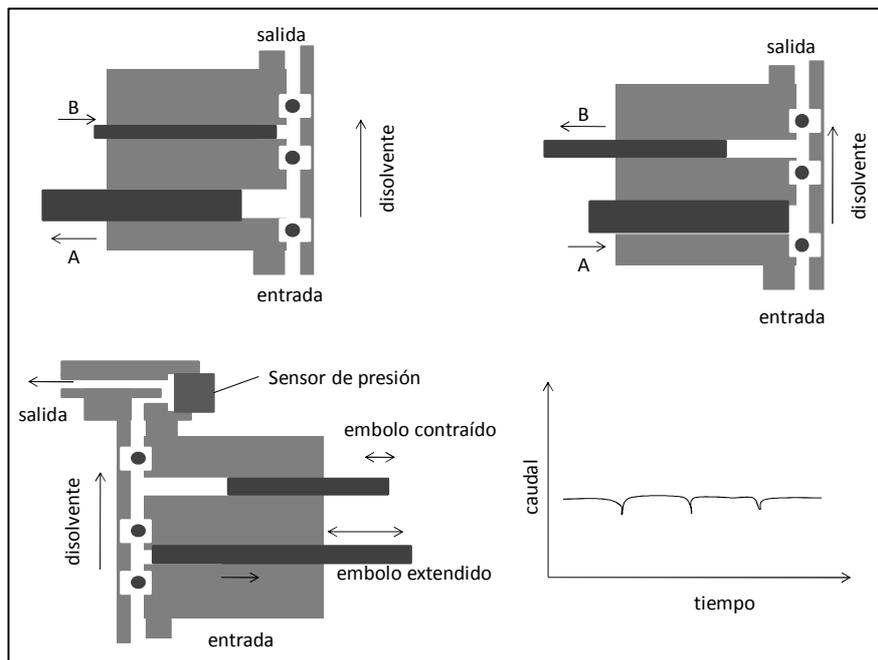


Figura 2.9 Bomba de dos pistones en serie
Fuente: Basado en (Rouessac, Rouessac et al. 2003)

Dependiendo de su diseño, los cromatógrafos pueden incluir una o varias bombas, situada en la entrada o en la salida, estas están asociadas a una cámara de mezcla. Las bombas permiten liberar un eluyente de composición fija (modo isocrático), o de composición variable para hacer un gradiente de elución. Para un sistema por gradiente se debe de tener en cuenta que la composición de la mezcla no se modifique por acción de la presión.

2.5.3. INYECTORES

La inyección de un volumen preciso de muestra debe hacerse a la entrada de la columna en un corto periodo de tiempo para perturbar lo menos posible el régimen de circulación establecido por columna y el detector, para ello se utiliza una válvula de alta presión de varias vías manual o automatizada, en el caso de inyectores automáticos, esta válvula debe de resistir presiones que puedan sobrepasar los 30,000KPa, En la figura 2.10 se puede observar el funcionamiento de una válvula para HPLC, la cual funciona en dos tiempos:

- a) *Posición de carga*, la bomba y la columna están conectadas, la muestra es introducida a presión atmosférica, con la ayuda de una jeringa en un depósito tubular denominado bucle, este puede ser de diferentes volúmenes, puede ser exterior o puede estar integrado en el bloque de la válvula
- b) *Posición de inyección*, la muestra es introducida en el flujo de la fase móvil por una rotación de la palanca de 60° que permite invertir el sentido de circulación del bucle, el volumen inyectado debe de ser unas 5 a 10 veces mayor que la del bucle.

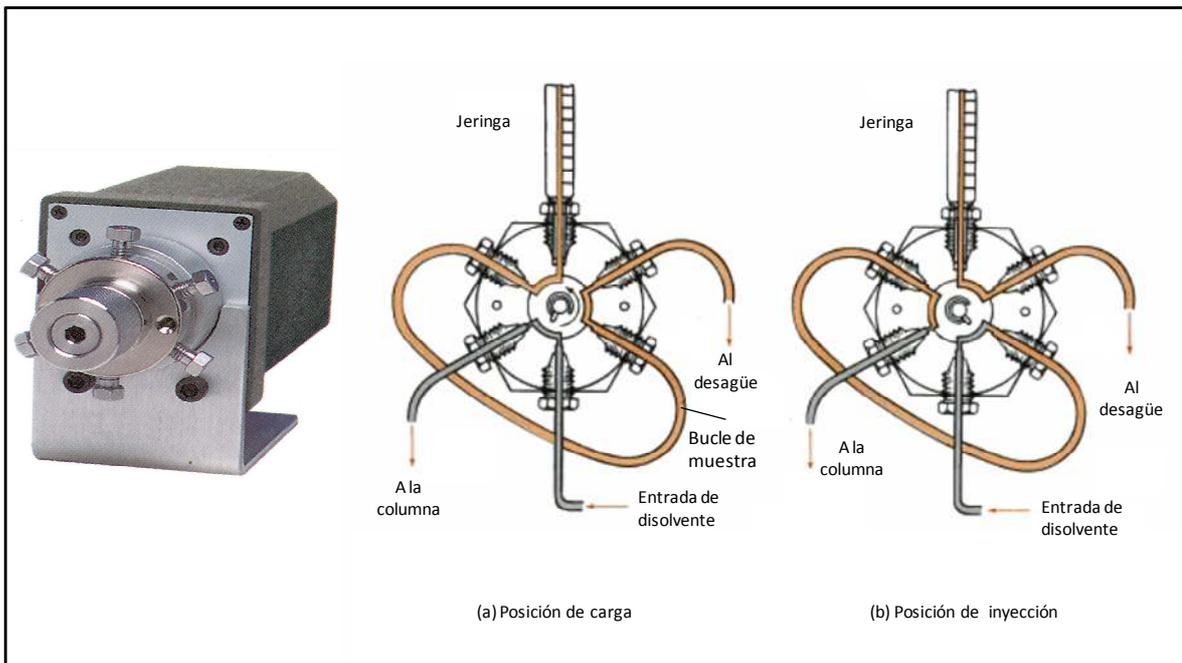


Figura 2.10 Válvula de inyección utilizada en HPLC
Fuente: Elaboración propia basado en (Harris 2007)

2.5.4. COLUMNAS

La columna es la parte esencial del cromatógrafo, ya que en ella a través de diferentes mecanismos (absorción, partición, intercambio iónico exclusión, etc.), tiene lugar la separación o discriminación entre analitos e interferentes. El gran aumento de la eficiencia cromatográfica de HPLC respecto a la alternativa clásica se basa en la disminución del tamaño de partícula de la fase estacionaria, lo que implicó un aumento en la presión de trabajo. Para la reproducibilidad de los datos es necesario que exista una gran homogeneidad en la distribución de la fase estacionaria, esto implica la necesidad de que existan técnicas precisas y complejas de preparación de las columnas.

En la actualidad en el mercado existen una gran variedad de columnas cromatográficas y en la tabla 2.3 podemos observar las características geométricas distribución básica de las columnas convencionales para cromatografía líquida clásica de las columnas y su material de relleno, así como las condiciones hidrodinámicas de trabajo.

Las columnas para HPLC convencionales, las primeras que se usaron fueron las de empaquetamiento de película. El material (fase estacionaria) consiste en bolitas esféricas regulares (30-70 μ m) de un sólido no poroso generalmente de vidrio, recubiertas de una capa (1-3 μ m) de material activo cromatográfico poroso de naturaleza polimérica. Debido a la densidad elevada de las mismas, se logra un empaquetamiento uniforme de la columna. La distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria es más factible si se tratara de moléculas porosas del mismo tamaño.

Características geométricas	Cromatografía clásica	HPLC		
		Empaquetamiento de la película	Micro particular	Micro columnas
Diámetro columna (mm)	20-70	1-3	2-6	0.05-1
Longitud columna (cm)	200-100	50-100	10-50	10 ³ -5X10 ³
Diámetro de partícula	150	30-70	5-10	5-30
Presión (atm)	1	30-50	100-200	150-250
Caudal (mL/min)	0.1	0.5-5.0	1-2	10 ⁻⁴ -5X10 ⁻²

Tabla 2.3 Características generales de las columnas cromatográficas empleadas en HPLC

Fuente: (Valcárcel y Gómez 2003)

La capacidad y eficiencia de la columna con el tipo de empaquetamiento antes mencionado aumenta cuando se sustituye el recubrimiento posterior por un tratamiento especial de las esferas de vidrio (30-60 μ m) para que adquieran una micro zona externa (1-3 μ m), también de vidrio, el volumen de poro de estas esferas es muy pequeño, lo que origina una rápida difusión de los solutos en ambos sentidos, debido a esta característica son adecuadas cuando se requiere un gran velocidad de determinación. En la figura 2.11 se muestra una columna de acero utilizada comúnmente en HPLC.

A medida la columna está precedida de una pre-columna corta, denominada guardacolumna, rellena de la misma fase estacionaria que retiene los compuestos y así se logra aumentar la duración de la vida de la columna cromatográfica, periódicamente se cambia esta precolumna. No obstante antes del análisis, es aconsejable pasar las muestras por un filtro de porosidad menor a $0.5\mu\text{m}$.

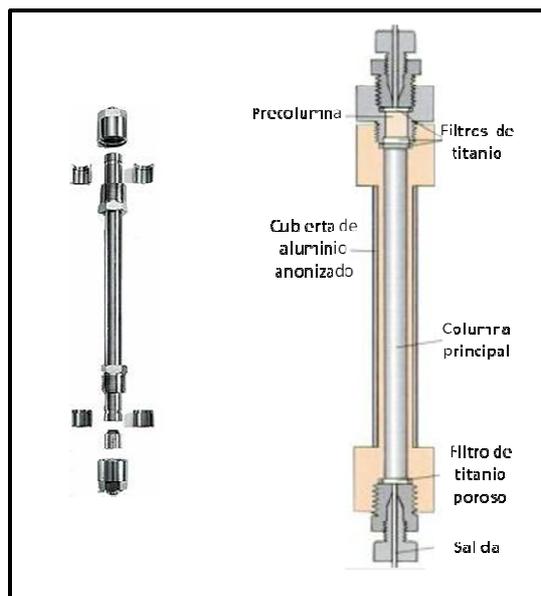


Figura 2.11 Columna de acero

Fuente: (Harris 2007)

2.5.5. FASE ESTACIONARIA

Existen varios materiales orgánicos e inorgánicos que sirven para el relleno de las columnas, uno de los más comúnmente usado es el *gel de sílice*, sólido amorfo rígido cuya fórmula es $\text{SiO}_2(\text{H}_2\text{O})_n$ (con n muy próximo a cero), se utiliza convenientemente transformado, en el 80% de aplicaciones. Este material básico, completamente diferente a la sílice cristalina (SiO_2), pero que puede servir de materia prima para su síntesis, se prepara en forma de esferas (porosas o no) con un diámetro muy regular de unos 2 a $5\mu\text{m}$. Estas partículas esféricas de dimensión homogénea aseguran un relleno compacto de las columnas que evita la aparición de caminos preferenciales para la fase móvil.

El gel de sílice es un material muy polar, el cual tiene una distribución de red tridimensional, no tiene una estructura ordenada como la sílice cristalina, es un polímero inorgánico reticulado (figura 2.12) que conlleva *agrupaciones silanoides* de número variable, que han resistido a la fase final de cocción . Estas agrupaciones son las responsables de las propiedades catalíticas ácidas.

La calidad de un gel de sílice para cromatografía depende de varios parámetros como por ejemplo la estructura interna, el tamaño de los granos, la porosidad abierta (dimensión y distribución de los poros), la superficie efectiva, la resistencia a la compresión y la polaridad.

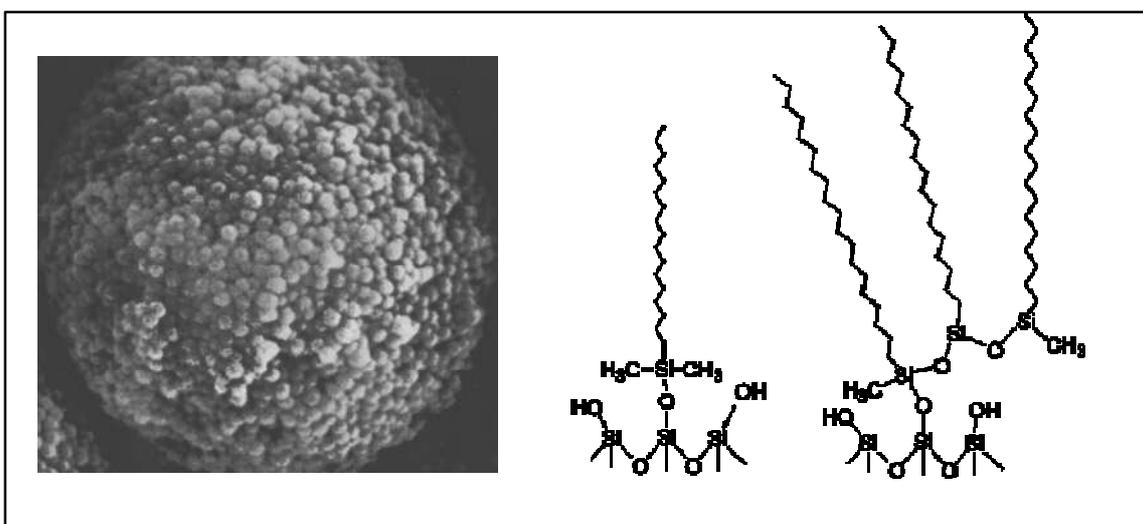


Figura 2.12 Estructura del gel de sílice para cromatografía.

Fuente: Elaboración propia

A pesar de tener una capacidad de adsorción elevada, el gel de sílice, sus características han evolucionado con el trascurso del tiempo, para muchas de las aplicaciones debe rehidratarse parcialmente (3 a 5%) de agua para acondicionarla. Para disminuir la polaridad, a menudo excesiva, se aprovecha la reactividad de los grupos silanos que se encuentran en la superficie para fijar moléculas orgánicas a través de enlaces covalentes, las fases enlazadas cuya polaridad puede ajustarse con facilidad, están en el origen en la cromatografía de reparto de polaridad de fase inversa utilizada en casi todas las separaciones cromatográficas por HPLC.

Podemos distinguir entre estas sílices modificadas con fase enlazada dos tipos: *fases monoméricas* y *poliméricas*.

Fases monoméricas (10 -15 μ m de espesor), resultan de la reacción de un monómero en presencia de un base con silanos de superficie de este modo se pueden obtener las fases RP-8 (agrupamiento dimetiloctilsilano), RP-18 u ODS (agrupamiento de metiloctadesilano). Cerca de la mitad de los grupos silanoles presentes están enlazados.

Fases poliméricas (25 μ m), para este tipo de fase enlazada se utiliza di-o-triclorosilano en presencia de vapor de agua, la cual provoca la polimerización en disolución del reactivo antes de depositarse y enlazarse a la sílice. De este modo se obtiene una capa polimérica reticulada.

Al lado de las fases enlazadas que comportan cadenas lineales de alquilo de 8 a 18 átomos de carbono, que se pueden utilizar desde pH 2 a pH 10, existen otras que llevan cadenas de grupos aminopropilo, cianopropilo, benzilo, o fases mixtas que confieren una cierta polaridad al conjunto. La naturaleza del grupo enlazado caracteriza las características separativas de las columnas con fase enlazada y el gel de sílice pierde su papel esencial que tenía como fase estacionaria.

2.5.6. FASES MÓVILES

La interacción que existe entre la fase estacionaria (normal o de polaridad) influye sobre los tiempos de retención de los solutos, la polaridad de la fase estacionaria permite distinguir dos situaciones:

Si la fase estacionaria es *polar*, la cromatografía se realiza en fase normal, en este caso se utilizará un fase móvil *poco polar*.

Si la fase estacionaria es muy *poco polar*, la cromatografía se denomina en fase reversa, o cromatografía hidrófoba y en este caso se utilizara una fase móvil *polar* (lo más utilizado son mezclas de metanol o acetonitrilo con agua).

Cuando modificamos la polaridad de la fase móvil estamos actuando directamente sobre el coeficiente de distribución o reparto K , es decir sobre el factor de retención k de los compuestos. Los cromatografistas deben hacer una buena elección de la fase móvil en función de los

compuestos que hay que separar. La formación de enlaces modificados conduce a una pérdida importante de polaridad. Cuando se utiliza un fase elanzada que podemos imaginar constituida por esferas de sílice recubiertos con una capa de parafina, el orden de elución es opuesto al que estamos acostumbrados a ver en una fase normal. De este modo, se utiliza un eluyente polar, un compuesto polar migra más rápido que un compuesto apolar, en estas condiciones se retienen más los hidrocarburos. Se realizan gradientes de elución para disminuir la polaridad del eluyente durante la separación (por ejemplo mezclas de agua/acetonitrilo, cuya concentración en acetonitrilo crece durante la elución).

2.5.7. DETECTORES

El sistema de detección se trata de un modulo del cromatógrafo de líquidos situado a la salida de la columna, que proporciona de forma continua información acerca de la composición del flujo que circula a través de él. Generalmente origina una señal eléctrica continua, que debidamente amplificada y registrada, constituye el cromatograma, del que se extrae información cualitativa y cuantitativa de la muestra inyectada.

Un detector debe de reunir ciertas características para su empleo: alta sensibilidad (del orden de 10^{-12} - 10^{-11} g/mL), lo que implica un bajo ruido de fondo, la respuesta universal a todos los solutos, amplio rango lineal de concentración (5-6 ordenes de magnitud volumen mínimo en la celda de flujo, para evitar la dispersión de los solutos, debe de ser no destructivo, en caso de que se requiera recoger fracciones, insensible a cambios de presión temperatura, etc. Debe de operar continuamente durante largo tiempo ser asequible a la automatización. Los modos de detección más utilizados se basan en las propiedades ópticas de los compuestos (absorción, fluorescencia e índice de refracción).

Detectores espectrofotométricos

Este tipo de detectores se basan en la ley de Lamber-Beer $A = \epsilon_{\lambda}lc$ la absorbancia A de de la fase móvil se mide a la salida de la columna, a una o varias longitudes de onda λ en el UV o visible, la intensidad depende del coeficiente de absortividad molar ϵ_{λ} característico, lo que hace que no sea posible el cálculo de las concentraciones de cada una de las especies detectadas por medida

directa de las áreas de los picos, que no consideraría estos coeficientes de absorción específicos. La fase móvil debe mostrar una absorbancia despreciable. Para aquellos compuestos que no poseen un espectro de absorción aprovechable, se recurre a formar derivados de los analitos. Para los detectores existen dos modelos básicos de detección monocromática o policromática, en la primera como su nombre lo indica permite aislar una longitud de onda específica y el modelo policromático permite registrar la absorbancia en varias longitudes de onda al mismo tiempo o también percibir todo un campo de longitudes de onda sin interrumpir la circulación en la columna. El detector de arreglo de diodos permite no solamente obtener un cromatograma sino también proporciona informaciones espectrales que puedan servir para asegurar la identidad de los compuestos separados.

Detectores espectrofluorimétrico

Los compuestos fluorescentes remiten, en forma de luz, toda una parte de la radiación de la fuente luminosa a la que están sometidos. La intensidad de la fluorescencia es proporcional a la concentración de la sustancia a condición de que esta sea débil, el campo de aplicación de este tipo de detector es muy sensible y selectivo, puede ampliarse aplicando reacciones de formación de derivados fluorescentes. Para estos procedimientos se sitúa un reactor antes de la columna (precolumna) o bien entre la columna y el detector (postcolumna) para realizar una o varias reacciones sobre los compuestos para hacerlos fluorescentes.

Detector refractométrico

Su funcionamiento se basa en lo que ocurre cuando un haz luminoso (mono o policromático) pasa a través de una célula que contiene dos compartimentos, uno de los cuales se rellena solo con una fase móvil y el otro con eluyente a la salida de la columna. La diferencia de los índices de refracción entre los dos líquidos que aparecen cuando un soluto se mezcla con el eluyente, se traduce en un desplazamiento angular del haz refractado. En la práctica la señal corresponde a la medida en continuo de la retroalimentación que hay que proporcionar a un elemento óptico para compensar el haz reflejado.

CAPITULO 3

DISEÑO DE EXPERIMENTOS

3.1 PLANEACIÓN DE UN EXPERIMENTO

La planeación es una actividad que permite eficacia, eficiencia y efectividad en el trabajo. En la investigación experimental, la planeación implica diseñar el experimento. El diseño estadístico de un experimento da la posibilidad de que éste sea realizado de una manera eficiente, es decir, con el mínimo de recursos materiales y tiempo (Ross 1996).

El éxito de un experimento radica en alto porcentaje en la calidad de su planeación. El diseño de experimentos se puede aplicar a problemas o situaciones en las que se quiere investigar y/o probar conjeturas en las que se compartan dos o más situaciones para las causas o factores involucrados (Montgomery 2007).

Un programa de investigación es un esfuerzo organizado de un científico para adquirir conocimientos sobre un proceso natural o artificial. El programa completo puede necesitar de muchos estudios individuales, cada uno con objetivos específicos. Normalmente, los estudios individuales responden preguntas y proporcionan piezas de información afines que, en conjunto, satisfacen las metas del programa.

Al iniciar el estudio, el investigador sagaz desarrolla una lista de verificación de aspectos concretos; algunos de los que suelen incluirse son: objetivos específicos del experimento identificación de los factores que influyen y cuáles de ellos varían y cuáles permanecen constantes características a medir procedimientos particulares para realizar las pruebas o medir las características número de repeticiones del experimento básico a realizar recursos y materiales disponibles.

Se pueden hacer preguntas sencillas para enfocar las actividades Las preguntas sencillas, pero que impliquen un reto, auxilian en el proceso de diseño, aunque se tenga una hipótesis de investigación bien definida como móvil del estudio de investigación.

Las preguntas que centran nuestra atención a través del proceso de diseño incluyen: “¿Cuál es mi objetivo?”, “¿Qué quiero saber?” y “¿Por qué quiero saberlo?”. Las preguntas de seguimiento productivo para cada actividad en el proceso, tales como: “¿Cómo voy a realizar esta tarea?” y “¿Por qué hago esta tarea?”, dirigen la atención a definir el papel de cada actividad en el estudio de investigación.

Las componentes del estudio se analizarán por separado en las siguientes secciones, pero están interrelacionadas y en un estudio real el investigador debe integrarlas. Para empezar, a continuación se establece el vocabulario concreto que se usará para expresar las ideas.

Uno de los objetivos del diseño de experimentos es conseguir determinadas características relacionadas con la calidad de los productos y que los procesos sean óptimos. En algunos de los casos se desea que los valores sean lo más grande posible (por ejemplo, el número de piezas procesadas por unidad de tiempo), o en otros casos, se desean valores lo más pequeños posibles (por ejemplo, la menor vibración en un cuarto de pesado de materias primas), o un tercer caso, en donde se desean valores próximos a una determinada referencia (por ejemplo, el peso de una tableta).

Los valores de las características de calidad dependen de variables que pueden ser: longitud, velocidad, tensión, temperatura, entre otros, o cualitativas como materiales, disposición, abierto, cerrado. El diseñador puede controlar algunas de estas características, mientras que otras dependen del proceso de producción del entorno o la utilización.

Experimentar es cambiar deliberadamente las condiciones del funcionamiento de los sistemas a utilizar, para mejorar el conocimiento de los productos o procesos, y a la vez orientar las acciones a tomar en el diseño y desarrollo. El objetivo básico del diseño de experimentos, basado en técnicas y metodologías estadísticas, consiste en determinar un conjunto de pruebas a realizar para obtener el máximo conocimiento sobre el sistema con el mínimo número de experimentos.

El diseño de experimentos tiene su procedencia en estudios de R. Fisher y las aplicaciones a la agronomía a partir de 1930, pero prácticamente no trascendió al campo de la ingeniería hasta mucho más tarde, hacia 1970 en Japón con los trabajos de G. Taguchi, pusieron énfasis en el

concepto de diseño robusto, poco sensible a las variaciones (Riba 2002). El diseño de experimentos parte de la idea de que el mejor momento para poner las bases de la calidad de los productos y procesos es durante las etapas de especificación y concepción.

En la ingeniería de calidad, es de gran importancia mejorar la productividad y la calidad, por ejemplo, minimizar el número de productos defectuosos en la fabricación. Las acciones pertinentes incluirían determinar el intervalo óptimo de inspección y los límites de control para ajustar el proceso, establecimiento de sistemas de mantenimiento preventivo, diseñar el proceso de conexión del sistema para conseguir la máxima automatización y racionalizar los sistemas de inspección. Todas las actividades son evaluadas mediante las consideraciones de la función de pérdida de calidad, la evaluación económica es necesaria para todos los métodos.

3.2 EL CONCEPTO DE ROBUSTEZ

El diseño robusto de experimentos en el cual existen factores de ruido no controlables, considerados de manera explícita o implícita, cuyo efecto se pretende minimizar de forma indirecta (es decir, sin controlarlo directamente) a fin de encontrar combinación de niveles de los factores de proceso que si se pueden controlar y en donde el efecto de dichos factores es mínimo. Dicho de otra manera en un experimento robusto se trata de lograr que el producto o proceso tenga el desempeño adecuado sin que afecten las fuentes de variación no controladas (Gutiérrez Pulido y Vara Salazar 2004). El significado de la palabra **robusto** es en el sentido de hacer el proceso o producto insensible o resistente a factores de ruido que no está en nuestras manos controlar.

El diseño robusto se enfoca a la fabricación de productos y procesos robustos, lo cual se logra mejor durante la etapa en que se concibe y diseña un nuevo producto; además en esta etapa es posible reducir el costo al incluir materiales más económicos que cumplan con la función deseada (Taguchi y Asian Productivity Organization 1988). Tener un proceso robusto significa que este funcione bien aunque varíen una serie de factores (de ruido) que no se puedan controlar, como variables ambientales (temperatura, humedad, etc.), cansancio de los operadores, cambio en el turno y de lotes, variaciones no controlables en variables de proceso, acumulación de suciedad, etc.

3.3 FACTORES DE CONTROL, RUIDO Y DE SEÑAL

En un proceso existen básicamente dos tipos de factores: controlables y no controlables (o de ruido). En el diseño robusto es conveniente tener una clasificación más detallada del tipo de factores controlables que puedan influenciar el proceso, en cuanto a su efecto sobre la media y la variabilidad de la respuesta de interés. Se distinguen cuatro tipos de factores de interés (Gutiérrez Pulido y Vara Salazar 2004):

Afecta a la media y a la variabilidad.

Afecta solo a la variabilidad.

Afecta solo a la media.

No afecta a la media ni la variabilidad.

Cuando en un diseño clásico se afirma que un factor tiene un efecto sobre la respuesta, por lo general se quiere decir que el factor tiene efecto sobre la media de la característica de calidad. En cambio en el diseño robusto se tiene más presente que el efecto de un factor tiene efecto sobre la media de la característica de calidad. En cambio en el diseño robusto se tiene más presente que el efecto de un factor también puede ser sobre la variabilidad, o sobre la media y la variabilidad de manera simultánea. Estos cuatro casos se representan en la figura 3.1 en el eje horizontal se muestra el efecto sobre la media y en el eje vertical el efecto sobre la variabilidad. El factor clase I afecta a la media y a la variabilidad y, el caso 2 solo a la variabilidad, el caso III afecta solo a la media y la clase IV no afecta a ninguna de las dos.

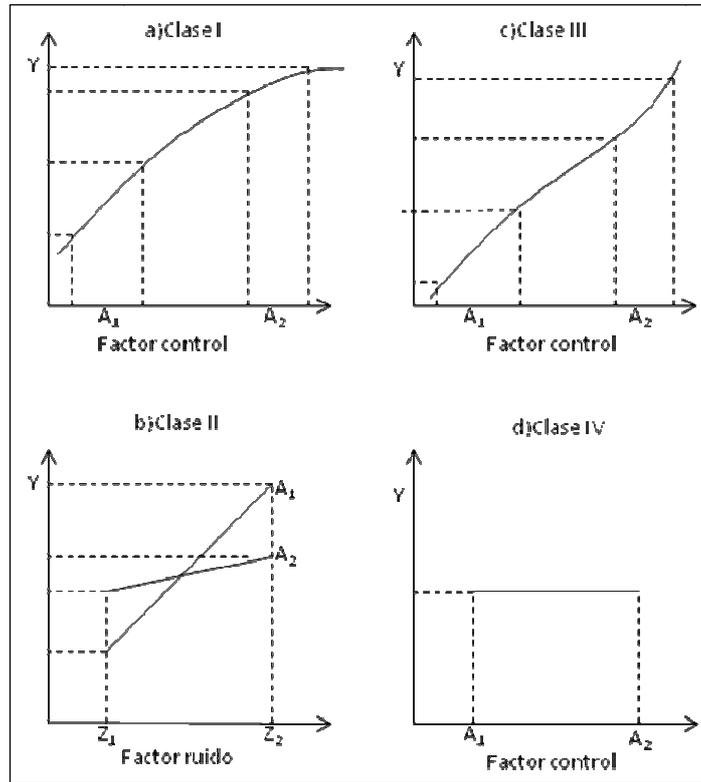


Figura 3.1 Clases de factores ortogonales de acuerdo a su efecto sobre la media (eje X) y/o variabilidad (eje Y).

Fuente:(Gutiérrez Pulido y Vara Salazar 2004)

El factor de clase I tiene una relación curva con la variable de respuesta: considerando dos niveles (A_1 y A_2) de este factor es claro de la gráfica que una misma oscilación o variación del factor sobre cada uno de estos niveles, (representadas por las curvas sobre ellos) tiene un efecto distinto sobre la variable respuesta. En el nivel A_2 la variable respuesta Y tendrá una variabilidad menor a la del nivel A_1 , es decir en el nivel A_2 se tiene un comportamiento más robusto del proceso a las posibles oscilaciones del factor. Es claro que al mismo tiempo en A_2 , la media de la característica es mayor que A_1 .

El factor de control de clase II se representa interactuando con un factor de ruido . Esta interacción tiene efecto principalmente en la variabilidad, ya que el factor de ruido no se controla y seguirá variando entre sus valores extremos Z_1 y Z_2 , de manera que en cualquiera de los niveles (A_1 y A_2) La media de la característica es la misma. Lo más relevante de esta interacción es que el nivel A_1 del

factor de control se minimiza el efecto del factor ruido sobre la variabilidad de Y. Entonces se puede afirmar que en el nivel A_1 el proceso es más robusto al efecto del factor ruido. Este tipo de relación entre un factor de control y un factor de ruido es la idea fundamental que permite el diseño robusto. Si en un experimento dado los factores de control actuaran independiente de los factores de ruido será imposible hacer diseño robusto, ya que no existirá una combinación de los primeros que minimicen el efecto de los segundos.

El factor clase III afecta solo a la característica de calidad. La variabilidad que pararía a la respuesta Y por la oscilación de este factor es la misma en cualquier lugar de su rango. Este tipo de factor es útil para llevar la media a su valor nominal una vez elegidos los niveles de los factores clase I y clase II que minimizan la variabilidad, de aquí que el factor clase 3 se le llame *factor de ajuste*. Esto es con los factores de clases I y II es posible elegir las condiciones más robustas, reduciendo la variabilidad de la respuesta, pero la media se moverá de su valor deseable, con el factor clase III esta se regresa a su valor nominal sin afectar la variabilidad. Finalmente el factor clase IV no tiene efecto ni en la media ni en la variabilidad y de este se elige su nivel más económico como el mejor.

A La medida en la que se conoce la relación entre los factores controlables y no controlables con la variable respuesta, se está en posición de establecer mejores condiciones de operación del proceso. El diseño robusto se trata de de sacra ventaja principalmente de los factores de control clase II que interactúan con factores de ruido: se trata de elegir un valor controlable que hace al proceso más insensible al ruido. Después se busca ajustar el valor nominal con un factor de ajuste (clase III).

Factor señal

Muchos de los productos están diseñados para trabajar en diferentes niveles de desempeño y de acuerdo a los deseos del usuario o consumidor. En otras palabras, el usuario puede elegir la señal (o valor promedio de la respuesta) que desea en un momento dado del producto. Se llama *factor señal* al dispositivo que permite cambiar el nivel de operación de acuerdo a los deseos del usuario.

El factor señal permite cambiar el valor de la media de la característica de calidad, y es deseable que la variabilidad de cada nivel de operación se mínima. Es decir el producto debe ser robusto a cada nivel del factor señal(Ross 1996).

Factores de ruido

Los factores de ruido que afectan sobre el producto o sobre el proceso se clasifican como: ruido interno, ruido externo y de deterioro. El ruido externo se refiere al ambiente en el cual el proceso o producto se desempeña a la carga de trabajo de trabajo a la que es sometido.

Tipos de robustez

Los estudios de robustez se clasifican utilizando los criterios de tipo variable de respuesta y la existencia o ausencia de factores de señal. Una variable de respuesta puede ser de tres tipos(Gutiérrez Pulido y Vara Salazar 2004):

Entre más pequeña mejor. Son variables o características de calidad cuya única exigencia es que no excedan cierto valor máximo tolerado o especificación superior, y entre más pequeño sea su valor mejor. Pr ejemplo: porcentaje de impurezas en una sustancia o la cantidad de sustancias toxicas en un producto alimenticio.

Entre más grande mejor. Son variables o características de calidad en las que se exige que sean mayores que un valor mínimo o que cierta especificación inferior, y entre mas grande sea el valor de la variable es mejor. Por ejemplo, la resistencia de una pieza de plástico inyectado o la blancura de una tela de color blanco.

Valor nominal es mejor. Variable que debe de tener un valor específico y que por lo tanto, no deben de ser menores a una especificación inferior, pero tampoco mayores que una especificación superior. Ejemplos de este tipo de características de calidad con doble especificación son el diámetro interior de una tuerca y la longitud de una pieza para ensamble.

En cuanto al factor señal se dice que el estudio es estático si no hay factor señal y es dinámico en el otro caso.

3.4 ARREGLOS ORTOGONALES

Los arreglos ortogonales son diseños propuestos por Taguchi, como su nombre lo indica, tienen la propiedad de ortogonalidad (Taguchi, Clausing et al. 1988), una matriz de diseño ortogonal es aquella en donde sus columnas son linealmente independientes lo cual se obtiene si la multiplicación de dos columnas cualesquiera es igual a cero. Esta propiedad también la poseen los diseños ortogonales clásicos. Estos arreglos son diseños factoriales completos, fraccionados o mixtos, dependiendo del número de factores a estudiar en un caso particular. Por ejemplo el arreglo ortogonal L8 tiene ocho corridas experimentales y con él se pueden estudiar desde dos hasta siete factores en dos niveles cada uno. Taguchi no hace énfasis en el estudio de las interacciones, prefiere saturar lo más posible los arreglos y analizar solo los efectos principales de cada factor.

En la figura 3.2. Se muestra los seis arreglos ortogonales de uso más frecuente, que son: L₄, L₈, L₁₂, L₁₆ Y L₁₈, y en la parte inferior de cada uno de ellos se lista la manera de asignar los factores a las columnas, lo cual es importante si no se van a ocupar todas, ya que una buena asignación evita confundir los efectos principales o incluso separar algunos efectos de interacción, el subíndice de la notación L_i indica el número de combinación de niveles que conforman el arreglo. Los arreglos L₉ y L₁₈ permiten estudiar factores con tres niveles (1, 2,3).

Diseño con arreglo interno y externo

La condición fundamental para que un diseño experimental sea de tipo robusto es que exista al menos un factor de ruido para el cual se busca hacer que el proceso o producto sea insensible a su efecto., sin pretender controlar dicho factor de ruido.

Un diseño experimental propuesto por Taguchi para determinar las condiciones de operación robustas a uno o varios factores de ruido es el diseño de *arreglo interno y externo*. Una vez identificados los factores de control y los factores de ruido con los que se requiere experimentar, se construyen dos arreglos ortogonales, uno para cada tipo de factores. Una de las desventajas del arreglo interno y externo es que requiere una cantidad grande de corridas experimentales, aun utilizando los arreglos ortogonales más pequeños.

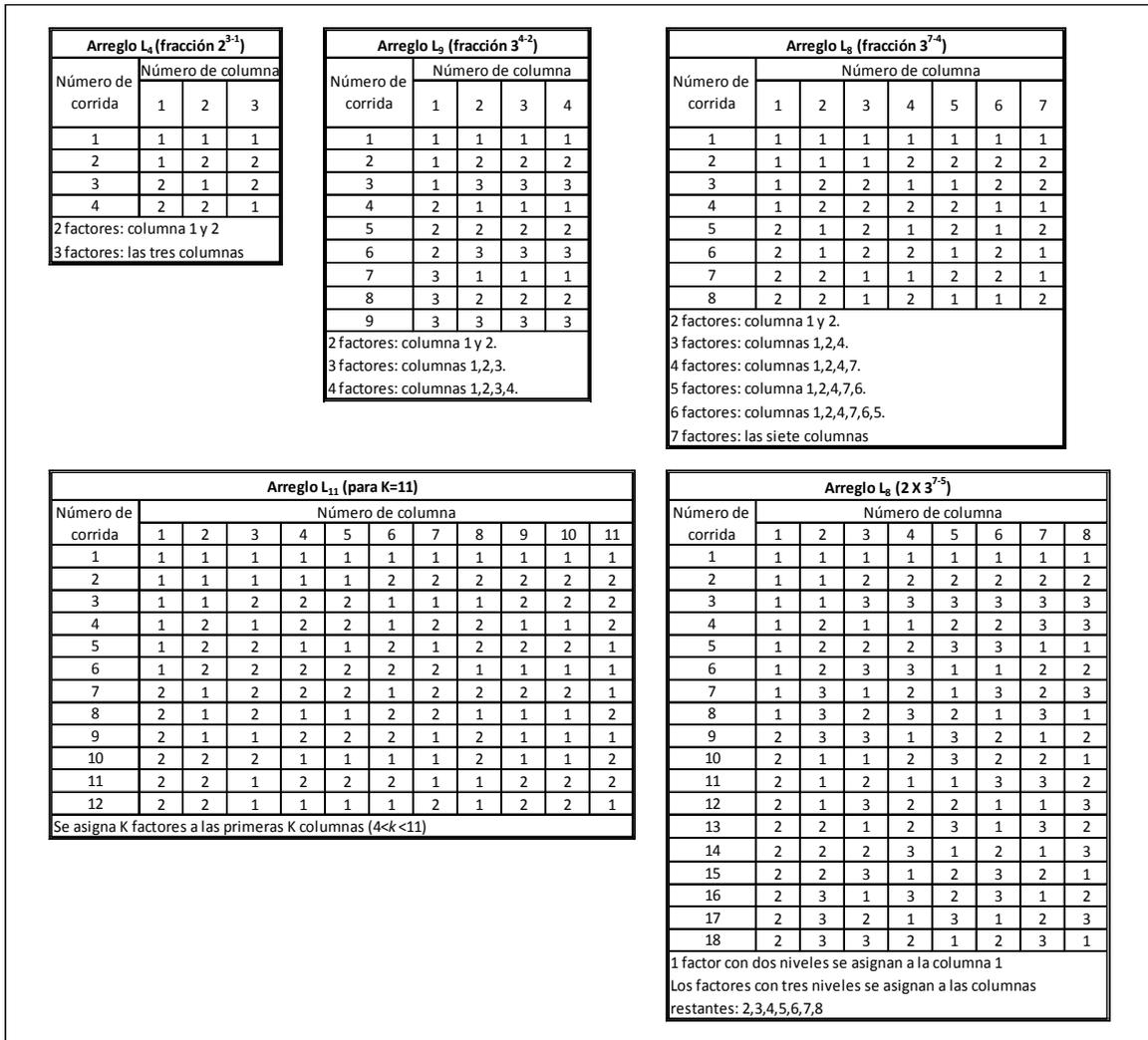


Figura 3.2 Arreglos ortogonales más frecuentes

Fuente: (Gutiérrez Pulido y Vara Salazar 2004)

3.5 RAZÓN SEÑAL/UIDO

En los comienzos de la ingeniería de calidad, el objetivo era reducir la variabilidad de un producto causada por las condiciones del entorno, el deterioro y la variabilidad pieza a pieza. Reducir la variabilidad y ajustar la media a un valor objetivo determinado. Estos valores incluían el cero, el infinito o valores nominales particulares, en la actualidad se denomina “no dinámico”. Lo “no dinámico” se refiere a un objeto fijado, y estos objetivos fijados se evalúan con relaciones señal-ruido no dinámicas.

A mediados de los años setenta, se desarrolló la aplicación para la evaluación y mejora de los sistemas de medida, aquí el objetivo no está limitado a medir la muestra teniendo solo un valor verdadero específico. Un sistema de medida está diseñado para medir las muestras teniendo un cierto rango de valores verdaderos. El valor debe de ser pequeño no solo para un determinado valor, sino para todo un rango de medida. Esto condujo a desarrollar un índice para evaluar el error en todo un rango de medida, con este propósito nació la relación señal-ruido dinámica.

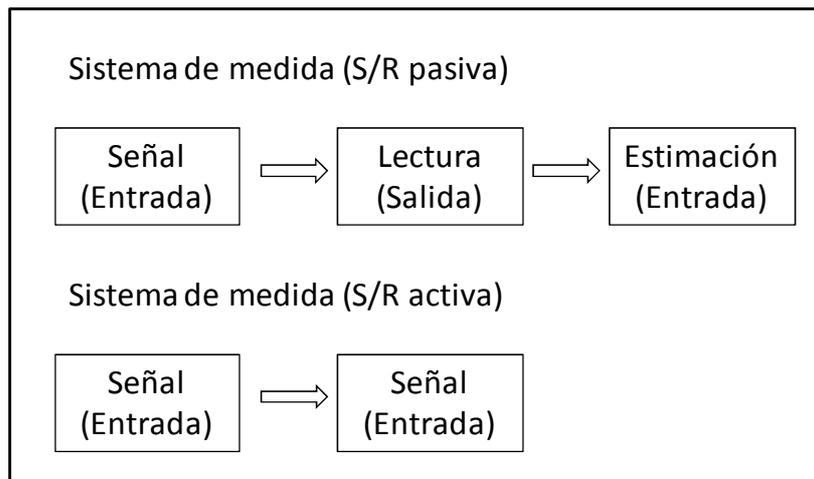


Figura 3.3 Relación señal-ruido

Fuente: (Riba 2002)

En los años setenta las relaciones señal/ruido (S/R) fueron ampliamente aplicadas para la optimización de productos y procesos además de la aplicación para medida, posteriormente, introducidas en las áreas de diseño de productos y procesos para medir la calidad de los productos. La relación S/R para medida y diseño, ambas se denominan relaciones S/R dinámicas, pero específicamente, la primera se denomina pasivo, y la segunda activo. La relación S/R para medida se llama de tipo pasivo porque el resultado (salida) se utiliza para estimar el verdadero valor de la muestra (entrada). En un sistema de control, por otra parte se manejan de tipo activo porque la intención es cambiar la salida, estos patrones pueden expresarse como se muestra en la figura 4.1.

Para el análisis de un diseño con arreglo interno y externo, Taguchi propone un estadístico de desempeño, el cual se llama cociente o razón señal/ruido, que se calcula en cada combinación de

los factores controlables y se analiza como cualquier variable de respuesta. La combinación más robusta de los niveles de los factores controlables es aquella que maximiza el estadístico señal/ruido.

El hecho de que se saque logaritmo en el estadístico tiene que ver con buscar los efectos de los factores controlables sea aditivo, es decir que se minimicen la posibilidad de efectos de interacción entre ellos. Se multiplican por 10 para trabajar en una escala más grande y el signo que los antecede se escoge de la manera que el problema siempre sea maximizar el valor estadístico para obtener las condiciones de operación más robustas. En la tabla 3.1 se muestran las razones de señal /ruido para los diferentes tipos de variable de respuesta.

Tipo de característica	Razón señal/ruido
Mientras más pequeña mejor	$-\log \left[\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n Y_i^2 \right]$
Mientras más grande mejor	$-\log \left[\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{Y_i^2} \right]$
Su valor nominal es lo mejor (Tipo I)	$10 \log \left(\frac{\bar{Y}^2}{S^2} \right)$
Su valor nominal es lo mejor (Tipo II)	$-10 \log (S^2)$
Proporción de defectuosos	$-10 \log \left(\frac{p}{1-p} \right)$

Tabla 3.1 Razón señal/ruido para las diferentes tipos de variables de respuesta

Fuente: (Gutiérrez Pulido y Vara Salazar 2004)

CAPITULO 4

APLICACIÓN DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS EN EL DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO

4.1. DESARROLLO DEL EXPERIMENTO

El método utilizado para la determinación de principio activo de Dinitrato de Isorbid se muestra en la figura 4.1, en el recuadro punteado se muestran la etapa de proceso en donde se modifican las condiciones de cromatografía para optimizar el método analítico.

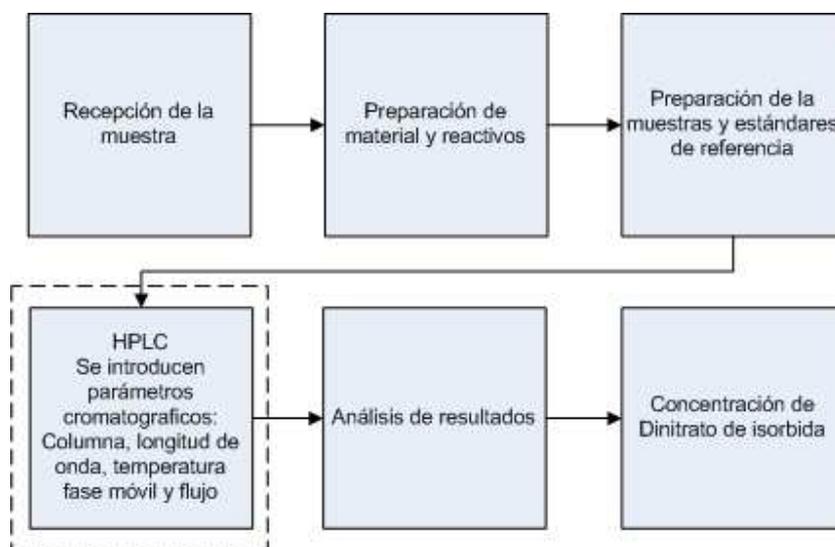


Figura 4.1 Metodología analítica para la determinación de la concentración de Dinitrato de isosorbida.

Fuente: Elaboración propia

En la figura 4.2 podemos observar el diagrama básico de un sistema de HPLC el cual consta de de un recipiente para el solvente (fase móvil), la cual nos va a permitir separar nuestro compuesto de interés cuando entre en contacto con la (fase estacionaria), que es la columna por medio de un sistema de bombeo. Normalmente se emplea una micro jeringa que inyecta la muestra al sistema, La columna de cromatografía estará conectada a un detector, que medirá la cantidad de cada uno

de los componentes (ya separados) que vayan saliendo de la columna. Los datos de este detector suelen ser recogidos y procesados por una computadora que elaborará una gráfica (un cromatograma), cuyos picos representarán cada uno de los compuestos que han sido separados por el HPLC. El área bajo el pico será proporcional a la cantidad del compuesto correspondiente.

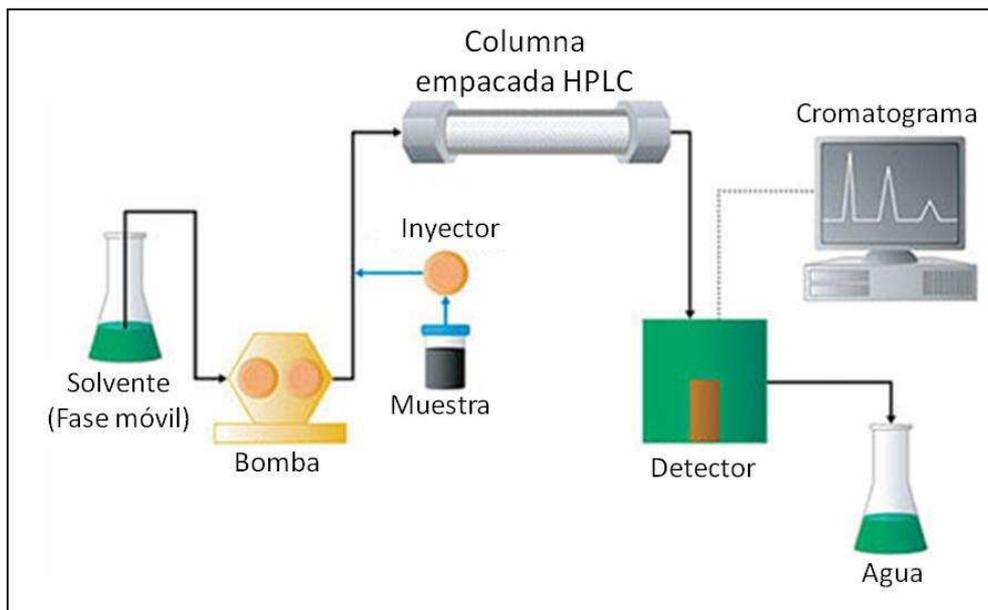


Figura 4.2 Diagrama básico de un sistema de HPLC.

Fuente: Elaboración propia

4.2. DETERMINACIÓN DE FACTORES

Se propone por medio del un arreglo ortogonal el comparar diferentes factores afectan el tiempo de retención de dinitrato de isorbida: Fase móvil, pH e la fase móvil, Flujo y temperatura.

En el análisis por HPLC, el tiempo en el cual el compuesto es retenido debe de ser el menor posible ya que entre menor sea este tiempo, se entregaran resultados con mucho más rapidez para la liberación del medicamento al mercado. Actualmente el tiempo de retención del di nitrato de isorbida es de 7.0 minutos.

En este caso estamos nos interesa analizar el efecto de 4 factores a dos niveles cada uno, por lo tanto, se usará un arreglo ortogonal L8. Esto implica que se ejecutarán 8 pruebas o condiciones experimentales.

FACTORES	DESCRIPCIÓN	NIVEL 1	NIVEL 2
A	Fase móvil	Buffer:Metanol (50:50)	Buffer:Metanol (60:40)
B	pH e la fase móvil	2	3
C	Flujo	1	1.5
D	Temperatura	25°C	40°C

Tabla 4.1 Descripción de los factores a combinar en el experimento.

Fuente: Elaboración propia

Corrida	A	B	C	D	e1	e2	Fase móvil	pH	Flujo	Temperatura	yi (tiempo de retención)
1	1	1	1	1	1	1	(50:50)	2	1	25	2.1
2	1	1	1	2	2	2	(50:50)	2	1.5	40	1.8
3	1	2	2	1	1	2	(50:50)	3	1	25	2.2
4	1	2	2	2	2	1	(50:50)	3	1.5	40	1.9
5	2	1	2	1	2	1	(60:40)	2	1	40	2.5
6	2	1	2	2	1	2	(60:40)	2	1.5	25	3
7	2	2	1	1	2	2	(60:40)	3	1	40	2.8
8	2	2	1	2	1	1	(60:40)	3	1.5	25	2.4

Tabla 4.2 Descripción de los factores a combinar en el experimento.

Fuente: Elaboración propia

4.3. METODOLOGÍA

Metodología analítica para la valoración de Dinitrato de isorbid tabletas 10 mg.

Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

Todos los solventes deben ser grado cromatográfico

Fase móvil:

Preparar una mezcla adecuada, filtrada y desgasificada, de sulfato de amonio 0,1 M ajustando el pH de acuerdo a la tabla 4.3 con ácido sulfúrico y metanol en las proporciones que indica la Tabla 4.4

FACTOR	DESCRIPCIÓN	NIVEL 1	NIVEL 2
A	Fase móvil	Buffer : Metanol (50:50)	Buffer : Metanol (60:40)

Tabla 4.3 Factor A. pH de la solución de sulfato de amonio

Fuente: Elaboración propia

FACTOR	DESCRIPCIÓN	NIVEL 1	NIVEL 2
B	pH e la fase móvil	2	3

Tabla 4.4 Factor B. pH de la solución de sulfato de amonio

Fuente: Elaboración propia

Condiciones cromatográficas:

Las condiciones cromatográficas a utilizar son las siguientes:

Cromatografo de Líquidos (HPLC) marca Dionex Ultimate 3000

Detector: Longitud de onda de 220 nm

Columna: Dionex C18 de 4,6 mm x 5,0 mm, o equivalente.

Volumen de inyección: 20 µL

En la Tabla 4.5 se muestran los factores que cambian.

FACTORES	DESCRIPCIÓN	NIVEL 1	NIVEL 2
C	Flujo	1	1.5
D	Temperatura	25°C	40°C

Tabla 4.5 Factores C y D. Flujo de la bomba y temperatura de la columna cromatográfica

Preparación de la Muestra (Por sextuplicado):

Pesar exactamente 20 tabletas individualmente y sacar el peso promedio, moler finamente las tabletas y pesar el equivalente a 10 mg de Dinitrato de isosorbida transferirlos cuantitativamente aun matraz volumétrico de 25 mL, adicionar 15 mL de fase móvil y sonicar durante 30 min, posteriormente llevar al aforo con fase móvil. Tomar una alícuota de 5 mL de la solución anterior y transferirla a un matraz volumétrico de 20 mL y llevar al aforo con fase móvil. Filtrar una porción de esta solución a través de un filtro 0,45 µm tipo HV. Concentración final 0,1 mg/mL.

En la tabla 4.5 se muestran las corridas experimentales.

Corrida	A	B	C	D	e1	e2	Fase móvil	pH	Flujo	Temperatura	yi (tiempo de retención)
1	1	1	1	1	1	1	(50:50)	2	1	25	2.1
2	1	1	1	2	2	2	(50:50)	2	1.5	40	1.8
3	1	2	2	1	1	2	(50:50)	3	1	25	2.2
4	1	2	2	2	2	1	(50:50)	3	1.5	40	1.9
5	2	1	2	1	2	1	(60:40)	2	1	40	2.5
6	2	1	2	2	1	2	(60:40)	2	1.5	25	3
7	2	2	1	1	2	2	(60:40)	3	1	40	2.8
8	2	2	1	2	1	1	(60:40)	3	1.5	25	2.4

Tabla 4.6 Descripción de los factores a combinar en el experimento.

Anexo 1. Desarrollo de las corridas experimentales

Corrida 1.

Cromatógrafo	Detector: Longitud de onda	Volumen de inyección:	Columna	Fase móvil	pH	Flujo	Temperatura
Dionex Ultimate	220 nm	20 µL	Dionex C18 de	(50:50)	2	1	25

Tabla 4.7 Condiciones experimentales de la corrida 1.

Fuente: Elaboración propia

Resultados:

Figura

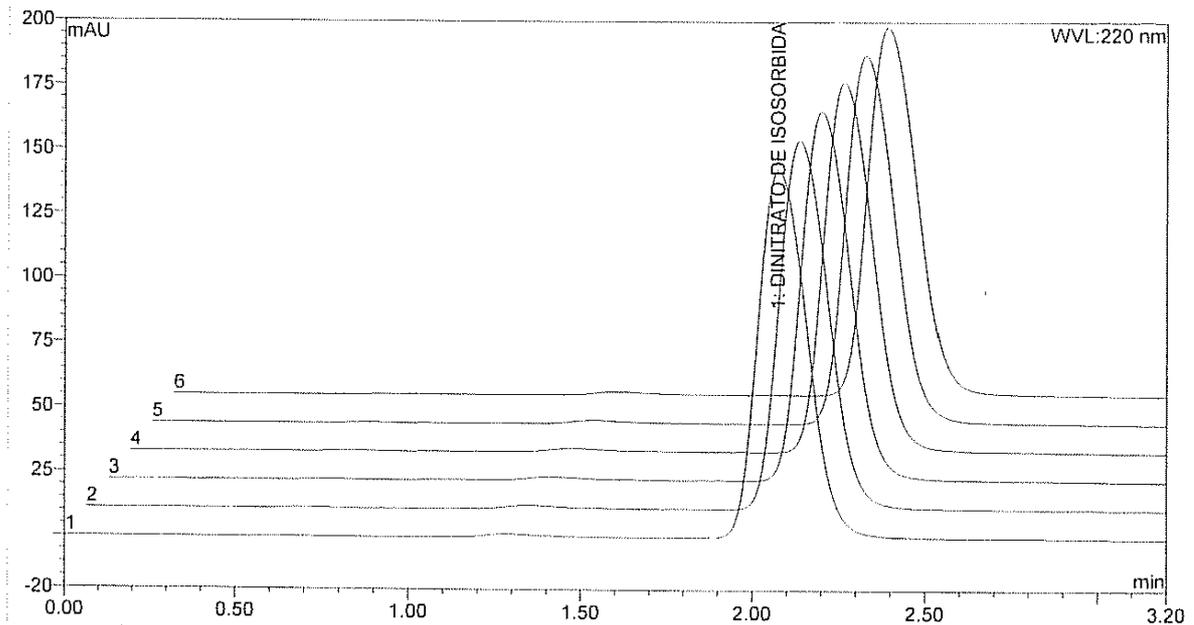


Figura 4.3 Cromatogramas del Corrida 1

Fuente: Elaboración propia

El tiempo de retención promedio del dinitrato de isorbid es de 2.1 min.

Corrida 2.

Cromatógrafo	Detector: Longitud	Volumen de	Columna	Fase móvil	pH	Flujo	Temperatura
Dionex Ultimate	220 nm	20 μ L	Dionex C18 de	(50:50)	2	1.5	40

Tabla 4.8 Condiciones experimentales de la corrida 2.

Fuente: Elaboración propia

Resultados:

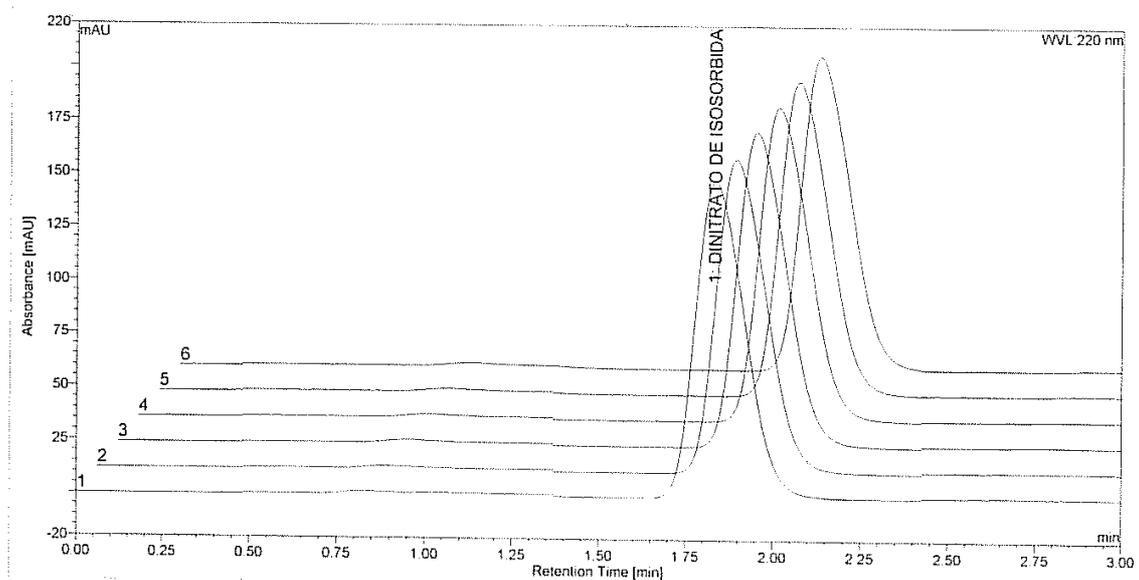


Figura 4.4 Cromatogramas del Corrida 2

Fuente: Elaboración propia

El tiempo de retención promedio del dinitrato de isorbid es de 1.8 min.

Corrida 3.

Cromatógrafo	Detector: Longitud de	Volumen de inyección:	Columna	Fase móvil	pH	Flujo	Temperatura
Dionex Ultimate 3000	220 nm	20 µL	Dionex C18 de 4,6 mm x 5,0	(50:50)	3	1	25

Tabla 4.9 Condiciones experimentales de la corrida 3.

Fuente: Elaboración propia

Resultados:

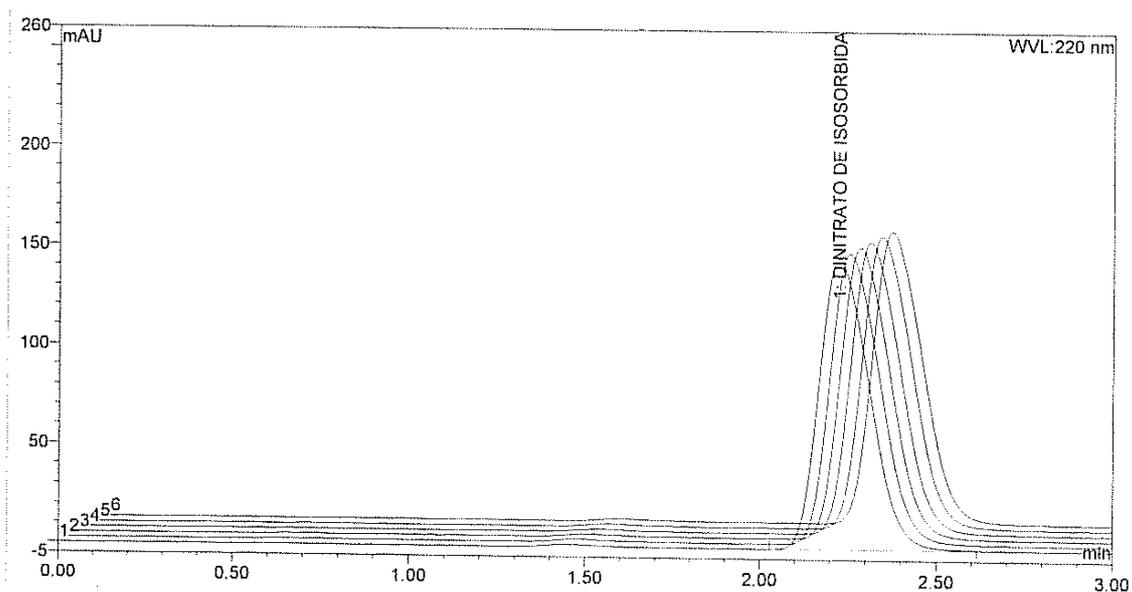


Figura 4.5 Cromatogramas del Corrida 3

Fuente: Elaboración propia

El tiempo de retención promedio del dinitrato de isorbid es de 2.2 min.

Corrida 4.

Cromatógrafo	Detector: Longitud de onda de	Volumen de inyección:	Columna	Fase móvil	pH	Flujo	Temperatura
Dionex Ultimate 3000	220 nm	20 µL	Dionex C18 de 4,6 mm x 5,0	(50:50)	3	1.5	40

Tabla 4.10 Condiciones experimentales de la corrida 4

Fuente: Elaboración propia

Resultados:

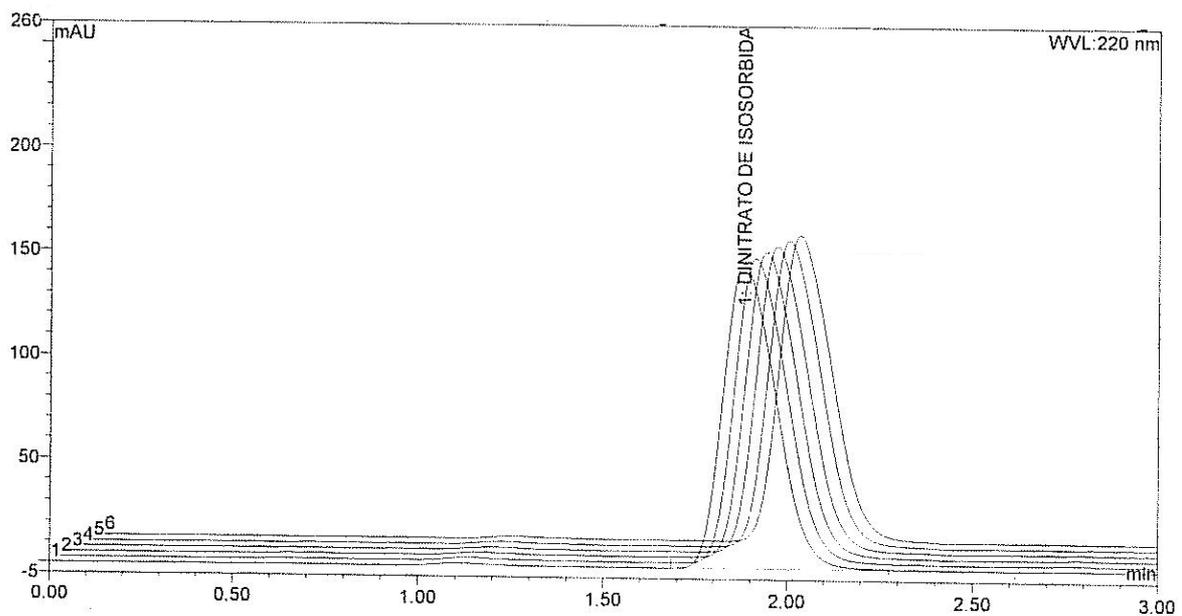


Figura 4.6 Cromatogramas del Corrida 4

Fuente: Elaboración propia

El tiempo de retención promedio del dinitrato de isorbid es de 1.9 min.

Corrida 5.

Cromatógrafo	Detector: Longitud de onda de	Volumen de inyección:	Columna	Fase móvil	pH	Flujo	Temperatura
Dionex Ultimate 3000	220 nm	20 µL	Dionex C18 de 4,6 mm x 5,0	(60:40)	2	1	40

Tabla 4.11 Condiciones experimentales de la corrida 5.

Fuente: Elaboración propia

Resultados:

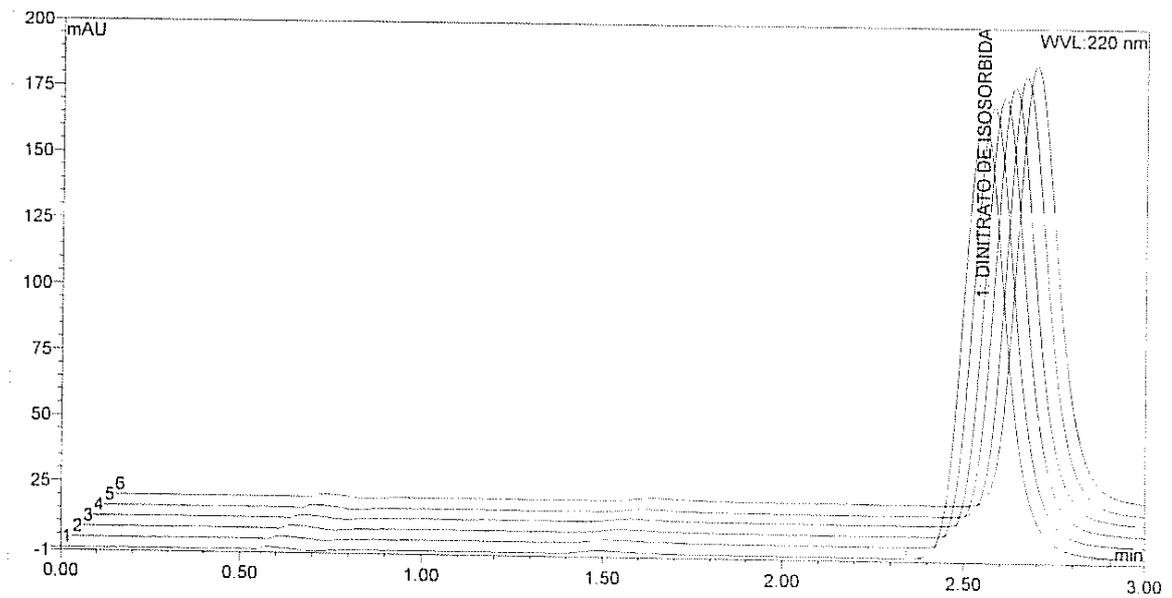


Figura 4.7 Cromatogramas del Corrida 5

Fuente: Elaboración propia

El tiempo de retención promedio del dinitrato de isorbid es de 2.5 min.

Corrida 6.

Cromatógrafo	Detector: Longitud de onda de	Volumen de inyección:	Columna	Fase móvil	pH	Flujo	Temperatura
Dionex Ultimate 3000	220 nm	20 µL	Dionex C18 de 4,6 mm x 5,0 mm	(60:40)	2	1.5	25

Tabla 4.12 Condiciones experimentales de la corrida 6. Fuente:

Elaboración propia

Resultados:

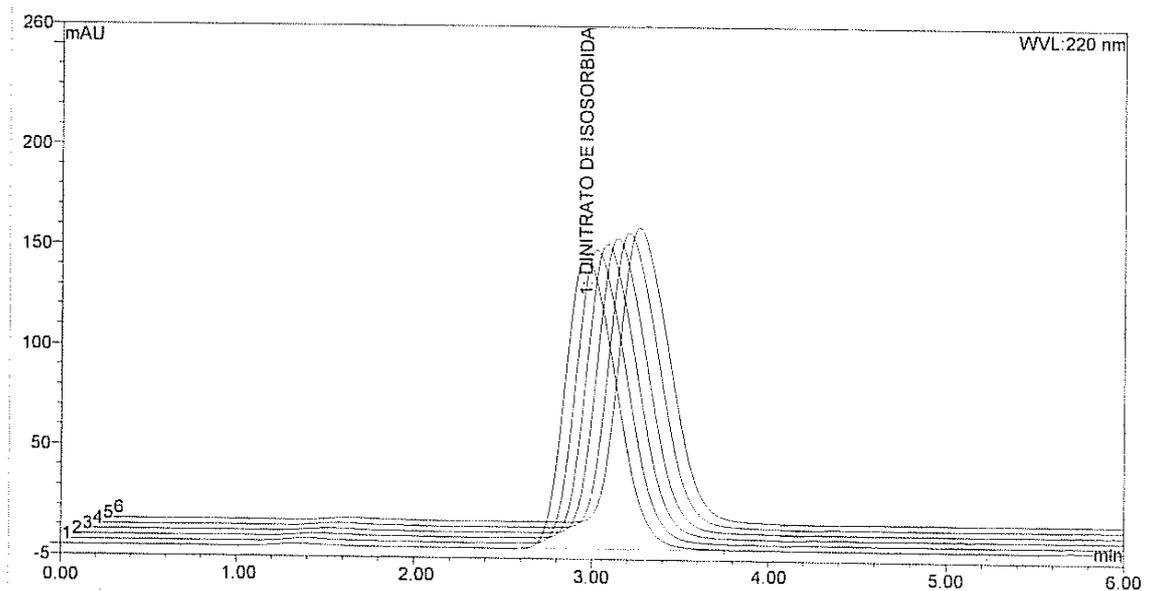


Figura 4.8 Cromatogramas del Corrida 6

Fuente: Elaboración propia

El tiempo de retención promedio del dinitrato de isorbid es de 3.0 min.

Corrida 7.

Cromatógrafo	Detector: Longitud de onda de	Volumen de inyección:	Columna	Fase móvil	pH	Flujo	Temperatura
Dionex Ultimate 3000	220 nm	20 µL	Dionex C18 de 4,6 mm x 5,0 mm	(60:40)	3	1	40

Tabla 4.13 Condiciones experimentales de la corrida 7.

Fuente: Elaboración propia

Resultados:

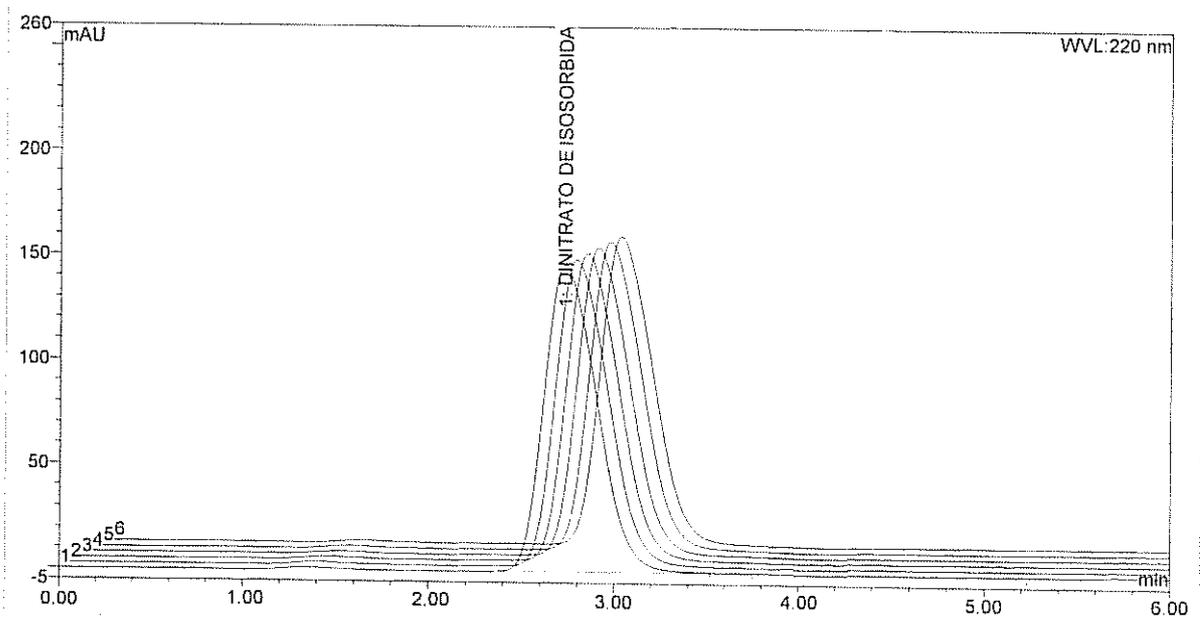


Figura 4.9 Cromatogramas del Corrida 7

Fuente: Elaboración propia

El tiempo de retención promedio del dinitrato de isorbid es de 2.8 min.

Corrida 8.

Cromatógrafo	Detector: Longitud de onda de	Volumen de inyección:	Columna	Fase móvil	pH	Flujo	Temperatura
Dionex Ultimate 3000	220 nm	20 µL	Dionex C18 de 4,6 mm x 5,0 mm	(60:40)	3	1.5	25

Tabla 4.14 Condiciones experimentales de la corrida 8.

Fuente: Elaboración propia

Resultados:

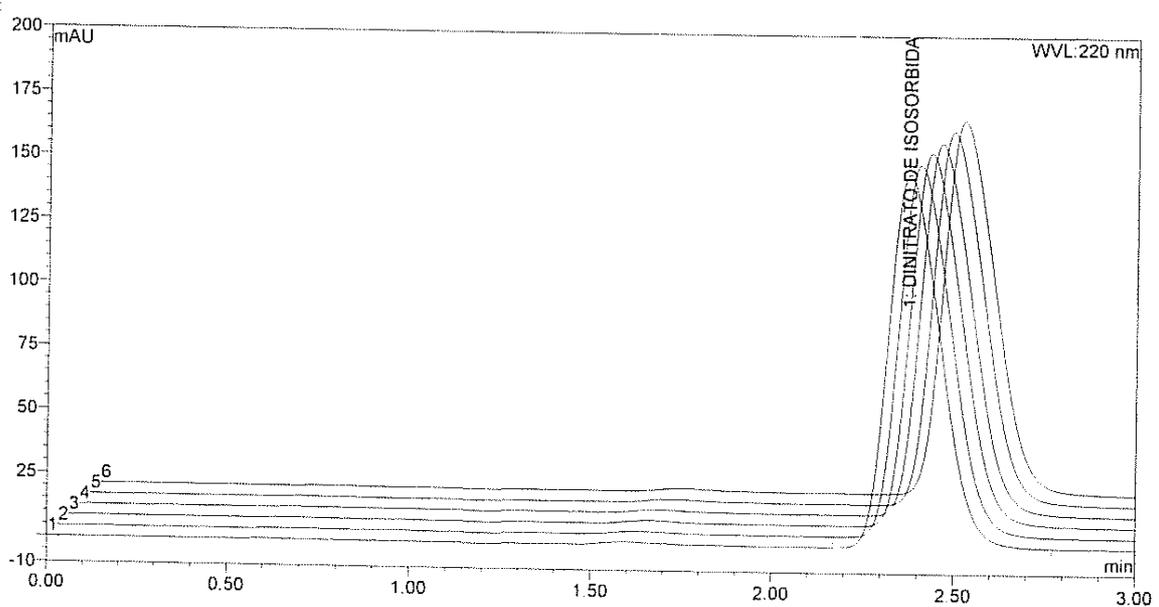


Figura 4.10 Cromatogramas del Corrida 8

Fuente: Elaboración propia

El tiempo de retención promedio del dinitrato de isorbid es de 2.4 min.

4.4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

A1 = total de las lecturas que se tomaron con el factor A a su nivel 1
= $2.1+1.8+2.2+1.9 = 8$

A2 = total de las lecturas que se tomaron con el factor A a su nivel 2
= $2.5+3+2.8+2.4 = 10.7$

B1= total de las lecturas que se tomaron con el factor A a su nivel 1
= $2.1+1.8+2.5+3.0 = 9.4$

B2= total de las lecturas que se tomaron con el factor A a su nivel 2
= $2.2+1.9+2.8+2.4 = 9.3$

C1= Total de las lecturas que se tomaron con el factor D a su nivel 1
= $2.1+1.8+2.8+2.4 = 9.1$

C2= Total de las lecturas que se tomaron con el factor D a su nivel 2
= $2.2+1.9+2.5+3.0 = 9.6$

D1= Total de las lecturas que se tomaron con el factor D a su nivel 1
= $2.1+2.2+2.5+2.8 = 9.6$

D2= Total de las lecturas que se tomaron con el factor D a su nivel 2
= $1.8+1.9+3.0+2.4 = 9.1$

e11= Total de las lecturas que se tomaron con el factor e1 a su nivel 1
= $2.1+2.2+3.0+2.4 = 9.7$

e12= Total de las lecturas que se tomaron con el factor e a su nivel 2
= $1.8+1.9+2.5+2.8 = 9$

e21= Total de las lecturas que se tomaron con el factor e1 a su nivel 1
= $2.1+1.9+2.5+2.4 = 8.9$

e22= Total de las lecturas que se tomaron con el factor e a su nivel 2
= $1.8+2.2+3.0+2.8 = 9.8$

En resumen se tiene:

Factor	A	B	C	D	e1	e2
Nivel 1	8	9.4	9.1	9.6	9.7	8.9
Nivel 2	10.7	9.3	9.6	9.1	9	9.8
	18.7	18.7	18.7	18.7	18.7	18.7

Tabla 4.15 Factores y niveles del experimento

Fuente: Elaboración propia

En seguida se obtiene una cantidad que llamaremos suma de cuadrados esta se calcula como sigue:

Suma de los cuadrados del factor $x = SS X = (\text{Total nivel 2} - \text{Total nivel 1})^2 / n$

Donde "n" representa el número total de lecturas que se tomaron.

$n = 8$

Así por ejemplo, para el factor A, tendremos que dado que $n=8$

$$SSA = (A_2 - A_1)^2 / 8 = (8 - 10.7)^2 / 8 = 0.91125 \text{ con 1 gl}$$

Para el factor B se tiene

$$SSB = (B_2 - B_1)^2 / 8 = (9.4 - 9.3)^2 / 8 = 0.00125 \text{ con 1 gl}$$

Similarmente

$$SSC = (C_2 - C_1)^2 / 8 = (9.1 - 9.6)^2 / 8 = 0.03125 \text{ con 1 gl}$$

$$SSD = (D_2 - D_1)^2 / 8 = (9.6 - 9.1)^2 / 8 = 0.03125 \text{ con 1 gl}$$

$$SSE = (e_{12} - e_{11})^2 / 8 = (9.7 - 9.0)^2 / 8 = 0.06125 \text{ con 1 gl}$$

$$SSe = (e_{22} - e_{21})^2 / 8 = (8.9 - 9.8)^2 / 8 = 0.10125 \text{ con 1 gl}$$

Para la estimación del error 1 y error 2 la suma de cuadrados es = 0.1625

FUENTE	SS	GL	MEDIA DE CUADRADOS	F
A	0.91125	1	0.91125	5.607692308
B	0.00125	1	0.00125	0.007692308
C	0.03125	1	0.03125	0.192307692
D	0.03125	1	0.03125	0.192307692
Error (e1+e2)	0.1625	1	0.16250	
Total	1.1375	6		

Tabla 4.16 Tabla ANOVA para el experimento

Fuente: Elaboración propia

Finalmente, la corrida final se realiza bajo las siguientes condiciones:

Fase móvil	Buffer pH=2:Metanol (50:50)
pH e la fase móvil	2
Flujo	1
Temperatura	25

Tabla 4. 17 Corrida final

Fuente: Elaboración propia

Los factores que resultan significativos son el A en primer lugar y posteriormente C y D, los niveles que deben fijarse son los que minimicen la evaluación, esto es, al nivel al que se obtenga el tiempo de retención menor. A a nivel 1, C a nivel 2 y D a nivel 1. El factor B no afecta la evaluación del método, así que se utilizara el valor que menos afecte el método.

En la tabla 4.17 se comparan el método actual y el método propuesto. Uno de los factores que influyen en gran medida en el análisis cromatográfico es la columna, en los experimentos que se realizaron, en todos ellos se utilizó una columna de longitud de 5,0 cm.

MÉTODO ACTUAL	MÉTODO PROPUESTO
Fase móvil: Etanol:2,2,4 trimetil pentano (15:85)	Fase móvil: Solución de sulfato de amonio 0,1M: Metanol (50:50)
Condiciones cromatográficas:	Condiciones cromatográficas:
Longitud de onda: 215 nm	Longitud de onda: 220 nm
Columna: Dionex C18 de 4,6 mm x 25,0 cm, o equivalente	Columna: Dionex C18 de 4,6 mm x 5,0 cm, o equivalente
Volumen de inyección: 20 µL	Volumen de inyección: 20 µL
Tamaño de partícula: 10 µm	Tamaño de partícula: 5µm
Flujo de solvente: 1mL/min	Flujo de solvente: 1mL/min

Tabla 4.18 Comparación del método actual con el método propuesto.

Fuente: Elaboración propia

Se realizaron pruebas de un lote con el método propuesto y se compararon los resultados obtenidos con el método actual Tabla 4.6.

	MÉTODO ACTUAL	MÉTODO PROPUESTO
Tiempo de retención de di nitrato de isosorbida	7.6 minutos	2.2 minutos
Consumo de fase móvil Etanol:2,2,4 trimetil pentano (15:85) para un lote	115.2	-
Consumo de fase móvil Solución de sulfato de amonio 0,1M: Metanol (50:50) para un lote (12 iny)	-	50.4

Tabla 4.19 Resultados obtenidos con el método propuesto

CONCLUSIONES

Se realizó el diseño de experimentos para la valoración de dinitrato de isosorbida por HPLC con el cambio de columna cromatográfica, se realizó el arreglo de los factores obteniendo del análisis de resultados por el método ANOVA obteniendo que los factores que influyeron en la reducción del tiempo de retención para el analito dinitrato de isosorbida es en mayor medida la composición de la fase móvil y en menor medida pero que también influyeron son el caudal de la bomba de alimentación y la temperatura de la columna.

El tiempo de retención del dinitrato de isosorbida antes del cambio de factores era de 7.6 minutos, con los cambios realizados a la técnica analítica se logró reducir este tiempo a 2.2 minutos correspondiente a una reducción del 70% del tiempo inicial, esto implica un proceso mucho más rápido para la realización de esta prueba.

El tiempo que tarda el equipo en procesar un lote de dinitrato de isosorbida es de 2.4 horas y con el cambio de columna es de 1.3 horas, el ahorro en el tiempo de uso de equipo es de una hora por lote. Si esto lo multiplicamos por el número de lotes fabricados que se analizan juntos (alrededor de 5 lotes), no da como resultado un ahorro de 5 horas de uso del equipo.

El tiempo de análisis total se obtiene sumándole al tiempo de uso de equipo, 2 horas más (corresponden al tiempo que tarda en prepararse las muestras). Para la valoración de 5 lotes de dinitrato de isosorbida se requeriría de 7 horas más una 1 hora adicional que corresponde al reporte de los resultados. Esto correspondería a una jornada de 8 horas de trabajo. Esto quiere decir que el análisis completo de esta prueba tardaría un día de trabajo. En la situación actual el análisis de 5 lotes de dinitrato de isosorbida se lleva a cabo en más de un día de trabajo.

El consumo de fase móvil (disolvente) también se redujo en un 44% paso de 115 mL a 50 mL para el análisis de un lote, además de la reducción en el consumo de solventes, los reactivos utilizados para preparación de la fase móvil que se utiliza actualmente son más caros que la fase móvil propuesta. El precio del trimetilpentano es de \$960 (garrafón de 4L), etanol es de \$1,063 (garrafón de 4L), el sulfato de amonio es de \$400 (1Kg) y metanol (garrafón 4L) \$260 pesos.

La columna cromatográfica C-18, 250mm de longitud X 4.6mm de diámetro interno que se utilizó para en los experimentos tuvo un costo de \$7,800 pesos, su precio es similar al de la columna que se utiliza actualmente C-18, 250mm de longitud X 4.6mm de diámetro interno que es de \$8,000 pesos. En este sentido el costo de la columna no impacto al momento de cambiar su longitud.

El manejo de los desechos es costoso debido a que se requiere de un tratamiento especial, debido a sus características se trata de material peligroso ya que representan un riesgo para el medio ambiente, en este sentido al disminuir el consumo de solventes en las técnicas instrumentales se están generando menos desechos peligrosos.

REFERENCIAS

1. Academia farmacéutica (1846). Farmacopea mexicana formada y publicada por la Academia farmacéutica de la Capital de la República. México, Manuel N. de la Vega.
2. Cela, R., R. A. Lorenzo, et al. (2002). Técnicas de separación en química analítica. Madrid, Editorial Síntesis.
3. Corona, J. M. y M. C. Jiménez (2003). Tayectoria científico-tecnológica de la industria farmacéutica México, Miguel Angel Porrúa UAM Xochimilco.
4. Ferreira González, V. y Universidad de Zaragoza. Servicio de Publicaciones (2007). Cromatografía : Fundamentos y práctica. Zaragoza, El Autor.
5. García de Marina, A. y B. d. Castillo (1988). Cromatografía líquida de alta resolución. México, Limusa.
6. Gennaro, A. (1990). Remington's Pharmaceutical Sciences. Easton, Pensilvania, Mack Publishing Company.
7. Gómez, V. H. (2008). Formación de las Capacidades Tecnológicas de la Industria Farmacéutica de México y del mundo. México, D.F, Centro de Invetigaciones Economicas, Academicas, Administrativas y Sociales.
8. Gutiérrez Pulido, H. y R. d. I. Vara Salazar (2004). Análisis y diseño de experimentos. México [etc.], McGraw-Hill.
9. Harris, C. D. (2007). Análisi químico cuantitativo. Barcelona, Reverté.
10. Hernández, H. L. y G. P. Claudio (2002). Introducción al análisis instrumental. España, Ariel.
11. Katz, E., R. Eksteen, et al. (1998). Handbook of HPLC. New York, Marcel Dekker.
12. Montgomery, D. C. (2007). Diseño y análisis de experimentos. México, Limusa-Wiley.
13. Oriol, V. y B. Del Castillo (1998). Técnicas instrumentales en farmacia y ciencias de la salud. México D.F., Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.
14. Ross, P. J. (1996). Taguchi techniques for quality engineering : loss function, orthogonal experiments, parameter and tolerance design. New York ; London, McGraw-Hill.
15. Rouessac, F., A. Rouessac, et al. (2003). Análisis químico : métodos y técnicas instrumentales modernas. Madrid, McGraw-Hill.
16. Secretaría de Salud. (2005). "Hacia una política farmacéutica integral para México." from www.ssa.gob.mx.
17. Skoog, D. A., E. Turiel Trujillo, et al. (2005). Fundamentos de química analítica. Madrid Thomson.
18. Skoog, D. A., D. M. West, et al. (2005). Fundamentos de Química Analítica. Madrid, Thomson.
19. Spilker, B. (1994). Multinational Pharmaceutical Companies: Principles and Practices. Nueva York, Raven Press.
20. Taguchi, G. and Asian Productivity Organization (1988). Introduction to quality engineering : Designing quality into products and processes. Tokyo, Asian Productivity Organization.
21. Taguchi, G., D. Clausing, et al. (1988). System of experimental design : engineering methods to optimize quality and minimize costs. White Plains, New York, UNIPUB-Kraus International Publications.
22. Valcárcel, C. M. y H. A. Gómez (2003). Técnicas analíticas de separación. España, Reverté.

23. Weston, A. y P. R. Brown (1997). HPLC and CE principles and practice. San Diego, Academic Press.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

24. Blanca L. Cejudo, M. Lourdes Garzón (2004). Aspectos esenciales para la validación de procesos en la Industria Farmacéutica, México, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco
25. Box, G. E. P., J. S. Hunter, et al. (2005). Estadística para investigadores: introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos. Barcelona, Reverté.
26. Cárdenas Rodríguez, Hilda (2003). Las ciencias farmacéuticas algunos aspectos de actualidad, México, Universidad Autónoma de Metropolitana-Xochimilco.
27. Colomer, M. Àngels, et al. (2003). Diseños aplicados a la Industria, Paperkite, Lehida.
28. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (España). Gabinete de Formación, E. González Mazo, et al. (2004). Cromatografía líquida (HPLC) aplicada a compuestos orgánicos marinos. Madrid, Gabinete del Formación.
29. Ferreira González, V. y Universidad de Zaragoza. Servicio de Publicaciones (2007). Cromatografía : Fundamentos y práctica. Zaragoza, El Autor.
30. G.E.P. Box, W.G. Hunter, J.S. Hunter (1989). Estadística para experimentadores, Barcelona,
31. García de Marina Bayo, Adrián y Yusá Marco, Dolores Julia (2008). HPLC fundamental , Valencia, Universidad Politécnica de Valencia.
32. García de Marina Bayo, et al (2008.) HPLC fundamental ,Valencia, Universidad politécnica de Valencia
33. García de Marina, A. y B. d. Castillo (1988). Cromatografía líquida de alta resolución. México, Limusa.
34. Gil Tesouro, M., A. Cepeda Sáez, et al. (2004). Desarrollo y validación de un nuevo método de determinación de decoquinato en leche mediante la tecnología del HPLC-LIF.
35. Guía de Validación de Métodos Analíticos (2002), Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México
36. Gutiérrez Pulido, H. y R. d. I. Vara Salazar (2004). Análisis y diseño de experimentos. México [etc.], McGraw-Hill.
37. Katz, E., R. Eksteen, et al. (1998). Handbook of HPLC. New York, Marcel Dekker.
38. Lunn, G. (2000). HPLC methods for pharmaceutical analysis. New York, John Wiley & Sons.
39. Mc Master, Marvin (1994) HPLC: A Practical User's Guide. Wiley-VCH.
40. Montgomery, D. C. (2007). Diseño y análisis de experimentos. México, Limusa-Wiley.
41. Myers, R.H. ,D.C. Montgomery, Response Surface Methodology (2002). 2a eEdición , Wiley Interscience.
42. Palacios González, Elías (2006). Sistema para el diseño, ejecución y análisis de experimentos utilizados en estudios de procesos psicológicos, Oviedo, Universidad de Oviedo.
43. Peña Sánchez de Rivera, D. (2002). Regresión y diseño de experimentos. Madrid, Alianza Editorial.

44. Ross, P. J. (1996). Taguchi techniques for quality engineering: loss function, orthogonal experiments, parameter and tolerance design. New York; London, McGraw-Hill.
45. Ryan, T.P., (2007) Modern Experimental Design. John Wiley & Sons, Inc.
46. Sadek, P. C. (2002). The HPLC solvent guide. New York, John Wiley
47. Skoog, D. A., E. Turiel Trujillo, et al. (2005). Fundamentos de química analítica. Madrid Thomson.
48. Taguchi, G. Asian Productivity Organization (1988). Introduction to quality engineering: Designing quality into products and processes. Tokyo, Asian Productivity Organization.
49. Taguchi, G., D. Clausing, et al. (1988). System of experimental design : engineering methods to optimize quality and minimize costs. White Plains, New York, UNIPUB-Kraus International Publications.
50. Taguchi, Naoko (2009). Pragmatic competence Berlin ; New York
51. Trevore Stone, Gail Darlington (2001). Como funcionan los fármacos, España, Ariel.
52. USP 32 The National Formulary 27, 2009, pág: 2972-2975