

21

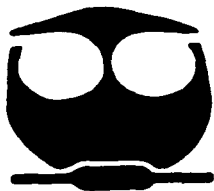


**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**VALIDACION DE TÉCNICAS
ANALÍTICAS EN
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS.**

**TRABAJO ESCRITO VIA CURSO DE
EDUCACION CONTINUA
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
P R E S E N T A :
VERÓNICA CEDILLO RAMÍREZ**



MEXICO, D. F.



2002

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: PROF. ERNESTO PÉREZ SANTANA
VOCAL: PROF. NORMA TRINIDAD GONZÁLEZ MONZÓN
SECRETARIO: PROF. MARIA DEL SOCORRO ALPIZAR RAMOS
1er. SUPLENTE: PROF. BERTA JULIETA SANDOVAL GUILLÉN
2o. SUPLENTE: PROF. ZOILA NIETO VILLALOBOS

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

COORDINACIÓN DE EXTENSIÓN ACADÉMICA, EDUCACIÓN CONTÍNUA
SEDE CU, FACULTAD DE QUÍMICA, EDIFICIO D, CIRCUITO INSTITUTOS,
CIUDAD UNIVERSITARIA, CP 04510

ASESOR DEL TEMA:


Ing. Ernesto Pérez Santana

SUSTENTANTE:


Verónica Cedillo Ramírez

Agradecimientos

A Dios

A las tres mujeres más importantes en mi vida, que con su apoyo, amor, y confianza he podido concluir esta etapa, las amo.

Ita, por haber sido el pilar de la familia, siempre estarás conmigo.

Mamá, por la vida y por enseñarme que a pesar de todo, siempre se puede salir adelante

Mamá Lupa, por el cariño que siempre nos has dado.

Patty, Roy, Claudia, porque sé que siempre estarán cuando los necesite, ánimo y gracias por ser mis hermanos.

Leo, por haber llegado a mi vida, por tu amor, apoyo y confianza para lograr esta meta.

A mis amigas: Nancy, Luisa y Viri por los momentos gratos que hemos y seguiremos pasando juntas.

Claudia V., amigos y compañeros de la carrera por haber compartido el mismo sueño.

Gloria E. Sánchez, Juanita, gracias por su amistad y la presión para alcanzar este objetivo.

A mis compañeros de trabajo.

Especial agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, por la educación que me brindaron.

*"Lo que uno sabe, en la juventud, es poco, es un momento.
Uno sabe lo suficiente, cuando aprende como aprender.*

Henry Brooks Adams

INDICE:

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
III. PROCESO DE VALIDACIÓN	3
i. Adaptabilidad del Sistema o "System Suitability" y Parámetros Cromatográficos.....	5
ii. Validación de Métodos Analíticos.....	10
iii. Clasificación de Métodos Analíticos.....	11
iv. Desarrollo de los Parámetros de Validación y sus Criterios de Aceptación.....	12
IV. CONTROL DE CAMBIOS Y REVALIDACIÓN	25
V. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (Generalidades)	28
i. Perspectiva Histórica.....	28
ii. Definición.....	29
iii. Aplicaciones.....	30
iv. Clasificación.....	32
VI. INSTRUMENTACIÓN (Guía práctica en las operaciones generales en CLAR)	36
VII. ANÁLISIS y CONCLUSIONES	50
VIII. BIBLIOGRAFÍA	54

I. INTRODUCCIÓN

Hoy día la importancia de la validación toma más auge debido a las exigencias del mercado y a los organismos Nacionales e Internacionales para asegurar la CALIDAD de los medicamentos, pero más que una ventaja competitiva, para la industria farmacéutica, la calidad es una "OBLIGACIÓN". Por tanto los laboratorios farmacéuticos deberán cumplir los mínimos requisitos de validación establecidos por la Secretaria de Salud (SS), y otros organismos internacionales, tales como la "Food and Drug Administration" (FDA). En lo que a verificaciones analíticas se refiere, la metodología empleada para controlar procesos y productos ha venido avanzando a grandes pasos científica y tecnológicamente.

Sin embargo, siempre es posible mejorar y facilitar dicho control a través de las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) ó (GMP) por sus siglas en inglés, de las verificaciones analíticas de los procedimientos involucrados en la manufactura del producto y a las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL)

A pesar de esto, no debe olvidarse que un resultado analítico sólo nos acerca al valor verdadero, hasta el momento, no es posible aún tener la cereza plena de que el resultado obtenido es la verdad absoluta, ya que el valor verdadero de una magnitud es un concepto ideal y en general no puede ser conocido exactamente. Por esta razón, una validación adecuada de la metodología permite conocer sobre que margen de error se está trabajando y mantener controlado dicho error.

Las actividades de control están encaminadas a vigilar permanentemente que los parámetros de una medición, independientemente de la medición específica, se mantengan dentro de los límites preestablecidos. Las actividades de aseguramiento de calidad están encaminadas a garantizar la confiabilidad de la medición, empleando un sistema integral de calidad.

Así como se entiende y se acepta que un buen producto es el resultado de un buen proceso y que ambos deben ser probados y controlados para asegurar la calidad final, de la misma manera, dentro del aseguramiento de la calidad en el laboratorio, los métodos analíticos y procedimientos, constituyen el proceso integral que debe ser controlado para asegurar la calidad de los resultados.

Por lo tanto ahora se habla de la validación como un proceso continuo, interactivo y multidisciplinario y no cómo un ente aislado.

De tal manera que el proceso de validación de un método en particular está basado en principios científicos adecuados y pruebas sistemáticas por las cuales queda establecido de manera clara y objetiva que el método de estudio reúne los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas y ha sido optimizado para principios de medición.

Por otra parte los criterios que deben cumplir los parámetros estadísticos son propuestos como se mencionó por organismos Nacionales, tales como la Farmacopea Nacional (FEUM) e Internacionales, como la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), etc., los cuales han publicado una serie de normas y especificaciones legales que los respaldan, pero estos son sólo una referencia, cada laboratorio llevará a cabo una validación del método analítico de acuerdo a sus necesidades y a los requisitos legales que ameriten.

Existen pocos libros que cubren o empatan en los procesos de desarrollo y validación. Sin embargo y a pesar de que muchas industrias, y laboratorios gubernamentales gastan un mucho de su tiempo intentando desarrollar nuevos o mejorar métodos validados de analitos específicos, hay poco en la literatura como guía de estos tópicos.

II. OBJETIVOS

Por lo tanto este trabajo tiene como objetivo presentar las consideraciones básicas necesarias para alcanzar un método analítico óptimo, confiable y por lo tanto validado, en concordancia con las regulaciones Nacionales e Internacionales, así como una guía práctica en las operaciones generales de cromatografía de líquidos, basada sobre todo en la experiencia diaria y los problemas más frecuentemente encontrados en la validación de métodos por cromatografía de líquidos. Enfocada no sólo en cubrir los requerimientos nacionales e Internacionales, sino optimizar el proceso de validación, sobre todo en uno de los factores determinantes en nuestros días, el tiempo, y siguiendo el tema de "bien a la primera", sin perder la objetividad del control de cambios.

III. PROCESO DE VALIDACIÓN

La validación se define según la NOM-059-SSA1-1993, como " la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad establecidos". Para llevar a cabo la validación es necesario tomar en cuenta tres ingredientes indispensables: 1) pruebas de desafío las cuales se establecen en el inicio del desarrollo farmacéutico o desarrollo analítico, en éste último nacen los métodos de análisis y especificaciones del producto, 2) la calibración de los instrumentos y 3) la calificación de los elementos o componentes del sistema.

En la actualidad, específicamente para la optimización, desarrollo y validación de métodos analíticos por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (CLAR), se contempla a la validación como un proceso que no difiere de lo esencial arriba mencionado y la validación del método es la parte final del proceso de validación total que consiste de 4 pasos básicos:

- (1) validación del software
- (2) calificación/validación del hardware (instrumentación y equipo)
- (3) Adaptabilidad o Adecuabilidad del sistema o "System Suitability"
- (4) Validación del método, proceso o sistema crítico.

Es decir el proceso empieza con la validación del software y la calificación del sistema, requisitos mínimos para que pueda ser validado un método analítico, de nada nos serviría empezar con la validación del método, si no contamos con la base de nuestro sistema cromatográfico, ya que de encontrarnos con un problema en la validación del método, no podríamos identificar la causa real y nuestro universo de posibilidades sería enorme.

Finalmente, la validación total es lograda definiendo la Adaptabilidad del Sistema, pero cada paso es crítico para el éxito global del proceso.

La validación entonces del sistema cromatográfico y del software comenzará desde el momento de la requisición del equipo, conjuntamente con el proveedor al cual se le solicitará que cumpla con los requisitos mínimos de Calificación de Diseño (CD), así mismo deberá cumplir los requerimientos y especificaciones establecidos de acuerdo a nuestras necesidades, bajo los lineamientos de los organismos regulatorios, es recomendable siempre y antes de comenzar el proceso de validación la elaboración de un PROTOCOLO que contemple una matriz donde se relacionen los requerimientos, especificaciones y las pruebas que deberán cumplir en la calificación de instalación (CI), en esta etapa se contemplan la preinstalación, manuales y piezas que lo conforman y la instalación en sí, calificación de operación (CO) y calificación de funcionalidad o desempeño (CF), en la calificación de funcionalidad o desempeño se evalúa también el "system suitability" con un método probado y en el cuál se hayan caracterizado perfectamente el analito, la mayoría de las veces estas dos etapas se realizan conjuntamente.

i. Adaptabilidad del Sistema o "System Suitability" y Parámetros Cromatográficos

La adaptabilidad o adecuabilidad del sistema es una parte integral del método cromatográfico y deberá ser incluido siempre y en todos los análisis de HPLC, nos ayuda a verificar si la resolución y reproducibilidad del sistema son adecuados antes y durante el análisis.

La esencia de esta prueba es el concepto de que el equipo en general, las partes electrónicas, las operaciones analíticas y la muestra constituyen un sistema analítico completo que puede someterse a una prueba general de funcionamiento.

Por lo tanto es recomendable verificar este parámetro antes de comenzar con el método analítico; consiste en inyectar por quintuplicado la solución de adecuabilidad. Reportar la respuesta del analito, calcular el Coeficiente de Variación (CV) y para cada inyección determinar cuando proceda, el Factor de Capacidad (K'), Resolución (R), Factor de Coleo (T) y el Número de platos teóricos (N).

Criterio de aceptación:

- ❖ Coeficiente de Variación (CV) $\leq 2\%$ para la respuesta analítica

Para cada inyección :

- ❖ Factor de capacidad (K') > 2
- ❖ Resolución R > 2
- ❖ Factor de coleo T < 2

A continuación definimos cada uno de estos parámetros y su forma manual de calcularlos, hoy día existen programas computacionales o software que los realizan de manera rutinaria y automática.

- **Número de platos teóricos (N)**

La eficiencia de la columna se mide por el número de platos teóricos, a mayor valor de N, la columna tendrá mayor eficiencia. Estos miden el ensanchamiento de la banda del soluto a medida que pasa a través de la columna. Un plato teórico es el equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria.

De manera practica nos indica el estado en que se encuentra el empaque (calidad y uniformidad) o la vida media de la columna. La temperatura, fase móvil, la longitud y diámetro de la columna, influyen directamente en este parámetro. El número de platos teóricos se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$N = 16 \left(tr / wb \right)^2 \quad \text{ó} \quad N = 5.54 \left(tr / wb_{1/2} \right)^2$$

Donde:

N = Numero de platos teóricos

tr = Tiempo de retención del soluto

wb = Ancho del pico en la base obtenido extrapolando los lados del pico hasta la línea base.

wb_{1/2} = Ancho del pico a la mitad de la altura

- **Resolución (R)**

Es una medida cuantitativa del grado de separación obtenido entre dos componentes o picos adyacentes. Se calcula de la siguiente manera:

$$R = \frac{2 (tr_2 - tr_1)}{(w_2 + w_1)} \quad \text{ó} \quad R = \frac{2 (tr_2 - tr_1)}{1.70 (w_{1(1/2)} + w_{2(1/2)})}$$

Donde:

tr_1 y tr_2 = son los tiempos de retención para los componentes 1 y 2

w_1 y w_2 = son los anchos de los picos 1 y 2, obtenidos extrapolando los lados de los picos hasta la línea base

$w_{1(1/2)} + w_{2(1/2)}$ = Anchos del pico a la mitad de la altura

Un valor de R mayor o igual a 1.5 significa una separación completa de los componentes en la línea base.

- *Factor de Coleo (T)*

Es una medida de la asimetría de un pico bajo las condiciones de operación. Para un pico simétrico el factor de coleo es la unidad. El valor de T aumenta conforme el coleo va siendo más pronunciado. Se expresa por la siguiente ecuación:

$$T = \frac{W_{0.05}}{2 f}$$

Donde:

$W_{0.05}$ = ancho de la base del pico al 5% de la altura con respecto a la línea base.

f = distancia desde el inicio del pico hasta la mitad de la anchura con respecto a $W_{0.05}$

- *Factor de capacidad (K')*

El factor de capacidad es el tiempo durante el cual puede retenerse cada componente en la columna. La fase estacionaria retarda al soluto en un tiempo dado " tr " mientras " to " representa el tiempo que permanece en la fase móvil, por lo tanto el cociente entre ambos factores, representa el factor de capacidad:

$$K' = \frac{t_r - t_o}{t_o} = \frac{\text{Tiempo en la fase estacionaria}}{\text{Tiempo en la fase móvil}}$$

- *Tiempo de retención (tr)*

Se define como el tiempo que transcurre desde la inyección hasta el momento en que se obtiene el punto de máxima señal del componente, es decir el tiempo que permanece en la columna. El tiempo de retención es característico de la sustancia, bajo las mismas condiciones de trabajo, y puede variar en función de la columna, temperatura, velocidad de flujo y composición de la fase móvil. Se expresa en minutos o segundos.

- *Tiempo muerto (to)*

Si un compuesto no es retenido y sale a la misma velocidad de la fase móvil se le llama tiempo muerto (to), es decir corresponde al tiempo en que la fase móvil se traslada de un lado a otro de la columna.

- *Selectividad (α)*

La selectividad de una columna es una medida de la separación relativa de los picos de los compuestos analizados. La habilidad para discriminar entre dos componentes y retardarlos selectivamente es referida como selectividad de la columna. Se expresa en términos de factores de capacidad relativa:

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

Donde:

k_1 y k_2 = son los factores de capacidad para los compuestos 1 y 2 respectivamente

En la siguiente figura se muestra la determinación de los parámetros cromatográficos.

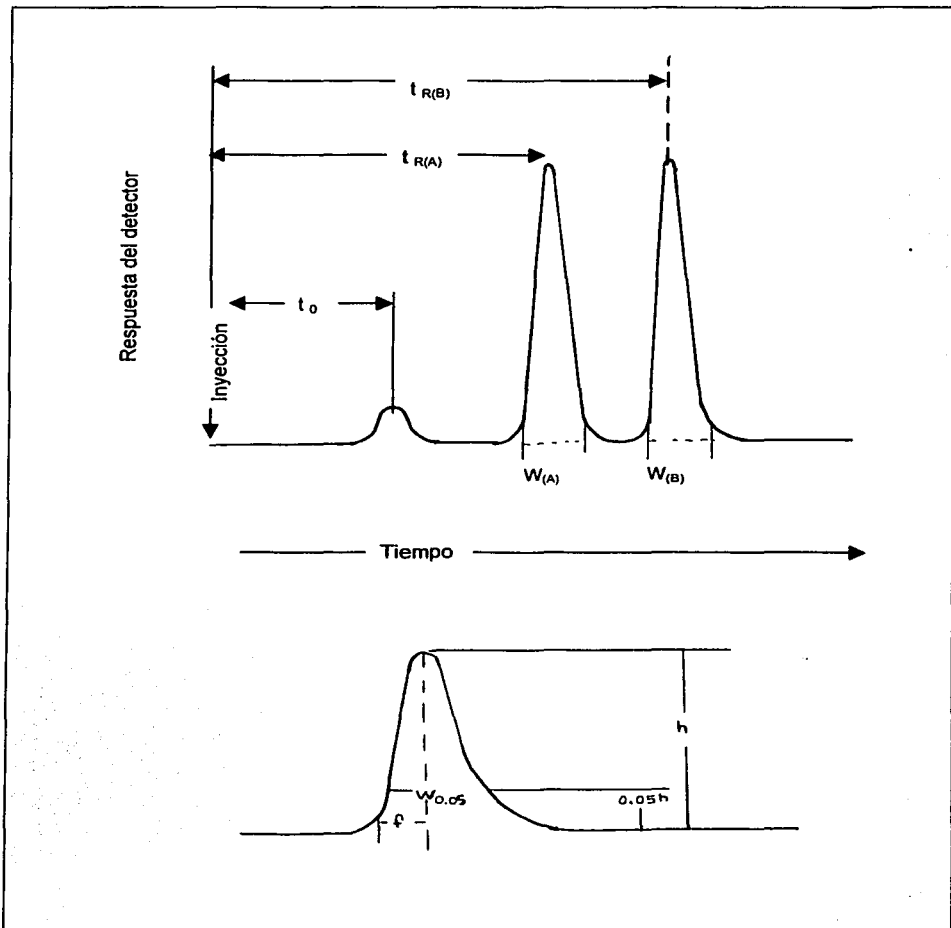


Figura 1. Parámetros Cromatográficos

ii. Validación de Métodos Analíticos

Una vez concluidos y aprobados los tres primeros pasos del proceso de validación, procedemos a la validación del método analítico, entendiéndola como la evidencia documentada por estudios de laboratorio de que las características del comportamiento del método, satisfacen los requerimientos para las aplicaciones analíticas deseadas, asegurando que un proceso específico producirá consistentemente un resultado cumpliendo las especificaciones corporativas y de regulación local.

Si estamos definiendo a la validación, como una evidencia documentada, es importante y necesario realizar una correcta planeación y preparación del protocolo de validación antes de iniciar el estudio, es decir elaborar la guía paso a paso de las actividades que deberán llevarse a cabo, para determinar y evaluar el tiempo, esfuerzo y recursos que se invertirán en esta etapa del proceso de validación, sin olvidar el objetivo principal de la validación del método.

Por lo tanto se propone una estructura de 7 pasos para la validación de métodos analíticos:

1. Objetivo, identificación y justificación del método que se requiera aplicar, de acuerdo a uno o varios de los siguientes aspectos: a) moral/ética, b) sistema crítico de Aseguramiento de Calidad, c) económico, (optimización de recursos) y d) regulatoria (Reglamento de Insumos para la Salud, NOM-059-SSA1-1993, NOM-073-SSA1-1993, FDA, etc.
2. Clasificación del método y elección de parámetros a evaluar (Diseño del protocolo de validación) en función de :
 - estado regulatorio: a) farmacopeicos, que aparecen en cualquier farmacopea y b) no farmacopeicos, no aparecen en ninguna farmacopea
 - aplicación: a) productos a granel, b) producto terminado, c) materias primas.
 - d) indicadores de estabilidad.

- Naturaleza respuesta analítica: a) Físicoquímicos y b) biológicos
 - Propósito analítico: a) Determinaciones de contenido/potencia/valoración, b) Pruebas de impurezas, c) Pruebas de identificación.
3. Determinación de los criterios de aceptación, para cada parámetro.
 4. Ejecución de la parte experimental de los parámetros de validación
 5. Evaluación de los resultados, mediante tratamientos estadísticos
 6. Reporte de resultados en los formatos correspondientes.
 7. Revisión y aprobación del Reporte de Validación.

iii. Clasificación de Métodos Analíticos

La USP clasifica a los métodos en 4 categorías, pero se recomienda la siguiente clasificación, que contempla la existente en la USP, y otros documentos no oficiales, la cuál dependerá de la aplicación deseada:

Categoría I. CONTENIDO/POTENCIA/VALORACIÓN. Métodos analíticos para la cuantificación de un componente específico en un análisis (analito). Para la determinación del contenido o potencia en productos a granel o terminados, materias primas, métodos indicadores de estabilidad, métodos para fármacos, para las pruebas de disoluciones, valoraciones, determinación del principio activo liberado, sustancias relacionadas, uniformidad de dosis.

Categoría II. CONTENIDO/VALORACIÓN PARA PRUEBAS DE IMPUREZAS. Métodos analíticos para establecer la presencia del analito a un límite. Incluye métodos de límite de impurezas y límite de residuos, así como para determinar el nivel de limpieza, pruebas límite y sustancias relacionadas.

Categoría III. IDENTIFICACIONES. Métodos analíticos para pruebas de identificación

iv. Desarrollo de los Parámetros de Validación y sus Criterios de Aceptación

Es importante establecer que estos criterios están en conformidad con organismos nacionales e internacionales, pero son sólo una guía para determinar si un parámetro cumple o no, sin embargo la decisión final deberá tomarse con base en la experiencia y al objeto para el cuál se desarrolló el método analítico.

La siguiente tabla, tomada y adaptada de la "Guía de Validación de Métodos Analíticos" del Colegio de QFB, muestra una guía de que parámetros son fundamentales en la validación de métodos analíticos.

PARÁMETRO	CATEGORÍA I POTENCIA/VALORACION	CATEGORÍA II PRUEBAS IMPUREZAS		CATEGORÍA III IDENTIFICACIONES
		CONTENIDO/ VALORACIÓN	LIMITE	
PRECISIÓN/ADECUABILIDAD DEL SISTEMA	SI	SI	SI	*
LINEALIDAD DEL SISTEMA	SI	SI	NO	NO
ESPECIFICIDAD	SI	SI	SI	SI
EXACTITUD Y REPETIBILIDAD	SI	SI	NO	NO
LINEALIDAD DEL MÉTODO	SI	SI	NO	NO
PRECISIÓN DEL MÉTODO O PRECISIÓN INTERMEDIA ¹	SI	SI	NO	NO
ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA	SI	*	NO	NO
LIMITE DE DETECCIÓN	*	NO	SI	NO
LIMITE DE CUANTIFICACIÓN	NO	SI	NO	NO
ROBUSTEZ Y TOLERANCIA	*	*	*	NO

*DEPENDERÁ DE LA NATURALEZA DEL MÉTODO

1. La falta de especificidad de un método, puede ser compensada por otra alternativa de soporte como la cromatografía capa fina
2. También definido como un estudio de tolerancia
3. Un método que es exacto y lineal, por definición es específico al placebo analítico o a los otros componentes de la muestra

Tabla 1

- Especificidad

Definitivamente si estamos desarrollando u optimizando un método, el primer parámetro a evaluar deberá ser la especificidad, definida como la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida **únicamente** a la sustancia de interés y no a otros componentes presentes en la matriz de la muestra.

Se determina comparando, los resultados de análisis de muestras conteniendo impurezas, productos de degradación, sustancias relacionadas y excipientes, con aquellos obtenidos del análisis de muestras en ausencia de lo anterior.

- Para métodos de identificación se deben seleccionar sustancias que potencialmente y partiendo de la experiencia en el análisis de la muestra y de la literatura del analito, interfieran en la determinación.
- Para métodos de contenido, potencia, valoración se deben analizar además :
 1. Placebo del producto
 2. Muestras del producto, y si procede
 3. Sustancias relacionadas (al proceso de manufactura o inherentes a la molécula), precursores, homólogos y una mezcla del producto con ellos o cualquiera de ellos.
- Límite de impurezas. Proceder a analizar muestras individuales de la impureza del producto y la mezcla de ambos, como lo indica el método.
- Valoración/contenido de impurezas: si se dispone de éstas adicionar al analito y/o muestra analítica en niveles que incluya la especificación. Cuando no se dispone de éstas, someter la muestra a condiciones que generen su inestabilidad química, como luz, calor, humedad, hidrólisis ácida-básica y oxidación y analizar como lo indica el método.
- Para métodos indicadores de estabilidad: Si los productos de degradación son conocidos y están disponibles, deben prepararse muestras con: 1) placebos

adicionados de éstos, 2) placebo adicionado de analito y 3) placebo adicionado con analito más los productos de degradación y analizar con el método propuesto y demostrar que no interfieren con la respuesta de la sustancia de estudio.

En el caso de que los productos de degradación de una sustancia de interés no sean conocidos, se sugieren los siguientes métodos para degradar la sustancia. La selección y aplicación de estas condiciones de degradación, se realiza con base en las características fisicoquímicas de la sustancia de interés y del producto a analizar con el fin de seleccionar aquella que proporcione resultados adecuados.

- Colocar la sustancia de interés en un horno a 70 – 120°C ó 20°C menos que el punto de fusión de la sustancia de interés por 2 a 4 semanas.
- Exposición a luz ultravioleta o fluorescente y/o humedad relativa por 2 semanas o el tiempo apropiado.
- Condiciones de pH ácido (1 - 2) y/o básico (10 – 12), entre 60 y 80 °C por una semana.
- Degradación por oxidación con peróxido de hidrógeno por 2 a 4 semanas a temperatura ambiente, sobre todo para formas farmacéuticas líquidas o semisólidas.

El tiempo y las condiciones se seleccionan con el fin de degradar al analito a niveles de un 15 a 30%.

Nota. El empleo de un detector por arreglo de diodos permite comprobar la pureza de las señales cromatográficas de los compuestos de interés, al comparar simultáneamente los espectros de las señales obtenidas en barridos realizados a diferentes longitudes de onda.

Criterios de aceptación:

- ❖ La respuesta del método únicamente debe ser debida al analito

- Linealidad del sistema

Tiene como objetivo demostrar que el sistema cromatográfico, origina una respuesta lineal de la sustancia de interés dentro de un intervalo de concentración. Se determina construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta), utilizando 5 niveles por triplicado de concentración de la solución de referencia ya sea por dilución o por pesadas independientes (intervalo o rango). El intervalo de concentraciones dependerá del propósito del método; pero deberá estar incluida la concentración equivalente al 100%, en la mayoría de los casos la concentración central debe ser esta.

Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones, construir la curva de calibración y calcular el valor de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de correlación o determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$)

Criterio de aceptación:

- ❖ Factor de correlación (r^2) ≥ 0.98
- ❖ Intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$), no debe incluir el cero. Se recomienda trazar la gráfica e incluir la ecuación, línea de ajuste y el coeficiente de determinación.
- ❖ La pendiente (m) y la ordenada al origen (b)

- Precisión del sistema

La precisión es una medida del grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia. Usualmente se expresa como el porcentaje de desviación estándar relativa (DER) o del coeficiente de variación (CV)

Se determina preparando por dilución (a partir de una misma solución concentrada) o por pesadas independientes, de por lo menos seis soluciones de estándar de referencia

correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema. Calcular el CV de la respuesta analítica.

Criterio de aceptación:

❖ El Coeficiente de variación entre las 6 muestras deberá ser: $(CV) \leq 1.5\%$

• *Rango y Linealidad del Método*

El *rango* es el intervalo comprendido entre el nivel de concentración mayor y menor de la sustancia de interés, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

La *linealidad* es la habilidad del método analítico, dentro de un intervalo determinado (rango), de obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración de la sustancia de interés. Se determina analizando muestra de placebos cargados de por lo menos 3 concentraciones o niveles, superior, inferior e incluyendo el 100% preparadas cada una de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado. Al igual que la exactitud se tiene dos formas de realizarla:

a) Cuando se conocen los componentes de la muestra y/o es posible preparar un placebo analítico.

b) No se conocen los componentes de la muestra o no es posible preparar un placebo (cuando se trata de muestras de importación).

Llevar a cabo las mismas consideraciones que en la exactitud, pero además de adicionar la cantidad de analito correspondiente al 100%, seleccionar al menos dos niveles inferior y superior de esta concentración, manteniendo constante la cantidad de muestra o placebo analítico, en los tres niveles. El intervalo de concentraciones dependerá del propósito del método; pero deberá estar incluida la concentración equivalente al 100%. La siguiente tabla sugiere intervalos o rangos para el estudio de linealidad.

CATEGORÍA DEL METODO	EJEMPLOS	ESPECIFICACIÓN LIMITE INFERIOR (Li) LIMITE SUPERIOR (Ls) Li - Ls	INTERVALO MINIMO Li -10% - Ls + 10
I. CONTENIDO/ POTENCIA/ VALORACION	VALORACIÓN	90 -110 %	80 % a 120% Por lo tanto los niveles podrían ser 80, 100 y 120%
	UNIFORMIDAD DE DOSIS	75 - 125%	60% a 140% Por lo tanto los niveles podrían ser 60%, 100% y 140%
	DISOLUCION	Q= 75% En el caso conservador, de llegar a tercera etapa, ninguna unidad es menor a Q-25% (FEUM)	40% a 130% Por lo tanto los niveles podrían ser 40%, 100% y 130%
II. CONTENIDO/ VALORACIÓN PARA PRUEBAS DE IMPUREZAS	SUSTANCIAS RALACIONADAS	No debe contener más de 100% Considerar que el 100%, puede ser 2 mg/mL	Ls +/- 20% 80% a 120% Por lo tanto los niveles podrían ser 80%, 100% y 120%

Tabla 2

Tratar los resultados matemáticamente con el cálculo de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados para la relación cantidad adicionada vs cantidad recuperada, calcular el valor de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de correlación (r^2), el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$), el intervalo de confianza para la ordenada al origen ($IC(\beta_0)$) y el coeficiente de variación de regresión ($CV_{y/x}$).

Además calcular el porcentaje de recobro de cada muestra adicionada, mediante la fórmula:

$$\% \text{recobro} = (\text{Cantidad recobrada} / \text{Cantidad adicionada}) \times 100$$

Calcular el promedio aritmético (\bar{y}), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional IC(μ) del porcentaje de recobro. La linealidad del método se expresa en términos de la variación alrededor de la pendiente calculada por regresión lineal, por otra parte el intercepto es una medida de los errores sistemáticos del método.

Criterios de aceptación:

Para la regresión lineal:

- ❖ Coeficiente de correlación (r^2) ≥ 0.98
- ❖ Intervalo de confianza para la pendiente (IC(β_1)) deberá incluir la unidad.
- ❖ El intervalo de confianza para la ordenada al origen (IC(β_0)), deberá incluir el cero
- ❖ Coeficiente de variación de regresión del porcentaje de recobro ($CV_{y/x}$) $\leq 2\%$

Para el porcentaje de recobro:

- ❖ Coeficiente de variación (CV) $\leq 2\%$
- ❖ El intervalo de confianza para la media poblacional IC(μ) deberá incluir el 100% o que
- ❖ Promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluya en el intervalo de 98–102%

• ***Precisión del Método***

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad del método analítico bajo condiciones normales de operación. Es el grado de concordancia entre resultados de medidas repetidas.

La precisión puede ser considerada bajo el nivel de:

Precisión Intermedia o Tolerancia intermedia / analista. Expresa el grado de concordancia obtenido dentro de las variaciones del laboratorio: días y analistas diferentes, mismo equipo.

Analizar por triplicado una muestra homogénea del producto que tenga un nivel cercano o igual al 100%, en dos días diferentes y por dos analistas, utilizando las mismas condiciones del método, reactivos, sustancias de referencia e instrumentos y/o equipos. Calcular el promedio aritmético (\bar{y}), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) del contenido/ potencia/ valoración, empleando todos los resultados obtenidos.

Criterios de aceptación:

- ❖ Coeficiente de variación (CV) \leq 2%

Nota: Si el análisis del método es de residuales este puede incrementarse, pero deberá ser justificado.

- *Exactitud y Repetibilidad del Método*

Es el grado de concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia o convencionalmente verdadero de la magnitud medida. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia de interés.

Se recomienda coleccionar un mínimo de 6 determinaciones al 100% de placebo cargado.

Existen dos formas de realizarlo, dependiendo de los factores experimentales que se tengan:

- a) Cuando se conocen los componentes de la muestra y/o es posible preparar un placebo analítico. Preparar el placebo y adicionarle la cantidad de analito correspondiente al 100% en la muestra.
- b) No se conocen los componentes de la muestra o no es posible preparar un placebo (cuándo se trata de muestras de importación). Se debe ocupar la muestra con el método; por ejemplo utilizando la mitad de la muestra analítica que originalmente requiere el

método y adicionar la sustancia de interés, hasta completar lo que represente el 100% de éste en la muestra.

Se recomienda adicionar el analito en las primeras etapas del tratamiento de la muestra, cuando esté no se puede adicionar de manera directa, para poder asegurar que las etapas posteriores no den lugar a resultados incorrectos.

Calcular el porcentaje de recobro de cada muestra adicionada, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{recobro} = (\text{Cantidad recobrada} / \text{Cantidad adicionada}) \times 100$$

Calcular el promedio aritmético (\bar{y}), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional IC(μ) del porcentaje de recobro.

Criterios de aceptación:

- ❖ Coeficiente de variación (CV) \leq 2%
- ❖ El intervalo de confianza para la media poblacional IC(μ) deberá incluir el 100% o que
- ❖ Promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluya en el intervalo de 98–102%

• Limite de Detección (LD)

Definido como la concentración mínima de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada. Para la estimación de este parámetro se sugieren 4 métodos.

1. Con base en señales de Ruido. Sólo para métodos instrumentales y que representan una señal de ruido basal.
2. Con base en curva de calibración y desviación estándar de los blancos, este y los siguientes aplica tanto para métodos instrumentales como no instrumentales.
3. Con base en la curva de calibración y a la desviación estándar de regresión

4. Con base en la curva de calibración y la desviación estándar de la ordenada al origen.

Determinar la respuesta analíticas de por lo menos 5 muestras blanco, como placebos, reactivos o matriz de preparación de la muestra, o ruido, y la señal analítica o respuesta de muestras (analito), de por lo menos 3 concentraciones de la sustancia de interés, en rango de concentraciones conocidas e inferiores que incluya la especificación de la prueba de impurezas límite, preparadas por dilución o por pesadas diferentes..

- Para el método 1: el límite de detección será aquella concentración de analito que genere una respuesta de 3 veces más grande que la respuesta promedio de la muestra blanco.

Criterio de aceptación:

- ❖ El LD debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite
-
- Para el método 2: Construir la curva de calibración, sin incluir los blancos, para las 3 concentraciones de la sustancia de interés vs la respuesta obtenida y calcular el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de correlación o determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$). Para los blancos, calcular la desviación estándar (S_b) El límite de detección se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$LD = (3.3 \times S_b) / b_1$$

Criterio de aceptación:

- ❖ El LD debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite
- ❖ Coeficiente de correlación (r^2) ≥ 0.98
- ❖ Intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$) no deberá incluir el cero.

- Para el método 3: Construir la curva de calibración para las 3 concentraciones de la sustancia de interés vs la respuesta obtenida y calcular el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de correlación o determinación (r^2), la desviación estándar de regresión ($S_{y/x}$) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$). El límite de detección se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$LD = (3.3 \times S_{y/x}) / b_1$$

Criterio de aceptación:

- ❖ El LD debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite
 - ❖ Coeficiente de correlación (r^2) ≥ 0.98
 - ❖ Intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$) no deberá incluir el cero.
- En el método 4: construir la curva de calibración y calcular el valor de la pendiente (b_1), el coeficiente de correlación o determinación (r^2), la desviación estándar de la ordenada al origen (S_{b_0}) y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$). El límite de detección se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$LD = (3.3 \times S_{b_0}) / b_1$$

Criterio de aceptación:

- ❖ El LD debe ser menor a la especificación de la prueba de impurezas límite
- ❖ Coeficiente de correlación (r^2) ≥ 0.98
- ❖ Intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$) no deberá incluir el cero.

- Límite de Cuantificación (LC)

Es la mínima cantidad en la cuál un método analítico es lo suficientemente preciso y exacto para producir un estimado satisfactorio de una concentración desconocida de una sustancia de interés.

Se sugiere seguir los métodos, y las determinaciones de los parámetros estadísticos que para el límite de detección, pero en las fórmulas sustituir el valor de 3.3 por 10, es decir, el límite de cuantificación será aquella concentración de analito que genere una respuesta 10 veces más grande que la respuesta promedio de los blancos.

Criterio de aceptación:

- ❖ El LC debe ser menor a la especificación del contenido o valoración de la prueba de impurezas.

- Robustez y Tolerancia

Robustez: es la capacidad del método analítico para permanecer inalterado por pequeñas, pero deliberadas variaciones en los parámetros del método, es decir a influencias de factores internos del método e indica su confiabilidad durante el uso normal, Se deben establecer aquellos factores que se consideren críticos relacionados al método, como presión de la columna, velocidad de flujo, pH de fases móviles, etc. Y analizar una misma muestra por triplicado, para cada condición de operación que se varíe, calcular la respuesta de analito y expresarla en porcentaje.

Calcular la media aritmética de la condición normal de operación (y_0) y de cada condición diferente a la normal (y_1), Determinar la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto a la condición normal ($|d_i|$)

Criterio de aceptación:

- ❖ La diferencia absoluta de las medias aritméticas ($|d_i|$) deberá ser $\leq 2\%$.

Tolerancia: es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos bajo condiciones de operación establecidas, factores externos al método analítico, como diferentes equipos, lotes de reactivos, columnas diferentes. Analizar una misma muestra por triplicado de por lo menos 2 condiciones de uso, Reportar la respuesta de todas las muestras del analito y calcular la media aritmética (\bar{y}), desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV).

Criterio de aceptación:

❖ El coeficiente de variación (CV) \leq 2%

Estabilidad de la muestra analítica

Indica la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de ser almacenada durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas, por ejemplo el tiempo que tarda la muestra en inyectarse dentro del carrusel, o por alguna falla en el programa del equipo, lo cual no deberá consumir más de 72 horas. Se determina calculando la diferencia absoluta de la media aritmética de condición de almacenaje respecto de la media aritmética del análisis inicial, de la concentración de por lo menos tres muestras a condiciones diferentes de almacenamiento.

Criterio de aceptación:

❖ La diferencia absoluta de las medias aritméticas ($|d_i|$) deberá ser \leq 2%.

No necesariamente todas las determinaciones anteriores se realizan para la validación de un método analítico, su determinación dependerá de cada método y su aplicación, así mismo los criterios de aceptación pueden variar, siempre y cuando se justifique dicho cambio, por ejemplo para un método bioanalítico, o de recobro en residuales, los criterios de aceptación pueden ser más amplios dada la complejidad de las muestras.

IV. CONTROL DE CAMBIOS Y REVALIDACION

Para mantener el estado de validación en general, es importante el manejo de la información que aseguren esta condición, por lo tanto cualquier modificación en la formulación, el proceso de manufactura, o el desarrollo del método analítico, requiere una revisión del trabajo de validación y concluir si es necesario una revalidación, para lo cual nos valemos de una herramienta fundamental en la documentación que nos permite conocer la historia de los procesos, métodos, equipos, servicios, especificaciones, etc., y juega un papel importante para determinar y evaluar, si requiere una revalidación, el **control de cambios**.

Los métodos analíticos validados, no son una verdad absoluta, por lo tanto no están exentos de sufrir modificaciones y optimizarlos, sólo que estos deberán darse de manera organizada y documentada, **todo cambio debe de ser planeado**.

Determinar, utilizando el mejor criterio científico, si el impacto del cambio compromete la validez del método analítico, si el cambio no es crítico documentarlo, en un formato de control de cambios, justificando ampliamente porque no es necesario revalidar el método, si el cambio se considera crítico, evaluar y realizar los parámetros de validación pertinentes, dirigidos al cambio en específico. Documentar el cambio en el formato de Control de Cambios, anexando a este el diseño experimental, los resultados y las conclusiones en el protocolo de revalidación:

Los ejemplos de cambios críticos pueden ser:

- Cambios en la concentración del estándar de referencia primario o del estándar externo
- Cambio en el empaque de la columna
- Cambio en pH de la fase móvil
- Cambio de la longitud de onda a la que se lee la señal
- Cambio en el proceso de manufactura o en la formulación.

Pero también es cierto que algunos cambios no pueden ser siempre planeados, por lo que para estos habrá que tomar una acción inmediata que resuelva el conflicto, y por lo tanto se realizó una desviación que también deberá ser documentada y además tomar las medidas necesarias para que no vuelva a presentarse.

Para tener una idea más clara sobre el impacto de un cambio, se puede clasificar al cambio dependiendo de su impacto en la calidad, como:

a) Cambio Crítico o Mayor

b) Cambio Menor

Es recomendable tener un sistema que evalúe y administre este proceso. A continuación se ejemplifica una forma de manejar este sistema y un formato de control de cambios (anexo 1).

- El solicitante deberá: Identificar la necesidad de un cambio y llenar un formato específico para ello. "Solicitud de Cambios (SC)", evaluarlo y clasificarlo como mayor, significativo o menor, recopilar información relacionada con el tipo de cambio solicitado y anexarla al formato, como documentación de soporte., Entregar el formato al administrador del Sistema de "Control de Cambios".
- Deberá existir un administrador que lleve número de folio consecutivo en una bitácora, revisa la información anexa a la forma de solicitud de cambio, convoca a junta con un comité de "Control de Cambios", para evaluar junto con el solicitante el impacto del cambio, decidiendo la aprobación o denegación del cambio; si el cambio fue aprobado se asegurará de que las siguientes actividades estén completas:
 - a) Documentar el cambio, anexando a este el diseño experimental, los resultados y las conclusiones en el protocolo de revalidación.
 - b) Entrenamiento y su documentación.

- c) Toda la documentación deberá ser aprobada de acuerdo a los procedimientos respectivos.
- d) Todas las áreas afectadas sean notificadas
- e) Una vez implantado el cambio, solicitar firma de la Jefatura de Aseguramiento de la Calidad como visto bueno para dar por concluido el proceso.

Si el cambio en el método se considera crítico, evaluar y realizar los parámetros de validación pertinentes, dirigidos al cambio en específico. Los ejemplos de cambios críticos pueden ser:

- o Cambios en la concentración del estándar de referencia primario o del estándar externo
- o Cambio en el empaque de la columna
- o Cambio en pH de la fase móvil
- o Cambio de la longitud de onda a la que se lee la señal
- o Cambio en el proceso de manufactura o en la formulación.

La siguiente tabla sugiere los parámetros a evaluar cuando se realiza un cambio en el método analítico:

CAMBIO	IMPACTA	PARÁMETRO A REVALIDAR
Dispositivo de medición en el instrumento	Variación en el sistema de medición	Precisión del sistema Adecuabilidad del sistema
Concentración de la solución de referencia	Exactitud del método	Linealidad del sistema y exactitud del método
Formulación del producto	Exactitud del método	Exactitud y repetibilidad del método. Linealidad del método Especificidad
Equipos	Variación del método	Tolerancia
Proveedor de columnas	Variación del método	Tolerancia

Tabla 3

V. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (Generalidades)

La cromatografía de líquidos es uno de los segmentos más desarrollados y aplicados de la instrumentación analítica, como ninguna otra técnica de separación y puede ser aplicada a una gran variedad de muestras así como a mezclas extremadamente complejas en sistemas químicos y biológicos.

Como resultado de los desarrollos tecnológicos de las últimas décadas la cromatografía de líquidos a evolucionado reflejándose en los continuos cambios de su nombre, primero como Cromatografía de líquidos de alta presión, (CLAP) conocida también como (HPLC) por sus siglas en inglés actualmente se le conoce como Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia o Cromatografía Líquida Moderna, la cual ha emergido como el método de análisis de preferencia para la separación y cuantificación de un amplio rango de muestras.

i. Perspectiva Histórica

La cromatografía de líquidos es una técnica de separación antigua, la cual tuvo sus inicios en 1805 con la separación de anilinas realizada por F. F. Runge 1, pero no es hasta 1903 que el botánico ruso Tswett² nombró esta técnica como "cromatografía" cuando reportó separaciones de extractos vegetales dentro de una columna empacada como bandas de colores.

En 1941 Martin y Synge desarrollan la cromatografía de partición, en la cual tratan de describir los procesos de separación con base en modelos matemáticos, Como resultado de esto Martín logra el premio Nobel de Química y sugiere la utilización de un gas como fase de elusión en lugar de un líquido.

En 1944 Consden, Gordon y Martin evolucionan la cromatografía de partición para dar paso a lo que actualmente se conoce como cromatografía en papel.

En 1952 Martin y James desarrollan la idea de utilizar un gas como fase móvil y publican la primera aplicación de la cromatografía de gases. Este trabajo culmina con la comercialización del primer cromatógrafo de gases. Técnica analítica que se ha convertido en una de las más útiles para el análisis de gases y compuestos orgánicos volátiles.

A partir de 1960s Giddings, reporta el uso de parámetros reducidos y compara los sistemas de cromatografía de gases y líquidos.

Es hasta 1967-1969 cuando se producen avances considerables en la cromatografía de líquidos, como la introducción de altas presiones y el desarrollo de sistemas de detección continua, lo cual facilita la construcción del primer cromatógrafo de líquidos comercial.

ii. Definición

La cromatografía es una técnica que permite la separación e identificación de los componentes de una mezcla de compuestos. La separación es el proceso de migración diferencial en el cual los componentes de la mezcla son transportados por una fase móvil retenidos selectivamente por una fase estacionaria (Fig. 1.a y b) a y b)

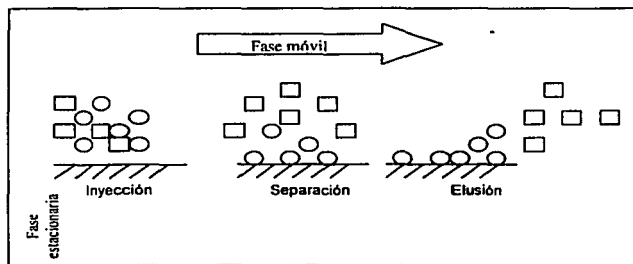


Figura 2.a

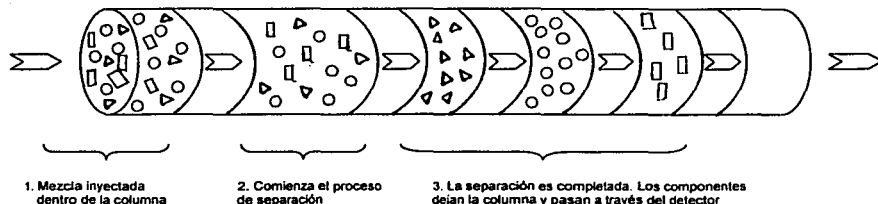


Figura 2.b

Es conveniente señalar que la cromatografía es en esencia una técnica de separación no de identificación, sin embargo cuando se encuentra acoplado a un sistema de detección puede ser utilizada para identificar los componentes separados en la columna. La identificación requiere del empleo de una sustancia de referencia. Cuando un componente de la muestra, presenta el mismo tiempo de retención al de la sustancia de referencia, bajo las mismas condiciones experimentales, la probabilidad de una identificación positiva es muy alta.

iii. Aplicaciones

La cromatografía de líquidos es una de las técnicas analíticas más usadas debido a la gran cantidad de aplicaciones como se muestra en la tabla 1.

Los trabajos científicos en la industria farmacéutica fueron de los primeros en reconocer la eficacia de la cromatografía de líquidos. Las primeras clases de compuestos analizados por CLAR, incluyeron antibióticos, analgésicos, vitaminas, esteroides y tranquilizantes. Con el desarrollo de columnas de fase reversa y el uso de par iónico como una alternativa para métodos de intercambio iónico, el número de compuestos farmacéuticos analizados por esta técnica se incrementa dramáticamente.

Su aplicación en la industria alimenticia, empieza a finales de 1960 con los análisis de azúcares, incluyendo los análisis de residuos de pesticidas en frutas y vegetales, ácidos orgánicos, lípidos, aminoácidos y contaminantes.

En el área clínica comienza su aplicación con la determinación de teofilina en infantes asmáticos, recientemente se pueden determinar diferentes drogas y sus metabolitos en sangre.

Es también una herramienta ideal para el análisis de los diferentes contaminantes ambientales.

Investigaciones en Química y Bioquímica --- Universidades e Industria

- Análisis de mezclas complejas
- Purificación de compuestos químicos
- Desarrollo en la síntesis de nuevos compuestos químicos
- Aislamiento de productos naturales con características benéficas
- Predicción de propiedades físicas

Control de Calidad

- Garantizar la pureza de las materias primas
- Pruebas en proceso para controlar y mejorar los procesos obtenidos
- Valoraciones cuantitativas de los productos finales para asegurar que cumplen sus especificaciones
- Evaluación de las pruebas de estabilidad y productos de degradación

Control Ambiental

- Análisis del aire y contaminantes en agua
- Monitoreo de pesticidas en el medioambiente

Área Clínica (Bioanalítica)

- Determinaciones cuantitativas de drogas y/o metabolitos en matrices biológicas como sangre, suero, plasma, u orina.

Tabla 4

iv. Clasificación

De acuerdo en la naturaleza de la fase móvil la cromatografía se divide en dos grandes ramas: Cromatografía de gases y Cromatografía de Líquidos, las cuales a su vez se subdividen al tomar en cuenta los mecanismos de separación, tal como se indica en el siguiente diagrama.

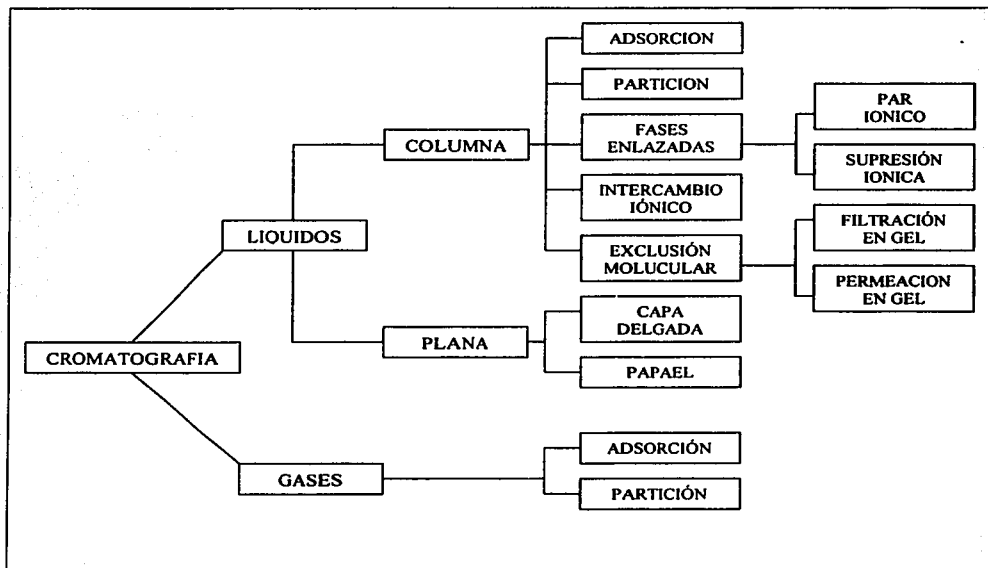


Tabla 5

A continuación, se describen brevemente los diferentes tipos de cromatografía de líquidos en columna.

- *Cromatografía de adsorción o Cromatografía líquido-sólido*

Su mecanismo de separación se basa en la competencia que existe entre las moléculas de la muestra y las de la fase móvil por ocupar los sitios activos en la superficie de un sólido. Generalmente es utilizada en fase normal

- *Cromatografía de partición o Cromatografía líquido-líquido*

Se le conoce como al proceso cromatográfico presente sobre una fase estacionaria líquida impregnada en un soporte. Idealmente inerte y una fase móvil constituida por otro líquido inmiscible al primero. Esta puede llevarse a cabo en fase normal o reversa.

- *Cromatografía de Intercambio Iónico*

La separación se basa en la competencia entre la fase móvil y la muestra iónica por los sitios o grupos activos de una resina intercambiadora de iones. Esta técnica se usa casi exclusivamente con compuestos iónicos, cuanto mayor es la carga de las muestras, más fuertemente será atraída hacia la superficie iónica y, por tanto, más tiempo tardará en ser eludida. La fase móvil es un amortiguador acuoso en donde el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elución.

Los grupos funcionales utilizados comúnmente son los de tipo sulfonato para intercambio catiónico y los de amina cuaternaria para el intercambio aniónico.

Como variantes de este tipo de cromatografía está también la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de supresión iónica.

- *Cromatografía de Exclusión Molecular*

Este tipo de cromatografía se basa en la retención selectiva de las moléculas de los solutos en función de su tamaño molecular, debido a la mayor o menor penetración o incluso a la exclusión de dichas moléculas de los poros de una fase estacionaria apropiada, así, las moléculas que son demasiado grandes para el poro migran rápidamente mientras que las que son pequeñas penetran en los poros prolongando

su tiempo de elución. La cromatografía de filtración en gel y la de permeación en gel son frecuentemente referidas como cromatografía de exclusión molecular.

- *Cromatografía de fases conectadas*

El desarrollo espectacular que tuvo la cromatografía de líquidos de alta presión en la década de los setentas condujo a la síntesis de las llamadas "fases estacionarias químicamente unidas", en las cuales la fase estacionaria en lugar de ser impregnada sobre el soporte se encuentra unida químicamente a él por ligaduras covalentes. Estas fases se clasificaron originalmente en la cromatografía de partición, pero debido a sus ventajas ha desplazado casi completamente a la cromatografía de partición sobre fases impregnadas.

La sílica es un sustrato reactivo que puede ser enlazado a diversos grupos funcionales, los más frecuentemente enlazados a ella son cadenas hidrocarbonadas C8 y C18, grupos fenilo, ciano y aminas. La fase enlazada más utilizada es el soporte octadecilsilano conocido también como fase C18 ó fase ODS

En general, los compuestos polares y medianamente polares se separan por cromatografía de partición en fases normal, enlazadas por grupos cianopropil y amonipropil son comunes para este uso. Los compuestos menos polares se separan por cromatografía de partición en fase reversa, las fases enlazadas por grupos C18, C8 y fenilo son las más utilizadas.

Como resultado de su gran versatilidad, las fases químicamente unidas han sido responsables del gran crecimiento de la cromatografía de líquidos en los últimos años. De lo cuál se desprende otra clasificación de la cromatografía de líquidos dependiendo de la polaridad de la fase móvil y de la fase estacionaria involucradas en la separación: *fase normal y fase reversa o inversa.*

En la *cromatografía de líquidos de fase normal*, la retención depende de las interacciones entre la parte polar de la fase estacionaria y el soluto. Para que la reacción ocurra, el material de empaque debe ser más polar que la fase móvil con respecto a la muestra. Por ejemplo la fase estacionaria es generalmente sílica y las fases móviles típicas son hexano, cloruro de metileno, tetrahidrofurano y mezclas de estos disolventes.

En la *cromatografía de fase reversa* el empaque es no polar y el disolvente es polar con respecto a la muestra. Las fases estacionarias típicas son cadenas hidrocarbonadas (C8 y C18) y las fases móviles están constituidas por mezclas de disolventes orgánicos y agua, tales como metanol-agua, acetonitrilo-agua, etc.

En la siguiente tabla se muestran algunas características de la cromatografía de líquidos en fase normal y en fase reversa.

CARACTERISTICA	FASE NORMAL	FASE INVERSA
- Polaridad de la fase estacionaria	- Alta	- Baja
- Polaridad del disolvente	- Baja - media	- Media - alta
- Orden de elución de la muestra	- Eluye primero el menos polar	- Eluye primero el más polar
- Efecto del incremento de la polaridad del disolvente	- Reduce el tiempo de elución	- Aumenta el tiempo de elución

Tabla 5

VI. INSTRUMENTACIÓN (Guía práctica en las operaciones generales en CLAR)

Los componentes esenciales que forman parte de un cromatógrafo de líquidos de alta presión se muestran en la figura de abajo y son: bomba, inyector, columna, detector y registrador, pero se mencionan otros debido a las recomendaciones básicas para el cuidado y funcionamiento de los componentes que integran el sistema cromatográfico:

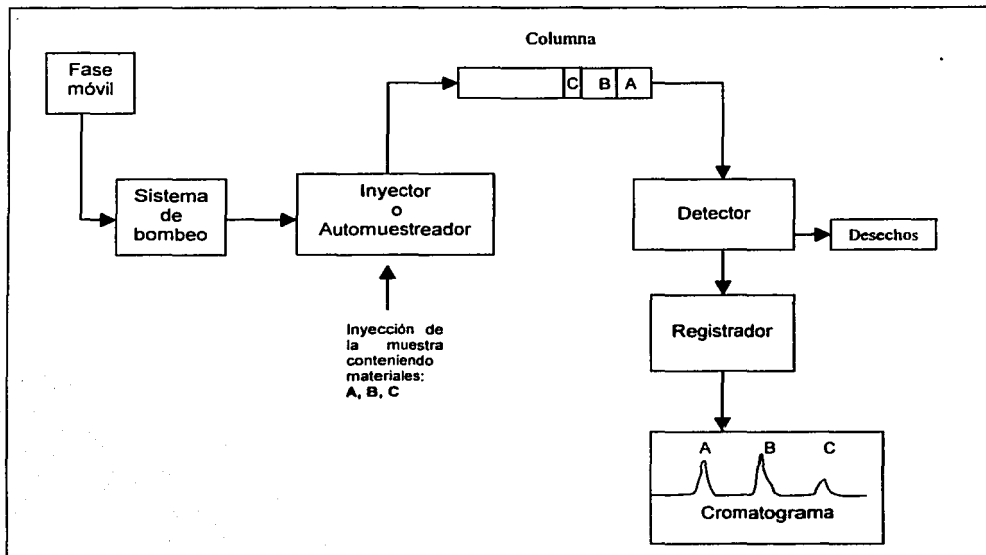


Figura . Sistema Cromatográfico

- Contenedor de fase móvil: Es el recipiente en el cuál se almacena la fase móvil, generalmente son frascos ámbar.
- Línea de alimentación: Es la tubería o manguera de teflón que sirve para surtir de fase móvil al sistema cromatográfico y va del contenedor de fase móvil, donde cuenta con un filtro de metal o teflón sumergido en e contenedor y el otro extremo conectado a la bomba.

- c) **Bomba cromatográfica.** Dispositivo que surte al sistema cromatográfico de la fase móvil. La característica fundamental es que sea capaz de proporcionar un flujo constante, reproducible, exacto y libre de pulsaciones. Las presiones a las que trabaja están en el rango de 1500 a 6000 psi.
- d) **Inyector:** Dispositivo por el cuál la muestra es introducida al sistema cromatográfico, puede ser manual, empleando una jeringa de volumen adecuado, o de manera automática, conocido también como automuestreador, es el más usado actualmente, ya que minimiza los errores en la medición del volumen y aumenta la reproducibilidad entre inyecciones. Un factor importante para obtener una buena resolución (picos simétricos y angostos) es la introducción adecuada de la muestra al sistema. Los volúmenes que maneja el sistema van de 5 a 200 mL.
- e) **Columna.** Considerado como el corazón del sistema cromatográfico, ya que en ella se lleva a cabo la separación de los componentes de una mezcla. Consiste básicamente de un segmento de tubo por lo general de acero inoxidable o algún otro material inerte capaz de soportar grandes presiones con una longitud de 5 a 30 cm y un diámetro interno de 2 a 5 mm, rellenas con partículas de formas regulares e irregulares de diámetros muy pequeños (3 a 15 micras).
- f) **Detector.** Es un instrumento que mide en forma continua algunas propiedades fisicoquímicas de los componentes de la muestra, generando una señal conforme éste sale de la columna, que es proporcional a su concentración.

Las principales características que debe cumplir un detector son:

- **Capacidad de respuesta.** Esta puede ser universal o selectiva, según la capacidad que tenga el detector de responder a todo tipo de muestras o a alguna en específico.

- Alta sensibilidad. Definida como la relación entre la señal generada y la cantidad de muestra que produce dicha señal. En los casos más favorables permiten la detección de nanogramos de soluto.
- Bajo nivel de ruido. Es la variación en la señal del instrumento que no es atribuida a la muestra y puede ser ocasionada por pequeñas variaciones en el flujo o temperatura, fluctuaciones de voltaje, o burbujas de aire en el sistema, etc.
- Linealidad. Para utilizar la señal generada por el detector como una medida cuantitativa, dicha señal debe guardar una relación lineal con la concentración de la muestra.
- Volumen muerto. El volumen de la celda del detector debe ser pequeño para evitar la pérdida de eficiencia, de preferencia debe ser menor de 10 μL .

Los detectores comúnmente utilizados son:

- Detector de UV
 - Detector de índice de refracción
 - Detector de Fluorescencia
 - Detector electroquímico
 - Detector de Arreglo de diodos.
- g) Registrador. Su función es representar de manera gráfica la señal generada por el detector mediante un graficador o actualmente usando un integrador electrónico el cuál evita los errores en la medición de forma manual de las áreas o alturas obtenidas para cada señal.
- h) Fase móvil. Aunque no es parte del instrumental propiamente dicho, juega un papel muy importante en el proceso de separación, por ello, su preparación debe ser cuidadosa, pues entre otras cosas ayuda a extender la vida media de las columnas cromatográficas, mejorando su eficiencia y reproducibilidad. algunas características que debe presentar toda fase móvil utilizada en cromatografía de líquidos son: Alta

pureza, filtrada, degasificada, disolver la muestra, no degradar o disolver la fase estacionaria, baja viscosidad, compatibilidad con el detector, no interaccionar con las partes del cromatógrafo

Se recomienda al prepararla tomar en consideración lo siguiente:

1. Los disolventes deberán ser puros (grado HPLC), en caso de necesitar estabilizadores o conservadores, se debe conocer su concentración para que siempre sea la misma o bien tratar de utilizar siempre los de un mismo proveedor, ya que si la concentración de estos varia puede modificar el poder de separación de las fases móviles.
2. Los volúmenes de cada uno de los disolventes que la forman, se miden de manera separada (ya que la mezcla de ciertos disolventes incrementa o disminuye la temperatura de la solución resultante y en consecuencia puede ocasionar errores en la medida de los volúmenes), utilizando un contenedor o un vaso de precipitado para posteriormente realizar la mezcla. Los disolventes utilizados deben estar a temperatura ambiente.
3. En caso de que la fase móvil requiera un ajuste de pH, se recomienda esperar a que la temperatura de la fase sea la ambiental. Durante este ajuste se recomienda utilizar agitación de manera constante.
4. Una vez realizado el ajuste, se procede a su filtración a través de una membrana de 0.45 micras. En caso de no requerir ajuste de pH, una vez realizada la fase móvil se filtra.
5. Degasificar en ultrasonido durante 15 minutos o mediante agitación y vacío 15 minutos, antes de utilizarla ó en los equipos si éstos tienen sistemas de degasificación en líneas (Ejemplo el degasys populaire o el 6324).

Entre los problemas que pueden resultar por la omisión de algunos de estos pasos estan:

- *Ruido en la línea base de los cromatogramas*
- *Taponamiento de las columnas o línea del equipo (incremento en la presión de operación)*
- *Fallas en la bomba o inyector.*
- *Fluctuaciones en el flujo, debido a aire en la fase.*

Purga de las líneas que alimentan de fase móvil a la bomba:

Esta operación tiene como objetivo dejar la línea libre del disolvente de la fase móvil utilizada en el análisis anterior, para evitar contaminación. La línea está hecha de teflón transparente (Ver Anexo A figura 2), en sus extremos tiene un filtro de acero inoxidable que se coloca dentro de los contenedores de la fase móvil y en el otro se encuentra conectada mediante un tubo de acero inoxidable a la válvula de drenado de la bomba.

Purga de Bombas:

Como se menciona en la preparación de las fases móviles, el aire puede ocasionar fluctuaciones en el flujo lo que trae como consecuencia la falta de reproducibilidad en los tiempos de retención y en los casos más graves, el que la bomba no envíe fase móvil a la columna cromatografica. Para evitar esto se recomienda antes de iniciar el análisis purgar la bomba.

Cambio de Fase:

Se realiza un cambio de fase para obtener tiempos más cortos en el acondicionamiento del sistema cromatografico, evitar ensuciar la celda del detector y prolongar la vida de las columnas y tuberías del cromatógrafo. Consiste en utilizar después de cada análisis, un

disolvente de polaridad intermedia, que sea miscible con la fase anterior y con la que se desea utilizar en el siguiente análisis.

Para su realización es necesario tener en consideración los siguientes puntos:

- a) Los disolventes involucrados deben ser miscibles entre si, filtrados y degasificados.
- b) Realizar una purga de las líneas, para evitar remanente de disolventes en ellas.
- c) No utilizar un mismo recipiente para diferentes fases.
- d) Cuando se utilizan soluciones amortiguadoras en la preparación de fases, debe lavarse el equipo con agua destilada filtrada y degasificada antes de utilizar cualquier disolvente, ya que puede ocurrir precipitación de sales.

Considerado lo anterior, el cambio se realiza de la siguiente manera:

1. Revisar la bitácora de uso de equipo, para conocer que tipo de fase se utilizo en el análisis anterior.
2. Seleccionar los disolventes adecuados, dependiendo del tipo de fase que tiene el equipo:
 - a) Si se trabaja con fase reversa y quiere cambiarse a fase normal, se utilizan los disolventes en el siguiente orden: primero agua y después Isopropanol.
 - b) Si se trabajo con fase normal y quiere cambiar a fase reversa: primero Isopropanol y después agua.
3. Filtrar y degasificar los disolventes a utilizar
4. Remover la columna y en su lugar conectar un volumen muerto.
5. Purgar las líneas, con el disolvente que se utiliza primero.
6. Programar en la bomba un flujo de 2.0 mL/min.
7. Dejar con ese disolvente aproximadamente 15 minutos.
8. Bajar el flujo lentamente a 0 y cambiar el disolvente.
9. Repetir los pasos 5 al 8, para llegar a la fase que requiere el análisis.

Preparación de Muestras:

La cuidadosa preparación de las muestras, mejora la separación y ayuda a evitar problemas en la columna o equipo. Se recomienda para ello que:

- Los disolventes y reactivos que se utilicen en la preparación de las muestras, deben ser grado HPLC.
- Remover la mayor cantidad de excipiente o contaminantes que puedan interferir, utilizando por ejemplo: extracción, filtración o centrifugación.
- Centrifugar las muestras en caso de polvos o mezclas de disolventes inmiscibles.
- Filtrar las muestras antes de inyectarlas con membrana de 0.45 micras.

Columnas y sus cuidados:

Las columnas cromatográficas juegan el papel más importante en la separación, consideradas el corazón del sistema cromatográfico, tienen un tiempo de vida limitado que está directamente relacionado con su uso y el cuidado que se les proporcione.

Algunos de los factores que contribuyen a disminuir su vida son:

- Contaminación proveniente de la fase móvil o de la muestra.
- Un inadecuado almacenaje y manejo de las columnas.
- Cambios frecuentes y bruscos de presión, temperatura, polaridad de disolventes o fases móviles.

Cuidados que se recomiendan para contrarrestar los factores anteriores, están:

Los disolventes utilizados en la preparación de fases móviles o en el lavado de los equipos, deben ser de grado HPLC filtrados y degasificados.

Deben protegerse a las columnas de vibración o choques mecánicos, que pueden ocasionar grietas en la fase estacionaria.

Deben lavarse cuidadosamente y exhaustivamente después de cada análisis.

No se debe exceder la presión de trabajo recomendada por el proveedor (3500psi).

Es necesario que la columna se equilibre antes de realizar el análisis, este equilibrio se realiza con la fase móvil.

El pH de las fases móviles debe estar comprendido entre 2.0 y 8.0.

Evitar que las fases estacionarias queden secas, ya que al igual que con los choques mecánicos, se ocasionan grietas.

Evitar cambios drásticos de polaridad, de preferencia se utiliza una columna por producto a analizar, o por composición de fase móvil, es decir, varios productos en los que se utilice la misma fase móvil o similar, pueden ser analizados con la misma columna. Cuando se corra gradientes conteniendo solvente orgánico / agua / sal (Ej. buffer o Ion par), es importante asegurarse que la sal pueda ser soluble totalmente en la proporción solvente orgánico/agua para el cual el gradiente es programado. La precipitación inadvertida de la sal puede causar daño irreversible en la columna desde la obstrucción del flujo.

El uso de la temperatura en la columna provoca que el empaque con cambios ocasionales bajo ciertas condiciones se dañe. Si se utiliza temperatura, la columna deberá de ser regresada a la temperatura ambiente haciendo pasar flujo continuo de 0.2 mL a 0.5 mL/min. No es recomendable usar temperaturas por arriba de los 60°C.

El acondicionamiento de la columna durante el análisis deberá de efectuarse con un incremento gradual del flujo, ya que incrementos grandes y de manera rápida puede provocar desequilibrio en el empaque de la columna generando grietas en él. Se recomienda incrementos de 0.5 mL/min por periodos de tiempo.

Nunca dejar la columna sin paso de flujo si se está utilizando horno.

No dejar las columnas que no estén en uso sobre los equipos HPLC o las mesas de trabajo **SIEMPRE DEBERA GUARDARSE EN EL LUGAR INDICADO.**

Lavado de Columnas:

La inyección continua de muestras, las impurezas que contienen los disolventes utilizados, etc., pueden ocasionar pérdida de eficiencia en la columna como resultado de adsorción irreversible en la fase estacionaria al ocupar estas impurezas los sitios activos. Estas impurezas pueden ser eliminadas mediante un adecuado lavado. A continuación se explica detalladamente como realizarlo dependiendo del tipo de columna que desee lavarse.

Columnas utilizadas en Fase Reversa:

Ejemplos: comercialmente se conocen como: Microbondapack C-18 (L1, L2 clasificación USP), Zorback C8, Brownlee RP-8 (L7 USP), etc.

Las fases móviles utilizadas en este tipo de cromatografía están compuestas en su gran mayoría por soluciones amortiguadoras y disolventes de polaridad mediana a alta. Las sales se acumulan; y para ayudar a su eliminación, el lavado se realizara de la siguiente manera:

- 1) Lavar la columna con aproximadamente 100mL de agua tipo Milli-Q o equivalente, por 1.5 h a flujo de 1.0 mL/min.
- 2) Lavar con una mezcla de Metanol: Agua (40:60), aproximadamente 100 mL (1.5 h a flujo de 0.8 mL/min).
- 3) Lavar con Metanol aproximadamente 50 mL (de 0.5 a 1.0 h a flujo de 1.0 mL/min).
- 4) En caso de que aún con este lavado continúen obteniéndose malos resultados, llevar a cabo un lavado más profundo que involucra disolventes con polaridad menor. El flujo para este lavado debe ser de 1.0 mL/min.
- 5) Repetir los pasos 1 - 3.
- 6) Lavar con 100 mL de Tetrahidrofurano (THF), para eluir componentes medianamente hidrofóbicos.

7) Lavar con 100 mL de Cloruro de Metileno, eluye los componentes fuertemente hidrofóbicos.

8) Lavar con 100 mL de cada uno, THF, Metanol y Agua, para regresar a la columna a su condición original.

En ocasiones es recomendable hacer inyecciones de 100 a 200 microlitros de Dimetilsulfoxido: Agua (50:50) o Isopropanol cuando se esta lavando con agua.

NOTA: En las columnas Brownlee se sigue el mismo procedimiento que para fase reversa, pero primero se lava la precolumna con agua aproximadamente 1.0 h separandola de la columna, después se vuelven a unir y se lavan con agua por otra 1.0 h, posteriormente se sigue el lavado con Metanol:Agua y Metanol.

Columnas utilizadas en Fase Normal:

Según la clasificación de la USP, son L3, L4, L5, comercialmente pueden ser: Microporasil, Lichrosorb, Si-100 o Si-60, etc.

Las fases móviles son compuestas por disolventes orgánicos de polaridad mediana a baja.

Lavar con 100 mL de Isopropanol (aproximadamente 1.5 -2.0 h a flujo de 0.5 mL/min).

Para un lavado más profundo realizar los siguientes pasos con flujo de 1.0 mL/min:

1. Lavar con 75 mL de Acetonitrilo
2. Lavar con 75 mL de Metanol.
3. Lavar con 75 mL de Cloruro de Metileno.
4. Lavar con 75 mL de Hexano.

Cuando en la realización de los análisis los picos se parten o tienen algún hombro, o si la presión de trabajo se incrementa drásticamente, puede ser debido a que los filtros de las columnas (frits) esten sucios, por lo que se sugiere:

1. Abrir la columna de los dos extremos.
2. Extraer e identificar los frits del inicio y final de la columna (Ver Anexo A fig. 4)
3. Colocarlos en un vaso de precipitado que contenga Metanol filtrado.
4. Llevarlos al baño de ultrasonido, y programar 5 minutos.
5. Secarlos con Nitrógeno o aire filtrado.
6. Colocarlos en la columna, y cerrarla bien para evitar fugas.

El lavado de las columnas deberá ser realizado en no más de 24h después de concluido el análisis. No deberán permanecer más de 24h en agua, ya que pueden afectarse o hidrolizarse los grupos activos de la fase estacionaria.

- Columnas Nuevas.

Al recibir una columna el químico responsable deberá verificar que esta haya sido solicitada. Comprobar que las características de la columna tales como: Marca, empaque, dimensión, tamaño de partícula, y funcionalidad coincidan con las de la solicitud registrada en la hoja de requisición. Si esto cumple se procederá a dar de alta en el inventario de nuevas columnas.

Si la columna no satisface los requerimientos de la requisición, se remitirá la columna al proveedor para su cambio.

Acondicionamiento para el Uso de Columnas Nuevas:

Las columnas nuevas contienen un disolvente denominado de embarque, el cual debe ser eliminado antes de utilizarlas para un análisis, ya que este puede ser inmisible o incompatible con la fase móvil. A esta actividad se le conoce como sangrar (acondicionar) la columna. Para eliminarlo se deben realizar los siguientes pasos:

1. Leer las especificaciones del proveedor, con el fin de conocer el tipo de disolvente de embarque.
2. Acondicionar la columna de acuerdo con las instrucciones del proveedor, utilizando un disolvente intermedio en polaridad y miscible tanto con la fase móvil que se pretende utilizar, así como con el disolvente de embarque. Desconectar la columna de la línea que va al detector y programar el flujo de 1.0 mL/min., realizar esta operación durante 30 minutos.
3. Cuantificar los platos teóricos al inicio con la primer determinación o según el certificado del proveedor.
4. Por último acondicionar la columna mediante el uso de 1 o varios disolventes para tener la polaridad que se desea.

Ejemplo:

Columna: Microbondapack C-18

Disolventes de Embarque: Metanol

Fase Móvil: Diocilsulfosuccinato sodico 0.01M

Acetonitrilo (80:20)

El Metanol puede ocasionar que el buffer se precipite, se recomienda acondicionar la columna con Acetonitrilo y después con Acetonitrilo: Agua (20:80), para dejarla a una polaridad cercana a la de la fase móvil.

Identificación de columnas

Para la identificación de las columnas se deben seguir la siguiente secuencia:

1. Identificar la columna con el nombre del producto o materia prima para la cual se va a utilizar.
2. Colocar la fecha de apertura colocando el día (con 2 dígitos), mes (con las tres primeras letras del mes correspondiente) y año (con 4 dígitos) y separándolo mediante diagonales o guiones; por ejemplo: 25 – Oct – 2002 ó 25/Oct/2002.
3. También se debe adicionar a la identificación la prueba para la cual se utilizará o la determinación del principio activo.
4. Si es necesario utilizar una nueva columna para un producto del cual ya se tiene otra en uso, es necesario adicionarle un número consecutivo.

Ejemplos:

- Nombre y Descripción del Producto, fecha, Prueba

Almacenamiento de Columnas:

Una columna que no es utilizada por más de 72 horas debe cubrir los puntos que se describen a continuación.

- 1.- Tapar perfectamente la columna con tornillos o cubiertas plásticas (que deberán estar bien ajustados a la columna para prevenir que el material de empaque se reseque y sufra agrietamiento o fractura.
- 2.- El lugar para almacenar columnas deberá estar aislado en la medida de lo posible, de fuentes de presión mecánica, como vibraciones, golpes, etc. Deberá estar aislado de fuentes de calor (temperaturas mayores a 60°C), que pudieran ocasionar choques térmicos o evaporación de la fase móvil de almacenaje.

3.- Dejar almacenada la columna en la fase móvil prescrita por el proveedor, o en su defecto, si es una columna utilizada en fase reversa en metanol: agua (60:40) y si la columna es utilizada con fase normal con isopropanol.

Lavado de Filtros Metálicos:

Estos filtros se utilizan para asegurar que la fase móvil pase libre de partículas que obstruyan las tuberías del cromatógrafo, por lo que su lavado es sumamente importante, mediante ácido nítrico 6N, filtrado, colocarlos en un vaso de precipitado y agregar el ácido nítrico suficiente para que queden completamente sumergidos, someter a un baño de ultrasonido por 5 minutos, pasado este tiempo, desechar adecuadamente y con cuidado el Ac. Nítrico, enjuagar perfectamente con agua destilada y filtrada, adicionar metanol filtrado y sonicar por 5 minutos más, finalmente secarlos con nitrógeno o con aire comprimido filtrado.

VII. ANÁLISIS y CONCLUSIONES

Como podemos ver en los métodos compendiales, la cantidad de pruebas para la validación de métodos analíticos es grande, y lo que marca la literatura, es básicamente directrices y definiciones que deberán seguir para la validación de métodos analítico en particular para los de cromatografía de líquidos. Quizás esta forma de presentar la validación de métodos analíticos es intencional, para dar libertad y flexibilidad en el método analítico, pero también es cierto que gran parte de lo establecido lo deja a criterio de los analistas, de forma subjetiva, cómo el número de muestras o repeticiones que se requieren para cada prueba, y si es adecuado realizar primero, la linealidad y exactitud o la robustez y precisión.

Razón por la cuál es recomendable para la validación de métodos analíticos antes que nada realizar un protocolo del método de validación y el diseño experimental, para saber que es lo que realmente conviene realizar primero.

Es importante notar que los requerimientos de validación dependerán en gran medida del tipo de método analítico.

Algunas consideraciones básicas que se sugiere deban tomarse en cuenta para la realización de los protocolos de validación serán:

1. La selectividad ha sido previamente demostrada en el desarrollo del método o es medida y documentada durante el curso del protocolo de validación.
2. El método ha sido desarrollado y optimizado hasta el punto donde se explica el esfuerzo y tiempo que se invertirán en su validación. Por lo que la robustez deberá ser el primer parámetro investigado.
3. Una vez que los datos son generado se deberá contar con las herramientas estadísticas necesarias para evaluar y tomar decisiones, evitando con esto la subjetividad en el análisis de métodos.

Este trabajo pretendió mostrar los lineamientos que se siguen para la validación de una técnica analítica, con base en las regulaciones nacionales e internacionales.

Y seguir por lo tanto un procedimiento lógico para la validación de una técnica analítica en cromatografía de líquidos para eficientar el proceso de validación, haciendo uso apropiado de las pruebas estadísticas, que serán básicas para tomar decisiones casi automáticamente.

No hay que olvidar que se habla actualmente del proceso de validación como un proceso constante y como tal, diferentes factores pueden influir para que este pueda ser revalidado, por ejemplo, el cambio de materias primas, modificaciones en el proceso de manufactura, cambio en la formulación y otros cambios inherentes al método, para lo cuál es importante tener un sistema de Control de cambios.

La validación de métodos analíticos es sólo una parte intermedia del proceso total de validación que comienza con 1) la validación del software, 2) la calificación del equipo (hardware), 3) validación de métodos analíticos y 4) la adaptabilidad del sistema .

La validación no sólo nos sirve para cumplir regulaciones oficiales o corporativas, sino también para garantizar la confiabilidad de los resultados obtenidos.

Mi paso por los laboratorios trasnacionales, donde muchas de las veces no se cuenta con un departamento de desarrollo, donde la esencia es la validación y optimización de métodos no es el objetivo principal de la empresa, hablamos entonces de una transferencia analítica, que tendrá que ser probada y posiblemente también tenga que ser validada. Así mismo, y a pesar que la NOM059-SSA1-1993, no exige que los métodos compendiales, estén validados, se tiene la experiencia de que la mayoría de las veces, no producen los mismos resultados ya que las condiciones de operación, reactivos, instrumentos, personal y formulaciones son diferentes y pueden alterar sus características, para todo esto puede aplicar la validación.

La revisión de la validación de métodos en las diferentes fuentes de apoyo como la ICH (Conferencia Internacional en Harmonización), la USP, y la Guía de Validación de métodos analíticos, del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, nos lleva a que las diferencias encontradas, son generalmente de semántica, sólo una diferencia real podemos definir, y es que en la ICH, trata al "System Suitability" como una parte fundamental de la validación y la USP, como la Guía de Validación, lo marcan como un proceso separado.

Pero quien tiene que establecer como debe realizarse, es el usuario con base en su objetivo principal de la validación.

Anexo I

SOLICITUD DE CAMBIOS

SOLICITUD NUMERO: _____

Título del cambio propuesto: _____

Descripción del cambio: _____

Razones del cambio: _____

Solicitado por: _____

Departamento: _____

Fecha: _____

Seleccione la (s) opción (es) del cambio propuesto:

A) Modificaciones:	
<input type="checkbox"/>	EQUIPOS
<input type="checkbox"/>	PROCESO
<input type="checkbox"/>	SISTEMA
<input type="checkbox"/>	SERVICIO
<input type="checkbox"/>	INSTALACION
<input type="checkbox"/>	INSUMOS INDIRECTOS
<input type="checkbox"/>	DETERGENTES/SANITIZANTES
<input type="checkbox"/>	OTROS

B) Nuevos proyectos para:	
<input type="checkbox"/>	EQUIPO
<input type="checkbox"/>	INSTALACION
<input type="checkbox"/>	EDIFICIO
<input type="checkbox"/>	PRODUCTO
<input type="checkbox"/>	SISTEMA
<input type="checkbox"/>	OTROS

Especifique los detalles del cambio propuesto (Descripción, Marca, Modelo, Función, Ubicación, etc.):

El cambio propuesto puede impactar los siguientes documentos ó actividades.

- | | | |
|--------------------------------------|--|---|
| <input type="checkbox"/> AMBIENTALES | <input type="checkbox"/> CALIBRACION | <input type="checkbox"/> CALIFICACION |
| <input type="checkbox"/> DIAGRAMAS | <input type="checkbox"/> PLANES DE MANTENIMIENTO | <input type="checkbox"/> PLANES DE MUESTREO Y MONITOREO |
| <input type="checkbox"/> PLANOS | <input type="checkbox"/> PROCEDIMIENTOS | <input type="checkbox"/> PROCESOS |
| <input type="checkbox"/> SEGURIDAD | <input type="checkbox"/> VALIDACION | <input type="checkbox"/> CAPACITACION |

OTROS: _____

EXPLIQUE: _____

Documentación necesaria para respaldar el cambio propuesto:

- | | |
|----------|----------|
| 1) _____ | 3) _____ |
| 2) _____ | 4) _____ |

Observaciones y Recomendaciones: _____

Firma

Fecha

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Mc Nair, H.A. Esquivel, B.H. Cromatografía líquida de alta presión. Programa regional de desarrollo científico y tecnológico, OEA Washinton DD (1980)
2. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Séptima Ed. México (2000)
3. Swartz E. Michael, Krull S. Ira Analytical Method and Validation. Marcel Dekker, Inc. NY. (1997)
4. Guía de validación de Métodos Analíticos; editado por Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.; registro ante la DGP-032; edición 2002
5. The United States Pharmacopoeia. USP 25, 2002
6. Guideline for submitting samples and analytical data for methods validation. FDA, 1987
7. Validación de Métodos. Estándar de Calidad Corporativo, documento No. QS 803; fecha de implementación Enero 2002.
8. Procedimiento Normalizado de Operación, Validación de Métodos Analíticos;
9. Procedimiento Normalizado de Operación, Operaciones generales en Cromatografía de Líquidos
10. Procedimiento Normalizado de Operación, Control de Cambios
11. Estadística 3ª. ED. Yamane T. Harla México (1979)
12. Memorias Curso Taller "Validación y Buenas prácticas de Laboratorio, Impartido por Calidad Siglo XXI, Agosto 2001
13. Dennis J. Runser , Maintaining and Trouble Shooting HPLC Systems. A User,s Guide , Wiley- Interscience – 1981.
14. Silica Analytical column. Care and User Manual, Waters Publication