

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA



**Calificación de un cromatógrafo líquido de alta resolución en el Laboratorio del
Departamento de Química Farmacéutica en la Universidad del Valle de Guatemala**

Trabajo de graduación por:

Ana Carolina Mejicanos Boleres

para optar por el grado académico de Licenciada en Química Farmacéutica

Guatemala

2013

**CALIFICACIÓN DE UN CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA RESOLUCIÓN EN EL
LABORATORIO DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA EN LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA



**Calificación de un cromatógrafo líquido de alta resolución en el Laboratorio del
Departamento de Química Farmacéutica en la Universidad del Valle de Guatemala**

Trabajo de graduación por:

Ana Carolina Mejicanos Boleres

para optar por el grado académico de Licenciada en Química Farmacéutica

Guatemala

2013

Vo. Bo.:

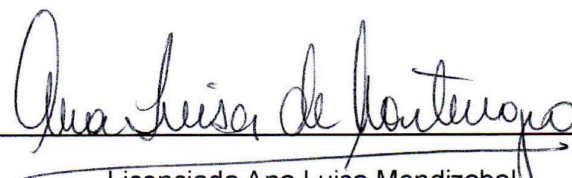
(f) 

Doctor Elfego Rolando López García
Asesor

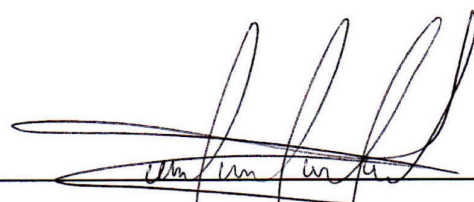
Tribunal Examinador:

(f) 

Doctor Elfego Rolando López García
Asesor

(f) 

Licenciada Ana Luisa Mendizabal

(f) 

Licenciado Carlos Humberto Pineda Salazar

Fecha de aprobación: Guatemala, 10 de enero de 2013.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS.....	viii
RESUMEN.....	x

CAPÍTULOS

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO CONCEPTUAL.....	3
A. Antecedentes del problema.....	3
B. Justificaciones.....	4
C. Planteamiento del problema.....	5
D. Alcance y limitantes del problema.....	5
III. MARCO TEÓRICO.....	6
A. Cromatografía.....	6
B. Clasificación de las técnicas cromatográficas.....	6
C. Campo de aplicación de HPLC.....	8
D. Instrumentación para cromatografía de líquidos.....	8
E. Calificación.....	12
F. Validación.....	12
IV. MARCO METODOLÓGICO.....	14
A. Objetivos.....	14
B. Hipótesis.....	15
C. Variables.....	15
D. Población y muestra.....	15
E. Procedimiento.....	16
F. Diseño de investigación.....	30
G. Análisis estadístico.....	31
H. Equipo y materiales.....	32

V.	MARCO OPERATIVO.....	33
A.	Recabación y tratamiento de los datos.....	33
B.	Recursos.....	33
VI.	RESULTADOS.....	35
A.	Calificación de instalación.....	35
B.	Calificación de operación.....	38
C.	Calificación de desempeño.....	41
VII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	48
A.	Calificación de instalación.....	48
B.	Calificación de operación.....	49
C.	Calificación de desempeño.....	51
VIII.	CONCLUSIONES.....	54
IX.	RECOMENDACIONES.....	56
X.	BIBLIOGRAFÍA.....	57
XI.	ANEXOS.....	59
A.	Glosario.....	59
B.	Fórmulas.....	60
C.	Protocolo de calificación.....	65
D.	Resultados originales.....	85
E.	Certificaciones y especificaciones.....	111

LISTA DE TABLAS

Tabla No. 1: Composición para la bomba binaria.....	30
Tabla No. 2: Ubicación.....	37
Tabla No. 3: Control de ambiente e infraestructura.....	37
Tabla No. 4: Descripción del sistema.....	36
Tabla No. 5: Módulos del sistema.	36
Tabla No. 6: Registro de la documentación.....	36
Tabla No. 7: Instalación.....	36
Tabla No. 8: Estado de los módulos.	38
Tabla No. 9: Información diagnóstica.	38
Tabla No. 10: Información modular.	39
Tabla No. 11. Prueba de óxido de holmio.	41
Tabla No. 12: Estabilidad de ruido.	41
Tabla No. 13: Estabilidad de flujo.	42
Tabla No. 14: Prueba de precisión de longitud de onda.	42
Tabla No. 15: Prueba de precisión del inyector con fase móvil mezclada por bomba binaria.....	43
Tabla No. 16: Precisión del inyector con fase móvil mezclada previamente.....	44
Tabla No. 17: Prueba de linealidad del detector con fase móvil mezclada por bomba binaria.....	44
Tabla No. 18: Prueba de linealidad del detector con absorbancias menores a 1AU.....	45
Tabla No. 19: Prueba de linealidad del detector con fase móvil mezclada previamente.....	45
Tabla No. 20: Prueba de arrastre del inyector.....	46
Tabla No. 21: Prueba de gradiente de composición.....	46
Tabla No. 22: Datos originales de prueba de precisión del inyector con fase móvil mezclada por bomba binaria.....	93

Tabla No. 23: Datos originales de prueba de precisión del inyector con fase móvil mezclada previamente.....	95
Tabla No. 24: Datos originales para factor de respuesta de la prueba de linealidad del detector con fase móvil mezclada por bomba binaria.....	97
Tabla No. 25: Datos originales para la prueba de linealidad del detector con absorbancias menores a 1 AU.....	100
Tabla No. 26: Datos originales para la prueba de linealidad del detector con fase móvil mezclada previamente.....	100
Tabla No. 27: Datos originales para la prueba de arrastre del inyector.....	101
Tabla No. 28: Datos originales para la prueba de gradiente de composición...	103

RESUMEN

En las pruebas analíticas, la calificación de los equipos, es un requerimiento exigido por las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL). El trabajo desarrollado muestra resultados válidos y confiables generados a partir de las pruebas realizadas al cromatógrafo Agilent serie 1100 del Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad del Valle de Guatemala.

El proceso llevado a cabo se divide en tres procedimientos:

Calificación de instalación en la que se verificó que el equipo cumple con especificaciones de ambiente, infraestructura e instalación. Además de registrar todas las características del sistema, sus módulos y documentación.

Calificación de operación en el que se verificó el correcto funcionamiento del estado de los módulos, de la intensidad de la lámpara, de la columna y presión.

Calificación de desempeño, se verificó que las longitudes de onda para UV y Vis se encuentran calibradas, que la bomba binaria aporta estabilidad de flujo, genera composiciones adecuadas y no aporta ruido significativo.

Se concluye que el cromatógrafo líquido de alta resolución marca Agilent, serie 1100 del Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad del Valle de Guatemala, cumple con especificaciones de ambiente, infraestructura e instalación. Además, cuenta con slit y filtro de óxido de holmio funcional. La intensidad de la lámpara es adecuada y las longitudes de onda se encuentran calibradas, según sus especificaciones.

El ruido máximo del equipo no es significativo, la bomba binaria cumple con sus especificaciones para flujo y composición.

El detector no es lineal en todo su intervalo de trabajo, por lo que es recomendable analizar analitos en una concentración tal que no superen 1 AU, según la ley de Beer-Lambert.

Es conveniente revisar el inyector ya que no mostró precisión. Además, este tiene una fuga al alcanzar los 365 bar por lo que no se debe alcanzar esta presión al utilizar el equipo. Se encontró también, arrastre de analitos en este por lo que es conveniente realizar limpieza del mismo con agua grado HPLC debidamente filtrada entre inyecciones.

Se encontró también que la columna utilizada, XTerra RP18 con tamaño de partícula de 5 μm , no cumplió con una dispersión adecuada de platos teóricos durante las lecturas.

I. INTRODUCCIÓN

La cromatografía es una técnica por medio de la cual se logra separación, aislamiento e identificación de los distintos componentes químicos en una mezcla. Esto es posible debido a la diferente velocidad a la que cada compuesto es transportado por la fase móvil a través de la fase estacionaria. (Skoog, *et.al.*, 2005)

Por medio de la cromatografía se pueden obtener resultados cualitativos y cuantitativos de los analitos. El análisis cualitativo está basado en mediciones de tiempos de retención, mientras que los resultados cuantitativos se basa en la medida de áreas de los picos cromatográficos, asociados a la concentración de analito en la muestra. (Skoog, *et.al.*, 2005)

Los cromatógrafos líquidos de alta resolución, son de gran utilidad en las pruebas analíticas debido a su alta sensibilidad, a las determinaciones cuantitativas más exactas que por otros métodos y a su aplicación en una gran variedad de sustancias utilizadas en la industria farmacéutica. A adquirido especial importancia en la investigación y desarrollo de productos, en el control de calidad farmacéutico y en los análisis medioambientales de las industrias. (Vazquez, 2006)

Actualmente, la industria farmacéutica tiene que cumplir con requisitos más exigentes. Esto debido a la seguridad de los productos, por lo tanto en la Food and Drug Administration (FDA) se consolidó el termino validación, dada a conocer en las Buenas Prácticas de Manufactura o GMP, así mismo sus etapas como lo son la calificación de las instalaciones, de los equipos, la calificación de desempeño para procesos y productos terminados. Con esto se pretende obtener información confiable y válida de los equipos para la elaboración de productos y procesos analíticos. Esto con el fin de evaluarlos, probarlos y verificar que operen de manera satisfactoria según los límites de aceptación establecidos por los fabricantes. (FDA, 2011)

Dentro de las GMP, se encuentran los requerimientos de calificación de equipos, en este se indica la necesidad de evidencia documentada de las calificaciones en cuatro procedimientos básicos, que son:

Calificación del diseño, en ésta se verifica por medio de evidencia documentada que el diseño propuesto para los sistemas, equipo y facilidades es adecuado para su propósito. (FDA, 2011)

Calificación de la instalación, en ésta se verifica por medio de evidencia documentada que el equipo y sistemas instalados cumplen con diseño aprobado y recomendaciones del fabricante. (FDA, 2011)

Calificación de la operación, en ésta se verifica por medio de evidencia documentada que el equipo y los sistemas operan de la forma adecuada, según los límites de aceptación. (FDA, 2011)

Calificación del funcionamiento o desempeño, en ésta se verifica por medio de evidencia documentada que el equipo puede ejecutar de forma efectiva y reproducible, al utilizar un método de proceso aprobado. (FDA, 2011)

Para todas las calificaciones se debe seguir el protocolo descrito en el Anexo C, solamente se podrá avanzar en el proceso si los resultados cumplen con los límites de aceptación en éste descritos, o bien, si las diferencias en los resultados han sido detectadas, reportadas y corregidas como resultado de un plan de acción. Una vez concluido el proceso de la calificación del equipo, es posible la validación de los métodos en donde interviene el mismo. Al validar estas metodologías se podrá afirmar que los resultados obtenidos en términos de desempeño son reproducibles y consistentes, que cumple con requerimientos establecidos por medio de resultados documentados, y que el método es robusto con la operación rutinaria previamente establecida.

II.MARCO CONCEPTUAL

A. Antecedentes del problema.

Durante los años 70 en la FDA, se consideró la validación como una regulación, por lo cual las buenas prácticas de laboratorio (BPL), incluyó el tema en sus marcos de calidad, en ésta el objetivo principal es asegurar la calidad e integridad de todos los datos obtenidos durante un estudio. El cumplimiento de las BPL incluye a todos los estudios no clínicos de seguridad para productos farmacéuticos, alimenticios e industriales. (FDA, 2001)

Dentro de las BPL, se establece que los equipos destinados a la obtención, almacenamiento, medida o recuperación de datos, deben ser calificados con el fin de obtener información documentada confiable, que permita asegurar que su diseño, capacidad y funcionamiento cumplen con los parámetros de aceptación establecidos para la obtención de datos válidos y confiables. (FDA, 2001)

Periódicamente estos equipos deben ser sometidos al mismo procedimiento de limpieza y validación, para estos procedimientos cada equipo debe de contar con un procedimiento estándar de operación. (Vilumara 2011)

Al referirse a la industria farmacéutica, hay que incluir las buenas prácticas de manufactura (BPM), para garantizar por medio de información documentada que los productos que se fabrican sean de calidad, para garantizar su seguridad y efectividad. (Vilumara 2011)

El marco que rige la calificación de equipos analíticos en Guatemala es el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 11.01.42:06 Productos farmacéuticos. Medicamentos de uso humano. Buenas prácticas de manufactura para la industria farmacéutica. , y en este se indica que es necesario documentar y desarrollar calificaciones y validaciones de equipos utilizados para la producción y control de calidad. (RTCA)

En estudios anteriores del tema está la *Calificación de equipos HPLC y validación de metodologías analíticas. Validación de metodología analítica de Aspirina® 500 mg*, por Álvaro, A. Vásquez Ortiz, en Santiago, Chile en 2006, como proyecto de tesis, en esta realizó la calificación a dos equipos HPLC y validó una metodología analítica para Aspirina 500 mg durante una pasantía en Laboratorios Bayer S.A. (Vásquez, 2006)

Cualificación de equipo para el ensayo de disolución en el laboratorio del Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad del Valle de Guatemala, por Andrea S. Aldana Molina, en 2009, como proyecto de tesis investigó los aspectos teóricos de la calificación de equipo y realizó la metodología y un protocolo para validar el mismo. (Molina, 2009)

B. Justificaciones.

El cromatógrafo líquido de alta resolución es un equipo analítico utilizado con el fin de determinar pureza y cuantificación de analitos. Por medio de éste se pueden identificar sustancias y su concentración individual a partir de una mezcla compleja. (Skoog, 2001)

En la industria farmacéutica, los analistas encargados de la operación de ensayos que utilizan el HPLC deben tener certeza de que los resultados son fiables, con el fin de aprobar o rechazar materias primas o productos terminados, que podrían tener repercusiones en las personas, animales o medio ambiente.

Por lo tanto, es de suma importancia evaluar los módulos del equipo para obtener información válida y confiable respecto al equipo y sus factores críticos, para comprobar que se encuentran dentro de las especificaciones creadas por el fabricante. Que aseguran sin lugar a duda que el equipo funciona de manera adecuada.

El cromatógrafo líquido de alta resolución del Laboratorio del Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad del Valle de Guatemala, será calificado y se realizará un protocolo para las recalificaciones periódicas de instalación, operación y desempeño. Con el fin de asegurar el buen

funcionamiento del mismo y de generar información documentada que garantice su funcionamiento óptimo y de esta forma obtener resultados confiables que puedan permitir su utilización de acuerdo a las normas vigentes internacionales.

C. Planteamiento del problema.

¿Cumple el equipo analítico HPLC Agilent serie 1100 del Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad del Valle de Guatemala con las especificaciones requeridas por las buenas prácticas de laboratorio para su calificación?

D. Alcance y limitantes del problema.

1. **Alcance.** En este estudio se evalúa los parámetros mediante estándares físicos y control del hardware y software; para calificar el equipo HPLC marca Agilent serie 1100, del laboratorio de Química Farmacéutica de la Universidad del Valle de Guatemala, por lo tanto los datos son válidos únicamente para este equipo. Con esta finalidad se elaborará un protocolo de calificación para el HPLC Agilent serie 1100.

2. **Límites.** El estudio incluye solamente al HPLC Agilent serie 1100, instalado en el Laboratorio de Química Farmacéutica de la Universidad del Valle de Guatemala, restringiéndose únicamente a la calificación del mismo. La calificación debe repetirse cada seis meses, según la USP.

III. MARCO TEÓRICO

A. Cromatografía.

La cromatografía es una técnica por medio de la cual se logra separación, aislamiento e identificación de los distintos componentes químicos en una mezcla. Esto es posible debido a la diferente velocidad a la que cada compuesto es transportado por la fase móvil a través de la fase estacionaria. (Skoog, *et.al.*, 2005)

En las separaciones cromatográficas hay una fase estacionaria y una fase móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido. La fase móvil puede ser un líquido o un gas que corre a través de la fase estacionaria. Las sustancias que están en un sistema de cromatografía interaccionan tanto con la fase estacionaria como con la fase móvil. La rapidez con que viaja una sustancia a través del sistema de cromatografía depende directamente de la interacción entre el analito y las dos fases. (Skoog, *et.al.*, 2005)

En la cromatografía se tiene en cuenta la velocidad del soluto y la del eluyente para determinar el factor de retardo. (Skoog, *et.al.*, 2005)

El aislamiento de los componentes de la mezcla se recogen al final de la columna y son detectadas en los cromatogramas. En los cromatogramas la posición de los picos respecto al tiempo se utiliza para la identificación de compuestos, mientras que la integración de las áreas bajo la curva proporcionan medidas para cuantificar los analitos. (Skoog, *et.al.*, 2005)

B. Clasificación de las técnicas cromatográficas.

1. Según la forma del lecho cromatográfico.

a. Cromatografía plana. En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria se encuentra en una placa plana o en poros de un papel, la fase móvil arrastra la muestra desplazándose por capilaridad. (Helrich, 1990)

b. Cromatografía con columna. En este tipo de cromatografía la fase estacionaria está contenida en columnas, éstas consisten en tubos de diámetro estrecho empaquetadas con un sólido inerte finamente dividido que contiene la fase estacionaria sobre su superficie. Durante el t_0 una porción de muestra es introducida al sistema, con la adición de fase móvil, el eluyente pasa a lo largo de la columna donde los solutos son retenidos por la fase estacionaria a diferentes tiempos. (Helrich, 1990)

2. Según el estado físico de las fases.

a. Cromatografía de gases. En este tipo de cromatografía la fase móvil es gaseosa, puede ser cromatografía gas-líquido o gas-sólido. (Helrich, 1990)

b. Cromatografía líquida. En este tipo de cromatografía la fase móvil es líquida, puede ser cromatografía líquido-líquido o líquido-sólido. (Helrich, 1990)

3. Según el mecanismo de separación.

a. Cromatografía de adsorción. Esta se basa en diferentes afinidades de adsorción, o capacidad de las superficies a fijar moléculas, de los componentes a la muestra sobre la superficie de un sólido activo, que es la fase estacionaria. (Helrich, 1990)

b. Cromatografía de reparto. Se basa en distinta solubilidad de componentes de una muestra en las fases estacionaria líquida. (Helrich, 1990)

c. Cromatografía de intercambio iónico. Se basa en diferentes afinidades para intercambio de iones en los componentes de una muestra. La fase estacionaria posee carga eléctrica, e interactúa con componentes de carga opuesta, es comunmente llamada resina de intercambio iónico. (Helrich, 1990)

d. Cromatografía de exclusión. Se basa en diferencias en tamaño y forma entre las moléculas de los distintos componentes en la muestra. (Helrich, 1990)

C. Campo de aplicación de HPLC.

La cromatografía de líquidos de alta resolución es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, la separación de compuestos no volátiles o termolábiles y, su gran aplicabilidad en muchos campos de las ciencias y para la sociedad en general. Algunos ejemplos de estos materiales incluyen: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas y una variedad de sustancias inorgánicas. (Skoog, *et.al.*, 2001)

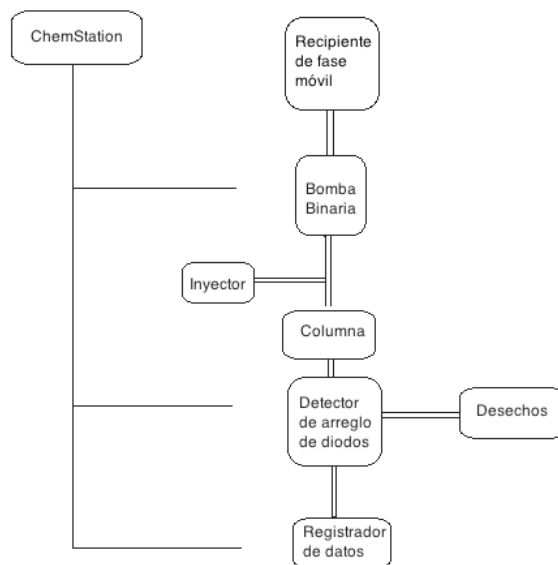
Para solutos con masas moleculares superiores a 10,000, a menudo se utiliza la cromatografía de exclusión por tamaño, aunque ahora también es posible tratar estos compuestos con cromatografía de reparto en fase inversa. Para especies iónicas de masa molecular más pequeña, se utiliza con frecuencia la cromatografía de intercambio iónico. Los métodos de reparto se aplican a las especies poco polares pero no iónicas. La cromatografía de adsorción se elige con frecuencia para separar especies no polares, isómeros estructurales y grupos de compuestos como, por ejemplo, los hidrocarburos alifáticos de los alcoholes alifáticos. (Skoog, *et.al.*, 2001)

D. Instrumentación para cromatografía de líquidos de alta resolución.

Con objeto de alcanzar un caudal de eluyente razonable con rellenos de tamaño particular en el orden de los micrómetros, que son muy comunes en la cromatografía de líquidos, se requieren presiones de algunos cientos de kilogramos de fuerza por centímetro cuadrado. Como consecuencia de estas elevadas presiones, el equipo necesario para la HPLC tiende a ser más sofisticado y caro que el que se utiliza en otros tipos de cromatografía. La

figura 1 muestra un esquema de los componentes fundamentales de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución típico. (Skoog, *et.al.*, 2001)

Figura No. 1 “Esquema de cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent serie 1100, instalado en el Laboratorio de Química Farmacéutica de la Universidad del Valle de Guatemala.”



1. **ChemStation.** El sistema ChemStation es el paquete de software que controla el equipo de cromatografía líquida de alta resolución marca Agilent, tanto de la serie 1100, como las 1050 y 1200 y los cromatógrafos de gases de la misma marca. Es la evolución del sistema ChemStation Hewlett-Packard. (Agilent, 2004)

2. **Recipientes para la fase móvil y sistemas para el tratamiento de los disolventes.** Un aparato moderno de HPLC está equipado con uno o más recipientes de vidrio o de acero inoxidable, cada uno de los cuales contiene de 200 a 1,000 mL de un disolvente. Los recipientes, a

menudo se equipa con un sistema degasificador (oxígeno y nitrógeno), ya que estos gases interfieren formando burbujas en la columna y en los sistemas de detección. Estas burbujas provocan ensanchamientos de banda y a menudo interfieren en el funcionamiento del detector. Un degasificador puede consistir en un sistema de bombeo por vacío, un sistema de destilación, dispositivos para calentar y agitar los disolventes o, sistemas de purga que permiten arrastrar los gases disueltos fuera de la solución mediante finas burbujas de un gas inerte de baja solubilidad. Con frecuencia estos sistemas también contienen un dispositivo para la filtración del polvo y de las partículas sólidas en suspensión en los disolventes para evitar que estas partículas dañen la bomba o los sistemas de inyección u obstruyan la columna. No es necesario que los degasificadores y los filtros sean partes integrantes de los sistemas de HPLC. (Skoog, *et.al.*, 2001)

3. Columnas. Las columnas para cromatografía de líquidos se construyen con tubo de acero inoxidable de diámetro interno uniforme, aunque en algunas ocasiones se encuentran tubos de vidrio de paredes resistentes. (Skoog, *et.al.*, 2001).

Existen varios tipos de columnas cromatográficas, entre las que se pueden mencionar:

a. Columnas analíticas. Tienen una longitud de 10 a 30 cm. Son rectas y se pueden alargar, si es necesario, acoplando dos o más columnas. El diámetro interno de las columnas es de 4 a 10 mm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son 5 a 10 micrómetros. (Skoog, *et.al.*, 2001).

b. Precolumnas. Se usan para aumentar la vida de la columna analítica, se coloca delante de ella. Esto permite que la precolumna elimine no sólo la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes sino también componentes de la muestra que se unen irreversiblemente a la fase estacionaria. A veces, sirve para saturar la fase móvil con la fase estacionaria

y así minimizar las pérdidas de ésta en la columna analítica. La composición del relleno de la precolumna debería ser semejante al de la columna analítica; sin embargo, el tamaño de partícula es por lo común mayor para minimizar la caída de presión. La precolumna se sacrifica para proteger a la columna analítica, más cara (Skoog, *et.al.*, 2001).

c. Columnas termostatzadas. La mayoría de los instrumentos comerciales llevan actualmente hornos para las columnas que controlan la temperatura de la columna a las décimas de grado, desde la temperatura ambiente hasta 100 o 150°C. Para poder controlar con resolución la temperatura, las columnas también se pueden colocar en camisas con agua que provenga de un baño a temperatura constante (Skoog, *et.al.*, 2001).

4. Detectores. Uno de los mayores retos en el desarrollo de la cromatografía de líquidos ha sido el perfeccionamiento de los detectores. Los detectores en cromatografía de líquidos son de dos tipos básicos. Los detectores que se basan en la medida de una propiedad de la disolución responden a una propiedad del efluente, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica o la densidad, que se modifica por la presencia de los analitos. Por el contrario, los detectores basados en una propiedad del soluto responden a alguna de las propiedades del soluto, como la absorbancia en el UV, fluorescencia, o corriente límite, que no son inherentes a la fase móvil. (Skoog, *et.al.*, 2001)

Dos tipos de detectores de radiación UV se utilizan hoy en día, el de longitud de onda variable y el detector de arreglo de diodos (DAD). El detector incorporado al cromatógrafo líquido de alta resolución tiene la característica de detectar en forma simultanea lectura en toda la región del espectro ultravioleta y visible. (Skoog, *et.al.*, 2001)

E. Calificación.

Es el proceso en el cual por medio de evidencia documentada se establece que los sistemas de un equipo funcionan correctamente, dentro de las especificaciones de operación. (Velazquez, 2006)

En las BPL se dedica un espacio a las calificaciones de equipos para manufactura y control de calidad. Al realizar una calificación de equipo, se deben de seguir cuatro procedimientos básicos que son:

Calificación de diseño (DQ), este se realiza únicamente en equipos nuevos.

Calificación de instalación (IQ), este tiene por objeto establecer por medio de evidencia válida y confiable que todos los aspectos necesarios para la instalación se encuentran dentro de las limitantes establecidas por el fabricante.

Calificación de Operación (OQ), en esta se debe demostrar que el equipo siendo validado opera de la misma forma que se definió en el diseño, según el fabricante.

Calificación de funcionamiento (PQ), en esta parte se debe demostrar el correcto funcionamiento, por medio de mediciones y herramientas estadísticas aplicadas a experimentación de las variables a controlar. (FDA, 2011)

F. Validación.

La finalidad de realizar la calificación de equipo es validar los procedimientos que se llevan a cabo en el mismo. Actualmente, las Buenas Prácticas de Manufactura, o BPM, requieren que los métodos de prueba utilizados para evaluar el cumplimiento de productos de acuerdo con sus especificaciones establecidas cumplan con normas adecuadas, en términos de exactitud y confiabilidad. (USP, 2001)

La validación de un procedimiento de análisis es el que establece, mediante estudios debidamente documentados, que las características de desempeño del procedimiento cumple con los requisitos para las aplicaciones

analíticas previstas. Estas características analíticas utilizadas para la validación de métodos incluye, exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, intervalo y robustez. (USP, 2011)

La exactitud es definida como la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos y el valor verdadero. La precisión es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se realiza el procedimiento repetidamente a muestreos aleatorios. La especificidad es la capacidad de evaluar el analito en presencia de componentes previsibles como impurezas, productos de degradación y de la matriz. El límite de detección se refiere a la cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser detectado. El límite de cuantificación es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables. Linealidad se define como la capacidad de obtener resultados proporcionales. Y robustez se refiere a la medida de la capacidad del procedimiento analítico para no afectar los resultados por variaciones pequeñas. (USP, 2011)

IV. MARCO METODOLÓGICO

A. Objetivos.

1. Objetivos generales.

a. Calificar el equipo de cromatografía líquida de alta presión marca Agilent serie 1100, del Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad del Valle de Guatemala, con el fin de obtener resultados confiables que permitan la utilización del equipo de acuerdo a las normas vigentes internacionales.

b. Generar información documentada del funcionamiento del equipo de cromatografía líquida de alta presión marca Agilent serie 1100, del Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad del Valle de Guatemala

2. Objetivos específicos.

a. Calificar la instalación del cromatógrafo líquido de alta presión marca Agilent serie 1100.

b. Verificar la operación del cromatógrafo líquido de alta presión marca Agilent serie 1100.

c. Calificar el desempeño del cromatógrafo líquido de alta presión marca Agilent serie 1100.

d. Elaborar un protocolo de calificación para el cromatógrafo líquido de alta presión marca Agilent serie 1100, que permita un monitoreo y calificación continua.

B. Hipótesis.

Los parámetros para la calificación del cromatógrafo líquido de alta presión marca Agilent serie 1100, del Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad del Valle de Guatemala, se encuentran dentro de los límites de aceptación definidos por el fabricante.

C. Variables.

1. Variables independientes.

- a. Temperatura ambiental.
- b. Humedad relativa
- c. Longitud de onda del detector.
- d. Precisión del detector.
- e. Precisión del inyector.
- f. Gradiente de composición de la bomba.

2. Variables dependientes.

- a. Ruido del sistema de bombeo.
- b. Ruido del detector.
- c. Linealidad del detector.
- d. Flujo del sistema de bombeo.
- e. Contaminación por arrastre del inyector.

D. Población y muestra.

El cromatógrafo líquido de alta precisión (HPLC) marca Agilent, serie 1100 del Laboratorio del Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad del Valle de Guatemala.

E. Procedimiento.

La metodología se divide en tres calificaciones:

1. Calificación de la instalación.

a. Objetivos.

1) Registrar los datos de ubicación, ambiente e infraestructura del lugar donde se instaló el sistema HPLC Agilent 1100.

2) Evaluar si el lugar en donde se encuentra instalado el equipo, cumple con requerimientos del medio ambiente e infraestructura indicados por el fabricante en el manual de operaciones.

3) Verificar que el sistema HPLC Agilent 1100 se ha instalado de forma adecuada.

b. Metodología.

1) Ubicación. Registrar los siguientes datos del lugar donde se instaló el sistema:

- a) Nombre de la Institución.
- b) Nombre del Laboratorio.
- c) Edificio.
- d) Número de Aula.

2) Control de ambiente e infraestructura. Registrar los siguientes datos de ambiente e infraestructura, las especificaciones se encuentran en Agilent, 2004:

- a) Lugar de instalación.
- b) Presencia de polvo.
- c) Presencia de gases corrosivos.
- d) Presencia de campos magnéticos.

- e) Mesa de instalación y sus dimensiones (Con al menos 2.5 cm de espacio de cada lado y 8 cm en la parte trasera).
 - f) Estabilidad de la mesa.
 - g) Módulos dispuestos horizontalmente.
 - h) Temperatura adecuada (Entre 0°C y 55°C).
 - i) Humedad ambiente adecuada (<95 %, entre 25° y 40° C).
 - j) Altitud de operación (Hasta 2000 m. sobre el nivel del mar) .
 - k) Voltaje adecuado (100 – 120 ó 200 - 240 VAC \pm 10%, 50 Hz).
 - l) Frecuencia de la línea (50 o 60 Hz \pm 5%).
- 3) Descripción del sistema. Registrar las siguientes características:
- a) Sistema computacional y sus características.
 - b) Nombre del Software y versión.
- 4) Módulos del sistema. Registrar los siguientes datos:
- a) Identificar cada módulo del sistema.
 - b) Registrar el modelo.
 - c) Registrar el número de serie.
- 5) Registro de la documentación. Registrar los siguientes documentos:
- a) Manuales de operación (Idioma y ubicación).
- 6) Instalación. Verificar y registrar los siguientes datos:
- a) Apariencia externa del sistema.
 - b) Presencia de contaminación.
 - c) Presencia de golpes.
 - d) Presencia de anomalías.

2. Calificación de operación.

a. **Objetivo.** Demostrar que el sistema opera normalmente, según las especificaciones del manual de usuario.

b. **Metodología.**

1) Estado de los módulos. Encender el equipo y verificar los siguientes indicadores, según Agilent 2004:

a) Un indicador LED verde en el switch de encendido que indica que la energía está encendida.

b) Un indicador LED multicolor en la parte superior derecha de cada módulo que indica el estado del sistema.

i) Rojo: indica error.

ii) Amarillo: El aparato no está listo .

iii) Apagado: El sistema está listo (ChemStation está en verde).

iv) Verde: El sistema está en modo de corrida (ChemStation está azul).

2) Información diagnóstica. Realizar el siguiente procedimiento, según Agilent 2004:

a) Seleccionar la vista *Diagnosis*.

b) Seleccionar *Update Variables Display*.

c) Seleccionar *Error Logbook Show*.

d) Verificar que no haya errores en el sistema.

3) Información modular. Realizar el siguiente procedimiento, según Agilent 2004:

a) Seleccionar la vista *Show Module Tests*.

b) Seleccionar cada una de las pruebas del sistema por separado y presionar *Start*.

c) Verificar en los resultados que todas las pruebas sean aprobadas con la palabra *Passed* bajo la ventana de *Result*.

4) Reporte de la columna. Realizar el siguiente procedimiento, según Agilent 2007:

a) Seleccionar la vista *Method and Run Control*.

b) Seleccionar el *Spectrum* y marcar *Store All*.

c) Realizar cinco lecturas con las siguientes condiciones:

Agua pura grado HPLC en canal A, Acetonitrilo grado HPLC en canal B. 0.8 ml/min 85% A / 15% B (Agua / Acetonitrilo). Estándar #3, 125 µg/ml del kit de estándares de cafeína.

d) Seleccionar *Specify report*, seleccionar *Performance, Print Report*.

3. Calificación de desempeño.

a) Prueba de óxido de holmio.

1) Objetivo. Verificar la correcta calibración de longitud de onda del detector.

2) Aspectos generales. La exactitud de la calibración de la longitud de onda del detector puede ser determinado midiendo el espectro de un compuesto bien conocido. Algunas bandas en el espectro deben aparecer a longitudes de onda bien definidas. Desviaciones de estas longitudes de onda son una medida de inexactitud del detector. El filtro de óxido de holmio tiene absorbancia característica máxima que puede ser utilizada para determinar la exactitud de la longitud de onda. (HP, 1997)

El detector de arreglo de diodos utiliza las siguientes longitudes para verificar la exactitud de la longitud de onda: 361 nm, 453.7 nm, 536.7 nm.

El test de óxido de holmio determina la desviación de la máxima medida y la longitud de onda máxima esperada. Para eliminar los efectos de solventes adsorbentes, el test se realiza con agua en la celda de flujo. (HP, 1997)

3) Condiciones.

- a) Método: DGNOISE.M.
- b) Fase móvil: agua grado HPLC en canal A.
- c) Flujo: 1 ml/min 100% A.
- d) Unión de volumen cero.

4) Evaluación. La exactitud está dada como la diferencia entre la medida y las longitudes de onda teóricas dadas en la máxima. El mínimo y máximo de la intensidad de la lámpara está determinado en un rango definido de longitud de onda y es comparado automáticamente con el límite de aceptación de 2 nm. (HP, 1997)

b) Estabilidad de ruido.

1) Objetivo. Verificar que el detector y sistema de bombeo están operando dentro de los límites de aceptación definidos para el sistema de ruido.

2) Aspectos generales. El ruido, desvío y errática son características de un detector que especifican su rendimiento. Tener un bajo nivel de ruido es importante, especialmente cuando se analizan compuestos a bajo nivel traza. La deriva y errática tienen un impacto directo en la calidad de integración. (HP, 1997)

El ruido para detectores de absorbancia UV-Visible está determinado por el método ASTM (ASTM E 19.09). Para esta prueba se calcula el ruido a corto plazo, lo cual es la máxima amplitud de todas las variaciones aleatorias

de la señal del detector a una frecuencia mayor que un ciclo por minuto. Este método permite determinar el ruido independiente de los efectos que resultan del desvío o errática. La prueba también determina estos factores, la errática está dada como la pendiente lineal de la señal medida durante el tiempo de prueba.

El ruido es el resultado de la influencia del detector y la bomba. El detector contribuye con un ruido que tiene más de un modelo estadístico. El ruido aportado por la bomba muestra un patrón más rítmico. (HP, 1997)

Para medir el ruido de la forma más realista posible, el agua es elegida como disolvente ya que se utiliza en la mayoría de las combinaciones de disolventes. La longitud de onda seleccionada se encuentra también en una gama de longitud de onda utilizada. La deriva es básicamente el resultado de la influencia de la temperatura, su impacto es mayor durante el tiempo de calentamiento de la lámpara. La determinación del ruido ASTM requiere el calentamiento de la lámpara durante 24 horas para minimizar los efectos de deriva por temperatura. (HP, 1997)

3) Condiciones.

- a) Método: DGNOISE.M.
- b) Fase móvil: agua grado HPLC en canal A.
- c) Flujo: 1 ml/min 100% A.
- d) Unión de volumen cero.

4) Evaluación. En primer lugar, la señal se divide en 20 segmentos de tiempo de un minuto. La deriva de cada segmento se determina a partir de la pendiente lineal de regresión lineal (uno por segmento). A continuación, la deriva corregida de pico a pico de ruido de cada segmento de tiempo se determina como el ruido de pico a pico entre los paralelos (distancia vertical) de cada segmento de tiempo. El valor de ruido se da como la media de todas las determinaciones del ruido de pico a pico.

El valor de deriva se da como el promedio de las pendientes de los 20 segmentos de tiempo. (HP, 1997)

La errática se determina marcando los centros de los 20 segmentos de tiempo, y después aplicando el cálculo de ruido en la línea creada uniendo los 20 centros. (HP, 1997)

El ruido, deriva y errática se comparan automáticamente con los criterios definidos que son ruido ASTM 0.05mAU/hr, desvío 4 mAU/hr, y errática 0.2 mAU. (HP, 1997)

c) Estabilidad de flujo.

1) Objetivo. Verificar que el sistema de bombeo entrega volúmenes de solvente dentro de los límites aceptados definidos, y verificar que no haya errores grandes de flujo. Los errores de flujo tienen un impacto negativo en todos los parámetros cromatográficos.

2) Aspectos generales. El flujo se define como la cantidad de volumen entregado por tiempo. En este cromatógrafo el flujo se define como la velocidad del émbolo. Se hace la verificación de la razón de flujo colectando un volumen de solvente predefinido entregado por el sistema de bombeo, y tomando el tiempo requerido para coleccionar el volumen del solvente. (HP, 1997)

Durante la prueba de estabilidad de ruido, el desagüe del detector está dirigido a un matraz volumétrico, y el tiempo requerido para coleccionar el volumen predefinido es medido. (HP, 1997)

3) Instrumentos.

- a) HPLC Agilent 1100.
- b) Bomba binaria.
- c) DAD.
- d) ChemStation.

4) Condiciones.

- a) Método: DGNOISE.M.

- b) Fase móvil: agua grado HPLC en canal A.
- c) Flujo: 1 ml/min 100% A.
- d) Volumen de unión cero.

5) Evaluación. La cantidad de disolvente recogido a la salida del detector dentro del tiempo especificado se introduce en el cuadro de diálogo que aparece durante el funcionamiento. El volumen que se recogió dentro del período de tiempo se utiliza para calcular la resolución de caudal. Este flujo medido se compara con el valor de consigna de flujo utilizado durante el ensayo. El límite de aceptación para este ensayo es de 5% de error. (HP, 1997)

d. Prueba de precisión de longitud de onda.

1) Objetivo. Verificar la precisión de longitud de onda del detector de UV en el rango UV inferior. Para los rangos UV inferiores, la precisión de longitud de onda se comprueba utilizando un compuesto con absorbancia conocida en el rango UV baja.

2) Aspectos generales. La exactitud de las longitudes de onda se puede determinar midiendo el espectro de un compuesto de espectro conocido. Algunas bandas dentro de este espectro debe aparecer en longitudes de onda bien definidas. Las desviaciones de estas longitudes de onda definidas son una medida de la inexactitud del detector. Esta prueba utiliza una solución 0,125 mg / ml de cafeína en agua (incluida en el paquete de estándares). La cafeína muestra un máximo de absorbancia característica a 272 nm, y un mínimo de la absorbancia a 244 nm. Ambas longitudes de onda se utilizan para verificar la precisión de la longitud de onda del detector UV. (HP, 1997)

Detector de arreglo de diodos (DAD). La muestra de cafeína es inyectada en la columna. Un espectro de muestra de cafeína es tomado cuando la muestra llega a la celda de flujo del detector. (HP, 1997)

3) Instrumentos.

- a) Bomba binaria Agilent serie 1100 .
- b) DAD.
- c) Controlador ChemStation.

4) Condiciones de prueba.

- a) Método: PRECISION.M
- b) Fase móvil: agua pura grado HPLC en canal A, acetonitrilo grado HPLC en canal B.
- c) Flujo: 0.8 ml/min 85% A/ 15% B (Agua / Acetonitrilo)
- d) Columna: Agilent Eclipse C18.
- e) Estándar #3 (0.125 mg/ml cafeína).

5) Evaluación. La desviación (en nm) de la máxima longitud de onda medida y mínima a partir del máximo esperado y mínimo esperado se calcula automáticamente. Los límites de aceptación para esta prueba son 2 nm en el mínimo y 2 nm en el máximo. (HP, 1997)

e. Prueba de precisión del inyector.

1) Objetivo. Verificar que la precisión del inyector se encuentre dentro de los límites aceptados.

2) Aspectos generales. El volumen de inyección de prueba de precisión se basa en una secuencia de carreras donde se inyecta un estándar cafeína varias veces siempre con el mismo volumen. Los cromatogramas deben mostrar un pico con cafeína siempre las mismas áreas. Las desviaciones de las áreas de la media de las superficies debe ser mínimo. Este hecho está expresada por la desviación estándar de los puntos

de la zona de datos. Esta desviación estándar se establece en relación con la media de las zonas para obtener la desviación estándar relativa que se usa aquí como una medida para la precisión. Este valor finalmente se compara con los criterios de aceptación. (HP, 1997)

3) Instrumentos.

- a) Bomba binaria Agilent serie 1100.
- b) DAD.
- c) ChemStation.

4) Condiciones.

- a) Método: PRESICION.M.
- b) Fase móvil: agua pura grado HPLC en canal A, acetonitrilo grado HPLC en canal B.
- c) Flujo: 0.8 ml/min 85% A / 15% B (Agua / Acetonitrilo).
- d) Columna: Agilent Eclipse C18.
- e) Estándar #3 (0.125 mg/ml cafeína).

5) Evaluación. Las áreas de pico medias, las alturas y los tiempos de retención de cada corrida de cafeína se determinan, y la desviación estándar relativa (RSD%) de estos promedios se calcula. Los límites de aceptación para esta prueba son: área de los picos 1% rsd, altura de los picos 2% rsd, y tiempo de retención 0.3% rsd. (HP, 1997)

f. Prueba de linealidad del detector.

1) Objetivo. Verificar que el detector muestra una respuesta lineal con el rango de absorbancia de trabajo (hasta un máximo de 2 AU).

2) Aspectos generales. Detectores de absorción se vuelven no lineales cuando la cantidad de luz absorbida aumenta por encima de un cierto límite. El principal contribuyente a la no linealidad es la luz parásita. A

valores altos de absorbancia, la luz difusa se vuelve significativa, y tiene un efecto creciente sobre la respuesta de los detectores.

La prueba de linealidad se basa en una secuencia de corridas donde se inyecta un estándar de cafeína varias veces a partir de diferentes viales utilizando siempre el mismo volumen de inyección, pero cada vial con un aumento de la concentración. Los cromatogramas deben mostrar un pico de cafeína con el aumento de tamaño correspondiente. Cuando las áreas de los picos (o alturas) se representan frente a la concentración (cantidad), los puntos deben estar en una línea recta que pasa a través del origen. (HP, 1997)

3) Instrumentos.

- a) Método: PRESICION.M.
- b) Fase móvil: agua pura grado HPLC en canal A, acetonitrilo grado HPLC en canal B.
- c) Flujo: 0.8 ml/min 85% A / 15% B (Agua / Acetonitrilo).
- d) Columna: Agilent Eclipse C18.
- e) Estándares #1 (0.005 mg cafeína/agua), #2 (0.025 mg cafeína/agua), #3 (0.125 mg cafeína/agua), #4 (0.250 mg cafeína/agua) y #5 (0.500 mg cafeína/agua).

4) Evaluación. Cuando las áreas de los picos (o alturas) se representan frente a la concentración (cantidad), los puntos deben estar en una línea recta que pasa a través del origen. De hecho, esto es una curva de calibración con ajuste lineal y forzados parámetros de origen. La correlación de esta curva de calibración es utilizada como un criterio de medida de la linealidad del detector. El inverso de la pendiente de la línea recta representa el factor de respuesta, que es impreso en la tabla de calibración para cada nivel. Estos factores de respuesta son idealmente los mismos. La desviación estándar relativa es un criterio de linealidad del detector. (HP, 1997)

Cinco corridas se llevan a cabo para evaluar los resultados. El método provee de una tabla de calibración de cinco niveles. Cada corrida recalibra su nivel apropiado utilizando la opción de reemplazo del factor de respuesta. Los límites de aceptación para este método son: correlación 0.999, y factor de respuesta 5% rsd. (HP, 1997)

g. Prueba de arrastre del inyector.

1) Objetivo. Verificar que la contaminación, de las muestras de la inyección anterior, esté dentro de los límites de aceptación.

2) Aspectos generales. Para probar el arrastre una inyección se realiza a partir de un vial lleno con una muestra de alta concentración. Luego, una inyección se realiza a partir de un vial diferente lleno sólo con el disolvente de la muestra anterior. Idealmente, no debería de aparecer muestra en el segundo análisis. El área o cantidad que se encuentra en el segundo análisis es la medida de los remanentes o el arrastre del inyector. (HP, 1997)

3) Instrumentos.

- a) Bomba binaria Agilent Serie 1100
- b) DAD
- c) ChemStation

4) Condiciones.

- a) Método: PRESICION.M.
- b) Fase móvil: agua pura grado HPLC en canal A, acetonitrilo grado HCPL en canal B.
- c) Flujo: 0.8 ml/min 85% A / 15% B (Agua / Acetonitrilo).
- d) Columna: Agilent Eclipse C18.
- e) Inyección de agua.

5) Evaluación. El área, la altura y la cantidad del pico de cafeína de la segunda inyección con disolvente puro se determina. Los límites de aceptación son: área 0.2% rsd, cantidad 0.2% rsd y altura 0.4% rsd. (HP, 1997)

h. Prueba de gradiente de composición.

1) Objetivo. Comprobar que la bomba es capaz de generar un gradiente de composición de acuerdo con los límites de aceptación.

2) Aspectos generales. La prueba de gradiente se basa en el método que se describe en el documento ASTM E-19.09.07: *Propuesta de norma práctica para la evaluación del gradiente de las bombas de HPLC*. Esta prueba determina: precisión de la composición, onda dentro de cada corrida, y precisión de la composición a través de múltiples corridas.

3) Instrumentos.

- a) Bomba binaria Agilent Serie 1100.
- b) DAD.
- c) ChemStation.

4) Condiciones. Un capilar de restricción es requerido, este se utiliza en lugar de una columna para minimizar la presión de retorno en esta alta velocidad de flujo, y para eliminar los efectos potenciales de columna. El capilar se debe colocar entre el compartimento de la columna y el detector (el capilar debe producir una contrapresión de 100-150 bar cuando se ejecuta el método). (HP, 1997)

Isopropanol puro grado HPLC en canal A, isopropanol / acetona (99.5% / 0.5%) grado HPLC en canal B. (HP, 1997)

5) Evaluación. Tres corridas se realizan para determinar la precisión de la exactitud de cada composición. Para cada etapa del gradiente y para cada corrida, el ruido de mezcla u ondulación y la diferencia entre las alturas teóricas experimental se determinará. (HP, 1997)

a) Exactitud de composición. Se determina la diferencia entre la altura teórica y la medida, expresada en unidades de porcentaje de B. El límite de aceptación para la exactitud es de 0.5%. (HP, 1997)

b) Precisión de la exactitud. La exactitud de composición promedio con su desviación estándar se calcula de las determinaciones individuales. El valor absoluto de la exactitud de composición promedio con su desviación estándar se calcula de las determinaciones individuales. El valor absoluto de la exactitud de composición promedio se compara entonces con el límite de precisión (criterios de aceptación). Si sólo una carrera se hace, el valor absoluto de la precisión de la única prueba se compara con el límite de precisión. El límite de aceptación para la precisión es de 0.5%. (HP, 1997)

c) Ondulación. La ondulación se determina como el ruido pico a pico (ruido de mezcla) de un paso expresada en unidades de porcentaje de B. La ondulación se calcula como el ruido pico a pico de cada paso en todas las corridas. La ondulación medida se determina como la ondulación máxima de cada paso en todas las corridas. (HP, 1997)

La altura medida de cada paso en todas las ejecuciones se determinan. Las diferencias de altura de paso de cada paso en todas las corridas se determinan a continuación. La diferencia de altura de los picos se define como la altura de paso medida menos altura del pico teórico. Para cada paso, la media y la desviación estándar de las diferencias de altura paso a través de todas las series se determina. La precisión global se define como el máximo de los valores absolutos de todas las alturas de pico medio. Este valor se compara con los criterios de aceptación que es de 0.5%. (HP, 1997)

Tabla No. 1: *Composición para la bomba binaria*

Tiempo (minutos)	% Canal A (Isopropanol)	% Canal B (99.5% isopropanol / 0.5% acetona)
1.00	100	0
1.01	99	1
5.00	99	1
5.01	100	0
8.00	100	0
8.01	0	100
13.00	0	100
13.01	1	99
17.00	1	99
17.01	100	0
20.00	100	0

(HP, 1997)

F. Diseño de investigación.

1. Descripción del área. El cromatógrafo líquido de alta resolución se encuentra en una sala del Laboratorio de Química Farmacéutica la Universidad del Valle de Guatemala. La sala del laboratorio cuenta con acceso restringido. La temperatura y humedad del laboratorio serán registradas.

2. Requisitos previos a la calificación. Se debe disponer de:

- a. Manual de operación y guía de usuario del cromatógrafo líquido de alta resolución Agilent 1100.
- b. Instrumentos adecuados.
- c. Solventes adecuados grado HPLC para el análisis.
- d. Estándares adecuados para el análisis.

3. Protocolo de validación. El método utilizado para la calificación del Cromatógrafo de alta resolución Agilent 1100 se encuentra en el Anexo C, desarrollado durante la etapa experimental de la investigación. En dicho método se encuentran los parámetros de aceptación y los pasos a seguir para realizar periódicamente el procedimiento de calificación.

G. Análisis estadístico.

Se utilizó la estadística descriptiva para determinar los parámetros del método de calificación de la metodología propuesta.

Los datos obtenidos, se presentan en forma de tablas, y se realizaron los cálculos correspondientes para cada parámetro. Los parámetros estadísticos muestrales se comparan con los límites de aceptación propuestos por el fabricante.

Se calculó los diferentes parámetros estadísticos: Análisis de regresión, desviación estándar relativa, promedio, y error absoluto.

La media aritmética o promedio, es la suma de todas las observaciones dividida entre el número total de los datos. (Skoog, 2001)

La desviación estándar, es una medida de dispersión que indica numeralmente la tendencia a alejarse los valores puntuales del valor promedio en una distribución dada. (Skoog, 2001)

La desviación estándar relativa, es la desviación estándar expresada como un porcentaje de la media. (Skoog, 2001)

El error absoluto es la medida basada en la diferencia numérica entre el valor experimental y el verdadero. (Skoog, 2001)

H. Equipo y materiales.

1. Cromatógrafo líquido de alta resolución marca Agilent, serie 1100.
2. Software ChemStation.
3. Columna Xterra RP 18.
4. Capilar de restricción.
5. Nivel medidor marca Stanley.
6. Termo-higrómetro digital marca OMEGA, modelo RH411.
7. Cronómetro digital.
8. Probeta graduada de 10 mL marca Tekk.
9. Jeringa de vidrio de 5 ml con cierre Luer.
10. Adaptador de jeringa con cierre Luer.
11. Agua grado HPLC.
12. Acetonitrilo HPLC.
13. Isopropanol HPLC.
14. Acetona HPLC.
15. Kit de estándares de cafeína:
 - a. Estándar 1, 0.005 mg/ml de cafeína en agua.
 - b. Estándar 2, 0.025 mg/ml de cafeína en agua.
 - c. Estándar 3, 0.125 mg/ml de cafeína en agua.
 - d. Estándar 4, 0.250 mg/ml de cafeína en agua.
 - e. Estándar 5, 0.500 mg/ml de cafeína en agua.

V. MARCO OPERATIVO

A. Recabación y tratamiento de los datos.

Se efectuaron pruebas al cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) Agilent serie 1100, del Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad del Valle de Guatemala, con el fin de validar el equipo comprobando que los siguientes parámetros se encuentran dentro de los límites de aceptación.

1. Prueba de óxido de holmio.
2. Estabilidad de ruido.
3. Estabilidad de flujo.
4. Precisión de longitud de onda.
5. Precisión del inyector.
6. Linealidad del detector.
7. Arrastre del inyector.
8. Linealidad del inyector.
9. Gradiente de composición.

Los resultados se presentan tabulados y comparados con los límites de aceptación especificados. Los datos obtenidos, se presentan mediante estadística descriptiva, los cálculos incluyen análisis de regresión, desviación estándar relativa, promedio, y error absoluto.

B. Recursos.

1. Recursos humanos.

Autora	Ana Carolina Mejicanos Boleres
Asesor	Dr. Elfego Rolando López
Colaboradores	Lda. Ana Luisa Mendizabal Lic. Carlos Pineda Sr. William Montenegro (Experto en mantenimiento de equipo instrumental para análisis químico)

2. Recursos materiales.

a. Equipo.

1100.

- 1) Cromatógrafo líquido de alta resolución marca Agilent, serie
- 2) Software ChemStation.

b. Materiales y cristalería.

- 1) Columna ZORBAX Eclipse C18.
- 2) Capilar de restricción.
- 3) Cronómetro digital.
- 4) Frasco volumétrico clase A de 5 ml.
- 5) Jeringa de virio de 5 ml con cierre Luer.
- 6) Adaptador de jeringa con cierre Luer.

c. Reactivos.

- 1) Agua grado HPLC.
- 2) Acetonitrilo HPLC.
- 3) Isopropanol HPLC.
- 4) Kit de estándares de cafeína:
 - a) Estándar 1, 0.005 mg/ml de cafeína en agua.
 - b) Estándar 2, 0.025 mg/ml de cafeína en agua.
 - c) Estándar 3, 0.125 mg/ml de cafeína en agua.
 - d) Estándar 4, 0.250 mg/ml de cafeína en agua.
 - e) Estándar 5, 0.500 mg/ml de cafeína en agua.

Las pruebas se llevaron a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Química Farmacéutica de la Universidad del Valle de Guatemala.

V. RESULTADOS

A. Calificación de instalación.

1. Tabla No. 2: *Ubicación.*

Nombre de la institución	Universidad del Valle de Guatemala
Nombre del laboratorio.	Departamento de Química Farmacéutica
Edificio	E
Número de Aula	105

2. Tabla No. 3: *Control de ambiente e infraestructura.*

Control	Especificación*	Cumple	No cumple
Polvo	Libre	✓	
Gases corrosivos	Libre	✓	
Campos magnéticos	Libre	N/A	N/A
Dimensiones de la mesa	Con al menos 2.5 cm de espacio de cada lado y 8 cm en la parte trasera	✓	
Estabilidad de la mesa	Estable	✓	
Módulos	Dispuestos horizontalmente	✓	
Temperatura	Entre 0°C y 55°C	✓ (19 – 22°C)	
Humedad ambiente	<95 % HR (entre 25 y 40 °C)	✓ (63 – 75 % HR)	
Altitud	Hasta 2000 m. sobre el nivel del mar	✓	
Voltaje	100 – 120 ó 200 – 240 VAC ±10%	✓ (220.8 VAC)	
Frecuencia de línea	50 o 60 Hz ± 5%	✓ (60 Hz)	

* Agilent. Agilent 1100 series, User's Guide. USA. 1999.

3. Tabla No. 4: *Descripción del sistema.*

Sistema	Marca	Serie
Monitor	Acer	X183H
CPU	Compaq HP	dc5750 Microlower
Software	Windows	XP Professional
ChemStation	HP	B.01.01(164)
UPS	Tripp lite	AGPS5183

4. Tabla No. 5: *Módulos del sistema.*

Módulo	Modelo	Serie
Bomba binaria	G1312A	DE14911578
Detector de arreglo de diodos	G1315B	DE4362972

5. Tabla No. 6: *Registro de la documentación.*

Manual	Idioma	Edición	Ubicación
Agilent 1100 Series HPLC Value System: User's Guide	Inglés	11/99	Secretaría del Depto. de Química Farmacéutica
Agilent ChemStation: Understanding your ChemStation	Inglés	07/09	Secretaría del Depto. de Química Farmacéutica
Agilent ChemStation for LC 3D Systems: Understanding your Spectra Module	Inglés	06/08	Secretaría del Depto. de Química Farmacéutica

6. Tabla No. 7: *Instalación.*

Control	Especificación*	Cumple	No cumple
Contaminación	Libre	✓	
Golpes	Libre	✓	
Anormalidades	Libre	✓	

* Agilent. Agilent 1100 series, User's Guide. USA. 1999.

7. Resultados de la calificación de instalación. Los resultados aplican únicamente para el equipo HPLC marca Agilent, serie 1100 con los módulos Bomba binaria G1312A, serie DE14911578 y Detector de arreglo de diodos G1315B, serie DE4362972.

Éste se encuentra ubicado en la Universidad del Valle de Guatemala, en el edificio E, salón 105. El salón cuenta con acceso restringido, no cuenta con temperatura controlada. El edificio E se encuentra a 1509m sobre el nivel del mar.

El equipo cuenta con tres manuales del uso del equipo, los cuales están ubicados en la secretaría del Departamento de Química Farmacéutica en idioma inglés, estos son: Agilent 1100 Series HPLC Value System: User's Guide, edición 11/99. Agilent ChemStation: Understanding your ChemStation, edición 07/99. Agilent ChemStation for LC 3D Systems: Understanding your Spectra Module, edición 07/08.

El ambiente donde se encuentra el equipo está libre de polvo y gases corrosivos, éste está ubicado en una mesa estable de concreto, los módulos están dispuestos horizontalmente esto se verificó con un nivel marca Stanley, la temperatura se mantuvo entre 19° y 22° C y humedad relativa entre 63% y 75% HR, verificado por medio de un termo-higrómetro digital marca OMEGA, modelo RH411.

No se verificó la presencia de campos magnéticos debido a la falta de medidores de inmisión de campo magnético, sin embargo, no se observaron fuentes visibles a los alrededores.

El equipo se encuentra conectado a un voltaje de 220 VAC con frecuencia de 60 Hz, verificado con un voltímetro de pinza marca General Line, serie 266 Data Hold. La corriente está asegurada por el UPS, este tiene capacidad de respaldo de 1 kVA en tiempo 0, ó inmediato durante un fallo de energía eléctrica.

B. Calificación de operación.

1. Tabla No. 8: *Estado de los módulos.*

Módulo	Color	Indicación*	Cumple	No cumple
Switch	Verde	Energía encendida	✓	
Bomba binaria	Rojo	Error	✓	
	Amarillo	No está listo	✓	
	Apagado	Listo	✓	
	Verde	Corrida en proceso	✓	
Detector de arreglo de diodos	Rojo	Error	✓	
	Amarillo	No está listo	✓	
	Apagado	Listo	✓	
	Verde	Corrida en proceso	✓	

* Agilent. Agilent 1100 series, User's Guide. USA. 1999.

2. Tabla No. 9: *Información diagnóstica.*

Control	Especificación*	Cumple	No cumple
Presencia de errores	Libre	✓	

* Agilent. Agilent 1100 series, User's Guide. USA. 1999.

3. Tabla No. 10: *Información modular.*

Prueba	Especificación*	Resultado	Cumple	No cumple
Corriente oscura ⁺	Máximo: ≤ 1200 cts Mínimo: >0 cts	Máximo: 2987 cts. Mínimo 2865 cts.	✓	
Celda-DAD ⁺⁺	Cumple/No cumple	Cumple (0.7)	✓	
Filtro DAD ⁺⁺⁺	0.005 – 0.500 AU	0.080 AU	✓	
Calibración de longitud de onda ⁺⁺⁺⁺	Línea alfa ≈ 656.10 nm Línea beta ≈ 486.00 nm Max. Desviación <0.50 nm	Línea alfa = 656.39 nm Línea beta = 486.13 nm Max. Desviación 0.29 nm	✓	
++++ Intensidad	Intensidad mínima: 190–220 nm: >2000 cts. 221–350 nm: >5000 cts. 351–500 nm: >2000 cts. 221–350 nm: >5000 cts. Intensidad máxima: 190–350nm: <450000 cts. 700–950 nm: <300000 cts. D2 Alfa: <1200000 cts.	Intensidad mínima: 190–220 nm: 3026 cts. 221–350 nm: 11064 cts. 351–500 nm: 6524 cts. 221–350 nm: 11336 cts. Intensidad máxima: 190–350nm: 30574 cts. 700–950 nm: 37508 cts. D2 Alfa: 122732 cts.	✓	
Slit ⁺⁺⁺⁺	0.70 -1.30	0.91	✓	
Mínima señal de línea base ⁺⁺⁺⁺	<0.0020 AU	0.0002 AU	✓	
Columna	Platos teóricos 0.5% rsd	13.6 % rsd		✓
Presión	380 bar por 4 minutos	365 bar		✓

* HP. ChemStation. B.01.01(164)

+ Ver anexos, D. 1. a.

++ Ver anexos, D. 1. b.

+++ Ver anexos, D. 1. c.

++++ Ver anexos, D. 1. d.

+++++ Ver anexos, D. 1. e.

4. Resultados de la calificación de operación. Durante las pruebas para la calificación se observó el encendido de cada una de las luces led, las cuales indican el estado de los módulos. La información de diagnóstica no mostró errores durante las corridas en le interfase del ChemStation.

En la información modular se encontró que la corriente oscura cumple con el número de cuentas máximo y mínimo, la relación celda-DAD cumple con 0.7 según los resultados de la prueba, la prueba de filtro DAD cumple con 0.08 AU, la intensidad cumple con el número de cuentas tanto para la intensidad mínima como para la máxima, la calibración de la longitud de onda de las líneas alfa y beta cumplen con una desviación de 0.29 nm, la prueba de slit cumple con 0.91, la prueba de mínima señal de la línea base cumple con 0.0002.

La prueba de columna falló, aún al inyectar el mismo estándar a las mismas condiciones se obtuvo una dispersión de 13.6% rsd en cuanto a platos teóricos.

La prueba de presión falló al alcanzar los 365 bar de los 380 que indicaba la prueba.

C. Calificación de desempeño.

1. Tabla No. 11: *Prueba de óxido de holmio.*

Especificación*	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3
Absorbancia (nm)	Absorbancia (nm)	Absorbancia (nm)	Absorbancia (nm)
360.0 – 362.0	361.4	361.3	361.4
452.7 – 454.7	453.6	453.5	453.3
535.7 – 537.7	536.7	536.8	536.7
Resultado final	Cumple	Cumple	Cumple

*Hewlett Packard. Operational qualification/performance verification for complete HP 1100 series HPLC systems. USA. 1997.

** Ver anexos, D. 2. a.

2. Tabla No. 12: *Estabilidad de ruido.*

Criterio	Especificación*	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3
Ruido ASTM	≤ 0.02000 mAU	0.01322 mAU	0.01398 mAU	0.01356 mAU
Desvío	≤ 5.0000 mAU/hr	-0.6033 mAU/hr	-0.2959 mAU/hr	-0.1600 mAU/hr
Errática	≤ 0.20000 mAU	0.04436 mAU	0.01015 mAU	0.00538 mAU
Resultado final		Cumple	Cumple	Cumple

* HP. ChemStation. B.01.01(164)

** Ver anexos, D. 2. b.

3. Tabla No. 13: *Estabilidad de flujo.*

Criterio	Especificación*	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3
Volumen	5.0 ml	5.0 ml	5.1 ml	5.1 ml
Variación	± 5%	0%	2%	2%
Resultado final		Cumple	Cumple	Cumple

*Hewlett Packard. Operational qualification/performance verification for complete HP 1100 series HPLC systems. USA. 1997.

4. Tabla No. 14: *Prueba de precisión de longitud de onda.*

Criterio	Especificación* (nm)	Corrida 1 (nm)	Corrida 2 (nm)	Corrida 3 (nm)	Corrida 4 (nm)	Corrida 5 (nm)
Absorción máxima	272 ± 2	274	274	274	274	274
Absorción mínima	244 ± 2	246	246	246	246	246
Resultado final		Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple

*Hewlett Packard. Operational qualification/performance verification for complete HP 1100 series HPLC systems. USA. 1997.

** Ver anexos, D. 2. c.

5. Tabla No. 15: *Prueba de precisión del inyector con fase móvil mezclada por bomba binaria.*

Criterio	Límite máx.* (% rsd)	Corrida 1 (% rsd)	Corrida 2 (% rsd)	Corrida 3 (% rsd)	Corrida 4 (% rsd)	Corrida 5 (% rsd)
Área de picos	1.00000	1.37554	3.02714	6.40830	4.08573	1.62738
Altura de picos	2.00000	1.90688	2.74823	6.22764	5.34253	2.01081
Tiempo de retención	0.30000	0.59066	0.49506	0.37527	0.36800	0.40876
Resultado final		No cumple	No cumple	No cumple	No cumple	No cumple

* Hewlett Packard. Operational qualification/performance verification for complete HP 1100 series HPLC systems. USA. 1997.

**Ver datos originales en anexos, D. 2. d.

***Ver reporte en anexos, D. 2. e.

6. Tabla No. 16: *Precisión del inyector con fase móvil mezclada previamente.*

Criterio	Límite máx.* (% rsd)	Corrida 1 (% rsd)	Corrida 2 (% rsd)	Corrida 3 (% rsd)
Área de picos	1.00000	5.71924	1.03275	8.29015
Altura de picos	2.00000	5.64240	0.99045	8.27729
Tiempo de retención	0.30000	0.04749	0.03207	0.05499
Resultado final		No cumple	No cumple	No cumple

*Hewlett Packard. Operational qualification/performance verification for complete HP 1100 series HPLC systems. USA. 1997.

**Ver datos originales en anexos, D. 2. f.

***Ver reporte en anexos, D. 2. g.

7. Tabla No. 17: *Prueba de linealidad del detector con fase móvil mezclada por bomba binaria.*

Criterio	Especificación*	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 4	Corrida 5
Correlación (5 estándares)	0.99900	0.99629	0.99841	0.99844	0.99771	0.99751
Factor de respuesta (% rsd)	5.0000	64.1121	10.6394	8.4634	17.4466	9.7455
Resultado final		No cumple	No cumple	No cumple	No cumple	No cumple

*Hewlett Packard. Operational qualification/performance verification for complete HP 1100 series HPLC systems. USA. 1997.

**Ver datos originales en anexos, D. 2. h.

***Ver reporte en anexos, D. 2. i.

8. Tabla No. 18: *Prueba de linealidad del detector con absorbancias menores a 1 AU*

Criterio	Especificación*	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 4	Corrida 5
Correlación (3 estándares)	0.99900	0.99940	0.99940	0.99979	0.99150	0.99971
Resultado final		Cumple	Cumple	Cumple	No cumple	Cumple

*Hewlett Packard. Operational qualification/performance verification for complete HP 1100 series HPLC systems. USA. 1997.

**Ver datos originales en anexos, D. 2. j.

9. Tabla No. 19: *Prueba de linealidad del detector con fase móvil mezclada previamente.*

Criterio	Especificación*	Corrida 1	Corrida 2
Correlación	0.99900	0.99859	0.99920
Factor de respuesta	5.00000% rsd	69.32887 %	29.44765 %
Resultado final		No cumple	No cumple

*Hewlett Packard. Operational qualification/performance verification for complete HP 1100 series HPLC systems. USA. 1997.

**Ver datos originales en anexos, D. 2. k.

10. Tabla No. 20: *Prueba de arrastre del inyector.*

Criterio	Especificación*	Resultado (rsd)
Área de picos	0.20000 % rsd	51.32570 %
Cantidad	0.20000 % rsd	51.13336 %
Altura de picos	0.40000 % rsd	51.76995 %
Resultado final		No cumple

* Hewlett Packard. Operational qualification/performance verification for complete HP 1100 series HPLC systems. USA. 1997.

**Ver datos originales en anexos, D. 2. l.

*** Ver reporte en anexos, D. 2. m.

11. Tabla No. 21: *Prueba de gradiente de composición.*

Criterio	Especificación*	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3
Exactitud de composición	0.50000 % B máx.	0.41759 % B máx.	0.23078 % B máx.	0.33131 % B máx.
Precisión de exactitud	0.50000 % rsd	0.38827 % rsd	0.26627 % rsd	0.31408 % rsd
Ondulación	0.50000 % rsd	0.38258 % rsd	0.38944 % rsd	0.46933 % rsd
Resultado final		Cumple	Cumple	Cumple

* Hewlett Packard. Operational qualification/performance verification for complete HP 1100 series HPLC systems. USA. 1997.

**Ver datos originales en anexos, D. 2. n.

*** Ver reporte en anexos, D. 2. o.

12. Resultados de la calificación de desempeño. La prueba de óxido de holmio cumple con la especificación, indicando calibración adecuada para la longitud de onda del detector en longitudes UV cercano y visible.

La prueba de ruido cumple para ruido, desvío y errática. Durante la prueba de estabilidad de flujo se demostró que el flujo se encuentra dentro de especificaciones y que el sistema entrega volúmenes dentro de límites de aceptación definidos, los valores no fueron corregidos según la compresibilidad del agua ya que la presión de la prueba fue de 27 bar, presión a la cual la compresión es de $5 \cdot 10^{-5}$.

En la precisión de longitud de onda se encontró que los resultaron cumplieron, indicando correcta calibración y precisión de la longitud de onda en los rangos UV inferiores.

La precisión del inyector no cumple con las especificaciones de % rsd para área, altura ni tiempo de retención, la prueba se realizó con fase móvil mezclada por bomba binaria y con fase móvil mezclada previamente.

La prueba de linealidad del detector no cumple con la especificación para el rango de trabajo especificada por el fabricante 0 - 2 AU. Al utilizar absorbancias menores de 1 AU, según la ley de Beer-Lambert se encontró linealidad en 4 de las 5 corridas realizadas.

La prueba de arrastre del inyector no cumplió con la especificación para área, cantidad, ni altura de los picos, indicando que en el sistema quedan rastros de contaminantes de pruebas anteriores.

La prueba de gradiente de composición cumple con las especificaciones de la bomba para generar gradientes de composición adecuados, la prueba se realizó utilizando un capilar de restricción, en lugar de la columna para eliminar sus efectos potenciales. Los solventes utilizados fueron isopropanol al 100% en canal A e isopropanol 99.5% acetona. 0.5% en canal B. La prueba se basa en la diferencia de altura en % B o bien, traza de acetona.

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A. Calificación de instalación.

Los resultados aplican para el equipo de cromatografía líquida de alta resolución marca Agilent serie 1100, ubicado en la Universidad del Valle de Guatemala en el laboratorio del Departamento de Química Farmacéutica en el edificio E, salón 105. Con los módulos: bomba binaria G1312A serie DE14911578 y detector de arreglo de diodos G1315B serie DE4362972.

El sistema está compuesto por un monitor marca Acer serie H183H, un CPU marca Compaq HP serie dc5750 Microlower, el software es Windows XP Professional y la interfase del cromatógrafo es ChemStation B.01.01(164).

Hay tres documentos referentes al cromatógrafo, estos se encuentran en la secretaría del Depto. de Química Farmacéutica en idioma inglés. Estos documentos son Agilent 1100 Series HPLC Value System: User's Guide edición 11/99, Agilent ChemStation: Understanding your ChemStation 07/99, y Agilent ChemStation for LC 3D Systems: Understanding your Spectra Module edición 07/08.

Durante la calificación de la instalación se encontró que el cromatógrafo se encuentra en un salón con acceso restringido, dentro del laboratorio del Depto. de Química Farmacéutica. Este salón no cuenta con temperatura controlada.

Se verificó también que el ambiente en donde se encuentra instalado el equipo se encuentra libre de polvo y gases corrosivos. Este se encuentra en una mesa estable de concreto con dimensionales suficientes para operación, con 10 cm de espacio a cada lado y en su parte trasera. Los módulos están dispuestos horizontalmente, esto fue verificado por medio de un nivel marca Stanley.

Durante los días de prueba la temperatura ambiente y humedad relativa se encontraron entre las especificaciones (0° – 55°C, <95% HR), con temperaturas entre 19° y 22°C y humedad entre 63% y 75%, verificado con un termo-higrómetro digital OMEGA RH411.

El voltaje del sistema es de 220 VAC con una frecuencia de 60 Hz, asegurado por el uso de UPS marca Tripp lite, modelo SmartOnLine, serie AGPS5183, con una capacidad de respaldo de 1kVA en tiempo cero o inmediato durante un fallo de energía eléctrica. Además fue verificado con un voltímetro de pinza marca General line, serie 266 Data Hold con un voltaje de 220.8 VAC, 60 Hz.

El lugar de instalación se encuentra libre de contaminación, golpes y anomalías en los módulos. La altitud máxima para operación del equipo es de 2000 m. sobre el nivel del mar, utilizando la aplicación Google Earth se encontró la altitud para el edificio E es de 1,509 m. sobre el nivel del mar. No fue posible verificar la presencia de campos magnéticos debido a la falta de medidores de inmisión de campo magnético. Sin embargo, no existe fuentes visibles de campos magnéticos a los alrededores del equipo.

B. Calificación de operación.

Se verificó el estado de los módulos, esto se realizó observando el encendido de la luz led del switch y el encendido de las luces amarillas y verde de los módulos de bomba binaria y detector de arreglo de diodos. No se encontró errores en la información diagnóstica del equipo durante su uso.

Se verificó también la información de los módulos, en estas pruebas se encontró la siguiente información: la prueba de corriente oscura se encuentra dentro de las especificaciones, esto significa que el slit funciona adecuadamente, asegurando que no haya excesivo ruido o no linealidad en longitudes de onda específicas.

La prueba del filtro del detector de arreglo de diodos se encuentra dentro de especificaciones, lo que indica que el motor del filtro funciona

correctamente y la absorbancia del filtro de óxido de holmio es la especificada, por lo cual no hay suciedad ni contaminación en el mismo.

La prueba de celda-DAD se encuentra dentro de especificaciones, indicando que la celda de flujo no se encuentra sucia ni contaminada por lo que no interfiere significativamente con la intensidad de las lámparas de deuterio y tungsteno.

La prueba de intensidad se encuentra dentro de las especificaciones tanto para el espectro UV (lámpara de deuterio), como para el espectro Vis (lámpara de tungsteno).

La prueba de calibración de la longitud de onda del detector de arreglo de diodos se encuentra dentro de la especificación, lo que significa que no existe desviación significativa de las longitudes de onda de las líneas alfa y beta de la lámpara de deuterio.

La prueba de slit se encuentra dentro de las especificaciones lo que indica que el sistema mecánico del slit funciona correctamente. La prueba de mínima señal de línea base del espectro cumple con la especificación lo que indica que el ruido máximo no es significativo.

La prueba de columna mostró que la columna tuvo una gran dispersión de platos teóricos, 13.6 % rsd, durante las lecturas de estándar de cafeína. la columna utilizada fue XTerra RP18 serie 193 con tamaño particular de 5 μm .

La prueba de presión, en la cual el sistema debió de soportar una presión de 380 bar durante 4 minutos, falló y se observó una fuga en el inyector al alcanzar una presión de 365 bar, para esta prueba se utilizó un tapón de columna aunado a la unión de volumen cero para bloquear el flujo, esta realizó la misma función que la tuerca de blanco, pieza especificada para esta prueba por el fabricante. Al observarse la fuga el sistema se paró automáticamente y los led indicadores se mostraban en rojo. Aunque se encontró una fuga en el inyector al alcanzar los 365 bar, la presión de trabajo fue para todas las pruebas menor que 150 bar, presión a la cual el sistema no muestra fugas ni errores en su interfase.

C. Calificación de desempeño.

Se utilizó un kit de estándares de cafeína certificados marca Agilent con concentraciones de 5 µg/ml, 25 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml y 500 µg/ml, una columna marca XTerra RP18 con tamaño de partícula de 5 µm y una unión de volumen cero para eliminar la influencia de la columna en algunas pruebas. Durante estas pruebas se encontró la siguiente información: la prueba de óxido de holmio, que indica la calibración de la longitud de onda del detector para longitudes de UV cercano y Vis, se encuentra dentro de las especificaciones.

La prueba de estabilidad de ruido se encuentra dentro de especificaciones para el ruido ASTM, el desvío y la errática, por lo cual se verificó que el detector opera dentro de los límites de aceptación definidos para el sistema de ruido. El desvío o movimiento en la escala ascendentemente o descendentemente ocurre si la temperatura no es estable. La errática o línea base irregular con movimientos hacia arriba y abajo ocurre si existe fuga en el sistema en las condiciones de operación.

La estabilidad del flujo se encuentra dentro de especificaciones, esto demuestra que el sistema de bombeo entrega volúmenes de solvente dentro de los límites de aceptación definidos, no se tomó en cuenta la compresibilidad de la fase móvil ya que los líquidos se comprimen un 0.5% de su volumen por cada 68.94 bar y la presión de la prueba fue de 27 bar.

La prueba de precisión de longitud de onda se encuentra dentro de las especificaciones, lo que indica una correcta calibración y precisión en los rangos UV inferiores.

La prueba de precisión del inyector no cumple con las especificaciones de desviación estándar relativa para área, altura ni tiempo de retención de los picos, la prueba se realizó con la columna equilibrada para el solvente durante 12 horas, empleando seis inyecciones del mismo volumen de estándar de 0.125 µg de cafeína/ml por corrida.

La prueba de linealidad del detector no cumple con las especificaciones de correlación ni de factor de respuesta, pese a que la intensidad de las lámparas se encuentran dentro de las especificaciones. La prueba se realizó con la columna equilibrada durante 12 horas con la fase móvil empleando 5 estándares de cafeína con concentraciones de 5, 25, 125, 250 y 500 μg de cafeína/ml, el objetivo de esta prueba era verificar que el detector tiene respuesta lineal en el rango de trabajo, de 0 hasta 2 AU, según lo especificado por el fabricante. Sin embargo según la ley de Beer-Lambert la certeza de la linealidad se pierde al alcanzar 1 AU, por lo que si se realiza el cálculo de linealidad para las tres concentraciones más bajas, que se encuentran debajo de 1 AU, si se obtienen resultados lineales dentro de las especificaciones para cuatro de las cinco corridas.

La prueba de arrastre del inyector no cumple para área, cantidad, ni altura de los picos, esta prueba se realizó inyectando agua grado HPLC al sistema luego de la inyección de mayor concentración de la prueba anterior (linealidad del detector), su objetivo era verificar que no existe contaminación de muestras en el detector, debido al fallo en esta prueba es conveniente realizar limpieza con agua grado HPLC entre inyecciones de estándares y de la muestra a analizar para lavar el inyector.

La prueba de gradiente de composición cumplió con las especificaciones de exactitud de composición, precisión de exactitud y ondulación por lo que se comprobó que la bomba es capaz de generar un gradiente de composición adecuado.

La prueba de precisión del inyector fue realizada mezclando la fase móvil previamente y programando esta mezcla en un solo canal, esto debido a que la mezcla de agua con acetonitrilo da una reacción endotérmica y el sistema de cromatografía no cuenta con termostato para mantener una temperatura adecuada de la fase móvil antes de llegar a la columna, sin embargo, los resultados no cumplieron con lo especificado aún asegurando una temperatura constante. Lo mismo se realizó para la linealidad del

detector y se observó que los resultados no cumplen con los límites de aceptación especificados para la prueba.

Se calculó los % rsd y correlaciones R^2 utilizando el programa Microsoft® Excel® for Mac 2011, Versión 14.1.2, Serie 110505.

Los métodos utilizados se obtuvieron de la guía Operational Qualification / Performance Verification for Complete HP 1100 Series HPLC systems, edición 05 del año 1997. Estos métodos están realizados para los cromatógrafos líquidos de alta resolución serie 1100 con bomba binaria, detector de arreglo de diodos y automuestreador por lo que la especificación del inyector permite poca dispersión por ser este un sistema automatizado, lo cual no es el caso en el equipo utilizado que cuenta con un inyector manual. Por prácticas realizadas con el mismo equipo recientemente, se conoce que se obtienen respuestas lineales al realizar curvas de calibración de cafeína con fase móvil Agua – Metanol.

VII. CONCLUSIONES

1. Los resultados aplican solamente para el cromatógrafo líquido de alta resolución marca Agilent, serie 1100 del Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad del Valle de Guatemala, con los módulos bomba binaria G1312A serie DE14911578 y detector de arreglo de diodos G1315B serie DE4362972.

2. El cromatógrafo cumple con las especificaciones de ambiente e infraestructura y de instalación.

3. La temperatura y la humedad de trabajo se mantuvieron dentro de los límites de trabajo.

4. El voltaje y la frecuencia de línea son asegurados por el uso de UPS.

5. El estado de los módulos y sus indicadores cumplen con lo establecido, al igual que la información diagnóstica ya que no se encontraron errores de diagnosis en ninguno de los dos módulos de trabajo.

6. El slit funciona adecuadamente por lo que este no afecta el ruido ni la linealidad.

7. El motor del filtro de óxido de holmio funciona apropiadamente.

8. La celda de flujo no se encuentra contaminada por lo cual no tiene absorbancia significativa.

9. La intensidad de la lámpara se encuentra dentro de sus especificaciones, las longitudes de onda para la lámpara de deuterio se encuentran calibradas, al igual que las longitudes de onda del detector para las regiones de UV lejano, UV cercano y Vis.

10. La columna utilizada fue XTerra RP₁₈ serie 193, con tamaño de partícula de 5 µm, esta mostró una dispersión alta de platos teóricos durante las lecturas.

11. Durante la prueba de presión se observó fuga en el inyector al alcanzar 365 bar, sin embargo la presión de trabajo fue menor a 150 bar.

12. El detector y sistema de bombeo no aportan ruido significativo a las lecturas. Además, el ruido máximo del sistema no es significativo.

13. La bomba binaria aporta estabilidad del flujo y genera composiciones adecuadas.

14. El inyector no mostró precisión, aún con la fase móvil en dos canales ni al ser previamente mezclada para disminuir los efectos de temperatura. Sin embargo, los resultados mejoraron al utilizar la fase móvil previamente mezclada. Además, las especificaciones dadas por el fabricante son para un sistema con automuestreador y no se cuenta con especificaciones para equipos con inyector manual.

15. Se encontró que el arrastre del inyector fue significativo.

16. El detector no mostró linealidad al realizar una curva de calibración con el kit de estándares de cafeína, el resultado persistió al utilizar la fase móvil en dos canales y al ser previamente mezclada para utilizar en un sólo canal. Con la prueba se intentó comprobar la linealidad en todo el intervalo de trabajo, de 0 a 2 AU. Sin embargo, al utilizar las concentraciones que se encontraban por debajo de 1 AU, según la ley de Beer-Lambert, los resultados fueron lineales.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Adquirir una columna ZORBAX Eclipse C18, que es la especificada para los métodos.
2. No utilizar presiones de trabajo que superen los 360 bar.
3. Debido a la falta de termostato de la columna, para poder mantener la temperatura constante, debe tomarse en cuenta los efectos de los solventes en la misma. Con el fin de analizar si es conveniente mezclarlos y estabilizarlos a la temperatura ambiente para lograr mejor precisión.
4. El detector no es lineal en todo su intervalo de trabajo por lo cual es conveniente utilizar analitos a concentraciones con absorbancias menores a 1 AU.
5. Es conveniente analizar la respuesta del detector con otras fases móviles, como agua-metanol para observar si al utilizarla se consiguen mejores resultados.

X. BIBLIOGRAFÍA

- a. *Agilent 1100 series HPLC Value System, User's Guide*. 1999. Agilent. USA. 74 págs.
- b. *Understanding your ChemStation*. Agilent. USA. 2004. 271 págs
- c. *Agilent 1100/1200 HPLC ChemStation Operation, laboratory manual*. 2007. Agilent. USA. 211 págs.
- d. *Understanding your Spectra Module*. 2008. USA. Agilent. 46 págs
- e. Aldana, Andrea. 2009. *Cualificación de equipo para el ensayo de disolución en el laboratorio de Química Farmacéutica de la Universidad del Valle de Guatemala*. Tesis Universidad del Valle de Guatemala. Departamento de Química Farmacéutica. 130 págs.
- f. Estados Unidos. 2011. United States Pharmacopeia. *Analytical Instrument Qualification USP <1058>*. NF 29. (USP 34). 554 págs
- g. Estados Unidos. 2011. Food and Drug Administration (FDA). *Process Validation: General Principles and Practices. Guidance for Industry*. 22 págs.
- h. Estados Unidos. 2001. Food and Drug Administration (FDA). *Q7A Good Manufacturing Guidance for Active Pharmaceutical Ingredients*. Guidance for Industry. 58 págs.
- i. Flores, Carlos. 2010. *Buenas Prácticas de Manufactura (BPM)*. Revista Ingeniería Primero, Universidad Rafael Landívar, Facultad de Ingeniería. No. 20; 141.
- j. Helrich, Kenneth. 1990. *Official Methods of the Association of Official Analytical Chemistry (AOAC Official Methods of Analysis)*, 15 th. Ed., Vol. 2.
- k. *Operational qualification/performance verification for complete HP 1100 series HPLC systems*. 1997. Hewlett Packard. USA. 102 págs

- l. RTCA 11.04.42:06 *Productos Farmacéuticos. Medicamentos de uso humano. Buenas prácticas de manufactura para la industria farmacéutica*. Reglamento Técnico Centroamericano. 69 págs.
- m. Suiza. 2005. Organización Internacional de Normalización. *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración, Norma Internacional ISO/IEC 17025*. 38 págs.
- n. Rojas, Beatriz. 1995. *Validación de procesos en la industria farmacéutica nacional*. Tesis Universidad del Valle de Guatemala. Facultad de Ciencias y Humanidades. 88 págs.
- o. Skoog, et. al. 2001. *Principios de Análisis Instrumental*. 5ta. Ed. Editorial McGraw Hill. Madrid, España. 1087 págs
- p. Skoog, et. al. 2005. *Fundamentos de Química Analítica*. 8ª Edición. Thomson Learning. México. 1065 págs.
- q. Vazquez, Álvaro. 2006. *Validación de metodología analítica de Aspirina 500mg*. Tesis Universidad de Chile. Departamento de Ciencia y Tecnología Farmaceutica. Santiago, Chile. 61 págs.
- r. Vilumara, Antonio. 2011. *Armonización y estandarización. Buenas prácticas de laboratorio (BPL)*. Barcelona, España.

XI. ANEXOS

A. Glosario.

1. Validación. Establecer evidencia documentada que proporciona un alto grado de aseguramiento de que un proceso específico producirá consistentemente un producto que cumpla con sus especificaciones y atributos de calidad predeterminados. (FDA, 2011)

2. Calificación. Proceso en el cual por medio de evidencia documentada se establece que los sistemas de un equipo funcionan correctamente, dentro de las especificaciones de operación. (Velazquez, 2006)

3. Cromatografía. Método de separación basado en el reparto de los compuestos de la muestra entre una fase estacionaria y una móvil. (Skoog, et., al. 2005)

4. Estándar de referencia. Sustancia que luego de análisis exhaustivos, se reconoce como un material de alta pureza que es utilizado con fines comparativos. (Velazquez, 2006)

5. Exactitud. Valor medido en términos del error entre un resultado analítico y su valor verdadero o aceptado. (Skoog, 2005)

6. Precisión. Medida de concordancia entre un conjunto de mediciones repetidas. (Skoog, 2005)

8. Ruido. Fluctuaciones aleatorias de una señal analítica, proceden de variables no controlables, y distorsionan la señal del analito. (Skoog, 2005)

9. Fase estacionaria. Se define como un sólido o un líquido inmóvil sobre el que se reparte la muestra al pasar con la fase móvil. (Skoog, 2005)

10. Fase móvil. Se define como un líquido o gas que transporta a los analitos de una muestra a través de la fase estacionaria. (Skoog, 2005)

11. Elución. Es el proceso mediante el cual los solutos se arrastran por la fase estacionaria a causa del movimiento de la fase móvil. (Skoog, 2005)

12. Eluato. Es la fase móvil que sale de la columna. (Skoog, 2005)

13. Eluyente. Es el disolvente que se usa para transportar los componentes de una mezcla a través de una fase estacionaria. (Skoog, 2005)

15. Cromatograma. Diagrama o gráfica en donde se obtiene una serie de picos de la concentración de un soluto frente al tiempo de elución o el volumen de elución. (Skoog, 2005)

B. Fórmulas.

1. Pruebas de ruido.

a. Fórmula No. 1. Determinación del desvío de cada ciclo usando análisis de regresión lineal.

$$Y_{(X)} = a + bX$$

(HP, 1997)

En donde,

$Y_{(X)}$ = respuesta de la señal.

X = tiempo de la señal.

a = pendiente que es idéntica al desvío.

b = intercepto de la línea de desvío.

b. Fórmula No. 2. Determinación del ruido de pico a pico o errática (N_{PtoP}).

$$N_{PtoP} = (Rsp_{Max^i} - y_i) - (Rsp_{Min^j} - y_j)$$

(HP, 1997)

En donde,

N_{PtoP} = Ruido de pico a pico.

Rsp_{Max}^i = Respuesta del pico i con máxima distancia vertical positiva desde la línea de desvío.

Rsp_{Min}^j = Respuesta del pico j con distancia mínima distancia vertical negativa desde la línea de desvío.

Y_i = respuesta correspondiente del nivel de desvío de pico i.

Y_j = respuesta correspondiente del nivel de desvío de pico j.

c. Fórmula No. 3. Cálculo de Ruido ASTM (N_{ASTM}).

$$N_{ASTM} = \frac{\sum_{i=1}^n N_{PtoP}}{n}$$

(HP, 1997)

En donde,

N_{PtoP} = Ruido pico a pico del ciclo i

n = numero total de ciclos

2. Exactitud de longitud de onda.

a. Fórmula No. 4. Determinación de la desviación entre la longitud de onda medida y la longitud de onda dada.

$$P_{lo} = |(LO_{medido} - LO_{dado})|$$

(HP, 1997)

En donde,

P_{lo} = Precisión de la longitud de onda.

LO_{dado} = Longitud de onda dada (244 o 272 nm).

$LO_{dmedido}$ = Longitud de onda dada.

Si más de un espectro es utilizado para medir la precisión, el máximo de todas las precisiones se utiliza como la precisión global.

3. Linealidad del detector y del inyector. Se determinan revisando la desviación estándar relativa dada como el resultado del análisis de regresión lineal.

a. Fórmula No. 5. Precisión del inyector.

$$A_{\bar{x}} = \frac{\sum_{i=1}^n A_i}{n}$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (A_i - A_{\bar{x}})^2}{n-1}}$$

$$PI = \frac{SD \cdot 100}{A_{\bar{x}}}$$

(HP, 1997)

En donde,

A_i = Área, altura o tiempo de retención del pico de cafeína de la i ésima corrida de las n corridas.

A_x = Promedio de área, altura o tiempo de retención del pico de cafeína de la i ésima corrida de las n corridas.

4. Bomba binaria. El cromatograma es reescala a una curva de composición. La transformación es aplicada a cada punto del cromatograma. El eje y se escribe en términos de %B.

a. Fórmula No. 6. Reescala del cromatograma.

$$H_j = (Rsp_j - Rsp_{\min}) \cdot \frac{100}{Rsp_{\max} - Rsp_{\min}}$$

(HP, 1997)

En donde,

Rsp_{\min} = Respuesta promedio en donde la señal representa 0%B.

Rsp_{\max} = Respuesta promedio en donde la señal representa 100%B.

Rsp_j = Respuesta en el punto j.

H_j = Altura en el punto.

b. Fórmula No. 7. Determinación del ruido pico a pico (N_{PtoP}) que representa la ondulación.

$$N_{PtoP} = (H_i - y_i) - (H_j - y_j)$$

(HP, 1997)

En donde,

N_{PtoP} = Ondulación.

H_i = Respuesta del pico i con máxima respuesta positiva desde la línea de desvío.

H_j = Respuesta del pico j con mínima respuesta negativa desde la línea de desvío.

Y_i = respuesta correspondiente del nivel de desvío de pico i.

Y_j = respuesta correspondiente del nivel de desvío de pico j.

c. Fórmula No. 8. Determinación de altura promedio (MSH_n).

$$MSH_n = \frac{\sum_{j=F_n}^{L_n} H_j}{L_n - F_n + 1}$$

(HP, 1997)

Donde,

H_j = Composición de la altura de una señal en el punto j.

F_n = Índice del primer punto en rango de tiempo del paso n.

L_n = Índice del último punto en rango de tiempo del paso n.

d. Fórmula No. 9. Determinación de la diferencia de alturas entre pasos en el paso n (SHD_n)

$$SHD_n = \frac{\sum_{k=1}^m SHD_{n,k}}{m}$$

(HP, 1997)

En donde,


$SHD_{n,k}$ = Diferencia de alturas del paso n en la corrida k.

e. Fórmula No. 10. Determinación de la desviación estándar de diferencias de alturas (SD)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^m (SHD_{n,k} - ASHD_n)^2}{m - 1}}$$

(HP, 1997)

C. Protocolo de calificación.

PROTOCOLO PARA LA CALIFICACIÓN DEL CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA RESOLUCIÓN AGILENT SERIE 1100 Universidad del Valle de Guatemala Laboratorio de Química Farmacéutica		
Elaborado por: Ana Carolina Mejicanos Boleres	Número de documento: QF-001-2012	
Fecha de Elaboración: 2012.11.21	Número de copia: 001	

1. **Introducción.** Los marcos actuales de calidad, son cada vez más complejos, las GLP requieren la calificación de equipos, en este se indica la necesidad de evidencia documentada de las calificaciones en cuatro procedimientos básicos, que son:

Calificación del diseño

Calificación de la instalación

Calificación de la operación

Calificación del funcionamiento

El marco que rige la calificación de equipos analíticos en Guatemala es el Reglamento Técnico Centroamericano, y en este se indica que es necesario documentar y realizar calificaciones y validaciones de equipos utilizados para la producción y control de calidad.

2. **Alcance.** En este estudio se evaluará los parámetros mediante estándares físicos y control del hardware y software; para calificar el equipo HPLC marca Agilent serie 1100, del laboratorio del departamento de Química Farmacéutica de la Universidad del Valle de Guatemala, por lo tanto los datos son válidos únicamente para este equipo.

3. Objetivos.

a. Objetivo general. Calificar el equipo de cromatografía líquida de alta presión marca Agilent serie 1100, del Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad del Valle de Guatemala, con el fin de obtener resultados confiables que permitan la utilización del equipo de acuerdo a las normas vigentes internacionales.

b. Objetivos específicos.

1) Calificar la instalación del cromatógrafo líquido de alta presión marca Agilent serie 1100.

2) Verificar la operación del cromatógrafo líquido de alta presión marca Agilent serie 1100.

3) Calificar el desempeño del cromatógrafo líquido de alta presión marca Agilent serie 1100.

4) Generar información válida y confiable respecto a la calificación de equipos que se utilizan en la Universidad del Valle de Guatemala.

4. Definiciones.

a. Validación. Establecer evidencia documentada que proporciona un alto grado de aseguramiento de que un proceso específico producirá consistentemente un producto que cumpla con sus especificaciones y atributos de calidad predeterminados. (FDA, 2011)

b. Calificación. Proceso en el cual por medio de evidencia documentada se establece que los sistemas de un equipo funcionan correctamente, dentro de las especificaciones de operación. (Velazquez, A., 2006)

c. Cromatografía. Método de separación basado en el reparte de los compuestos de la muestra entre una fase estacionaria y una móvil. (Skoog, *et. al.*, 2005)

- d. Estándar de referencia. Sustancia que luego de análisis exhaustivos, se reconoce como un material de alta pureza que es utilizado con fines comparativos. (Velazquez, A., 2006)
- e. Exactitud. Valor medido en términos del error entre un resultado analítico y su valor verdadero o aceptado. (Skoog, *et. al.*, 2005)
- f. Presición. Medida de concordancia entre un conjunto de mediciones repetidas. (Skoog, *et. al.*, 2005)
- g. Ruido. Fluctuaciones aleatorias de una señal analítica, proceden de variables no controlables, y distorcionan la señal del analito. (Skoog, *et. al.*, 2005)

5. Materiales.

a. Equipo.

1) Cromatógrafo líquido de alta resolución marca Agilent, serie 1100 del Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad del Valle de Guatemala.

b. Materiales y cristalería.

- 1) Columna Agilent Eclipse Plus C18.
- 2) Capilar de restricción.
- 3) Cronómetro digital.
- 4) Frasco volumétrico clase A de 5 ml.
- 5) Jeringa de vidrio de 5 ml con cierre Luer.
- 6) Adaptador de jeringa con cierre Luer.
- 7) Termo-higrómetro.
- 8) Medidor de nivel.
- 9) Medidor de corriente.

c. Reactivos.

- 1) Agua grado HPLC.
- 2) Acetonitrilo HPLC.
- 3) Isopropanol HPLC.
- 4) Acetona HPLC.
- 5) Kit de estándares de cafeína:
 - a) Estándar 1, 0.005 mg/ml de cafeína en agua.
 - b) Estándar 2, 0.025 mg/ml de cafeína en agua.
 - c) Estándar 3, 0.125 mg/ml de cafeína en agua.
 - d) Estándar 4, 0.250 mg/ml de cafeína en agua.
 - e) Estándar 5, 0.500 mg/ml de cafeína en agua.

6. Procedimiento.

a. Calificación de instalación.

1) Metodología.

a) Ubicación. Registrar los siguientes datos:

Nombre de la institución	
Nombre del laboratorio.	
Edificio	
Número de aula	

b) Control de ambiente e infraestructura. Registrar los siguientes datos de ambiente e infraestructura:

Control	Especificación	Cumple	No cumple
Polvo	Libre		
Gases corrosivos	Libre		
Campos magnéticos	Libre		
Dimensiones de la mesa	Con al menos 2.5 cm de espacio de cada lado y 8 cm en la parte trasera		
Estabilidad de la mesa	Estable		
Módulos	Dispuestos horizontalmente		
Temperatura	Entre 0°C y 55°C		
Humedad ambiente	<95 %, entre 25° y 40° C		
Altitud	Hasta 2000 m. sobre el nivel del mar		
Voltaje	100 – 120 ó 200 - 240 VAC ±10%, 50 Hz		
Frecuencia de línea	50 o 60 Hz ± 5%		

c) Descripción del sistema. Registrar las siguientes características:

Sistema	Marca	Serie
Monitor		
CPU		
Software		
ChemStation		
UPS		

d) Módulos del sistema. Registrar los siguientes datos:

Módulo	Modelo	Serie
Bomba binaria		
DAD		

e) Registro de la documentación. Registrar los manuales del equipo:

Manual	Idioma	Ubicación

f) Instalación. Verificar la apariencia del sistema y registrar los siguientes datos:

Control	Especificación	Cumple	No cumple
Contaminación	Libre		
Golpes	Libre		
Anormalidades	Libre		

b. Calificación de operación.

1) Metodología.

a) Estado de los módulos. Encender el equipo y verificar los siguientes indicadores:

Módulo	Color	Indicación	Cumple	No cumple
Switch	Verde	Energía encendida		
Bomba binaria	Rojo	Error		
	Amarillo	No está listo		
	Apagado	Listo		
	Verde	Corrida en proceso		
Detector de arreglo de diodos	Rojo	Error		
	Amarillo	No está listo		
	Apagado	Listo		
	Verde	Corrida en proceso		

b) Información diagnóstica. Seguir el siguiente procedimiento:

Pasos a seguir	Seleccionar		
1.	<i>Diagnosis</i>		
2.	Update Variables Display		
3.	Error Logbook Show		
4.	Presencia de errores en el sistema	Sí	No
Observaciones.			

c) Información modular. Seguir el siguiente procedimiento:

Pasos a seguir	Seleccionar		
1.	<i>Show Module Tests</i>		
2.	Seleccionar cada una de las pruebas del sistema por separado y presionar <i>Start</i>		
3.	Los resultados de todas las pruebas son aprobados con la palabra <i>Passed</i> bajo la ventana de <i>Result</i>	Sí	No
Observaciones.			

d) Reporte de la columna. Seguir el siguiente procedimiento:

Pasos a seguir	Procedimiento
1.	Seleccionar la vista <i>Method and Run Control</i>
2.	Seleccionar el método <i>PRESICION.M</i>
3.	Seleccionar <i>Spectrum</i> , marcar <i>Store all</i> .
4.	Flujo: 0.8 ml/min 85% A / 15% B (Agua HPLC/ Acetonitrilo HPLC). Purgar el sistema por 10 minutos. Seleccionar <i>Balance</i> de la línea base.
5.	Realizar cinco inyecciones de estándar 3, (125 µg/ml)
6.	Tiempo por corrida: 5.5 minutos Tiempo total: 27.5 minutos
Resultados.	

e) Verificación de la presión. Seguir el siguiente procedimiento:

Pasos a seguir	Seleccionar
1.	<i>Diagnosis</i>
2.	Menú <i>Binary Pump</i>
3.	<i>Module test</i>
4.	Seleccionar <i>OK</i>
5.	Resultado: test passed
Observaciones.	

c. Calificación de desempeño.

1) Metodología.

a) Prueba de óxido de holmio. Seguir el siguiente procedimiento:

	Condiciones	
Método	DGNOISE.M	
Fase móvil	Agua grado HPLC en canal A	
Flujo	1 ml/min 100% A	
Preparación	Purgar el sistema por 10 minutos. Seleccionar <i>Balance</i> de la línea base.	
Resultados teóricos	361 nm., 453 nm., y 536.7 nm.	
Límite de aceptación	2 nm. de diferencia en el mínimo y 2 nm. de diferencia en el máximo	
Resultados	Mínimo	Máximo
Disposición	Cumple	No cumple

b) Estabilidad de ruido. Seguir el siguiente procedimiento:

	Condiciones		
Método	DGNOISE.M		
Fase móvil	Agua grado HPLC en canal A		
Flujo	1 ml/min 100% A		
Columna	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18		
Tiempo	20 minutos por corrida. Realizar 3 corridas Tiempo total 60 minutos		
Límite de aceptación	Ruido ASTM	Desvío	Errática
	0.05mAU/hr	5 mAU/hr	0.2 mAU
Resultados	Ruido ASTM	Desvío	Errática
Disposición	Cumple		No cumple

c) Estabilidad de flujo. Seguir el siguiente procedimiento:

	Condiciones	
Método	DGNOISE.M	
Fase móvil	Agua grado HPLC en canal A	
Flujo	1 ml/min 100% A	
Columna	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18	
Materiales	Cronómetro digital Probeta graduada clase A	
Indicaciones	Recibir la fase móvil en la probeta graduada clase A, durante 5 minutos verificados mediante el cronómetro digital.	
Tiempo	5 minutos por corrida. Realizar 3 corridas Tiempo total 15 minutos	
Límite de aceptación	5% de variación	
Resultados		
Disposición	Cumple	No cumple

d) Prueba de precisión de longitud de onda. Seguir el siguiente procedimiento:

	Condiciones	
Método	PRESICION.M	
Fase móvil	Agua grado HPLC en canal A, Acetonitrilo grado HPLC en canal B	
Flujo	0.8 ml/min 85% A / 15% B (Agua / Acetonitrilo)	
Preparación	Purgar el sistema durante 10 minutos Seleccionar <i>Balance</i> de la línea base	
Columna	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18	
Estándar	#3 del kit de estándares de cafeína (0.125 mg/ml)	
Tiempo	5.5 minutos por corrida, realizar 5 inyecciones Tiempo total 27.5 minutos	
Resultados teóricos	Absorbancia máxima a 272 nm. y mínima a 244 nm.	
Límite de aceptación	2 nm. de diferencia en el máximo y 2 nm. de diferencia en el máximo.	
Resultados	Mínimo	Máximo
Disposición	Cumple	No cumple

e) Prueba de precisión del inyector. Seguir el siguiente procedimiento:

	Condiciones		
Método	PRESICION.M		
Fase móvil	Agua grado HPLC en canal A, Acetonitrilo grado HPLC en canal B		
Flujo	0.8 ml/min 85% A / 15% B (Agua / Acetonitrilo)		
Columna	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18		
Estándar	#3 del kit de estándares de cafeína (0.125 mg/ml)		
Tiempo	5.5 minutos por inyección (6 inyecciones por corrida) Realizar 5 corridas Total 165 minutos		
Límite de aceptación	Área de picos:	Altura de picos:	Tiempo de retención:
	1% rsd	2% rsd	0.3% rsd
Resultados	Área de picos:	Altura de picos:	Tiempo de retención:
Disposición	Cumple		No cumple

f) Prueba de linealidad del detector. Seguir el siguiente procedimiento:

	Condiciones	
Método	PRESICION.M	
Fase móvil	Agua grado HPLC en canal A, Acetonitrilo grado HPLC en canal B	
Flujo	0.8 ml/min 85% A / 15% B (Agua / Acetonitrilo)	
Columna	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18	
Estándares	#1(0.005 mg/ml cafeína en agua), #2 (0.025 mg/ml cafeína en agua), #3 (0.125 mg/ml cafeína en agua), #4 (0.250 mg/ml cafeína en agua) y #5 (0.500 mg/ml de cafeína en agua).	
Tiempo	5.5 minutos por inyección (27.5 minutos). Realizar 5 corridas Tiempo total 137.5 minutos	
Límite de aceptación	Correlación	Factor de respuesta
	0.999	5% rsd
Resultados	Correlación	Factor de respuesta
Disposición	Cumple	No cumple

g) Prueba de arrastre del inyector. Seguir el siguiente procedimiento:

	Condiciones		
Método	PRESICION.M		
Fase móvil	Agua grado HPLC en canal A, Acetonitrilo grado HPLC en canal B		
Flujo	0.8 ml/min 85% A / 15% B (Agua / Acetonitrilo)		
Columna	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18		
Inyección	Inyección de estándar #5 (0.500 mg cafeína/ml agua y luego inyección de agua grado HPLC		
Tiempo	11 minutos por corrida. Realizar 5 corridas Total 55 minutos		
Límite de aceptación	Área	Cantidad	Altura
	0.2% rsd	0.2% rsd	0.4% rsd
Resultados	Área	Cantidad	Altura
Disposición	Cumple		No cumple

h) Prueba de gradiente de composición. Seguir el siguiente procedimiento:

	Condiciones		
Método	GRADIENTE.M		
Fase móvil	Isopropanol grado HPLC en canal A, 99.5% isopropanol / 0.5% acetona en canal B		
Flujo	3 ml/min 100% A		
Otras condiciones	Capilar de restricción		
Tiempo	20 minutos por corrida, realizar 3 corridas. Total 60 min.		
Gradiente de composición	Tiempo (minutos)	% Canal A (Isopropanol)	% Canal B (99.5% isopropanol / 0.5% acetona)
	1.00	100	0
	1.01	99	1
	5.00	99	1
	5.01	100	0
	8.00	100	0
	8.01	0	100
	13.00	0	100
	13.01	1	99
	17.00	1	99
	17.01	100	0
	20.00	100	0

Límite de aceptación	Ondulación	Exactitud de composición	Precisión de la exactitud
	0.5%	0.5%	0.5%
Resultados	Ondulación	Exactitud de composición	Precisión de la exactitud
Disposición	Cumple		No cumple

7. Referencias bibliográficas

- a. *Agilent 1100 series HPLC Value System, User's Guide*. 1999. Agilent. USA. 74 págs.
- b. *Agilent 1100/1200 HPLC ChemStation Operation, laboratory manual*. 2007. Agilent. USA. 211 págs.
- c. Estados Unidos. 2001. Food and Drug Administration (FDA). *Q7A Good Manufacturing Guidance for Active Pharmaceutical Ingredients*. Guidance for Industry. 58 págs.
- d. *Operational qualification/performance verification for complete HP 1100 series HPLC systems*. 1997. Hewlett Packard. USA. 102 págs
- e. Skoog, *et. al*. 2005. *Fundamentos de Química Analítica*. 8ª Edición. Thomson Learning. México. 1065 págs.
- f. *Understanding your ChemStation*. Agilent. USA. 2004. 271 págs
- g. *Understanding your Spectra Module*. 2008. USA. Agilent. 46 págs
- h. Vazquez, Álvaro. 2006. *Validación de metodología analítica de Aspirina 500mg*. Tesis Universidad de Chile. Departamento de Ciencia y Tecnología Farmaceutica. Santiago, Chile. 61 págs.

8. Responsables

	Elaborado por	Revisado por	Autorizado por
Nombre	Ana Carolina Mejicanos	Lda. Ana Luisa Mendizabal	Dr. Elfego Rolando López
Firma			
Fecha	2012.11.21	2012.11.21	2012.11.21

D. Resultados originales.

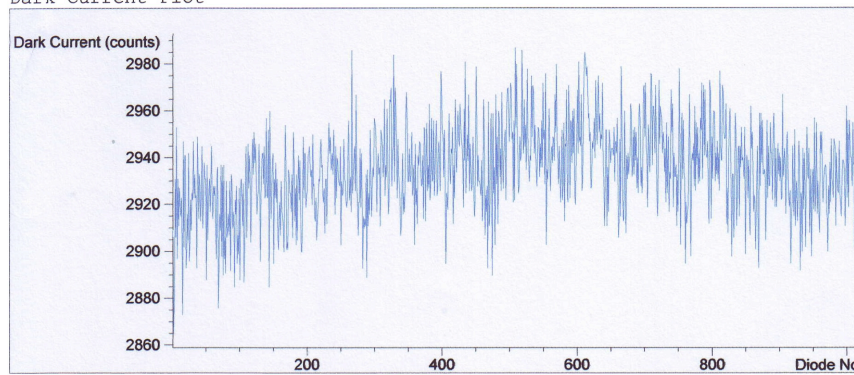
1. Calificación de operación.

a. Reporte de corriente oscura.

>>>> Dark Current Test Report <<<<

Instrument: G1315B
 Serial Number: DE00000000
 Operator: AdeM
 Date: 11/23/2012
 Time: 8:22:12 AM

Dark Current Plot



Dark Current Test Results

	Specification	Measured	Result
Dark current maximum value	<= 12000 cts	2987 cts	Passed
Dark current minimum value	> 0 cts	2865 cts	Passed

b. Reporte Celda-DAD.

>>>> DAD Cell Test <<<<

Instrument:
Serial Number:
Operator: AdeM

	Result	Status

Detector Cell Test		
Expected total time: approx. 45 s.		
Test Procedure:		
1. If cell not in place, install it		done
2. Measuring intensity with cell	6067	done
3. Remove cell		done
4. Measuring intensity without cell	9150	done
5. Calculating intensity ratio	0.7	done

c. Reporte filtro DAD.

>>>> DAD Filter Test <<<<

Instrument: G1315B
Serial Number: DE00000000
Operator: AdeM

	Result	Status
DAD Filter Test		
Expected total time: approx. 45s.		
Test Procedure:		
1. Measuring and evaluating filter test result	0.08	done

d. Reporte de calibración de longitud de onda.

>>>> DAD WL Calibration Test <<<<<

Instrument: G1315B
Serial Number: DE00000000
Operator: AdeM

	Result	Status

DAD Wavelength Calibration Test		
Expected total time: approx. 15 s.		
Test Procedure:		
1. Remove DAD flow cell		done
2. Measuring WL for alpha-line (@656.1 nm)	656.39	done
3. Measuring WL for beta-line (@486.0 nm)	486.13	done
4. Evaluating largest deviation from center WL (nm)	0.29	done

e. Reporte de autopuebas.

>>>> Agilent G1315 Self Test Report <<<<<

Instrument: G1315B
 Serial Number: DE00000000
 Operator: AdeM
 Date: 11/22/2012
 Time: 12:40:00 PM
 Self-Test Mode: Single Self-Test

Agilent G1315 Self Test Results

	Specification	Measured	Result
Filter test	0.005..0.5 AU	0.06 AU	Passed
Slit test	0.7..1.3	0.91	Passed
Dark current test	0..12000 cts	2981..3117 cts	Passed
Min. intensity (190nm - 220nm)	> 2000 cts	6946 cts	Passed
Min. intensity (221nm - 350nm)	> 5000 cts	15794 cts	Passed
Min. intensity (351nm - 500nm)	> 2000 cts	9442 cts	Passed
Min. intensity (501nm - 950nm)	> 4000 cts	14606 cts	Passed
Max. intensity (190nm - 350nm)	< 450000 cts	43861 cts	Passed
Max. intensity (700nm - 950nm)	< 300000 cts	49473 cts	Passed
Max. intensity (D2 alpha line)	< 1200000 cts	161425 cts	Passed
Wavelength at 486.0nm	485.5..486.5 nm	486.07 nm	Passed
Wavelength at 656.1nm	655.6..656.6 nm	656.44 nm	Passed
Holmium test	-1..1 nm	-0.60 nm	Passed
Spectral flatness	< 0.002 AU	0.0002 AU	Passed
ASTM noise (20 min. at 254nm)	<= 0.02 mAU	0.0147 mAU	Passed

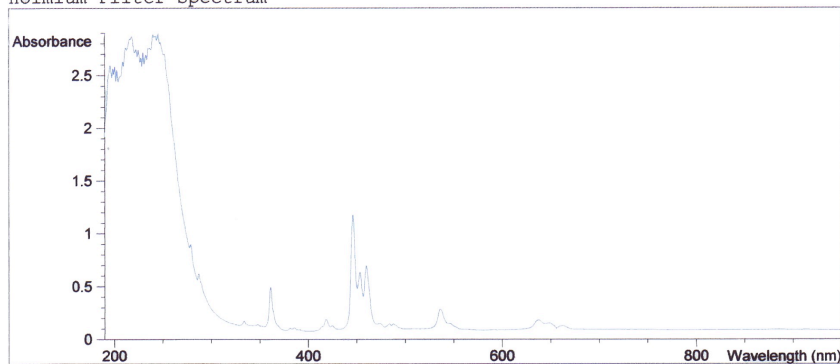
2. Calificación de desempeño.

a. Reporte de prueba de óxido de holmio.

>>>> Holmium Filter Test Report <<<<<

Instrument: G1315B
 Serial Number: DE00000000
 Operator: AdeM
 Date: 11/22/2012
 Time: 11:58:50 AM

Holmium Filter Spectrum



Holmium Filter Test Results

	Specification	Measured	Result
Wavelength 1: 361.0 nm	360..362 nm	361.4 nm	Passed
Wavelength 2: 453.7 nm	452.7..454.7 nm	453.6 nm	Passed
Wavelength 3: 536.7 nm	535.7..537.7 nm	536.7 nm	Passed

*Ejemplo correspondiente a corrida 3.

b. Reporte de prueba de estabilidad de ruido.

Data File C:\CHEM32\1\DATA\CAROL\121123000016.D
 Sample Name: Ruido 2

```

=====
Injection Date   : 11/23/2012 11:16:53 AM
Sample Name     : Ruido 2                               Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : LC1100
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\METHODS\DGNOISE.M
Last changed   : 11/23/2012 10:52:30 AM by AdeM
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\DGNOISE.M
Last changed   : 4/6/2004 9:17:29 AM
DAD noise test method
=====
  
```

Area Percent Report with Performance and Noise

```

=====
Multiplier      :      1.0000
Dilution        :      1.0000
Sample Amount   :      20.00000 [ng/ul]   (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Noise determination:

Time range		Noise	Noise	Noise	Wander	Drift
from	to	(6*SD)	(PtoP)	(ASTM)		
[min]	[min]	[mAU]	[mAU]	[mAU]	[mAU]	[mAU/h]
0.000	20.000	2.037e-2	2.015e-2	1.356e-2	5.380e-3	-1.600e-1

*** End of Report ***

*Ejemplo correspondiente a corrida 3.

c. Reporte de prueba de precision de longitud de onda.

Data File C:\CHEM32\1\DATA\CAROL\121123000033.D
 Sample Name: precision lo 4.1

```

=====
Injection Date : 11/27/2012 1:22:08 PM
Sample Name    : precision lo 4.1                Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : LC1100
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\METHODS\PRESICION.M
Last changed   : 11/27/2012 12:58:27 PM by AdeM
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\PRESICION.M
Last changed   : 11/27/2012 12:26:17 PM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinar precision
=====
  
```

Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      20.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=245,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	2.637	BB	0.0630	7.48751	1.85700	0.5685
2	4.358	BB	0.1111	1309.47266	179.41580	99.4315

Totals : 1316.96017 181.27281

Signal 2: DAD1 B, Sig=246,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	2.637	BB	0.0631	7.32903	1.81706	0.5595
2	4.358	BB	0.1111	1302.65222	178.49269	99.4405

Totals : 1309.98125 180.30975

Signal 3: DAD1 C, Sig=247,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	2.637	BB	0.0630	7.16588	1.77964	0.5411
2	4.358	BB	0.1112	1317.20190	180.45978	99.4589

Totals : 1324.36779 182.23942

*** End of Report ***

*Ejemplo correspondiente a corrida 4.

d. Tabla No. 22: *Datos originales de prueba de precisión del inyector con fase móvil mezclada por bomba binaria.*

	Corrida 1			Corrida 2			Corrida 3			Corrida 4			Corrida 5		
	Tiempo	Área	Altura	Tiempo	Área	Altura	Tiempo	Área	Altura	Tiempo	Área	Altura	Tiempo	Área	Altura
	4.40900	5012.71631	665.66290	4.37900	5028.13574	674.31085	4.42100	4784.93066	642.61938	4.39400	4600.64941	597.19855	4.37500	4965.53711	676.24280
	4.37300	4936.77637	664.03296	4.39000	4941.28711	657.08899	4.38700	5090.28809	683.01788	4.36600	4995.97021	676.77942	4.40000	5137.59033	707.15179
	4.44800	4977.24121	660.70271	4.39700	5002.79932	667.63733	4.41300	5037.49707	669.81140	4.36100	4594.71582	621.86383	4.34500	5133.88672	686.98145
	4.38800	4823.87695	638.83679	4.44200	5076.46240	683.27161	4.38200	4266.57275	578.79730	4.34900	4896.74414	644.48169	4.37000	5193.39502	694.16425
	4.41700	4999.22754	673.70154	4.41000	5070.50732	676.00049	4.38500	5038.87109	683.76685	4.37300	4943.88477	677.46417	4.36700	5106.32813	671.60931
	4.39700	4950.08154	672.35364	4.39800	4676.10742	632.44781	4.38900	4967.89697	678.74292	4.35400	5040.88477	680.72272	4.37900	5028.13574	674.31085
s	0.02602	68.08915	12.63397	0.02180	150.32439	18.27919	0.01650	311.72186	40.86113	0.01607	197.97299	34.71318	0.01787	82.90128	13.77558
media	4.40533	4949.98665	662.54842	4.40267	4965.88322	665.12618	4.39617	4864.34277	656.12596	4.36617	4845.47485	649.75173	4.37267	5094.14551	685.07674
% rsd	0.59066	1.37554	1.90688	0.49506	3.02714	2.74823	0.37527	6.40830	6.22764	0.36800	4.08573	5.34253	0.40876	1.62738	2.01081

e. Reporte de prueba de precisión del inyector con fase móvil mezclada por bomba binaria.

```

=====
Injection Date   : 11/27/2012 2:39:36 PM
Sample Name     : precision inyl.4           Location : Vial 1
Acq. Operator  : AdeM
Acq. Instrument : LC1100
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\METHODS\PRESICION.M
Last changed   : 11/27/2012 2:39:30 PM by AdeM
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\PRESICION.M
Last changed   : 11/27/2012 12:26:17 PM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para determinar precision
=====
                          Area Percent Report
=====
Sorted By       :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount   :      20.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=274,4 Ref=360,100

Peak RetTime Type Width Area Height Area
# [min] [min] [mAU*s] [mAU] %
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
  1  4.388 BB  0.1161 4823.87695 638.83679 100.0000

Totals :                      4823.87695 638.83679 100.0000

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

```

*Ejemplo correspondiente a inyección 4 de corrida 1.

f. Tabla No. 23: *Datos originales de prueba de precisión del inyector con fase móvil mezclada previamente.*

	Corrida 1			Corrida 2			Corrida 3		
	Tiempo	Área	Altura	Tiempo	Área	Altura	Tiempo	Área	Altura
	4.29700	4488.30908	616.98413	4.29800	5157.45020	708.31580	4.30000	5151.45898	708.27374
	4.29800	4848.24805	664.93488	4.29700	5196.57520	712.90881	4.30200	5229.50586	717.96228
	4.29600	5158.98260	707.63477	4.29700	5094.31396	699.77271	4.30200	5232.55127	718.96930
	4.29800	5173.64404	710.30750	4.29900	5213.31494	715.66893	4.30300	5264.45605	722.33301
	4.30200	5203.64844	712.01465	4.30000	5080.65771	698.06665	4.30400	5278.17871	725.38428
	4.29800	5168.95557	709.99164	4.30000	5151.45898	708.27374	4.30300	5358.81055	736.17224
s	0.00204	286.36047	38.76202	0.00138	53.17610	7.00411	0.00137	68.17660	9.21855
media	4.29817	5006.96463	686.97793	4.29850	5148.96183	707.16777	4.30233	5252.49357	721.51581
% rsd	0.04749	5.71924	5.64240	0.03207	1.03275	0.99045	0.03176	1.29799	1.27766

g. Reporte de prueba de precisión del inyector con fase móvil mezclada previamente.

```

=====
Injection Date   : 11/28/2012 4:45:15 PM
Sample Name     : prec iny 2.4                      Location : Vial 1
Acq. Operator   : AdeM
Acq. Instrument : LC1100
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\METHODS\PRESICION.M
Last changed    : 11/28/2012 2:10:34 PM by AdeM
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\PRECISION CAL.M
Last changed    : 11/28/2012 4:37:39 PM by AdeM
                  (modified after loading)
Metodo para determinar precision

```

Area Percent Report

```

Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : Wednesday, November 28, 2012 4:32:51 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 20.00000 [mg/lt] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=274,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Height [mAU]	Name
1	4.298	RR	0.1110	5173.64404	100.0000	710.3075	

Totals : 5173.64404

*** End of Report ***

*Ejemplo correspondiente a inyección 4 de corrida 1.

h. Tabla No. 24: *Datos originales para factor de respuesta de la prueba de linealidad del detector con fase móvil mezclada por bomba binaria.*

	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 4	Corrida 5
	Amt/Area	Amt/Area	Amt/Area	Amt/Area	Amt/Area
	0.07589	0.02262	0.02456	0.01867	0.02363
	0.02325	0.02550	0.02635	0.02614	0.02605
	0.02394	0.02751	0.02758	0.02897	0.02746
	0.02458	0.02656	0.02714	0.02582	0.02601
	0.02969	0.03034	0.03088	0.03044	0.03075
s	0.02274	0.00282	0.00231	0.00454	0.00261
media	0.03547	0.02651	0.02730	0.02601	0.02678
% rsd	64.11212	10.63946	8.46347	17.44668	9.74560

i. Reporte de prueba de linealidad del detector con fase móvil mezclada por bomba binaria.

Method C:\CHEM32\1\METHODS\PRECISION CAL.M

=====
 Calibration Table
 =====

Curva de calibracion cafeina

Calib. Data Modified : Wednesday, November 28, 2012 11:20:07 AM

Calculate : External Standard
 Based on : Peak Area

Rel. Reference Window : 5.000 %
 Abs. Reference Window : 0.000 min
 Rel. Non-ref. Window : 5.000 %
 Abs. Non-ref. Window : 0.000 min
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
 Uncalibrated Peaks : not reported
 Partial Calibration : Yes, identified peaks are recalibrated
 Correct All Ret. Times: No, only for identified peaks

Curve Type : Linear
 Origin : Forced
 Weight : Equal

Recalibration Settings:
 Average Response : Average all calibrations
 Average Retention Time: Floating Average New 75%

Calibration Report Options :
 Printout of recalibrations within a sequence:
 Calibration Table after Recalibration
 Normal Report after Recalibration
 If the sequence is done with bracketing:
 Results of first cycle (ending previous bracket)

Signal 1: DAD1 A, Sig=274,4 Ref=360,100

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [ug/ml]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
4.332	1	5.00000	267.82751	1.86687e-2	
	2	25.00000	956.30182	2.61424e-2	
	3	125.00000	4314.51221	2.89720e-2	
	4	250.00000	9683.10645	2.58182e-2	
	5	500.00000	1.64245e4	3.04423e-2	

More compound-specific settings:

Compound:
 Time Window : From 4.036 min To 4.736 min

! Warnings or Errors :

=====
 Peak Sum Table
 =====

No Entries in table
 =====

- j. Tabla No. 25: *Datos originales para la prueba de linealidad del detector con absorbancias menores a 1 AU.*

	5 ug	25 ug	125 ug
Corrida 1 (Área)	295.6636	1075.38452	5221.94922
Corrida 2 (Área)	221.01395	980.36584	4544.54834
Corrida 3 (Área)	203.59808	948.7326	4531.85986
Corrida 4 (Área)	267.82751	956.30182	4314.51221
Corrida 5 (Área)	211.55876	959.6524	4552.96143

- k. Tabla No. 26: *Datos originales para la prueba de linealidad del detector con fase móvil mezclada previamente.*

	Corrida 1 Amt/Area	Corrida 2 Amt/Area
	0.09013	0.01198
	0.02774	0.02628
	0.02699	0.02787
	0.02647	0.02758
	0.02996	0.03024
s	0.02791	0.00730
media	0.04026	0.02479
% rsd	69.32887	29.44765

I. Tabla No. 27: *Datos originales para la prueba de arrastre del inyector.*

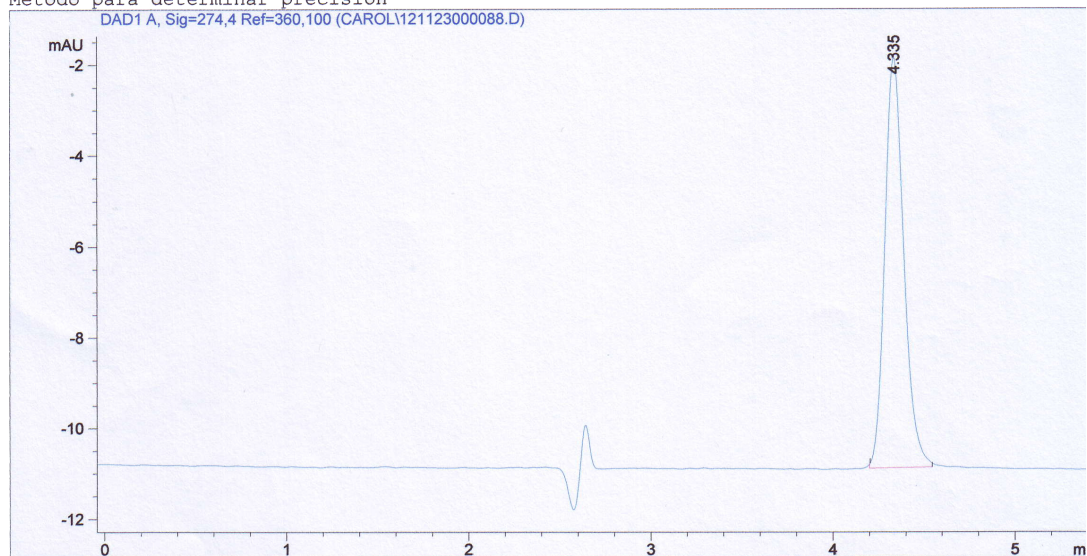
	Área	Cantidad	Altura
Corrida 1	12.37885	0.36382	1.66776
Corrida 2	47.02430	1.40679	6.37679
Corrida 3	55.47643	1.63920	7.66671
Corrida 4	65.88282	1.93440	9.03912
Corrida 5	41.72642	1.21323	5.82547
s	23.19439	0.68317	3.20331
media	45.19060	1.33605	6.18760
% rsd	51.32570	51.13336	51.76995

m. Reporte para la prueba de arrastre del inyector.

```

=====
Injection Date   : 11/28/2012 11:19:04 AM
Sample Name      : arrastre iny 4                Location : Vial 1
Acq. Operator    : AdeM
Acq. Instrument  : LC1100
Acq. Method      : C:\CHEM32\1\METHODS\PRESICION.M
Last changed     : 11/28/2012 8:15:17 AM by AdeM
                  (modified after loading)
Analysis Method  : C:\CHEM32\1\METHODS\PRECISION CAL.M
Last changed     : 11/28/2012 11:26:37 AM by AdeM
                  (modified after loading)
Metodo para determinar precision

```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified :      Wednesday, November 28, 2012 11:26:36 AM
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount   :      20.00000 [ug/ml] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=274,4 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ug/ml]	Grp	Height [mAU]	Name
4.335	BB	65.88282	2.93612e-2	1.93440		9.03912	

```
Totals :                               1.93440
```

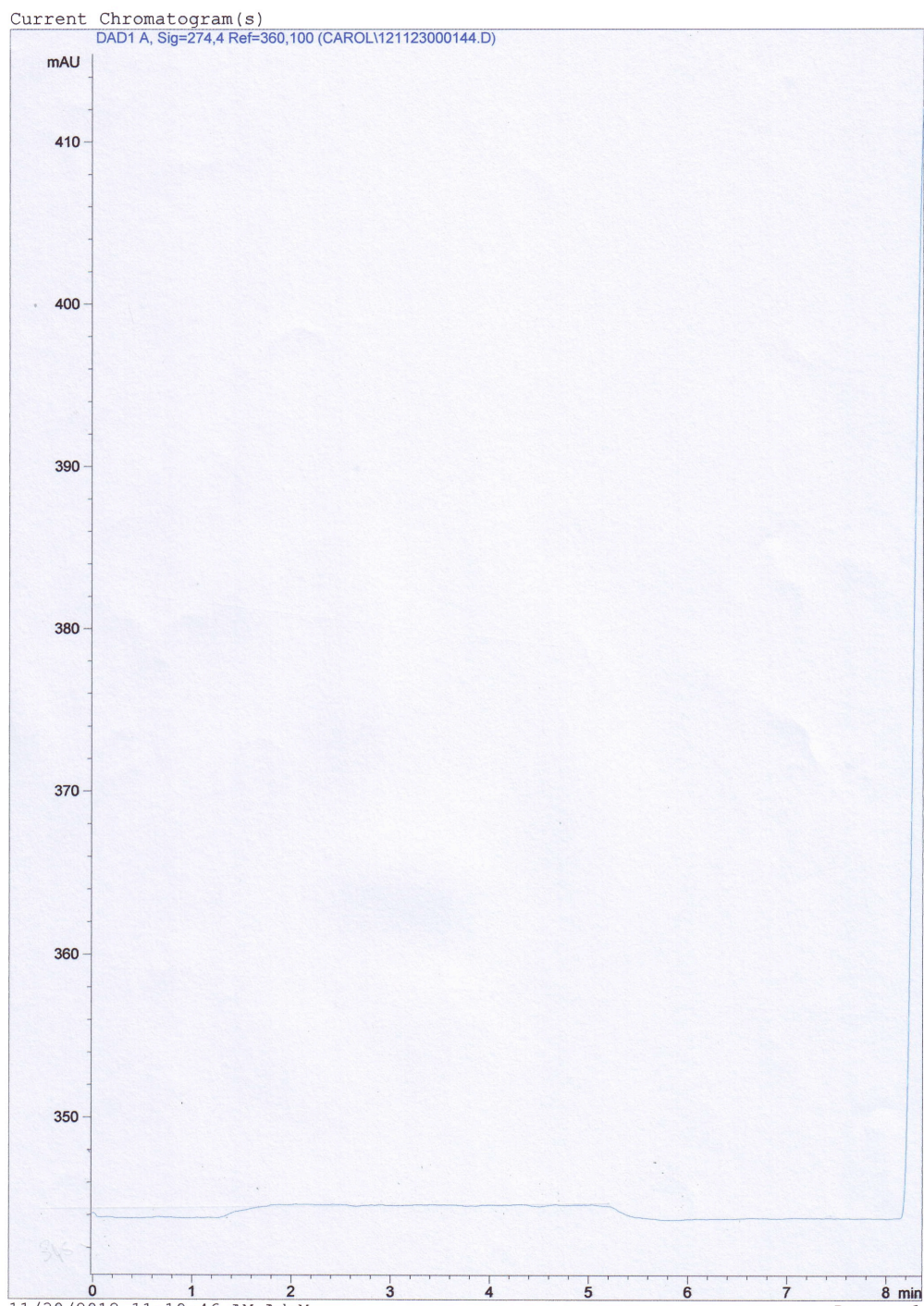
*Ejemplo correspondiente a corrida 4.

n. Tabla No. 28: *Datos originales para la prueba de gradiente de composición.*

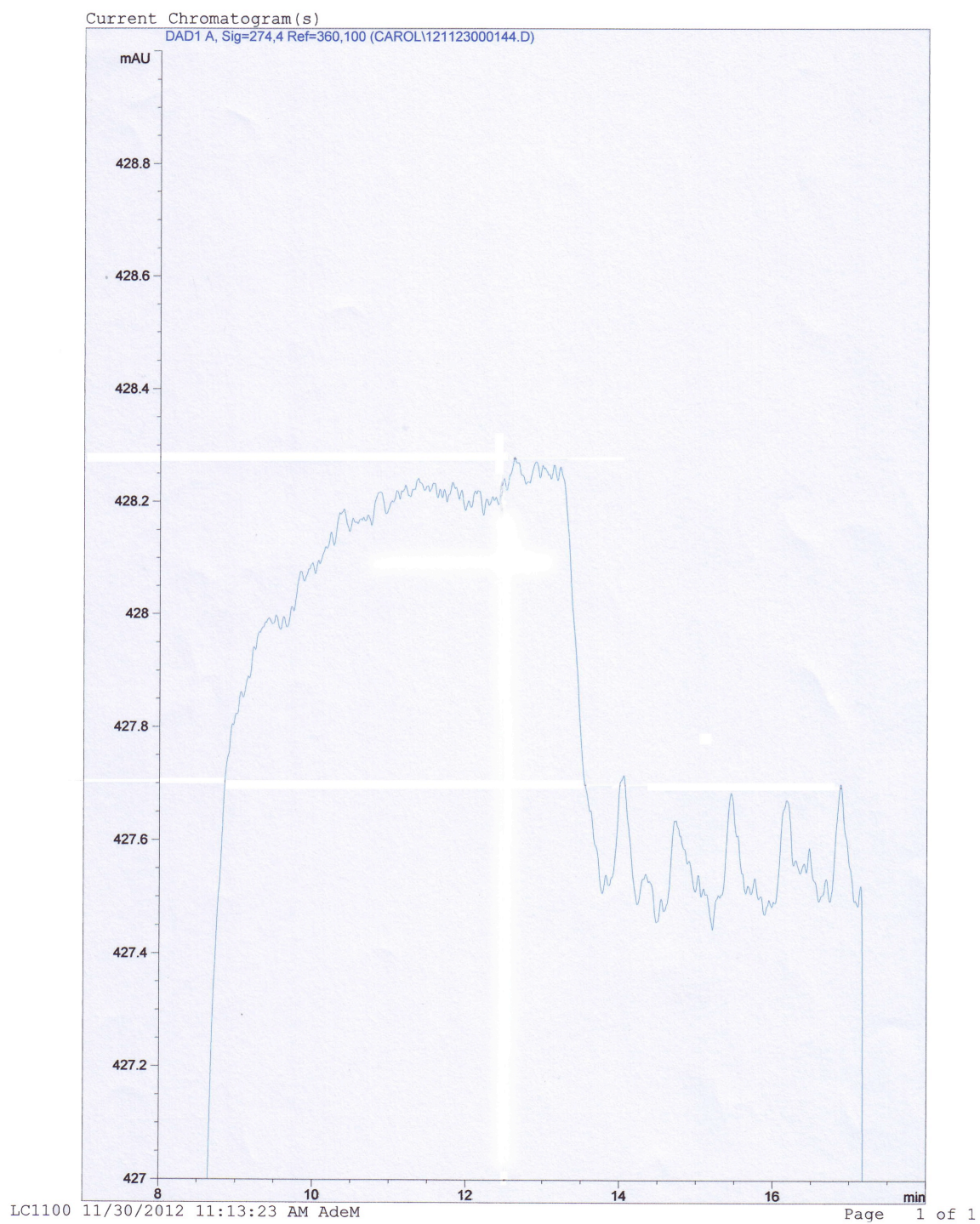
Corrida 1			Corrida 2			Corrida 3		
Tiempo	Valor obs	Valor de B	Tiempo	Valor obs	Valor de B	Tiempo	Valor obs	Valor de B
1	342.5	0	1	344	0	1	346	0
5	343.5	1	5	345	1	5	346.2	1
8	343.5	0	8	344	0	8	345.8	0
13	428.35	100	13	428.5	100	13	428.25	100
17	427.85	99	17	427.85	99	17	427.7	99
20	343	0	20	345	0	20	345	0

o. Cromatograma de la prueba de gradiente de composición.

Print of window 38: Current Chromatogram(s)



Print of window 38: Current Chromatogram(s)



E. Certificaciones y especificaciones.

1. Certificación de columna analítica.



Certificate of Analysis

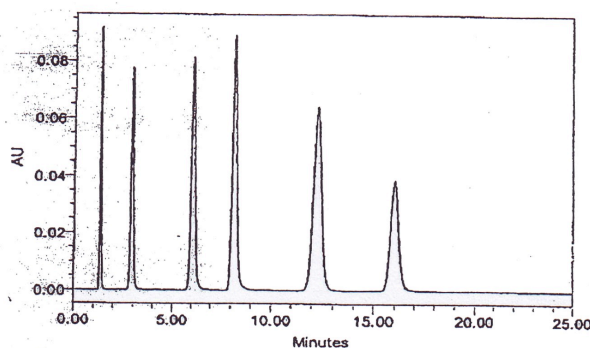
XTerra® RP18 5 µm

Batch # 193

Chromatographic Results* for XTerra® RP18, 5 µm

Peak Identification

1. Uracil
2. Propranolol
3. Butyl Paraben
4. Naphthalene
5. Amitriptyline
6. Acenaphthene



	Specification	Result
k Acenaphthene		11.05
Relative Retention (r)		
Propranolol/Acenaphthene	0.100 - 0.118	0.110
Butyl Paraben/Acenaphthene	0.301 - 0.329	0.322
Naphthalene/Acenaphthene	0.459 - 0.477	0.465
Amitriptyline/Acenaphthene	0.722 - 0.798	0.744
USP Tailing Factor		
Amitriptyline	≤ 1.40	1.03
Propranolol	≤ 1.45	1.12

*Chromatographic Conditions: Column: 3.9 mm x 150 mm, Flow Rate: 1 mL/min
Mobile Phase: 40.0% v/v 20.0 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ at pH 7.00/ 60.0 % Methanol at 23°C

Material Approved: _____

Quality Control

Date: _____

31 January 2008

Form #1278, Rev. 1

Waters

Xterra and Waters are trademarks of Waters Corporation © 1999 Waters Corporation
Waters Corporation 34 Maple Street Milford, Massachusetts 01757-3696 U.S.A. 508 478-2000 www.waters.com



Part Number: 186000492
XTerra® RP18 5.0µm
4.6mm x 150mm Column

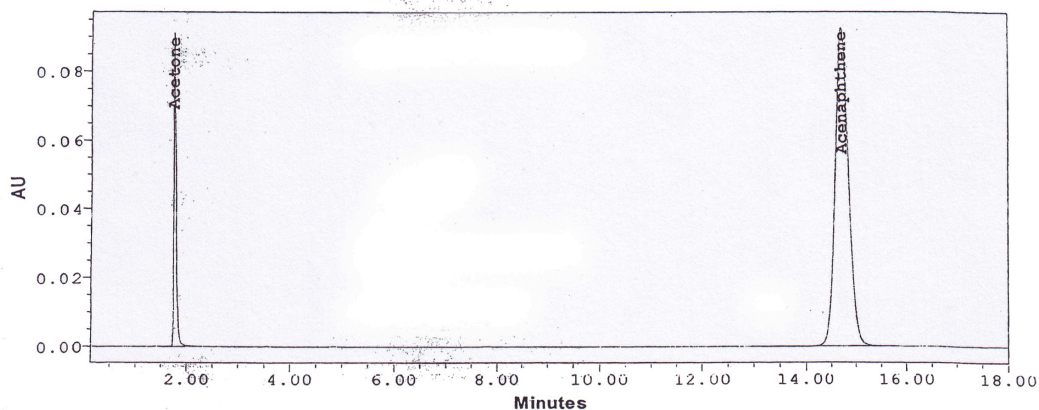
Column Serial Number: 01933811913642

Batch Number: 0193

Test Method

Mobile Phase: 50/50 Acetonitrile/Water
Sample: Acetone 6 µL/mL
Acenaphthene 0.5 mg/mL
Flow Rate: 1.0 mL/min.
Detection: 254 nm
Temperature: Ambient
Injection Volume: 3.0µL

System Name: System 22



Test Results For Acenaphthene

Retention Time: 14.75

USP Tangent Efficiency: 13942

Capacity Factor: 7.31

USP Tailing: 1.00

Accepted By: 280

Pressure (Psig): 1392

Date: 30 April 2008 05:33:11

Waters

XTerra and Waters are trademarks of Waters Corporation © 1999 Waters Corporation
Waters Corporation 34 Maple Street Milford, Massachusetts 01757-3696 U.S.A. 508 478-2000 www.waters.com



Certificate of Analysis

Xtterra® RP₁₈ 5 µm

Batch # 193

Analytical Results for Xtterra® RP₁₈, 5 µm

	<u>Result</u>
Analysis of Unbonded Particles	
5 µm Particle Size Distribution	
90 % / 10 % Diameter Ratio	1.72
Particle Consistency	Pass
Pore Structure	
Pore Volume	0.65 cm ³ /g
Average Pore Diameter	139 Å
Surface Area	163 m ² /g
Metal Impurity Concentrations	
Na	<1 ppm
Al	<1 ppm
Fe	<1 ppm
Analysis of Xtterra® RP₁₈, 5 µm	
Total Carbon Content	14.44 %
C ₁₈ Surface Concentration	2.41 µmoles/m ²

Material Approved:

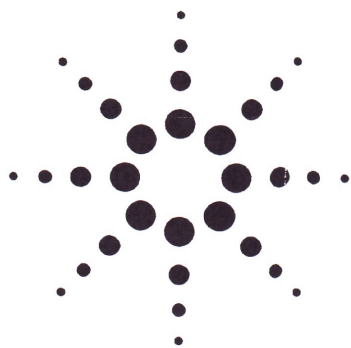

Quality Control

Date: 31 January 2008

Waters

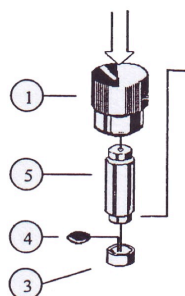
Xtterra and Waters are trademarks of Waters Corporation © 1999 Waters Corporation.
Waters Corporation 34 Maple Street, Milford, Massachusetts 01757-3696 U.S.A. 508 478-2000 www.waters.com

2. Especificaciones de la precolumna.



HPLC Sample Clean-up and Guard Columns

Datasheet



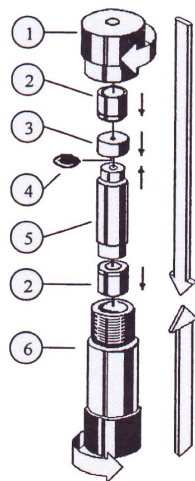
Packing a Sample Clean-up Column

1. Insert a sieve (4) into a cap (3). Repeat this operation with a second sieve and cap and place it aside for later usage.
2. Place one sieve/cap combination on one end of the cartridge (5) and snap together firmly.
3. Carefully guide the funnel (1) over the open end of the cartridge assembly with a slight twisting motion until it bottoms snugly against the tube end.
4. With a clean spatula, place a small amount of packing material in the funnel. To transfer the material to the cartridge, lightly tap the cartridge on a clean bench/desk top. Repeat this operation until the cartridge is full.

Warning!

The inhalation of packing material can damage your health.

Refill and fill columns in a fume hood.



5. Slowly remove the funnel with an upward twisting motion. CLEAN EXCESS MATERIAL FROM THE TOP OF THE CARTRIDGE WITH A SPATULA. Seal with the sieve/cap combination previously assembled and set aside.

Attention!

Use insert with one groove for 2.1mm i.d. cartridges and insert with 2 grooves for 4.0mm i.d. cartridges. Grooves should show towards the cartridges.



for 2.1 mm i.d.



for 4.0 mm i.d.

6. To assemble the cartridge in the holder, first place one stainless steel insert (2), cone-side down into the main holder body (6). The cone should not be visible upon looking down into the holder. Next, insert the packed cartridge into the holder. Place a second insert, cone-side up (cone visible) in holder and screw all parts together with the knurled nut (1). Hand-tighten only.



Agilent Technologies

IMPORTANT:**Installing the Pre-column in Your Chromatographic System**

To obtain a leak-free seal to 400 bars, it is necessary to use two ¼" wrenches when connecting the pre-column to the inlet and outlet capillaries of your chromatographic system. Normally, ¾ turn beyond finger-tight connection of the capillary nuts is required to seal at 400 bars. Repeated reuse of the same cartridge may require slightly more tightening. Only Swagelok (R)-type fittings/ferrules are suggested for proper sealing.

Changing the Cartridge (Self and Pre-Packed)

The entire cartridge holder must be removed from your chromatographic system using two ¼" wrenches. Do not attempt to unscrew the two halves of the holder until after the capillary connections are removed. WITH THE CARTRIDGE IN A VERTICAL POSITION on a bench/desk top, unscrew the knurled nut and carefully remove the top insert. The cartridge can in most cases be removed by simply inverting the holder on the lab bench. If it does not slide out, use a blunt instrument to push it out through the threaded end of the holder.

Without removing the bottom stainless steel insert, place a new cartridge in the holder, (or to refill a present sample clean-up column, see the following "Refilling" section). On top of the cartridge, replace the metal insert and screw all parts together finger-tight with the knurled nut.

Refilling a Sample Clean-up Cartridge

Having removed and disassembled the cartridge holder as previously described, remove the plastic caps from the cartridge; use piers if necessary. Use compressed bottled nitrogen to blow the packing material from the cartridge. If the material is compacted, use a drill to remove it. Clean the cartridge in dichloromethane using an ultrasonic bath. DO NOT REUSE THE CAPS OR THE SIEVES. For refilling the cleaned and DRIED cartridge, follow the illustrated directions at left.

Changing the Frits in a Guard Column

If the frits become blocked, there will be an increase in back pressure and the frits should be changed. With the holder in an upright position on a table top unscrew the knurled nut, remove the metal insert and then the column. If difficulty is encountered refer to "Changing the Cartridge" section for further details. Remove the top (inlet) cap from the cartridge, using pliers if necessary. Dispose of the old cap. If some packing material is lost or the guard column is compacted, you may need to add some material to the top of the column. Place a small amount of packing mate-

rial in a beaker and add a few drops of acetone to obtain a paste. Use a clean spatula to top-up the cartridge. Carefully remove all excess material from the top of the column and press on the new cap with frit. Replace the metal insert and the top of the cartridge holder. Flush the column with the mobile phase for 10 minutes. The column is now ready for use.

Installation of a Guard Column

Refer to illustrated instruction item 6

OPERATING SPECIFICATIONS

The pre-column system has been successfully tested within the following range of conditions:

Pressure:	0 - 400 Bar
Temperature:	20 - 80°C

In order to obtain a reliable seal with a previously used cartridge, it is recommended that both plastic end caps be replaced before re-installing the cartridge in the holder.

Ordering Information**Agilent Part No.****Replacement Parts and Kits**

Guard Cartridge Kits (Each consists of 3 cartridges)	
2.1mm i.d. ODS-Hypersil, 5µm	79916KT-110
2.1mm i.d. MOS-Hypersil, 5µm	79916KT-111
2.1mm i.d. Hypersil, 5µm	79916KT-113
4.0mm i.d. ODS-Hypersil, 5µm	79916KT-120
4.0mm i.d. MOS-Hypersil, 5µm	79916KT-121
4.0mm i.d. APS-Hypersil, 5µm	79916KT-122
4.0mm i.d. Hypersil, 5µm	79916KT-123
Cartridge Holder	79900CH-010
Sample Clean-up Cartridge Kit (5 empty cartridges 20 x 2.1mm i.d., 10 caps, 10 sieves)	79916KT-101
Package of 6 Frits and Caps For 2.1mm i.d. Guard cartridges	01090-27606
Package of 6 Frits and Caps For 4.0mm i.d. Guard cartridges	01090-27613
Package of 6 Sieves and Caps For Sample Clean-up cartridges	01090-27605
Package of 6 Spare Stainless Steel Inserts For 2.1mm i.d. Guard cartridges	01090-27611
Package of 6 Spare Stainless Steel Inserts For 4.0mm i.d. Guard cartridges	01090-27614
Spare Funnel	79910-62304
Package of 10 Spare o-rings for funnel	5061-3314
Connecting Capillary 35µm length, 0.12mm i.d.	79841-87609
Packing Material	
ODS-Hypersil 30µm, 5g	79903-85031
Hypersil 30µm, 5g	79903-85032
ODS-Hypersil 10µm, 5g	79903-85021


Agilent Technologies

3. Certificación de los estándares.



Agilent Technologies



Certificate of Analysis

Caffeine Standards Kit

Part No 8500-6762

Lot No HC015875

Concentrations:Caffeine in water:

Nominal value	Effective value determined by UV-spectroscopy using the absorption maximum at 273 nm
500 µg/ml	481.0 µg/ml + 1,5 %
250 µg/ml	242.0 µg/ml + 1,5 %
125 µg/ml	121.0 µg/ml + 1,5 %
25 µg/ml	24.3 µg/ml + 2 %
5 µg/ml	4.90 µg/ml + 5 %

Purity grades:

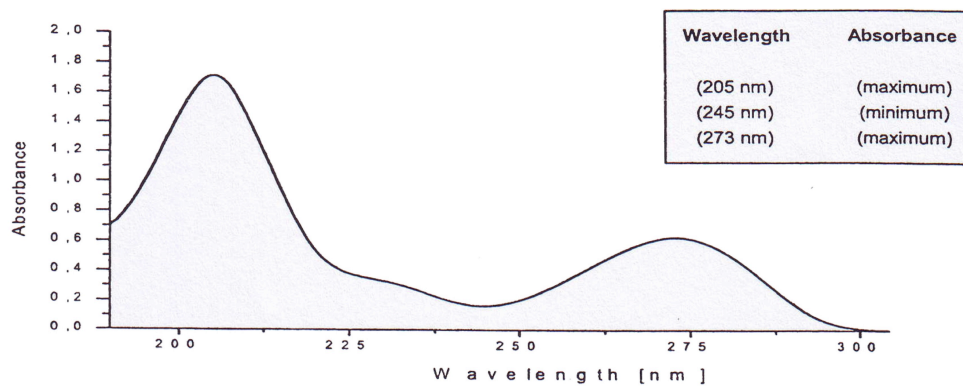
Caffeine: extra pure, acc. to Ph. Eur.
 Concentration (acid. titration): 98.5 – 101.5 %
 Heavy metals (as Pb): < 0.001%
 Loss on drying (105°C): < 0.5%

Water: 18.2 MΩ x cm

The standards in this kit have been produced gravimetrically under controlled environmental conditions. Balances used are calibrated regularly against PTB (Physikalisch Technische Bundesanstalt [Federal Physical-Technical Institute] – Braunschweig – Germany) traceable weight sets. The manufacturing, testing and distribution of these standards meet the requirements of the quality management norm DIN EN ISO 9001:2008.

The standards have been analysed on a high-performance UV/VIS/NIR spectrophotometer. The spectrophotometer is regularly validated for accuracy and reproducibility of absorbance and wavelength as well as for linearity, baseline drift, stray light and spectral resolution power using the following testing materials:

Absorbance: NIST SRM 1930 and double aperture method
 Wavelength: Intrinsic values of a holmium oxide solution Merck reference material Cat. No. 108166 [1], emission lines of D₂ and Hg lamps
 Stray light: Merck Cat. No. 108164 (KCl standard, 200 nm), Merck Cat. No. 108163 (NaI standard, 220 nm), Merck Cat. No. 108161 (NaNO₂ standard, 370 nm)
 Spectral resolution power: Half width value of D₂ emission lines for checking the effective optical bandwidth

UV/VIS Spectrum Caffeine in water [concentration: 125 µg/ml]

[1] J. C. Travis et al., J. Phys. Chem. Ref. Data (2005), 34(1), 41-56.

Date of release: 27.05.2010

Expiration date: 31.05.2013

Dr. S. Frey

Dr. Stefan Frey
(responsible laboratory manager quality control)