UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONÓMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

"Calificación de un Sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, como Parte del Aseguramiento de Calidad de los Medicamentos"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO

P R E S E N T A :

JUAN LUIS GARCÍA GUZMÁN

Unidad en la Diversidad
Zaragoza Frente al Siglo XXI

Asesor: QFB. Ramón Rodríguez Hernández

México D. F. Febrero 2005

m342810

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

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres

A quienes me han heredado el tesoro más valioso que pueda dársele a un ser: Amor.

A quienes sin escatimar esfuerzo alguno han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme.

A quienes la ilusión de su vida ha sido convertirme en una persona de provecho.

A quienes nunca podré pagar todos sus desvelos ni aún con las riquezas más grandes del mundo.

Por esto y más... GRACIAS.

T E S I S

"Calificación de un Sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, como Parte del Aseguramiento de Calidad de los Medicamentos"

PRESENTA: JUAN LUIS GARCÍA GUZMÁN

ASESOR: QFB. RAMÓN RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

Lugar donde se Desarrollo el Trabajo:

Laboratorio de Control Químico, Merck Sharp & Dohme de México.
Laboratorio de Computo, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

INDICE

INDICE 2

RESUMEN 4

INTRODUCCIÓN 5

I. MARCO TEORICO 7
- A. Historia de la Cromatografía 7
- B. Instrumentación para Sistemas de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución 7
  - 1. Sistemas de Entrega de Solvente 7
    - a. Bombas Alternativas o Neumaticas 8
    - b. Bombas de Tipo Jeringa 9
  - 2. Automuestreadores 9
    - a. Inyectores de Tipo Jeringa 9
    - b. Valvulas de Inyección 10
  - 3. Columnas 10
  - 4. Detectores 11
    - a. Detectores de Absorbancia 11
    - b. Detectores de Indice de Refracción 11
    - c. Detectores Fluorométricos 12
    - d. Detectores Electroquímicos 12
  - 5. Sistemas de Datos 12
- C. Forma de un Pico Cromatográfico 12
- D. Adecuabilidad del Sistema 14
  - 1. Altura del Pico Cromatográfico 14
  - 2. Area del Pico Cromatográfico 14
  - 3. Tiempo de Retención del Pico Cromatográfico 15
  - 4. Platos Teóricos 16
  - 5. Resolución 16
  - 6. Factor de Capacidad 16
  - 7. Factor de Asimetría 17
- E. Calificación de Equipos 18
  - 1. Calificación de Diseño (DQ) 20
  - 2. Calificación de Instalación (IQ) 20
  - 3. Calificación de Operación (OQ) 21
  - 4. Calificación de Desempeño (PQ) 21
  - 5. Re-Calificación 22
  - 6. Roles y Responsabilidades en la Calificación de Equipos 23
    - a. Usuarios 23
    - b. Aseguramiento de la Calidad 23
    - c. Fabricante 23
  - 7. Aseguramiento de la Calidad de los Datos 24
    - a. Validación de Método Analíticos 24
    - b. Pruebas de Adecuabilidad del Sistema 24
    - c. Verificación del Control de Calidad 24

8. Validación contra Calificación 25
a. Validación de Procesos 25
b. Validación de Sistemas Computarizados 26
c. Validación de Software 28
9. Plan de Validación 28

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 30

III. HIPOTESIS 30

IV. OBJETIVOS 30
A. Objetivo General 30
B. Objetivos Particulares 30

V. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN 31
A. Tipo de Estudio 31
1. Comparativo 31
2. Experimental 31
3. Propectivo 31

VI. POBLACIÓN 31
A. Componentes del Sistema de Cromatografia de Líquidos de Alta Resolución 31
1. Automuestreador 717 Plus 31
2. Sistema de Entrega Multisolvente 600E 32
3. Detector de Absorbancia 2487 doble λ 32
4. Software: Millenium[32] versión 3.20 32
5. Hardware del Sistema de Computo 32

VII. METODOLOGÍA 33

VIII. RESULTADOS 34
A. Calificación de Instalación 34
B. Calificación de Operación 35
C. Calificación de Desempeño 36
D. Estrategía de Calificación de un Sistema de Cromatografía (HPLC) 37

IX. ANALISIS DE RESULTADOS 38

X. CONCLUSIONES 41

XI. RECOMENDACIONES 42

XII. REFERENCIAS 43

XIII. APENDICES
APENDICE I: CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES
APENDICE II: PROTOCOLO DE CALIFICACIÓN DE DISEÑO
APENDICE III: PROTOCOLO DE CALIFICACIÓN DE INSTALACIÓN
APENDICE IV: PROTOCOLO DE CALIFICACIÓN DE OPERACIÓN
APENDICE V: PROTOCOLO DE CALIFICACIÓN DE DESEMPEÑO

RESUMEN

Para garantizar la confiabilidad, exactitud y reproducibilidad de los resultados generados en un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución Waters (constituido por los módulos: automuestreador (717Plus), detector de Absorbancia (2487 doble λ), sistema de entrega multisolvente (600E), y el sistema de computo (hardware), y configurado con el software cromatografico Millenium[32] versión 3.20, el equipo fue sometido al proceso de calificación para evaluar su funcionamiento; previo a la generación de datos que involucren o sean parte de la decisión de aseguramiento de calidad de los medicamentos. Este proceso se divide en cuatro etapas: Calificación de Diseño (se desarrollo un documento con los requerimientos y especificaciones, que involucran la decisión para seleccionar un equipo HPLC), Calificación de Instalación (se verificó y documento que el equipo fue instalado en el ambiente seleccionado), Calificación de Operación (se comprobó y documento que los aspectos clave de operación de cada modulo funcionen de acuerdo a las especificaciones predeterminados) y Calificación de Desempeño (se demostró y documento el funcionamiento de todo el sistema HPLC, a través de la evaluación de los parámetros cromatográficos: reproducibilidad de los tiempos de retención, áreas y alturas de los picos de ácido benzoico, metilparabeno y propilparabeno, y se comprueba que el sistema es capaz de generar resultados confiables, exactos y reproducibles).

Las pruebas fueron realizadas a través de protocolos diseñados y desarrollados para cada etapa del proceso de calificación, en estos fueron descritas las pruebas críticas desarrolladas a cada componente del sistema. Con base en estás actividades, el sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución, cumple con las especificaciones de fabricante y los criterios de aceptación de desempeño para su uso rutinario, ya que se tiene la evidencia documentada de que el equipo es capaz de generar resultados confiables, exactos y reproducibles.

INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica, por la complejidad de sus procesos y fines a los que están dedicados sus productos, es una industria muy regulada. Los productos farmacéuticos deben satisfacer un gran conjunto de regulaciones y el cumplimiento de las mismas es sometido frecuentemente a inspección y auditorias, tanto por autoridades nacionales como internacionales; los laboratorios farmacéuticos están obligados a generar la evidencia documentada y asegurar con un alto grado de seguridad que se producen medicamentos que cumplen con las especificaciones de manera uniforme y con los atributos de calidad predeterminados.

Para el cumplimiento de lo anterior, la industria farmacéutica se soporta de la validación, definido como un proceso de aseguramiento de la calidad que permite demostrar, que, cumpliendo los principios de buenas practicas de manufactura (GMP's), los procesos, sistemas, equipos, materiales y métodos analíticos usados para la fabricación de medicamentos logran consistentemente lo que se espera de los mismos.

Los laboratorios de control de calidad de la industria farmacéutica también cumplen con los principios de las GMP's, más específicamente se suelen denominar estos principios como GLP's (Good Laboratory Practice por sus siglas en ingles), Buenas Prácticas de Laboratorio. La responsabilidad de los laboratorios de control de calidad es asegurar la calidad de los medicamentos que son fabricados, es decir, su fin es comprobar, que cumplen con los requisitos y especificaciones establecidas y aprobadas para su disposición en el usuario final.

Para garantizar que los resultados generados en los laboratorios de control de calidad son validos, los equipos/sistemas utilizados para la generación, medición, o análisis de datos; deben ser sometidos a calificación. La estrategia de calificación usada en la industria farmacéutica se basa en los requerimientos regulatorios, practicas de proveedores, y el resultado de las prácticas de la industria. Ejemplo de equipo analítico de laboratorio son cromatógrafos (HPLC), espectrofotómetros, sistemas computarizados para el control de instrumentos, etc.

La calificación es un proceso que consta de las siguientes etapas: Calificación de Diseño (DQ), Instalación (IQ), Operación (OQ) y Desempeño (PQ), las cuales proporcionan la garantía de que un sistema cumple con los requerimientos, de instalación en el ambiente operativo, que su operación es correcta y su desempeño cotidiano cumple con los criterios de aceptación predeterminados y requeridos para su uso, de acuerdo a protocolos de calificación.

Así mismo, en la industria farmacéutica la estrategia de calificación presenta grandes variaciones de una compañía a otra en cuanto a la manera de interpretar y desarrollar la calificación de un equipo de laboratorio, sin embargo, el objetivo de esta tesis es proponer una estrategia de calificación a un sistema de cromatografía de líquidos de alta Resolución y el desarrollo de las cuatro etapas de la calificación, aplicadas a cada uno de los módulos que componen el sistema, hardware y software del sistema de computo; con el fin de asegurar la validez de los datos, que son generados como parte del proceso de aseguramiento de la calidad de los medicamentos.

El alcance de este proyecto es aplicar una estrategia de calificación al sistema HPLC constituido por los módulos: automuestreador (717 Plus), detector de absorbancia (2487 doble λ), sistema de entrega multisolvente (600E) y el sistema de computo (hardware), y configurado con el software millenium[32] del fabricante Waters.

En la calificación del sistema HPLC, se comprobaran las especificaciones técnicas, diseño, construcción, ambientales, operacionales y desempeño. Para proporcionar la evidencia de que este sistema de laboratorio es adecuado para cumplir con su propósito durante su uso, a través de generar resultados confiables, exactos y reproducibles, como parte del aseguramiento de la calidad de los medicamentos.

I. MARCO TEORICO

A. Historia de la Cromatografía.

El botánico ruso Mikhail Tswett (Mikhail Semenovich Tsvett, 1872-1919) empleó por primera vez en 1906 el término "cromatografía" (del griego *chroma* y *graphein* que significan respectivamente "color" y "escribir").

A comienzos del año 1903, Mikhail Tswett usó columnas de adsorción de líquidos para separar pigmentos vegetales (por ejemplo, clorofilas). Las disoluciones se hacían pasar a través de una columna de vidrio rellena de carbonato de calcio, que finamente dividido da un material poroso que interacciona de forma diferente con los componentes de la mezcla, de forma que éstos se separaban en distintas bandas a lo largo de la columna.
Los primeros equipos de cromatografía de gases aparecieron en el mercado a mediados del siglo XX. A su vez, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) comenzó a desarrollarse en los años 1960, aumentando su importancia en las décadas siguientes, hasta convertirse en la técnica cromatografica más empleada[1, 2].

La cromatografía engloba a un conjunto de técnicas de análisis basadas en la separación de los componentes de una mezcla y su posterior detección.

Las técnicas cromatograficas son muy variadas, pero en todas ellas hay una fase móvil que consiste en un fluido (gas, líquido o fluido supercrítico) que arrastra a la muestra a través de una fase estacionaria que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido. Los componentes de la mezcla interaccionan de distinta forma con la fase estacionaria y con la fase móvil. De este modo, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y se van separando; después de haber pasado los componentes por la fase estacionaria y haberse separado pasan por un detector que genera una señal que puede depender de la concentración y del tipo de compuesto[1,2].

B. Instrumentación para Sistemas de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

Los componentes básicos de un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución se esquematizan en la figura 1. El sistema de bombeo (sistema de entrega de solvente) impulsa la fase móvil a través de la columna en la que se separan los componentes de la muestra que han sido introducidos en ella mediante el sistema de inyección (automuestreador). Una vez separados, los componentes son detectados y registrados dando lugar al cromatograma de la muestra. Actualmente los equipos de HPLC incluyen un sistema de cómputo, para controlar cada uno de los componentes del cromatógrafo y para realizar la adquisición y tratamiento de los datos[2].

1. Sistemas de Entrega de Solvente

La función del sistema de entrega de solvente es proporcionar a la columna una velocidad de flujo controlado, reproducible y constante. Además, las bombas empleadas en HPLC deben cumplir las siguientes condiciones: estar construidas con un material inerte a la fase móvil, poder trabajar a presiones elevadas y suministrar flujos adecuados al diámetro

de la columna empleada y libre de pulsaciones para no disminuir la sensibilidad de la detección.

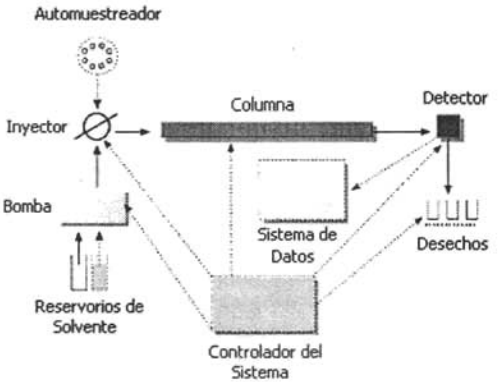


Figura 1. Instrumentación de un Sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

Las bombas pueden clasificarse en neumáticas y eléctricas, dependiendo si el origen de la fuerza motriz es un gas comprimido o un motor eléctrico. Las más empleadas en HPLC son las eléctricas y, dentro de ellas, las alternativas o reciprocas, sin embargo, también se utilizan las bombas de tipo jeringa cuando se trabaja con columnas de pequeño diámetro en modo isocrático[2, 3, 4].

a. Bombas Alternativas o Neumáticas

Cuentan con una cámara de pequeño volumen, en las que un pistón avanza y retrocede de forma cíclica, provistas de válvulas antirretorno. Una válvula antirretorno consiste en una esfera de zafiro que cuando pasa el flujo del disolvente se desplaza del asiento cónico en el que se apoya. Al terminar el flujo, la esfera regresa al asiento, cerrándose la válvula e impidiendo el retroceso del disolvente. Durante el retroceso del pistón se abre la válvula antirretorno inferior y se cierra la superior, produciéndose la aspiración del líquido desde el recipiente de la fase móvil al interior de la cámara, y durante el avance del pistón la posición de las válvulas antirretorno es la contraria, de modo que el líquido es impulsado desde la cámara hacia la columna. Este modo de funcionamiento origina pulsaciones en el flujo de la fase móvil, con flujo nulo durante el llenado de la cámara. Actualmente la disminución de las fluctuaciones de flujo se realiza mediante el empleo de bombas con múltiples cabezas. El caso más habitual es utilizar bombas de doble pistón en las que el desplazamiento de estos está desfasado, de tal manera que mientras un pistón está enviando liquido a la columna, la cámara del otro se está llenando. Otros fabricantes optan por utilizar bombas con mayor número de pistones para eliminar pulsaciones [2, 3, 4].

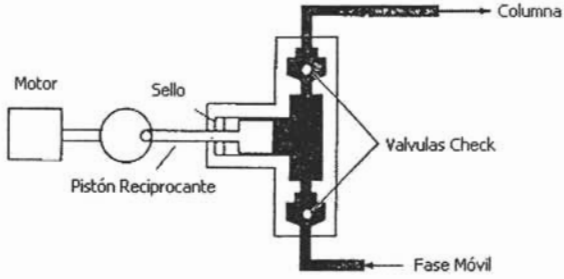


Figura 2. Esquema de una bomba reciprocante.

b. Bombas de Tipo Jeringa

Consisten básicamente de una jeringa capaz de trabajar a presiones elevadas y un engranaje de cremallera que transforma el movimiento circular del motor en un desplazamiento lineal. La pequeña compresibilidad de los líquidos hace necesario que trascurra cierto tiempo antes de que se estabilice el flujo cuando el gradiente de presión es de 50-70atm, lo que unido a su capacidad limitada, que obliga a interrumpir el flujo para rellenar la jeringa, ha hecho decaer el uso de estas bombas. La introducción de columnas de pequeño diámetro y capilares, que requieren flujos de fase móvil de orden µL/min que evitan tener que rellenar frecuentemente la jeringa, ha provocado el resurgimiento el uso de este tipo de bombas que tienen la ventaja de proporcionar flujos libres de pulsaciones[2, 3, 4].

2. Automuestreadores

El procedimiento empleado para introducir la muestra en la columna tiene gran importancia. Tanto el volumen inyectado como la anchura de la zona en que se introduce la muestra deben ser reproducibles. El sistema de inyección debe ser capaz de introducir la muestra en la columna en una zona lo más estrecha posible ya que está anchura es un factor determinante de la que van a tener los picos a su paso por el detector. Además, el inyector debe ser de fácil manejo y capaz de trabajar a presiones elevadas sin producir fugas. Dentro de los sistemas de inyección hay que distinguir los de tipo de jeringa y las válvulas de inyección[2, 3, 4, 5].

a. Inyectores de Tipo Jeringa

Los inyectores de jeringa, están prácticamente en desuso debido a la dificultad de su utilización y de la obtención de reproducibilidades aceptables, la producción de fugas a presiones elevadas y la sobrepresión que se produce por acumulación de fragmentos de la junta del inyector (septum) en la entrada de la columna[2, 3, 4, 5].

b. Válvulas de Inyección

El sistema de introducción de muestra más generalizado es la válvula de inyección, generalmente de seis vías. Existen varios diseños, pudiendo encontrarse válvulas con una espira externa y otras empleadas para pequeños volúmenes de inyección en las que la espira está grabada en el interior de la válvula. Ambos tipos funcionan de manera similar, en la figura 3 se encuentra representado el esquema de funcionamiento de la válvula de seis vías con espira externa. Dos de las vías, las correspondientes a las posiciones 1 y 4, se encuentran conectadas entre sí por la espira. En la fase de carga, con ayuda de una jeringa se introduce la muestra en la espira a presión ambiente mientras la fase móvil pasa por la columna. Para realizar la inyección gira el rotor de la válvula de modo que, impulsada por la fase móvil, la muestra contenida en la espira pasa al interior de la columna. Estas válvulas son reproducibles y permiten trabajar a presiones elevadas. Su desventaja respecto a las de tipo de jeringa es su mayor costo[2, 3, 4,5].

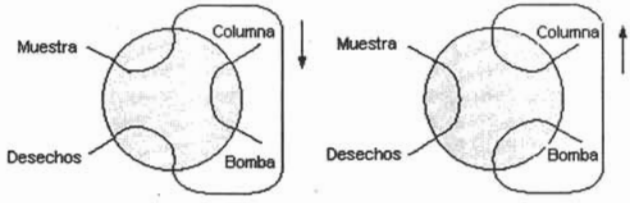


Figura 3. Esquema de una válvula de seis vías.

3. Columnas

Las columnas son el corazón del cromatograma, representa la separación de una mezcla de componentes. La selectividad, capacidad, y eficiencia de la columna son afectadas por la naturaleza del material de empaque o de los materiales de construcción, la longitud y el diámetro. La figura 4, indica como los componentes de la columna contribuyen al desempeño cromatográfico.

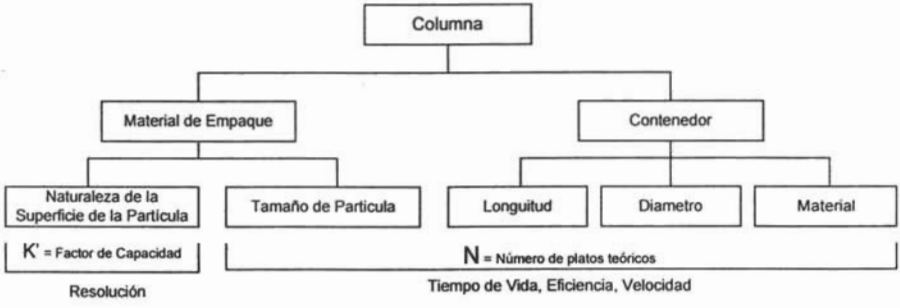


Figura 4. Esquema que representa la importancia de la columna.

La mayoría de las columnas para cromatografía de líquidos tienen una longitud entre 10 y 30cm. El diámetro interno de las columnas es a menudo de 4 a 10mm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son 3, 5 y 10μm[1, 2, 4].

4. Detectores

El detector convierte un cambio de la fase móvil de la columna en una señal eléctrica que es registrado por el sistema de datos. Los detectores son clasificados como selectivos o universales dependiendo de la propiedad medida. Detectores selectivos (dependen de una propiedad del soluto), tal como los detectores fluorescentes, la medida de una propiedad química o física que es característica del soluto(s) en la mezcla; solo estos componentes que poseen características que pueden ser detectados. Detectores universales (dependen de una propiedad del eluente), miden una propiedad física del eluente. En los detectores de índice de refracción, por ejemplo, todos los solutos los cuales poseen un índice de refracción diferente que el eluente pueden ser detectados. Los detectores selectivos tienen una mayor sensibilidad que los detectores universales, y son mucho más ampliamente utilizados. Los detectores universales son más comúnmente utilizados en cromatografía preparativa, donde una respuesta universal es deseada y el tamaño de la muestra es grande[1, 3, 4].

a. Detectores de Absorbancia.

Los detectores de absorbancia son no destructivos y responden solo a sustancias que absorben la radiación en la longitud de onda de la fuente de luz. Son clasificados como selectivos. Los detectores que miden solo en el rango de 190-350nm son detectores de absorbancia ultravioleta (UV). Mientras que los detectores que miden en el rango de 350-700nm son visibles (vis). Los detectores que abarcan el rango 190-700nm son conocidos como detectores UV/Vis. Son los detectores mas ampliamente utilizados, no solo por la insensibilidad relativa del detector a los cambios de temperatura o gradiente, si no también por el gran número de compuestos que absorben radiación en el rango UV.

La función del detector es monitorear la luz que pasa a través del eluente. Cuando un compuesto con absorción UV, disuelto en el eluente, pasa a través del detector, este absorbe un poco de luz, de tal modo previene alcanzar la luz del sensor. El decrecimiento en los resultados de la luz en la respuesta eléctrica va del detector al sistema de datos.

La concentración del soluto y la intensidad de la luz transmitida a través de la celda de flujo están relacionadas a la ley de Lambert-Beer[1, 3,4].

b. Detectores de Índice de Refracción.

Son refractómetros diferenciales que marcan una diferencia entre el índice de refracción de la fase móvil y el eluente de la columna.

Los hay de diferente tipo: Los de tipo deflector tienen un intervalo amplio de linealidad. Los de tipo reflexivo de intervalo más limitado y los que miden el efecto christiansen.

La sensibilidad de estos detectores es menor que otros; su detección está en el orden de µg y las modificaciones de temperatura alteran el índice de refracción por lo que se requiere un control de 0.001° C. No es útil para las eluciones en gradiente. La principal ventaja de este detector radica en su respuesta casi universal a todos los solutos[2, 3, 4].

c. Detectores Fluorométricos.

Mide la fluorescencia de un soluto que tenga esta propiedad o de fase(s) móvil(es) que lo sean, revelándose los solutos como picos negativos; o después de la columna puede hacerse una reacción con un reactivo fluorescente para que el soluto presente esta propiedad, esto se le conoce como derivatización post-columna. Es un método que aumenta la selectividad y la sensibilidad, puede usarse en eluciones isocráticas o de gradiente. Las sustancias fluorescentes típicas son aromáticos polinucleares, esteroides, pigmentos vegetales, vitaminas alcaloides, catecolaminas, aflatoxinas, etc[2, 3, 4].

d. Detectores Electroquímicos

Estos detectores son simples y extremadamente sensibles a aquellos analitos que pueden detectar. Para emplearlos, las moléculas de soluto han de tener una característica voltamperométrica en una fase móvil acuosa o acuosa-orgánica. Hay detectores que miden la conductividad eléctrica, fuerzas coulómbicas, reacciones redox y se pueden utilizar en eluciones isocráticas o con gradientes[2, 3, 4].

5. Sistema de Datos.

Actualmente los equipos de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), pueden ser controlados a través de un software (sistema de computo), desarrollado específicamente con gran capacidad de almacenamiento, tratamiento y presentación de datos.

Las ventajas de los sistemas de computo se basan en su capacidad prácticamente ilimitada de almacenamiento de datos procedentes de la conversión analógico/digital de la señal, mediante el uso de soportes externos, y en las distintas opciones que permite el procesado y, sobre todo, la presentación de datos. Los cromatógramas pueden examinarse en pantalla, compararse o imprimirse de la forma más adecuada a partir de la señal digital almacenada. Los cálculos necesarios para obtener resultados cuantitativos se ejecutan directamente, permitiendo la elaboración inmediata de un informe[1, 2,3].

C. Forma de un Pico Cromatográfico

El examen del pico de un cromatograma (figura 5), revela una semejanza con las curvas de error normal o gaussianas, la cual representa un pico cromatográfico ideal.

En este pico gaussiano, la anchura en varios niveles de su altura, se puede relacionar con la desviación estándar (σ). En la figura 5, se ilustra una manera sencilla de deducir σ a partir de un cromatograma experimental. Se trazan las tangentes en los puntos de inflexión a los dos lados del pico cromatográfico (d), y se extienden para formar un triangulo con la línea base del cromatógrama. De manera relativa en casi un 96% del área bajo la curva de un pico gaussiano se encuentra dentro del intervalo comprendido entre más y menos dos desviaciones estándar ($\pm\sigma$) alrededor de su máximo (c). Así las

intersecciones, tienen lugar a una distancia del máximo aproximadamente ±2σ y W =4σ, donde W corresponde a la base del triangulo (b).

Mientras que 2.354σ representa un medio de la altura del pico (a). A partir de esto se obtiene:

$$\sigma = \frac{t_r}{\sqrt{N}} \qquad N = \left[\frac{t_r}{\sigma}\right]^2$$

Donde: t_r = Tiempo de retención.
N = Número de platos teóricos que contiene la columna.
σ = desviación estándar.

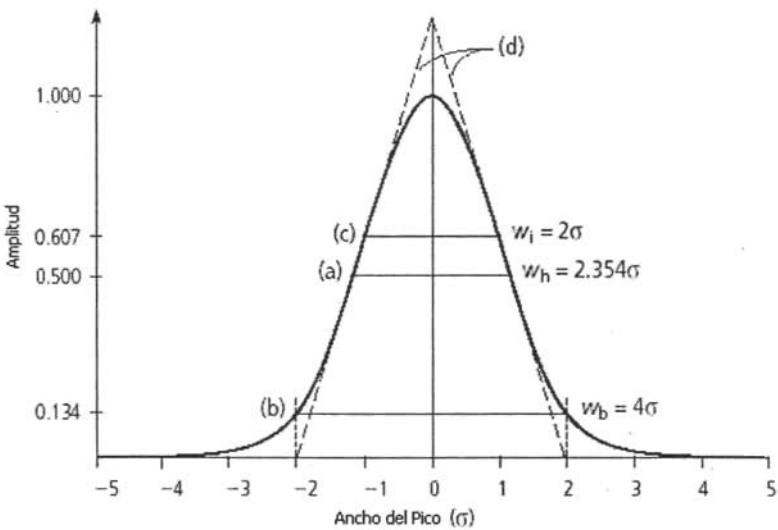


Figura 5. Esquema de un Pico Cromatógrafico Ideal.

A medida que aumenta N, los picos son más estrechos y por lo tanto la columna será más eficiente. Pero como N también depende de la longitud de la columna (L), se emplea otro parámetro que se llama altura del plato teórico (H), que mide su eficiencia por unidad de longitud[1, 6,7].

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

D. Adecuabilidad del Sistema

La adecuabilidad del sistema forma parte de los métodos de cromatografía (HPLC). Se emplean para comprobar que la resolución y la reproducibilidad del sistema cromatográfico son aptas para realizar una corrida cromatografica. Para estos ensayos se considera que el equipo, las operaciones analíticas y las muestras a ensayar constituyen un sistema único que puede evaluarse como tal.
Los parámetros de aptitud del sistema se determinan para el pico de la sustancia, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente.

Si es necesario, pueden realizarse ajustes en las condiciones operativas para cumplir con los requisitos de aptitud del sistema, entre ellos, las proporciones de los componentes de la fase móvil y la velocidad de flujo.

Para evaluar si se cumplen los requisitos de adecuabilidad del sistema se realizan inyecciones repetidas de un estándar, empleada en la valoración u otra solución estándar. A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, para calcular el % del coeficiente de variación (% CV), se emplean los datos de cinco a seis inyecciones repetidas del estándar. El % del coeficiente de variación, se calcula según la fórmula siguiente:

$$\%CV = \left(\frac{100}{\overline{X}}\right)\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N}(x_i - x)^2}{N-1}}$$

Las pruebas de adecuabilidad es una parte integral de muchos procedimientos analíticos. Los parámetros de prueba de adecuabilidad del sistema, más importantes no se limitan a los siguientes[6, 7]:

1. Altura del Pico Cromatográfico.

La altura de un pico cromatográfico se obtiene uniendo las líneas base a cada lado del pico por una línea recta, y midiendo la distancia perpendicular desde esta línea al pico. Es importante considerar, sin embargo, que las alturas del pico están inversamente relacionadas con las anchuras del pico (Ver figura 5). Por ello, con las alturas del pico se obtienen resultados exactos sólo si las variaciones en las condiciones de la columna no alteran el ancho del pico durante el tiempo necesario para obtener los cromatógramas de la muestra y de los estándares. Las variables que deben controlarse estrechamente son la temperatura de la columna, la velocidad de flujo y el volumen de inyección de la muestra [1, 6, 7].

2. Área del Pico Cromatográfico.

El área del pico es independiente de los efectos del ensanchamiento del pico debido a las variables que se han mencionado, las áreas son un parámetro analítico más adecuado que las alturas del pico, sin embargo esta condicionada por el volumen de inyección de la muestra[1, 6, 7].

3. Tiempo de Retención del Pico Cromatográfico.

El tiempo de retención que transcurre después de la inyección de la muestra, para que el pico del analito alcance el detector se denomina tiempo de retención y se le da el símbolo t_R. Es característico de un soluto dado, siempre y cuando se conserven las mismas condiciones de operación.

El tiempo de la retención (t_R), es una de las medidas más fáciles de realizar y seguir en una corrida cromatografica. La reproducibilidad del tiempo de retención, es un parámetro de desempeño del equipo, principalmente de la columna, el sistema de entrega de solvente y la temperatura de la columna. Por otro lado, el sistema de datos utiliza el tiempo de retención para identificar picos; es decir, los picos que se encuentran fuera del intervalo del tiempo de retención no son reportados por el sistema de datos. Sin embargo, el tiempo de la retención, por sí mismo, no es importante y puede variar de un instrumento idéntico a otro.

En la figura 6, se representa un cromatograma, donde se muestra el tiempo de retención, de dos picos cromatográficos (pico 2 y 3) [1, 6, 7].

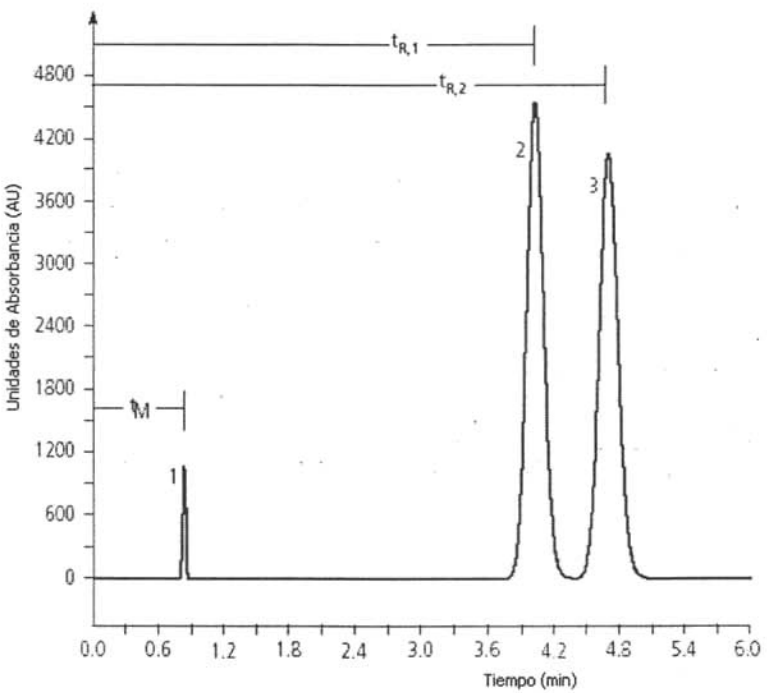


Figura 6. Esquema de un Cromatograma.

4. Platos Teóricos.

El número de platos teóricos N, es una medida de la eficiencia de la columna. Para los picos gaussianos, se calcula por la fórmula siguiente:

$$N = 16\left[\frac{t}{W}\right]^2$$

$$N = 5.54\left[\frac{t'}{W_{\frac{1}{2}}}\right]^2$$

en la cual t es el tiempo de retención de la sustancia, W es el ancho del pico en su base, obtenido al extrapolar los lados del pico con la línea de base y t' es la diferencia entre el tiempo de retención de la sustancia y el tiempo de elución de una sustancia que no es retenida (tiempo muerto). El ancho máximo a media altura, $W_{1/2}$, es obtenido directamente por integradores electrónicos. El valor de N depende del analito, así como de las condiciones operativas, como por ej., la fase móvil, la velocidad de flujo, la temperatura y la columna[1, 6, 7].

5. Resolución.

La resolución R, es una función de la eficiencia de la columna N, y se especifica para asegurar que las sustancias que eluyan muy cercanas se resuelvan entre sí y para asegurar que los estándares internos se resuelvan de las sustancias a ensayar. La eficiencia de la columna puede especificarse también como un requisito de adecuabilidad del sistema, especialmente si hay un solo pico de interés en el cromatograma, sin embargo, el valor aislado de eficiencia no puede asegurar la resolución para el sistema en estudio. La eficiencia de la columna es una medida de la agudeza de los picos, importante para detectar componentes en baja concentración.

Para la separación de dos sustancias en una mezcla, la resolución, R, es determinada por la fórmula siguiente:

$$R = \frac{t_2 - t_1}{\frac{1}{2}(W_2 - W_1)}$$

Donde: t_2 y t_1 son los tiempos de retención de los dos componentes y W_2 y W_1 son los anchos de la base de los picos correspondientes, obtenidos al extrapolar los lados con la línea de base[1, 6, 7].

6. Factor de Capacidad

El factor de capacidad k', está relacionado con el coeficiente de distribución de la sustancia a ensayar entre ambas fases. El factor de capacidad depende de la naturaleza química de la sustancia; del área, naturaleza y cantidad de fase estacionaria; de la

temperatura de la columna y la velocidad de flujo de la fase móvil. Cada sustancia tiene un factor de capacidad característico para un conjunto específico de condiciones experimentales. La separación cromatográfica sólo se produce si las sustancias involucradas poseen diferentes factores de capacidad. El factor de capacidad se calcula por la fórmula siguiente:

$$K' = \frac{t_n - t_0}{t_0}$$

Donde: t_n es el tiempo requerido para que la sustancia a ensayar eluya a través de la columna (tiempo de retención) y t_0 es el tiempo de elución de una sustancia que no es retenida (tiempo muerto) [1, 6, 7].

7. Factor de Asimetría.

El factor de asimetría F, es una medida de la simetría del pico, es 1 para los picos perfectamente simétricos y su valor aumenta a medida que la asimetría es más pronunciada. En algunos casos, pueden observarse valores menores de la unidad. Como consecuencia de la asimetría del pico, la integración y la precisión se tornan menos confiables.

El factor de asimetría se calcula por la fórmula siguiente:

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

Donde: $W_{0,05}$ = ancho del pico al 5% de altura
f = es la distancia entre el borde simétrico del pico y el centro del mismo medida al 5% de la altura.

Estos datos se obtienen a partir de Inyecciones repetidas del estándar u otras soluciones según se especifique en la monografía correspondiente[1, 6, 7].

E. Calificación de Equipos

La calificación de equipos es un proceso formal que provee evidencia documentada de que un equipo funciona correctamente, para el propósito requerido y guarda un estado de mantenimiento y calibración consistente para su uso.

La calificación de equipos consiste de una serie de verificaciones y pruebas efectuadas sobre el equipo con la finalidad de asegurar que el mismo cumple con las especificaciones de diseño, instalación, operación y que todas las operaciones futuras serán confiables y estarán dentro de los límites de operación especificados. De esta manera se pueden evitar problemas en el funcionamiento de los equipos y sus posteriores repercusiones sobre la calidad del producto elaborado. Todas las actividades a desarrollar durante la calificación del equipo deben ser planeadas, aprobadas y documentadas en protocolos de calificación, los cuales servirán como guía de los pasos a seguir[8, 9, 10].

La calificación de equipos es dividida en cuatro etapas: Calificación de Diseño (DQ), Instalación (IQ), Operación (OQ) y Desempeño (PQ). El rol de cada etapa es resumido en la siguiente figura:

Figura 7. Proceso de Calificación de Equipos.

La calificación de equipos provee evidencia importante de que un equipo se desempeña satisfactoriamente y este se encuentra dentro de los fines de cada compañía

farmacéutica. Sin embargo, la calificación de equipos es una parte de las actividades que contribuyen a demostrar el aseguramiento de la calidad de los datos, entre otros factores que deben ser considerador se encuentran: la validación de métodos analíticos, pruebas de adecuabilidad del sistema y verificación del control de calidad de los datos[8, 9, 10].

La documentación que se genera en la calificación de equipos debe cumplir con los siguientes lineamientos (enunciativos más no limitativos):

Toda la documentación debe ser escrita en español, impresa en un medio que asegure su legibilidad, empleando vocabulario sencillo, indicando el tipo, naturaleza, propósito o uso del documento. La organización de su contenido será tal que permita su fácil compresión.

Todos los documentos maestros deben incluir: titulo, tipo de documento, paginación, fecha de emisión, nombre, firma y posición dentro de la empresa de las personas que elaboraron, revisaron y autorizaron el documento.

Los documentos destinados al registro de datos durante el proceso deben ser diseñados con suficiente espacio para los datos que habrá de registrarse[11, 12, 13, 14].

Por otro lado, la SSA a través de la NOM-059-SSA1-1993, establece los lineamientos y requisitos para la fabricación de medicamentos en México, sin embargo, en la norma no se define de manera clara el término calificación, así como los lineamientos a seguir en la calificación de equipos, únicamente se menciona de manera textual las siguientes secciones de la norma:

En la sección 7. Documentación legal y técnica, aparatado 7.5 *"Se debe contar con los registros de los resultados analíticos de materias primas, material de acondicionamiento y producto terminado, así como la documentación que avale los resultados del laboratorio de control conforme a los requerimientos de las buenas prácticas de laboratorio"*[11].

En la sección 9.11 Validación, apartado 9.11.4 "*Los sistemas críticos y equipos de producción y acondicionamiento deben ser calificados de acuerdo a protocolos que tomen en cuenta su diseño, construcción, instalación y operación*" [11].

En la sección 10.5 Equipo automático, mecánico y electrónico, apartado 10.5.2 "*Con el fin de asegurar la exactitud de los datos manejados por estos sistemas, se debe implementar un sistema de protección de los mismos para evitar modificaciones a las formulas o registros efectuados por personal no autorizado*" y el apartado 10.5.3 "*Se debe mantener un respaldo en copias fieles, cintas o microfilms de toda la información archivada en las computadoras o los sistemas relacionados, para asegurar que la información emitida por estos sistemas es exacta, completa y que no existen modificaciones inadvertidas*" [11].

Sin embargo, en la NOM-059-SSA1-1993 no es un requerimiento presentar la documentación relacionada a calificación de equipos analíticos de laboratorio. Ya que el enfoque de la norma es netamente hacia el área de producción (manufactura).

1. Calificación de Diseño (DQ).

Define las especificaciones del equipo y detalles de la decisión concisa para la selección del proveedor. El DQ es la parte de planeación del Proceso de Calificación de equipos, y es enfocado frecuentemente, como parte del proceso de compra de un equipo nuevo. La Calificación de diseño es una actividad para especificar los requerimientos funcionales y operacionales que son requeridos por el usuario de acuerdo al proceso. Así mismo, no se limita a estas especificaciones, también es requerido que los fabricantes o proveedores tengan el soporte para actividades de instalación, servicio y entrenamiento [8, 9, 10, 12].

El documento no se limita al contenido de las siguientes secciones:

- *Uso del Sistema y Descripción:* En este apartado se da una referencia de las necesidades, y cuales son las razones por las que es requerido el equipo.

- *Especificaciones de Requerimientos de Usuario:* Se deben documentar los requerimientos generales, con los que deberá cumplir el equipo, para cubrir las necesidades especificas del usuario.
- *Especificaciones de Requerimientos Funcionales y/o Operacionales:* Se deben documentar todas las especificaciones funcionales y operacionales requeridas, que debe ser capaz de desarrollar el equipo, de acuerdo a las necesidades del proceso.

2. Calificación de Instalación (IQ).

Establece que el equipo es recibido como es diseñado y especificado, que es apropiadamente instalado en el ambiente seleccionado, y que este ambiente es adecuado para la operación del equipo, y algunas veces incluye una respuesta al encendido inicial, aunque también puede ser incluido como parte del OQ.

La calificación de la instalación (IQ), es la segunda etapa de la calificación. Las actividades específicas de la instalación, no se limitan a: incluir el equipo dentro del programa de mantenimiento, asignar una identificación única, etiquetándolo y creando un registro. Posteriormente, los proveedores deben realizar la instalación y ejecución de los protocolos[8, 9, 10, 12].

Las actividades y la documentación asociada con el IQ no se limita a la siguiente:

- *Descripción del Equipo o Sistema*: Provee una descripción general del equipo. Pueden ser usados dibujos y diagramas cuando sea apropiado. Si en un sistema complejo, debe darse una descripción de cada modulo que lo conforma.

- *Recepción del Equipo o Sistema*: Asegurar que el equipo, software, manuales, refacciones, y algún otro accesorio que este asociado al equipo, como es especificada la orden de compra sea recibidos y se encuentren sin algún daño visible.

- *Requerimientos del Sitio de Instalación*: Verificar que el sitio de instalación sea adecuado a los requerimientos ambientales especificados por el fabricante. Dentro de las consideraciones importantes se encuentra la superficie, requerimientos eléctricos, humedad y temperatura ambiental.

- *Ensamble e instalación*: El ensamble e instalación del equipo, debe ser realizado por el proveedor y son los encargados de establecer y/o recomendar las pruebas y guías, para evaluar que el equipo se encuentre dentro de los parámetros establecidos.

- *Identificación de los Componentes*: Provee la descripción de cada componente del sistema o equipo como son, marca, modelo, No. de serie, características de diseño, versión del software, etc.

- *Red y Almacenaje de Datos*: Para equipos analíticos (provistos de un sistema de computo), equipos que requieren conexión a red de datos y tienen la capacidad de almacenar datos. Se debe conectar el equipo a la red y verificar su funcionalidad[8, 9, 10, 12].

3. Calificación de Operación (OQ).

Verificación que confirma los aspectos clave de desempeño en ausencia de que contribuya a introducir efectos al método. Las pruebas de OQ aseguran que el equipo es capaz de desempeñarse dentro de los criterios de funcionamiento especificados, de acuerdo a los rangos usados para todas las pruebas. La selección de pruebas de OQ se basa en las bases teóricas, técnicas y el uso previsto del equipo [8, 9, 10].

Las actividades y la documentación asociada con el OQ no se limitan a la siguiente:

- *Verificación de Operación*: Tiene el objetivo de desarrollar el diagnostico inicial y pruebas del equipo o de cada modulo después de la instalación. En la obtención de resultados aceptables, debe proceder con las pruebas de operación del sistema [8,10].

- *Pruebas de Operación del Equipo*: Las pruebas a desarrollar se deben enfocar, en las funciones críticas del equipo, para verificar y comprobar que opera como es descrito por el fabricante y como es requerido por el usuario. El usuario debe seleccionar los parámetros a probar, por lo que es requerido utilizar la información del proveedor-vendedor para identificar estos parámetros [8, 10, 15].

Las siguientes pruebas son críticas para la calificación del sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución, ver tabla 1.

4. Calificación de Desempeño (PQ).

Verificación documentada de que un sistema es capaz de desarrollar o controlar las actividades del proceso requerido, de acuerdo a especificaciones escritas y pre-aprobadas. La calificación de desempeño involucra las pruebas del equipo usando el método o análisis especifico para asegurar que el método está produciendo datos válidos. El PQ puede consistir de las pruebas de validación del método, pruebas de adecuabilidad del sistema, análisis y tendencia de las muestras de control. El PQ complementa el OQ por adición de pruebas usando el método especifico. Los procedimientos de prueba del PQ deben ser basados en la teoría, y dependiendo del método especifico usado [8, 9, 10, 12].

Tabla 1. Ejemplos de Pruebas para la Calificación de Operación para Sistemas HPLC.

Sistema	Módulos	Pruebas
Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución.	Sistema de Entrega de Solvente (Bomba).	• Exactitud de la velocidad de Flujo. • Prueba de Proporción de Gradiente. • Exactitud y Estabilidad de la Temperatura de la Columna.
	Automuestreador	• Exactitud del Volumen de Inyección.
	Detector	• Prueba de Exactitud de la Longitud de Onda. • Linealidad de Respuesta del detector.
	Software Cromatográfico	• Operación del Software de Aplicación Millenium[32] versión 3.20. o Creación del Método de Proyecto. o Creación del Método de Instrumento. o Secuencia de Muestras. o Creación del Método de Proceso. o Generación y Diseño de Informes. o Administración de la Configuración.

Las actividades y la documentación asociada con el PQ no se limita a la siguiente:

Verificación de Desempeño. Se debe desarrollar una prueba o serie de pruebas para verificar un desempeño aceptable del equipo para el uso destinado. Las pruebas de PQ son usualmente basadas en la aplicación típica requerida en el sitio usuario. Algunas pruebas pueden parecerse a las realizadas en el OQ, pero los criterios de aceptación para estos resultados pueden ser diferentes si es requerido, ver tabla 2.

Las pruebas de PQ deben ser desarrolladas independientemente de las pruebas analíticas de rutina desarrolladas en el equipo. Generalmente, también las pruebas del PQ, son repetidas a intervalos definidos para documentar el desempeño del equipo histórico y se verifique que sigue encontrándose dentro de estado calificado[15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22].

Tabla 2. Ejemplos de Pruebas de Calificación de Desempeño para Sistemas de Cromatografía.

Sistema	Pruebas
Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución.	• Precisión del tiempo de retención del pico. • Precisión del área del pico. • Precisión de la altura del pico.

5. Re-Calificación.

En general, un equipo experimentará una variedad de cambios durante su vida útil. Estos pueden variar desde el reemplazo rutinario de una parte simple, consumible, hasta

cambios significativos que afectan el sistema completo. Los ejemplos de tales circunstancias incluyen:

- Movimiento o re-localización del equipo.
- Interrupción de los servicios o suministros.
- Mantenimiento de rutina y reemplazo de refacciones
- Modificación (p. ej. actualización del sistema o mejora)
- Cambio de las funciones de uso.

Cada vez que ocurran tales cambios, es esencial repetir aspectos relevantes del proceso de calificación original. Este procedimiento es ampliamente referido como re-calificación.

El nivel de re-calificación requerida dependerá del alcance de los cambios y su impacto sobre el equipo. En muchos casos, la re-calificación puede ser realizada utilizando los mismos protocolos de calificación, revisiones y pruebas, los cuales fueron llevados a cabo previo al uso rutinario del equipo. Sin embargo, la re-calificación no es necesariamente repetir todo el proceso. Pero es requerido cubrir el cambio realizado y re-calificar aquellas partes (refacciones y/o accesorios, equipos acoplados, entre otros) del sistema, que fueron afectados por dichos cambios[8, 9, 17].

6. Roles y Responsabilidades en la Calificación de Equipos

a. Usuarios

Los usuarios son responsables por la operación del equipo y la calidad de los datos generados. El grupo de usuarios incluye analistas, sus supervisores, y el gerente del área. Los usuarios deben ser entrenados en el uso de los equipos, y sus registros de entrenamiento deben ser mantenidos como es requerido por las regulaciones.
Sus entrenamientos y habilidad en su uso hacen un grupo bien calificado para el propósito de las especificaciones y pruebas del equipo para una exitosa calificación de equipos analíticos.
Consultores, especialistas de validación y el personal aseguramiento de la calidad puede dar recomendaciones y asistir como sea necesario, en la calificación de equipos[10, 12].

b. Aseguramiento de la Calidad

El rol de aseguramiento de la calidad en la calificación de equipos, permanece en la verificación del cumplimiento de algunas regulaciones. El personal debe entender el proceso de calificación de equipos. Finalmente, deben revisar el proceso de calificación de equipos para determinar si se encuentra dentro de los requerimientos regulatorios y se debe verificar que la documentación sea clara concisa y completa[10, 12].

c. Fabricante

El fabricante es responsable del DQ cuando es diseñado el equipo. Es también responsable para la validación del proceso relevante para manufactura y el montaje del hardware para la validación del software asociado con el equipo para el trabajo analítico. Este debe proveer las funciones críticas de prueba escritas, usadas para la calificación del equipo y software en el sitio usuario.

Finalmente, el fabricante debe notificar para conocimiento de todos los usuarios acerca de los defectos del hardware y software descubiertos después de la liberación del producto, entrenamiento a usuarios, soporte de la instalación, servicio de mantenimiento, calibración y partes reemplazables[10, 12].

7. Aseguramiento de la Calidad de los Datos.

La calificación de equipos ayuda a justificar el uso continuo del equipo, pero no asegura por si solo la calidad de los datos generados. La calificación de equipos es uno de los cuatro elementos críticos de la calidad de los datos. La figura 8, muestra estos componentes. La calificación de equipos representa la base para la generación de la calidad de los datos, los otros componentes esenciales son los siguientes: validación de métodos analíticos, pruebas de adecuabilidad del sistema y verificación del control de calidad[10, 12].

a. Validación de Métodos Analíticos.

La validación de métodos es el proceso para establecer que las características de desempeño sean adecuadas para la aplicación buscada. La validación de métodos cromatográficos se realiza cuando:

- Antes de la introducción en el uso de rutina.
- Cuando las condiciones del método validado han cambiado, por ejemplo un instrumento con diferentes características o muestras con diferente matriz.
- Cuando el método es cambiado, y los cambios están fuera del alcance original del método.

Para obtener resultados exactos, todas las variables del método deben ser consideradas, incluyendo procedimiento de muestreo, preparación de muestras, separación cromatografica, detección y evaluación de datos, etc[10, 12].

b. Pruebas de Adecuabilidad del Sistema.

Típicamente son realizadas, antes del desarrollo de métodos analíticos y del análisis muestras, las pruebas de adecuabilidad del sistema verifican, que el sistema trabaja de acuerdo a su desempeño esperado y dentro de las especificaciones del método, asegurando que las pruebas se encuentren dentro de los límites permisibles[10, 11, 12].

c. Verificación del Control de la Calidad.

La verificación del control de calidad, se refiere al uso de muestras de control de calidad, llamadas también muestras de concentración conocida que son intermezcladas con las muestras en estudio durante una corrida cromatografica. La finalidad es demostrar que el método es desarrollado según lo esperado.

Así mismo, algunas veces este concepto también es referido al mantenimiento y calibración del equipo de manera regular, para mantener el estado calificado del equipo, mediante estándares de calibración o de referencia, que correlacionan la respuesta del equipo con un analito conocido en cantidad o cualidad[10, 12].

Figura 8. Los Componentes de la Calidad de los Datos.

8. Validación Contra Calificación

El termino validación y calificación son usados amplia y frecuentemente para trasmitir el mismo concepto. Sin embargo, la validación es una aplicación orientada y relacionada o un método de medición específico o aún proceso, mientras que la calificación es orientada aún equipo y debe ser relacionada primariamente a proveer evidencia del desempeño satisfactorio de un equipo.

Los términos de validación y calificación frecuentemente son mezclados y muchas veces combinados. La calificación de equipos verifica que un equipo-sistema cumple con especificaciones funcionales y de desempeño definidas previamente. Para la calificación de operación, los estándares genéricos y las condiciones analíticas son usados más que las condiciones reales de las muestras que van a ser procesadas. La validación relaciona más o intenta procesar las muestras reales, preparación de muestras, análisis y evaluación de datos[10, 12].

a. Validación de Procesos

La validación es aplicada a muchos aspectos de la manufactura farmacéutica, incluyendo servicios, equipo, sistemas, procesos y limpieza. En cada caso el objetivo es para reunir la evidencia documentada, la cual provee un alto grado de aseguramiento que todas las partes de las instalaciones son consistentemente correctas para el trabajo. Para un nuevo equipo, la validación ocurre de una manera prospectiva involucrando ambos usuario y proveedor, y sigue una extensa progresión secuencial.

Según los principios generales de validación de procesos por la Food and Drug Administration (FDA), la validación de procesos se define como "establecer una evidencia documentada que proporciona un alto nivel de garantía de que un determinado proceso

producirá consistentemente un producto que se ajuste a las especificaciones y a los atributos de calidad definidos para él" [12, 23, 24, 25].

b. Validación de Sistemas Computarizados.

Un rango extenso de sistemas incluye pero no se limitan a equipo de manufactura, equipo de laboratorio computarizado, control de proceso, ejecución de manufactura, administración de la información de laboratorio, planeación de los recursos de manufactura, administración de datos de pruebas clínicas y administración de la documentación de sistemas.

Los sistemas computarizados consisten de hardware, software y componentes de red junto con las funciones controladas y la documentación asociada. Los sistemas computarizados son algunas veces referidos a sistemas automatizados.

El incremento de uso de sistemas computarizados en la industria farmacéutica en las últimas décadas ha requerido incrementar los esfuerzos en la validación del software y el hardware. La validación de sistemas computarizados está enfocada a los principios utilizados en la validación de procesos o métodos analíticos. Hoy en día las inspecciones oficiales en las compañías farmacéuticas se concentran cada vez más y más en la validación de sistemas computarizados con base en las GMP. Diversas guías e interpretaciones de estas guías existen, pero no hay alguna que este disponible y detalle todos los aspectos a considerar para validar los sistemas computarizados para todos los países[12, 26, 27, 28].

Diferentes definiciones existen del término sistema computarizado. La definición de la comunidad europea de un sistema computarizado, es la siguiente:

Sistema computarizado: un sistema incluye las entradas de datos, procesamiento electrónico y la salida de la información a ser usada para reportes o control automático.

Sistema computarizado (USA, PDA): es definido por un sistema de computadora puro y la función controlada. El sistema de computadora incluye hardware y software. La función controlada es el equipo o puede ser una operación la cual no requiera otro equipo de hardware en el sistema de computadora. Esta definición de sistema computarizado es ilustrada en la figura 9.

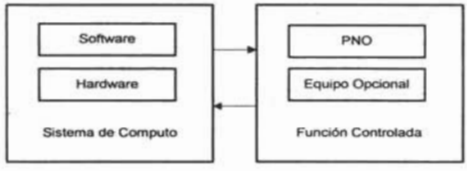


Figura 9. Sistema Computarizado.

La validación de sistemas computarizados significa la validación del sistema de cómputo y el proceso de producción controlado. La validación de computadoras en la industria farmacéutica es un campo nuevo, por lo que hoy en día es difícil encontrar una base concreta en las guías[26, 29, 30].

Las regulaciones más sobresalientes se encuentran concentradas en la comunidad europea, Estados Unidos y Suiza.

La validación hoy en día debe llevarse paralelamente con el desarrollo del sistema. Esto representa una ventaja al realizar una conexión entre la validación y el desarrollo del sistema, y sigue un esquema de cambios razonable en la aprobación. El orden a seguir para administrar las actividades necesarias para producir un sistema validado, es recomendable que los proveedores sigan un sistema de administración de la calidad formal. Hoy en día hay muy pocas metodologías disponibles para la validación de sistemas computarizados. Solo se mencionara el Modelo-V que manejan las guías GAMP4, esta metodología debe ser desarrollada para describir el procedimiento de validación [23, 26, 27,28, 30].

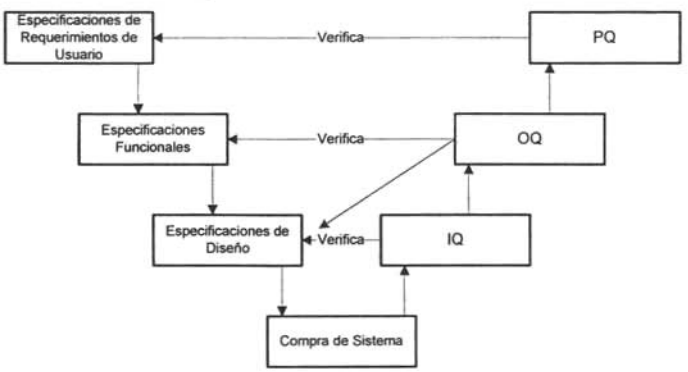


Figura 10. Modelo-V.

Especificación de Requerimientos de Usuario.- describe que es lo que el equipo o sistema debe hacer, y por lo tanto normalmente debe ser escrito por el usuario. El documento de especificación de requerimientos de usuario puede ser enviado a los proveedores como parte del proceso de selección del vendedor. Esta versión debe incluir todos los requerimientos esenciales, y de ser posible prioritizar los requerimientos de configuración deseables[12, 23].

Especificaciones Funcionales.- Este es normalmente escrito por el proveedor y describe las funciones detalladas del equipo o sistema. Una versión inicial de las especificaciones funcionales debe ser producida como parte de la respuesta del proveedor.

Especificaciones de Diseño.- documentan como un sistema es construido.

Compra del Sistema.- Una vez seleccionado el vendedor con base al cumplimiento de los documentos anteriores se compra el sistema.

IQ, OQ, PQ.- El IQ es ligado a las especificaciones de diseño y verifica que el sistema este correctamente instalado y el OQ verifica que opera como es especificado. El OQ también está ligado a las especificaciones funcionales y prueba la operación correcta de todas las funciones especificadas. El PQ está ligado a las especificaciones funcionales del usuario, y verifica que se cumpla con estas[12, 23].

c. Validación del Software

El software de un sistema puede ser analizado y categorizado. Estás categorías del software deben ser evaluadas utilizando la evaluación de riesgos (Risk Assessment) y la evaluación del proveedor, para determinar la estrategia adecuada de validación.

Las categorías son basadas en el incremento del riesgo del sistema para fallar, y se clasifican como sigue:

Categoría 1: Sistemas Operativos.- Sistemas operativos disponibles comercialmente. Las aplicaciones son desarrolladas para correr bajo el control de estos sistemas operativos. Los sistemas operativos establecidos no son sujetos a una validación específica; porque sus características son funcionalmente probadas e indirectamente retadas durante las pruebas de la aplicación. Ejemplos incluyen: UNIX, Windows NT, etc.

Categoría 2: Firmware.- La combinación de un dispositivo de hardware e instrucciones programadas que son almacenadas en una unidad de memoria de solo lectura. La instrumentación y controladores frecuentemente cuentan con un firmware. Ejemplos incluyen: Balanzas, Tituladotes, Potenciómetros, etc.

Categoría 3: Paquetes de Software Estándar: Software comercialmente disponible, paquetes de software estándar, que provee una solución comercial ('off-the-shelf') para un negocio o proceso de manufactura, el paquete no es configurable. Ejemplo incluyen: paquetes de análisis estadístico, software para instrumentos de laboratorio.

Categoría 4: Paquetes de Software Configurable: Los paquetes de software configurables proveen interfaces estándar y funciones que permitan la configuración especifica de los usuarios. Esto involucra la configuración predefinida de los módulos del software y la posibilidad de personalizarlos. Ejemplos de paquetes categoría 4 incluyen los sistemas de control distribuido (DCS), Paquete de Supervisión de control y adquisición de datos (SCADA), Sistemas de ejecución de manufactura (MES) y LIMS.

Categoría 5: Software Personalizado: Estos sistemas son desarrollados de acuerdo a necesidades especificas de una compañía. El desarrollo personalizado puede ser un sistema completo o algún componente adicional de un sistema existente.

La validación de software es realizada por el desarrollador del sistema, siguiendo alguna metodología de ciclo de vida de sistemas[12, 23, 27, 28, 31, 32, 33].

9. Plan de Validación.

En la industria farmacéutica se recomienda ampliamente que la validación sea considerada como parte integral de todos los proyectos apropiados como sea posible para programar y asegurar que las etapas necesarias tienen que ser realizadas durante cada fase del proyecto. Donde la planeación del proyecto, utiliza una metodología de validación de ciclo de vida para sistemas relacionados a computadoras la cual provee las bases para realizar un plan del proyecto de validación.

El propósito de un plan del proyecto de validación es para identificar los sistemas a ser incluidos y el procedimiento a ser seguido en el proyecto de validación especifico. Los procedimientos descritos en el plan del proyecto de validación deben ser consistentes con las políticas establecidas y las referencias apropiadas, PNO. Un propósito importante del plan del proyecto de validación es para establecer responsabilidades específicas y expectativas para cada tarea de la validación.

En esta sección un ejemplo del entorno presentado con las formas pertinentes, hojas de trabajo, e información para asistir en los detalles del proceso de validación presentadas para la implementación de un plan del proyecto de validación.
El formato de la documentación de un plan del proyecto de validación debe ser consistente, propio de cada compañía. Los encabezados y los pies de página deben incluir un espacio para el nombre de la compañía, el nombre del proyecto, fechas, designaciones, números de revisión, números de página, y los nombres de los responsables, departamento, y firmas junto con los nombres de los revisores, departamento, y firmas. Los títulos pertinentes, nombres de prueba, instrucciones, referencias, texto, y comentarios deben ser incluidos en el cuerpo principal de las páginas de los documentos, datos detallados, y resultados de prueba en una manera clara, que es lógica y fácil para leer [12, 24, 34].

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la industria farmacéutica, la función principal del laboratorio de control de calidad, es realizar pruebas y ensayos para acreditar y documentar que un medicamento, cumple con los requisitos y especificaciones establecidas y aprobadas de manera uniforme. Estos resultados obtenidos son confiables, exactos y precisos, si se tiene evidencia documentada de la calificación de equipos, validación de métodos analíticos, pruebas de adecuabilidad del sistema y la verificación del control de calidad, en las pruebas cromatograficas. Estos resultados, permiten elaborar conclusiones sobre la calidad de los productos y servir como base adecuada para cualquier acción administrativa o legal que se deba tomar, de ahí la importancia de confirmar que el sistema de laboratorio que genere estos resultados, demuestre que va a funcionar de acuerdo a especificaciones predeterminadas antes de utilizarlo para su fin destinado.

Por lo anterior, es indispensable el desarrollo y aplicación de una estrategia de calificación a un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución, que incluya las pruebas críticas a ser desarrolladas, para demostrar que el equipo genera resultados confiables, exactos y reproducibles. Por lo que se proponen algunos lineamientos a seguir para llevar acabo la selección adecuada de equipos de cromatografía de líquidos (DQ), que permitan instalar el sistema en el ambiente operativo (IQ), verificar y comprobar que opera cada parte del sistema de manera satisfactoria (OQ) y a partir de estas etapas previas, evaluar el desempeño del sistema total (PQ), mediante la integración de cada parte que compone el sistema, a través del diseño, elaboración y ejecución de protocolos de calificación.

III. HIPOTESIS

Al instalar el sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución en el ambiente operacional, y comprobar que cada módulo opera de acuerdo a especificaciones predeterminadas, al desarrollar una prueba de integración del sistema total (corrida cromatográfica), los resultados generados deben encontrarse dentro de los criterios de aceptación para la reproducibilidad de los tiempos de retención, altura y área del pico; de los estándares de ácido benzoico, metilparabeno y propilparabeno; con lo que se asegura que el sistema genera resultados confiables, exactos y reproducibles.

IV. OBJETIVOS

A. Objetivo General

- Desarrollar la Calificación de un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), para asegurar que el sistema genera resultados confiables, exactos y reproducibles.

B. Objetivos Particulares

- Desarrollar una Estrategia de Calificación de un Sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

- Desarrollar la Calificación de Diseño (DQ), de un Sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución a partir de sus características críticas.

- Desarrollar las pruebas críticas de Calificación de Instalación (IQ), de los componentes del Cromatógrafo de Líquidos de alta Resolución.

- Desarrollar las pruebas críticas de Calificación de Operación (OQ), de los componentes del Cromatógrafo de Líquidos de alta Resolución.

- Desarrollar una prueba que integre el desempeño del sistema total a través de la Calificación de Desempeño (PQ), de los componentes que conforman el Cromatógrafo de Líquidos de alta Resolución.

V. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

A. Tipo de Estudio

1. Comparativo.

El desarrollo y ejecución de pruebas IQ y OQ para software, hardware y módulos del sistema HPLC (cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución), son del tipo comparativo, ya que estás pruebas son enunciados que únicamente son verificados con respecto al diseño y construcción del sistema.

2. Experimental.

El desarrollo y ejecución del OQ y PQ es del tipo experimental, el desarrollo de pruebas y los resultados obtenidos, están comprendidos en un intervalo especifico, pero estos son obtenidos mediante el control de las variables que puedan afectar al desarrollo de una corrida de prueba cromatográfica.

3. Prospectivo.

El desarrollo y colección de datos se va a realizar en los protocolos de prueba que van a ser generados; así mismo, la instalación y operación del sistema va a ser implementada para poder generar datos y evidencia de que el sistema ha sido instalado y opera de acuerdo a especificaciones predeterminadas.

VI. POBLACIÓN:

A. Componentes del Sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

1. Automuestreador 717 Plus

El automuestreador 717 Plus inyecta muestras dentro del sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. El automuestreador, puede ser utilizado como una unidad

estacionaria única o como un componente en un sistema HPLC basado en una interfase IEEE-488.

2. Sistema de Entrega Multisolvente 600E

El modulo Waters 600E, es un sistema de entrega multisolvente para cromatografía de líquidos de alta resolución. Su función principal es el mezclado de las fases o eluentes colocados en el reservorio, y va a proporcionar el movimiento de la muestra dentro del sistema para su separación y cuantificación.

3. Detector de Absorbancia 2487 doble λ.

El Detector de absorción Waters 2487 doble λ, es un detector ultravioleta/visible (UV/Vis) ajustable de dos canales diseñado para aplicaciones de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). El Detector de absorción Waters 2487 doble λ funciona de 190 a 700 nm.

4. Software Millenium^{32} Versión 3.20

El software Millenium^{32} ofrece una interfaz gráfica basada en iconos para adquirir, procesar, administrar y presentar los datos cromatográficos de la base de datos Millenium^{32}. El software millenium^{32} es compatible con windows 98 y windows NT. El sistema windows permite tener abiertas varias ventanas al mismo tiempo. El sistema windows y multitarea le permiten ver la adquisición de datos de un ciclo de análisis en tiempo real mientras se calculan los resultados de los datos adquiridos anteriormente, o se ajustan los parámetros de integración de cualquier inyector anterior.

5. Hardware del Sistema de Cómputo.

El sistema de cómputo está formado por un ordenador que ejecuta el software Millenium^{32} y la base de datos Millenium^{32}. La configuración del hardware es una estación de trabajo.

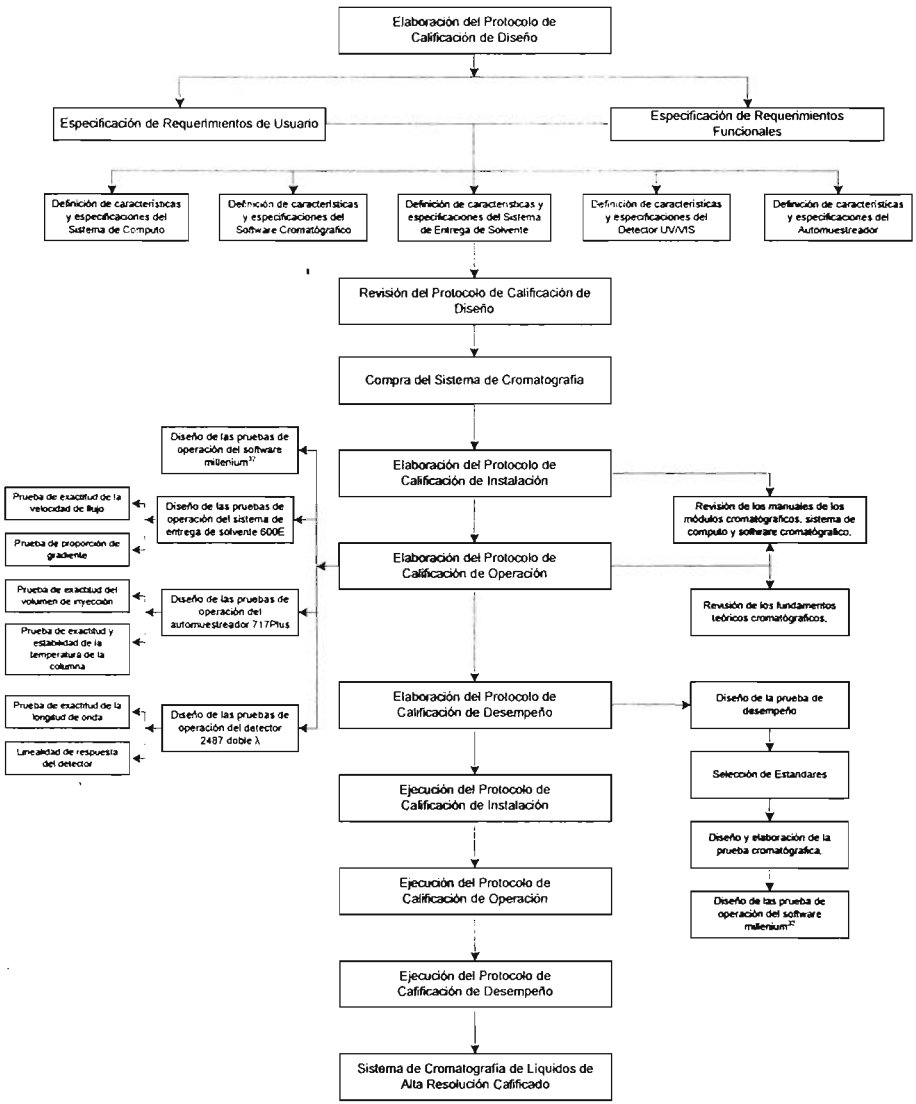
La estación de trabajo Millenium^{32} es un ordenador personal de uso individual e independiente. Incluye una tarjeta de interfase busLAC/TM, una tarjeta de interfase de 8 puertos en serie y/o puerto COM y una base de datos local que soporta el software de aplicación cromatografica Millenium^{32}.

La estación de trabajo incluye:

- Ordenador PentiumTM Millenium^{32} (incluye la tarjeta busLAC/E Waters, la tarjeta con 8 puertos en serie, y/o un puerto COM).
- Software de Aplicación Millenium^{32}.
- Sistema Operativo Windows NT.

La tarjeta busLAC/E es un microprocesador basado en una tarjeta de interfase que permite al software Millenium^{32} para comunicar con los instrumentos cromatograficos. La tarjeta transmite los comandos del software Millenium^{32}, para los detectores, automuestreadores, bombas, y otro aparatos que tienen conexión IEEE-488. Los datos de los módulos son trasmitidos a través de la tarjeta busLAC/E a la computadora para su análisis.

VII. METODOLOGÍA



VIII. RESULTADOS

Los resultados para la calificación del cromatógrafo de líquidos de alta resolución son organizados de la siguiente manera:

En el apéndice II se presenta el documento generado para la Calificación del Diseño del Cromatógrafo, donde se describen los requerimientos de usuario y algunas especificaciones funcionales y operaciones del equipo.

En el apéndice III se presenta el documento generado para la Calificación de Instalación del Cromatógrafo, donde se documento la recepción del sistema, sitio de instalación, conexiones e identificación de los componentes del sistema de cromatografía de líquidos.

En el apéndice IV se presenta el documento generado para la Calificación de Operación del Cromatógrafo, donde se documentaron las pruebas de encendido e inicio de cada uno de los módulos cromatográficos y las pruebas operativas requeridas para verificar su funcionamiento.

En el apéndice V se presenta el documento generado para la Calificación de Desempeño del Cromatógrafo, donde se documentaron las pruebas operativas realizadas al software cromatógrafico y la prueba de desempeño del equipo.

A continuación se resumen los resultados más relevantes de los protocolos de calificación:

A. Calificación de Instalación

Tabla 3. Resumen de resultados de las pruebas de calificación de instalación del sistema de cromatografía.

Referencia de Prueba	Prueba	Criterio de Aceptación	Resultado
3.	Recepción del sistema.	Los componentes del sistema HPLC se encuentran sin daño físico, completas y de acuerdo a las características previstas.	*Cumple*
4.	Requerimientos del sitio de instalación.	Cumple con lo requerimientos del sitio de instalación, ambientales, eléctricos y servicios.	*Cumple*
5.	Verificación de la instalación de las conexiones del sistema.	Los componentes del sistema HPLC están instalados con base en el cumplimiento de los criterios de aceptación.	*Cumple*
6.	Identificación de los componentes del sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución.	Documentación de las características de diseño e identificación de los componentes del sistema de entrega multisolvente 600E, 2487 doble λ, automuestreador 717Plus y el sistema de computo.	*Cumple*

B. Calificación de Operación

Tabla 4. Resumen de resultados de las pruebas de calificación de operación del sistema de cromatografía.

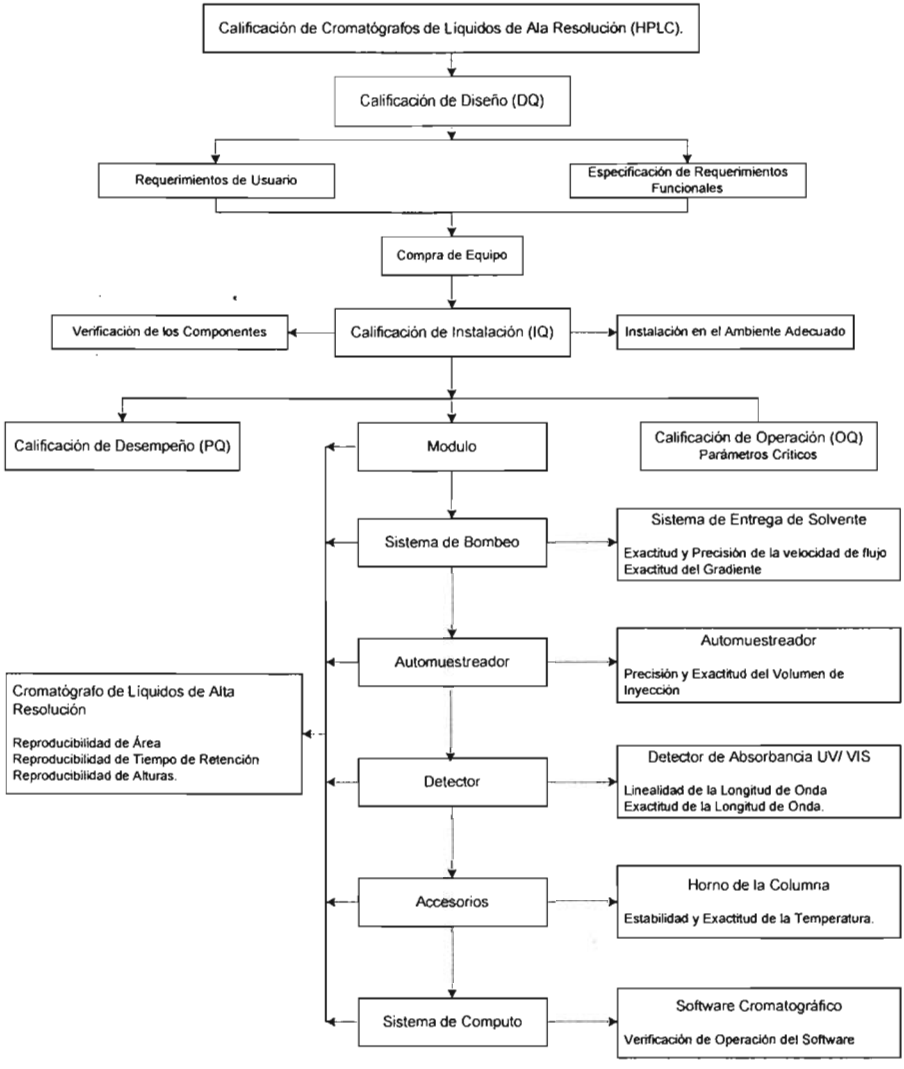
Referencia de Prueba	Prueba	Criterio de Aceptación	Resultado
2.	Prerrequisitos.	Los componentes del sistema HPLC deben estar instalados de acuerdo a los criterios de aceptación.	*Cumple*
3.1	Inicio del software millenium[32].	El software inicia correctamente al ingresar a la aplicación y revisar la configuración de los instrumentos cromatográficos.	*Cumple*
4.1	Encendido del sistema de entrega multisolvente 600E.	El modulo inicia correctamente mediante el encendido y desarrollo de los autodiagnósticos de rutina.	*Cumple*
4.3	Prueba de exactitud de la velocidad de flujo.	Exactitud de la velocidad de flujo 1) 0.25 ± 0.0025mL/ min. 2) 1.0 ± 0.01mL/ min. 3) 2.5 ± 0.025mL/ min. 4) 5 ± 0.05mL/ min.	Velocidad de flujo 1) 0.2515 2) 1.0095 3) 2.469 4) 5.043 *Cumple*
4.4	Prueba de Proporción de Gradiente.	Proporción de Gradiente 1) (Etapa inicial) 100% 2) (Etapa 1) 80 ± 2% 3) (Etapa 2) 60 ± 2% 4) (Etapa 3) 40 ± 2% 5) (Etapa 4) 20 ± 2% 6) (Etapa 5) 0 ± 2%	Líneas A/B Líneas C/D 1) 100% 1) 100% 2) 81.7% 2) 81.6% 3) 61.4% 3) 61.5% 4) 41.7% 4) 41.8% 5) 21.1% 5) 21.2% 6) 0.19% 6) 0.17% *Cumple* *Cumple*
5.1	Encendido del Automuestreador 717Plus.	El modulo inicia correctamente mediante el encendido y desarrollo de los autodiagnósticos de rutina.	*Cumple*
5.2	Prueba de exactitud del volumen de inyección.	Exactitud de la inyección 1) 25µL ± 0.5µL 2) 50µL ± 1.0µL 3) 100µL ± 2.0µL	Exactitud de la inyección 1) 25.34µL 2) 50.62µL 3) 100.95µL *Cumple*
		Precisión de la inyección 4) 25µL < 0.5% CV 5) 50µL < 0.5% CV 6) 100µL <0.5% CV	Precisión de la inyección 4) 0.43% CV 5) 0.35% CV 6) 0.37% CV *Cumple*
5.3	Prueba de exactitud y estabilidad de la temperatura.	Exactitud de la temperatura 1) 15 ± 1° C. 2) 25 ± 1° C. 3) 40 ± 1° C.	Exactitud de la temperatura 1) 15.32° C 2) 25.20° C 3) 40.22° C *Cumple*
		Estabilidad de la temperatura 1) 15 ± 0.5° C. 2) 25 ± 0.5° C. 3) 40 ± 0.5° C.	Estabilidad de la temperatura 1) 15.38° C 2) 25.33° C 3) 40.36° C *Cumple*
6.1	Encendido del detector 2487 doble λ.	El modulo inicia correctamente mediante el encendido y desarrollo de los autodiagnósticos de rutina.	*Cumple*
6.4	Prueba de exactitud de la longitud de onda.	Exactitud de la longitud de onda del propilparabeno 256 ± 2nm	257nm *Cumple*
6.5	Linealidad de respuesta del detector.	Linealidad de respuesta < 5% CV de la Sensibilidad	2.81% CV *Cumple*

C. Calificación de Desempeño

Tabla 5. Resumen de resultados de las pruebas de calificación de desempeño del sistema de cromatografía.

Referencia de Prueba	Prueba	Criterio de Aceptación	Resultado
2.	Prerrequisitos.	Los componentes del sistema HPLC deben estar correctamente instalados y las pruebas operativas cumplen las especificaciones.	*Cumple*
3.	Operación del software millenium[32].	El software cromatógrafico millenium[32], crea un proyecto, un método de instrumento, una secuencia de muestras, un método de proceso, genera y diseña informes, respalda y recupera información cromatográfica y genera un audit trail (registro de modificaciones).	*Cumple*
4.	Pruebas de desempeño del sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución.	Estándar ácido benzoico Precisión del tiempo de retención % CV ≤ 1.0 Precisión de las áreas del pico % CV ≤ 1.0 Precisión de la altura del pico % CV ≤ 1.0	Estándar ácido benzoico Precisión del tiempo de retención 0.1% CV Precisión de las áreas del pico 0.2% CV Precisión de la altura del pico 0.2% CV *Cumple*
		Estándar de metilparabeno Precisión del tiempo de retención % CV ≤ 1.0 Precisión de las áreas del pico % CV ≤ 1.0 Precisión de la altura del pico % CV ≤ 1.0	Estándar de metilparabeno Precisión del tiempo de retención 0.1% CV Precisión de las áreas del pico 0.2% CV Precisión de la altura del pico 0.4% CV *Cumple*
		Estándar de propilparabeno Precisión del tiempo de retención % CV ≤ 1.0 Precisión de las áreas del pico % CV ≤ 1.0 Precisión de la altura del pico % CV ≤ 1.0	Estándar de propilparabeno Precisión del tiempo de retención 0.1% CV Precisión de las áreas del pico 0.6% CV Precisión de la altura del pico 0.2% CV *Cumple*

D. Estrategia de Calificación de un Sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.



IX. ANALISIS DE RESULTADOS

La calificación de equipos de laboratorio es una parte importante e integral para asegurar que un equipo o instrumento se desempeña consistentemente durante su uso, ya que para obtener resultados con un alto grado de aseguramiento de calidad, se debe contar con equipos calificados, métodos analíticos validados, pruebas de adecuabilidad del sistema y verificación del control de calidad.

En la presente tesis fue realizada cada una de las cuatro etapas de la calificación, desde el DQ (*Desing Qualification,* Calificación de Diseño), donde se especificaron los requerimientos de usuario y los requerimientos funcionales/operacionales del sistema HPLC, la intención del DQ es asegurar la selección y compra adecuada de un equipo de acuerdo a los requerimientos de las compañías (cabe señalar que el equipo ya había sido comprado, (ver apéndice II, Protocolo de Calificación de Diseño).

Posteriormente, se realizó el IQ (Installation Qualification, Calificación de la instalación), desde el desarrollo hasta la ejecución del protocolo respectivo en el cual se verifico que los componentes del sistema HPLC están completos, sin daños físicos visibles y comparados contra el diseño original (Ver tabla 3, referencia de prueba 3 y 6). Por otro lado, se realizó la evaluación de las condiciones del sitio de instalación, cabe señalar que el sistema ya se encontraba instalado (ver tabla 3, referencia de prueba 4). Finalmente se verificó que las conexiones y servicios relacionados con el sistema, se encontraran instalados de acuerdo con el proveedor/fabricante, para cumplir con los criterios de aceptación para su correcta operación (ver tabla 3, referencia de prueba 5).

Por otro lado las pruebas realizadas en el OQ (*Operational Qualification*, Calificación de Operación) a cada componente del sistema HPLC, fueron realizadas comenzando con la respuesta inicial (encendido), con la finalidad de verificar y asegurar que cada modulo desarrolla el reconocimiento del sistema y los autodiagnósticos de rutina, según lo especificado por el fabricante, como parte de su buen funcionamiento (Ver tabla 4, referencia de prueba 4.1, 5.1 y 6.1. Una vez realizadas estas pruebas se procedió a realizar la prueba de exactitud de la velocidad de flujo en el sistema de entrega multisolvente 600E, en la cuál se encontró que la bomba provee los caudales de fase móvil requeridos de manera exacta y precisa, contra la selección realizada en el controlador del sistema de entrega multisolvente (ver tabla 4, referencia de prueba 4.3).

Así mismo, para este módulo se realizó la prueba de exactitud de gradiente, donde se comprobó, que las cuatro líneas del sistema de entrega de solvente, son capaces de proporcionar una mezcla de solventes de manera gradual, en un intervalo definido de tiempo (ver tabla 4, referencia de prueba 4.4).

Estás pruebas son críticas para evaluar la correcta operación del módulo de entrega de solvente ya que puede afectar la reproducibilidad de los tiempos de retención en los resultados cromatográficos finales.

Para el Automuestreador 717Plus se realizó la prueba de exactitud y precisión del volumen de inyección, para verificar que el inyector es capaz de introducir los volúmenes de muestra seleccionados por el usuario, de manera exacta y reproducible, obteniendo resultados que comprueban su operación adecuada (ver tabla 4, referencia de prueba 5.2).

Para el horno de la columna, que por lo regular es un módulo individual, pero en este caso, el horno de la columna se encuentra como parte del diseño del sistema de entrega multisolvente 600E: la prueba realizada en este componente se fundamenta en verificar la exactitud y estabilidad de la temperatura. Los resultados encontrados demuestran que el horno de la columna es capaz de operar en la temperatura seleccionada por el usuario (ver tabla 4, referencia de prueba 5.3).

Una operación defectuosa del modulo de inyección de muestras puede afectar el área y la altura de los picos cromatográficos, mientras que una exactitud pobre y mala estabilidad de la temperatura del horno de la columna puede afectar los tiempos de retención y estabilidad de la muestra

Por ultimo, en el detector 2487 doble λ, fueron desarrolladas las siguientes pruebas, la prueba de exactitud de la longitud de onda y la prueba de linealidad del detector.

Para la primera prueba se realizó un barrido de 190 a 600nm, utilizando un estándar de (propilparabeno), de propiedades bien definidas, con la finalidad de comprobar, la desviación de la lectura de la longitud de onda en una banda de emisión o absorción de la longitud de onda de una banda conocida, de las sustancias que puedan ser detectadas por está propiedad (ver tabla 4, referencia de prueba 6.4).

Por otro lado, para la prueba de linealidad se utilizó el propilparabeno a diferentes concentraciones, para verificar que el detector es capaz de detectar el analito de interés a diferentes concentraciones y ser capaz de producir una respuesta lineal con respecto a la variación de la concentración dentro de un rango (ver tabla 4, referencia de prueba 6.5).

Con el desarrollo de estás pruebas se reto y comprobó que el detector opera de acuerdo a los criterios de aceptación, y que la exactitud del área del pico y altura del pico, no se verán afectadas por la operación del detector.

Para la parte del sistema de cómputo del HPLC, en la etapa de calificación de operación solo se realizó la prueba de verificación del encendido inicial y verificación de la configuración de los módulos cromatográficos (ver tabla 4, referencia de prueba 3.1). Y como parte, del PQ (Performance Qualification, Calificación de Desempeño), se realizó la creación y desarrollo de una corrida cromatográfica, para verificar la correcta operación del software cromatográfico millenium[32] (Ver tabla 5, referencia de prueba 3); cabe señalar que el software es validado por el proveedor, ya que todas las funciones y operación del software son validadas durante las fases de desarrollo del software, por lo que es requerido la entrega de un certificado de validación del software por parte del fabricante. Sin embargo, en el sitio usuario solo se verifico que efectivamente el software "*haga lo que dice que hace*", de manera general.

Así mismo, en la Calificación de Desempeño (PQ), se realizó una corrida cromatográfica en gradiente con tres estándares (ácido benzoico, metilparabeno y propilparabeno), para evaluar la integración y desempeño del sistema completo, a través de la reproducibilidad de los parámetros: tiempos de retención, altura del pico y área del pico, para cada uno de los analitos en estudio, comprobando que el desempeño del sistema cumple con los criterios de aceptación y que el sistema HPLC es capaz de generar resultados confiables, exactos y reproducibles (ver tabla 5, referencia de prueba 4).

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Cabe mencionar que cada una de las pruebas y verificaciones realizadas en las etapas de calificación, son propuestas basadas en los fundamentos teórico-científicos, prácticas de proveedores y de manera general las prácticas que son desarrolladas en la industria farmacéutica.

Es importante mencionar que solo se hizo referencia al resumen de los resultados de las pruebas más relevantes de la calificación del cromatógrafo, por su mayor sencillez y comprensión, sin embargo, en los protocolos de calificación se presenta cada una de los procedimientos, condiciones y resultados de cada una de las pruebas de manera específica.

X. CONCLUSIONES

El objetivo general de esta tesis fue desarrollar la calificación de un cromatógrafo de líquidos de Alta Resolución (HPLC), y desarrollar una estrategia de calificación para un sistema HPLC, ya que es una práctica que no se realiza usualmente en la mayor parte de la industria farmacéutica de México y es un tema que no es contemplado en los estudios de licenciatura de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo.

La calificación de equipos es un concepto general que difícilmente puede resumirse en un procedimiento único y general, por lo que el grado de calificación requerido varía dependiendo el tipo de equipo, su complejidad y el proceso en el cuál está involucrado; en el presente trabajo se proporciona un propuesta de calificación de un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución, sin embargo, el grado de calificación, no es limitativo al descrito.

Por otro lado, los resultados de prueba obtenidos desde el diseño de protocolos de calificación, hasta la realización de las actividades descritas en cada etapa de la calificación DQ, IQ, OQ y PQ; fueron considerados los aspectos críticos a ser incluidos, realizando la instalación del sistema HPLC en el ambiente operacional y comprobar que cada módulo del sistema opera de acuerdo a especificaciones predeterminadas.

La propuesta (estrategia) presentada para la calificación del sistema de cromatografía de manera general, describe los aspectos críticos a ser evaluados para verificar y comprobar el buen funcionamiento del equipo.

Por otro lado, la hipótesis propuesta es correcta ya que a través de realizar la instalación del sistema en el ambiente operacional, y al comprobar que cada módulo opera dentro de especificaciones predeterminadas. Al desarrollar una prueba de integración del sistema total (corrida cromatográfica), se encontró que los resultados de prueba están dentro de los criterios de aceptación, para la reproducibilidad de los tiempos de retención, altura del pico y área del pico, con lo que se asegura que el sistema genera resultados confiables, exactos y reproducibles.

XI. RECOMENDACIONES

1) La calificación de equipos analíticos es un concepto que ha evolucionado en la industria farmacéutica mexicana y actualmente el nuevo proyecto de norma PROY-NOM-059-SSA1-2003, incluye algunos lineamientos y requerimientos para la calificación de equipo, instalaciones, sistemas críticos y computacionales, que impacten la calidad de los productos, (calificación de diseño, instalación, operación y desempeño). Ya que en la revisión vigente de la norma este proceso está enfocado al área de producción (fabricación de medicamentos) y no al área de laboratorio (análisis de medicamentos). Esto quiere decir, que también los estudiantes de la carrera de QFB, deben contar próximamente con los conceptos generales sobre calificación de equipos, ya que en la industria será ahora un nuevo requerimiento regulatorio.

2) La calificación de equipos ayuda a comprobar y documentar el buen funcionamiento operacional de un equipo, para tener la certeza de que genera datos confiables, exactos y reproducibles a través de su uso. Sin embargo, se deben de tener en cuenta otros factores como son el mantenimiento y/o calibración, control de cambios, reporte de problemas y re-calificación de los equipos, para mantener el estado calificado de un equipo.

3) La etapa de calificación de diseño es realizada para verificar que es lo que requiere que el sistema haga, y que consideraciones técnicas deben ser oportunamente visualizadas, el éxito en la compra de un equipo para los fines requeridos radica en la evaluación y compra acertada. Para el caso de la presente tesis, la calificación de diseño fue desarrollada como un ejemplo, ya que el sistema de cromatografía se encontraba dentro del laboratorio.

4) Para la prueba de estabilidad de temperatura se coloco la sonda de un termohigrógrafo patrón para el monitoreo de la temperatura, sin embargo, lo ideal al desarrollar esta prueba es utilizar un sistema de monitoreo de temperatura, a través del uso de termopares calibrados y distribuidos dentro del compartimiento de la columna, de está manera los resultados son más confiables y exactos.

5) En algunos artículos de divulgación científica se especifica realizar la prueba de señal-ruido para el detector, sin embargo, está prueba es considerada como parte de la validación del método analítico para el analito de interés, por eso no fue realizada en el OQ. Sin embargo, puede ser realizada dentro de este.

XII. REFERENCIAS

1. Skoog D. Análisis Instrumental. Madrid: McGraw-Hill, 1994: 674- 675.
2. Dabrioyco M. Cromatografía y Electroforesis en Columna. Barcelona: Springer-Velarg Iberica, 2000: 2-6.
3. Weston A, Brown PR. HPLC and CE Principles and Practice. USA: Academic Press, 1997: 71-95.
4. Hanai T. HPLC A Practical Guide. Kyoto: Series Editor Roger M. Smith, 1999: 11-15.
5. Dolan J. Autosamplers, Part I Desing Features. LCGC Europe 2001: 2-5.
6. Hinshaw JV. Anatomy of a Peak. LCGC Europe 2004; 4: 2- 7.
7. Dolan JW. System Suitability. LCGC North America 2004; 22: 432- 435.
8. Sigvardson KW, Manalo JA, Roller RW, Saless F, Wassrman D. Laboratory Equipment Qualification. Pharmaceutical Technology 2001; 10: 102-108.
9. Guía Sobre la Calificación de Equipos e Instrumentos Analíticos. CENAM 2004: 1-21. Vinculo disponible en: http://www.cenam.mx/
10. Bansal KS, Layloff Th, Bush ED, Hamilton M, Hankinson AE, Landy SJ, Lowes S, Nasr MM, Jean PA, Shah PV, Qualification of Analytical Instruments for Use in the Pharmaceutical Industry: A Scientific Approach. AAPS PharmSciTech 2004; 5: 1-8.
11. NOM-059-SSA1-1993, Buenas Prácticas de fabricación para Establecimientos de la Industria Químico Farmacéutica Dedicados a la Fabricación de Medicamentos.
12. Good Laboratory Practice and Current Good Manufacturing Practice. Agilent Technologies 2002: 37- 38, 40- 41, 45- 49, 53- 62, 77- 81. Vinculo disponible en : http://www.agilent.com/
13. Willing S, Stoker J. Good Manufacturing Practices Pharmaceuticals. New York: Marcel Dekker, 1992: vol 52: 49- 60.
14. Weinberg S. Good Laboratory Practice Regulations. New York: Marcel Dekker, 1995: vol 69: 60-62.
15. Operacional and Performance Qualification. LCGC North America 2002; 20: 356-362.
16. Dolan JW. Performance Qualification of LC Systems. LCGC North America 2002; 20: 842- 848.
17. Automated Qualification of HPLC Equipment. Agilent Technologies, Inc. USA. 2000. Vínculo disponible: http://www.agilent.com/
18. Maxwell WB. Using Advanced Qualification Technologies to Meet the Changing Landscape of Regulatory Compliance. Journal Validation Technology 2002; 8: 343-351.
19. Waters Breeze Software Automated System Performance Monitoring. Waters Corporation. USA. 2000. Vinculo disponible en : http://www.waters.com/
20. Testing Gradient Performance, A Gradient Test Mix for Characterizing Instrument Performance. Waters Corporation. USA. 1998. Vinculo disponible en : http://www.waters.com/
21. Waters Alliance System, Achúrate and Reproducible Automated Solvent Blending. Waters Corporation. USA. 2003. Vinculo disponible en : http://www.waters.com/
22. Gradient Proportioning Valve Test Predicts Performance, Definitive Measurement for Gradient Performance. Waters Corporation. USA. 1998. Vinculo disponible en : http://www.waters.com/
23. GAMP 4 "Good Automated Manufacturing Practice". Guide for Validation of Automated Systems. ISPE 2001: 19- 25.

24. Gent Ch. A System Developer's approach to Validation. Pharmaceutical Technology 2002; 7: 62- 73.
25. Neal Ch. Prerequisites for Successful Validation. Journal Validation of Technology 2003; 9: 240-245.
26. Hoffmann A, Kahny-Simonius Jacqueline, Plattner M, Schmidli-Vckovski V, Kronseder Ch. Computer System Validatión: An overwiew of official requirements and standards. Pharmaceutical Acta Helvetie 1998; 72: 317-325.
27. Budihandojo R, Bergeson DJ, D'Eramo P, Huber L, Lopez O, Perez A, Selby D, Wingate G, Wyrick M. The Future State of Computer Validation, Part I. Pharmaceutical Technology 2001; 7: 86-93.
28. Budihandojo R, Bergeson DJ, D'Eramo P, Huber L, Lopez O, Perez A, Selby D, Wingate G, Wyrick M. The Future State of Computer Validation, Part II. Pharmaceutical Technology 2001; 9: 50-60.
29. Lucas I. Testing Times in Computer Validation. Journal of Validation Technology 2003; 9: 153-159.
30. Guide to Inspection of Computerized Systems in Drug Processing. FDA 1983.
31. Berry I, Nash R. Pharmaceutical Process Validation. New York: Marcel Dekker, Brower GN. Validation of Commercial-off-the Shelf (COTS) Software. Journal of Validation Technology 1999; 5: 318-323.
32. Despautz J. Automation and Validation of Information in Pharmaceutical Processing. New York: Marcel Dekker, 1993: vol 90: 221-232.
33. Lloyd K. A Guide to 21 CFR 11 Compliance. Contract Pharma 2001: 1-23.
34. Weinberg S. Good Laboratory Practice Regulations. New York: Marcel Dekker, 1995: vol 69: 60-62.
35. Brower GN. Independent Verification and Validation of Software. Journal of Validation Technology 1996; 1: 38-43.
36. Flarakos J, Swartz EM. Analytical Validation Software. LCGC North America 2001; 19: 304- 310.
37. Glossary of Computerized System and Software Development Terminology. FDA.
38. Guía Técnica Sobre Trazabilidad e Incertidumbre en las Mediciones Analíticas que Emplean las Técnicas de Cromatografía de Gases (GC) y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR). EMA 2004: 13-22, 49-51. Vinculo disponible en: http://www.ema.org.mx/index1024.htm

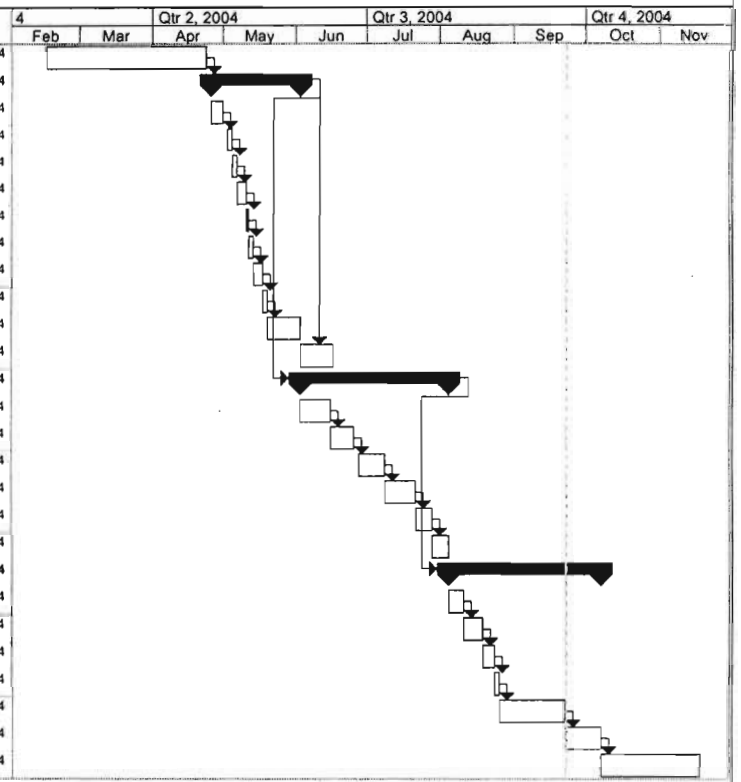
XIII. APÉNDICES

APÉNDICE I: CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.

Cronograma de Actividades

Calificación de un Sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, Como Parte del Aseguramiento de Calidad de los Medicamentos.

ID	Nombre de tarea	Duration	Start
1	Investigación Bibliografica	50 days	Mon 16/02/04
2	**Elaboración del Anteproyecto de Tesis**	**28 days**	**Mon 26/04/04**
3	Compilación de Información en el Marco Teorico	5 days	Mon 26/04/04
4	Elaboración de Objetivos	2 days	Mon 03/05/04
5	Elaboración de Hipotesis	2 days	Wed 05/05/04
6	Diseño Experimental	2 days	Fri 07/05/04
7	Cronograma de Actividades	1 day	Tue 11/05/04
8	Planteamiento del Problema	2 days	Wed 12/05/04
9	Introducción y Titulo de la Tesis	2 days	Fri 14/05/04
10	Referencias	2 days	Tue 18/05/04
11	Revisión del Anteproyecto	10 days	Thu 20/05/04
12	Registro de Tema de Tesis	10 days	Thu 03/06/04
13	**Calificación del Sistema HPLC**	**45 days**	**Thu 03/06/04**
14	Elaboración de Protocolos de Calificación de Diseño	9 days	Thu 03/06/04
15	Elaboración de Protocolos de Calificación de Instalación	8 days	Wed 16/06/04
16	Elaboración de Protocolos de Calificación de Operación	9 days	Mon 28/06/04
17	Elaboración de Protocolos de Calificación de Desempeño	9 days	Fri 09/07/04
18	Desarrollo de Pruebas de Calificación al Sistema HPLC	5 days	Thu 22/07/04
19	Desarrollo de Estrategia de Calificación de Sistemas HPLC	5 days	Thu 29/07/04
20	**Resultados**	**46 days**	**Thu 05/08/04**
21	Revisión de Resultados	4 days	Thu 05/08/04
22	Analisis de Resultados	6 days	Wed 11/08/04
23	Conclusiones	3 days	Thu 19/08/04
24	Resumen de Tesis	2 days	Tue 24/08/04
25	Escritura final de la tesis	20 days	Thu 26/08/04
26	Revisión Final de la Tesis	11 days	Thu 23/09/04
27	Entrega de Tesis a la Secretaria Técnica de Carrera de QFB	30 days	Fri 08/10/04



APENDICE II. PROTOCOLO DE CALIFICACIÓN DE DISEÑO

[redacted]

Protocolo de Calificación de Diseño

Sistema:	Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución		
Marca:	Waters	**Revisión:**	1.0
Fecha:	07/Agosto/2004	**Paginas Totales:**	9
Realizado por:	Juan Luis García Guzmán	**Revisado por:**	Ramón Rodríguez Hernández

Tabla de Contenido

1. INTRODUCCIÓN 3
   1.1 Proposito 3
   1.2 Alcance 3
   1.3 Definiciones 3

2. USO DEL SISTEMA Y DESCRIPCIÓN 4

3. ESPECIFICACIONES DE REQUERIMIENTOS DE USUARIO 5
   3.1 Consideraciones Generales 5

4. ESPECIFICACIÓN DE REQUERIMIENTOS FUNCIONALES Y/O OPERACIONALES 6
   4.1 Sistema de Entrega de Solventes 6
   4.2 Automuestreador 7
   4.3 Detector UV/VIS 8
   4.4 Software Cromatografico 9

1. INTRODUCCIÓN

La calificación de diseño (DQ) es parte de la planeación del Proceso de Calificación de equipos, y es enfocado frecuentemente, como parte del proceso de compra de un nuevo equipo. Actualmente la calificación de diseño del equipo es responsabilidad de los fabricantes de equipos, los usuarios de los equipos, quienes tienen un rol importante en el DQ, para asegurar la admisión de una nueva especificación de requerimientos de usuario, la cual debe satisfacer el uso pretendido.

1.1. Propósito

El propósito de este documento es definir los requerimientos del usuario y las especificaciones funcionales, para definir la arquitectura, componentes e interfases y otras características del sistema o componentes, para la selección de un Sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

1.2. Alcance

El sistema Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución de acuerdo a sus características debe ser capaz de interactuar adecuada y fácilmente, con el usuario final, para el control de calidad de los medicamentos.

1.3. Definiciones

Termino	Definición
Software de Aplicación	El software de aplicación es definido como configurable y que ha sido desarrollado para un propósito general como solución computarizada y los elementos del sistema operativo asociado para un uso particular o aplicación.
Hardware	Es un término usado para describir los componentes de computadora, CPU y equipos periféricos tal como impresoras, equipo de comunicación, etc.
Calificación de Instalación	La Calificación de Instalación es una actividad de verificación documentada para proveer evidencia que todos los aspectos críticos de la instalación del sistema se encuentran acorde a las especificaciones de hardware y software, servicios y requerimientos eléctricos, provee recursos y soporte satisfactoriamente.
Calificación de Operación	La Calificación de Operación es una actividad de verificación documentada para proveer evidencia que el software y el hardware instalado es configurado y funciona de acuerdo con las especificaciones de fabricación.
Software	Software, en general, es la colección de programas, rutinas, y subrutinas que controlan la operación de una computadora o sistema computarizado.
Sistema	Un sistema es definido como la colección de componentes de hardware y software para el control de una función o serie de funciones, para el control de proceso en tiempo real o administración de la información. Está constituido, por una colección de componentes comúnmente.
Equipo	Instrumentos de medición analítica, que en conjunto con el firmware, es montado para desarrollar un proceso mecánico, para producir un resultado. En un sistema

	computarizado, el equipo es controlado por el sistema de computadora. La computadora colecta los datos medidos por el equipo.
Instrumento	Un aparato (químico, eléctrico, mecánico, magnético, hidráulico, óptico) usado para probar, observar, medir, monitorear, generar, registrar, calibrar, administrar, o controlar propiedades físicas, movimientos u otras características. Es decir, este aparato toma una medida física y muestra un valor en pantalla y no tiene una función analítica. Por ejemplo, cronómetros, controladores de tiempo y termómetros.

2. USO DEL SISTEMA Y DESCRIPCIÓN

El cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución será utilizado para el análisis rutinario de medicamentos, como parte del aseguramiento de la Calidad. El sistema debe ser controlado por un sistema de cómputo, funcionar adecuadamente para realizar análisis en modo isocrático y gradiente y la detección estándar debe operar dentro del rango UV. La adquisición, procesamiento y reporte de los datos, es requerido como parte de las GLP, que rigen la industria farmacéutica.

3. ESPECIFICACIONES DE REQUERIMIENTOS DE USUARIO.

3.1. Consideraciones Generales.

Parámetro	Característica
Control y Configuración del Sistema	• Sistema modular. • Compatibilidad entre módulos (mismo fabricante). • Configuración y Control de las condiciones de operación y parámetros, a través del software. • Adquisición de datos, proceso y presentación de datos.
Introducción y colocación de muestras	• Inyección de muestras automático/ auto lavado del inyector. • Introducción y colocación de muestras manual.
Materiales de Construcción	• Resistencia a la corrosión y contaminación. • Inerte a solventes y muestras.
Documentación	• Clara y fácil de usar, la documentación consiste de: Manuales de operación, calibración, mantenimiento y limpieza, etc. • Identificación de los documentos único, por número de revisión y fecha de emisión.
Requerimientos de servicios, energía y espacio	• Requerimientos de energía eléctrica de acuerdo al voltaje del área de instalación (110 ± 10V AC), sistema de tubería y contenedor de desechos (solventes), dimensiones del sistema total (130cm largo x 90cm de ancho).
Soporte y Mantenimiento	• Facilidad al realizar el mantenimiento y limpieza. • Costo y disponibilidad de piezas y partes. • Costo y disponibilidad de proveedores de servicio y soporte técnico. • Intervalos sugeridos y procedimientos de mantenimiento y calibración para el sistema. • Periodo de garantía y soporte (Calificación, mantenimiento, calibración, partes reemplazables, etc.).
Requerimientos de Entrenamiento	• El nivel de entrenamiento requerido para operar el sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución y detalles de algún entrenamiento necesario y cursos realizados por el proveedor.
Condiciones Ambientales	• Las condiciones ambientales deben ser adecuadas, dentro de los rangos de operación de los módulos. o Temperatura: 4 a 40° C. o Humedad Relativa: Máxima 80% HR.
Seguridad	• Seguridad y cuestiones ambientales y/o requerimientos.

4. ESPECIFICACIÓN DE REQUERIMIENTOS FUNCIONALES Y/O OPERACIONALES.

4.1. Sistema de Entrega de Solventes.

Parámetro	Característica	Especificación
Especificaciones generales del Sistema de Entrega Multisolvente	▪ Número de Eluentes	1 a 4.
	▪ Modos de Operación	Gradiente, Isocrático y flujo programable.
	▪ Rango de flujo de operación	0.00 a 20.0 mL/min.
	▪ Rango de composición de gradiente	Programable de 0 a 100%, en incrementos de 1%, para cada reservorio.
	▪ Presión Máxima	6000psi (420Kg/cm^2) a 10mL/min.
	▪ Perfiles de Gradiente	11 curvas de gradiente
	▪ Límites de Presión Programables	Bajo: 0 a 5950psi (0 a 420Kg/cm^2). Alto: 51 a 6000psi (3.6 a 420Kg/cm^2).
	▪ Materiales	Acero inoxidable 316, rubí, zafiro, polímero de fluorocarbono.
	▪ Compatibilidad con eluentes	Compatible con los eluentes de acuerdo con los materiales de construcción.
Especificaciones Ambientales	▪ Temperatura de funcionamiento	De 4 a 40 ° C.
	▪ Humedad de funcionamiento	De 20 a 80%, sin condensación
Especificaciones Eléctricas	▪ Frecuencia	50 a 60HZ.
	▪ Voltaje	100 a 240Vca.
Dimensiones	▪ Dimensiones de la bomba (Alto, largo y Ancho).	24.4x 52.1x 28.3cm.
	▪ Dimensiones del Controlador (Alto, largo y Ancho).	18.3x 55.3x 28.8cm.

4.2. Automuestreador

Parámetro	Característica	Especificación
Especificaciones generales del Automuestreador	▪ Rango de Volumen de Inyección	0.1 µL a 2000 µL, en incrementos de 0.1 µL
	▪ Linealidad (1 a 100µL)	$r^2 > 0.99$
	▪ Arrastre	< 0.1%
	▪ Precisión (5 a 50µL)	< 0.5 % CV
	▪ Volumen de lavado por inyección	> 0.4mL
	▪ Número de viales con muestra	1 a 96 muestras
	▪ Número de inyecciones	Programable de 1 a 99 inyecciones por vial.
	▪ Materiales	Acero inoxidable 316, Teflon®, vidrio.
Horno de la Columna	▪ Exactitud de la Temperatura del Compartimiento de la Columna.	≥ ±1° C
	▪ Estabilidad de la Temperatura del Compartimiento de la Columna.	≥ ±0.5° C.
Especificaciones Ambientales	▪ Temperatura de funcionamiento	De 4 a 40 ° C.
	▪ Humedad de funcionamiento	De 20 a 80%, sin condensación
Especificaciones Eléctricas	▪ Frecuencia	50 a 60HZ.
	▪ Voltaje	100 a 240Vca.
Dimensiones	▪ Alto, largo y Ancho	8.8x 59x.53cm.

4.3. Detector UV/VIS

Parámetro	Característica	Especificación
Especificaciones generales del detector	▪ Intervalo de Longitud de Onda	190 a 700nm
	▪ Exactitud de longitud de onda	± 1nm
	▪ Linealidad	5% a 257nm con propilparabeno.
	▪ Intervalo de valor de sensibilidad.	0.0001 a 4,0000 AUFS
	▪ Ruido longitud de onda simple	< ± 0.35 x 10^{-5} AU, celda seca, 254nm, constante de tiempo = 1,0seg.
	▪ Ruido longitud de onda doble	< ± 2.5 x 10^{-5} AU, celda seca, 254nm/ 280nm, constante de tiempo = 2,0seg.
Especificaciones de los componentes ópticos	▪ Fuente de lámpara	Lámpara de arco de deuterio
	▪ Celda de flujo	Diseño de celda de flujo TaperSlit.
	▪ Longitud del recorrido	10mm (estándar analítico)
	▪ Volumen de la celda	10µL (estándar analítico)
	▪ Límite de presión	1000psi / 70 bar
	▪ Materiales	Acero inoxidable 316, sílice fundido, Teflon®
Especificaciones Ambientales	▪ Temperatura de funcionamiento	De 4 a 40 ° C.
	▪ Humedad de funcionamiento	De 20 a 80%, sin condensación
Especificaciones Eléctricas	▪ Frecuencia	50 a 60HZ.
	▪ Voltaje	100 a 240Vca.
Dimensiones	▪ Alto, largo y Ancho	20.8x 50.3x 28.4cm.

4.4. Software Cromatografico.

Parámetro	Característica	Especificación
Especificaciones generales del Software Cromatografico	▪ Método de Proyecto.	▪ Creación del Método de Proyecto.
	▪ Método de Instrumento.	▪ Creación del Método de Instrumento.
	▪ Secuencia de Muestras.	▪ Secuencia de Muestras.
	▪ Método de Proceso.	▪ Creación del Método de Proceso.
	▪ Generación y Diseño de Informes.	▪ Generación y Diseño de Informes.
	▪ Administración de la Configuración.	▪ Administración de la Configuración.
Ambiente de Operación del Software	▪ Disponibilidad para operar en el sistema operativo Windows NT® versión 4.00.	

APENDICE III. PROTOCOLO DE CALIFICACIÓN DE INSTALACIÓN

[redacted]

Protocolo de Calificación de Instalación

Sistema:	Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución		
Marca:	Waters	**Revisión:**	1.0
Fecha:	07/Agosto/2004	**Paginas Totales:**	19
Realizado por:	Juan Luis García Guzmán	**Revisado por:**	Ramón Rodríguez Hernández
Verificado por:	Yanet Angélica Lizarraga		

Tabla de Contenido

1. INTRODUCCIÓN 3
1.1 Propósito 3
1.2 Alcance 3
1.3 Instrucciones de Prueba 4

2. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA 4
2.1 Sistema de Computo 4
2.1.1 Hardware 4
2.1.2 Software 5
2.2 Detector 2487 doble λ 5
2.2.1 Descripción 5
2.2.2 Componentes 5
2.3 Automuestreador 717Plus 6
2.3.1 Descripción 6
2.3.2 Componentes y Subsistemas 6
2.4 Sistema de Entrega Multisolvente 600E 6
2.4.1 Descripción 6
2.4.2 Componentes 7

3. RECEPCIÓN DEL SISTEMA 8

4. REQUERIMIENTOS DEL SITIO DE INSTALACIÓN 9

5. INSTALACIÓN DEL SISTEMA DE COMPUTO Y MÓDULOS CROMATOGRAFICOS 10
5.1 Verificación de la Instalación de las Conexiones del Sistema 11

6. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA 12
6.1 Sistema de Entrega Multisolvente 600E 12
6.2 Detector de Absorbancia 2487 doble λ 13
6.3 Automuestreador 717Plus 14
6.4 Hardware 15
6.5 Software Millenium[32] 16
6.5.1 Instalación del Software Millenium[32] 17

7. REPORTE DE NO CONFORMIDADES 18

8. ANEXOS 19

1. INTRODUCCIÓN

La cromatografía es una técnica desarrollada a principios de siglo, que permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla. La cromatografía es un proceso de migración diferencial en los cuales los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil, liquida y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido. La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), es conocida está técnica también como Cromatografía de Líquidos de Alta Presión.
El éxito en la aplicación de la CLAR para un compuesto dado depende de la combinación correcta de las condiciones de operación, es decir: el tipo de columna, la fase móvil, la longitud y el diámetro de la columna, la velocidad de flujo de la fase móvil, etc.
La migración diferencial en el CLAR es resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil. Dichos componentes se separan en la columna y al salir de está son conducidos por la fase móvil y en el orden en que emergieron, hacia un detector, donde se registran sus concentraciones y sus tiempos de retención. El cromatógrama resultante muestra cada compuesto que sale de la columna en forma de picos simétricos con un tiempo de retención característico por lo que este tiempo puede emplearse para identificar el compuesto. Este tiempo de retención, tr, se mide desde el momento de la inyección de la muestra hasta el momento en que aparece el máximo del pico en el cromatógrama.

Un cromatógrafo de líquidos de alta resolución consta de las siguientes partes:

Sistema de bombeo.- tiene por objeto impulsar la fase móvil a través de la columna y debe cumplir ciertas especificaciones como reproducibilidad y precisión, manteniendo un flujo constante.
Sistema de inyección.- debe ser un inyector automático que minimice los errores en la introducción de la muestra. Este dispositivo ayuda a mantener la reproducibilidad entre inyecciones y elimina el error en la medición del volumen por inyectar.
Columna.- se considera la columna la parte fundamental de la cromatografía ya que es en esta, donde se va a llevar a cabo la separación.
Registrador de señales.- al emerger un compuesto ya separado en la columna y pasar por el detector, la señal que provoca en esté debe ser registrada en un graficador o integrador electrónico ó un software cromatografico realiza la adquisición.

1.1. Propósito

Este protocolo de Calificación de Instalación, evalúa que el sistema es entregado como es diseñado y especificado, que es apropiadamente instalado en el ambiente seleccionado y que este ambiente es adecuado para la operación y uso del sistema.

1.2. Alcance

Este protocolo verifica los aspectos claves de la instalación del Sistema "Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución" Marca Waters, constituido por un sistema de entrega multisolvente 600E, automuestreador 717Plus, Detector 2487 doble λ y el sistema de computo que controla el equipamiento.

1.3. Instrucciones de Prueba

1) Registrar las instrucciones que deban ser seguidas para ejecutar este documento.

2) El Protocolo de Calificación de Instalación del Sistema debe ser completado y aceptado con base en el Cumplimiento de las condiciones siguientes:

a) La instalación del sistema cumple con las especificaciones.
b) Cuando proceda, todas las no conformidades han sido documentadas adecuadamente en el reporte y resueltas (Sección 8).
   - Una no conformidad se presenta cuando no alcanza o no iguala el criterio de aceptación.
   - Se cambia el criterio de aceptación.
   - No se sigue el procedimiento o instrucciones de prueba.
c) Firma cada apartado de prueba una vez concluido y fecha el día en que se realizó la acción, en el momento en que se genera.
d) Para su Aprobación Final, todas las no conformidades deben estar cerradas (o ausencia de toda no conformidad).

3) El protocolo ha sido concluido de acuerdo con las Buenas Prácticas de Documentación.

2. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA.

2.1. Sistema de computo

2.1.1. Hardware

El sistema Millenium^{32} está formado por un ordenador que ejecuta el software Millenium^{32} y la base de datos Millenium^{32}. La configuración del Hardware es una estación de trabajo.

La estación de trabajo Millenium^{32} es un ordenador personal de uso individual e independiente. Incluye una tarjeta de interfase busLAC/E, una tarjeta de interfase de 8 puertos en serie y/o puerto COM y una base de datos local que soporta el software de aplicación cromatográfica Millenium^{32}.

La estación de trabajo incluye:

- Ordenador Pentium™ Millenium^{32} (incluye la tarjeta busLAC/E Waters, la tarjeta con 8 puertos en serie, y/o un puerto COM).
- Software de Aplicación Millenium^{32}.
- Sistema Operativo Windows NT.

Tarjeta busLAC/E es un microprocesador basado en una tarjeta de interfase que permite al software Millenium^{32} para comunicar con los instrumentos Cromatográficos. La tarjeta transmite los comandos del software Millenium^{32}, para los detectores, automuestreadores, bombas, y otro aparatos que tienen conexión IEEE-488. Los datos de los módulos son trasmitidos a través de la tarjeta busLAC/E a la computadora para su análisis.

2.1.2. Software

El software Millenium[32] ofrece una interfaz gráfica basada en iconos para adquirir, procesar, administrar y presentar los datos Cromatográficos de la base de datos Millenium[32]. Todas las acciones del usuario están realizadas para poder situar el puntero y hacer clic con el ratón.
El software millenium[32] es compatible con windows 98 y windows NT. El sistema windows y la multitarea, permite tener abiertas varias ventanas al mismo tiempo. El sistema windows y multitarea le permiten ver la adquisición de datos de un ciclo de análisis en tiempo real mientras se calculan los resultados de los datos adquiridos anteriormente, o se ajustan los parámetros de integración de cualquier inyección anterior.

Las funciones del software son:

- Creación de Métodos de Proyecto.
- Creación de Métodos de Instrumento.
- Secuencia de Muestras.
- Creación de Métodos de Proceso.
- Creación de Curvas de Calibración con Múltiples Componentes.
- Generación y Diseño de Informes.
- Administración de la Configuración.
- Almacenamiento, Respaldo y Recuperación de Proyectos de Datos.

2.2. Detector 2487 doble λ.

2.2.1. Descripción

El Detector de absorción Waters 2487 doble λ, es un detector ultravioleta/visible (UV/Vis) ajustable de dos canales diseñado para aplicaciones de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

El Detector de absorción Waters 2487 doble λ funciona de 190 a 700nm. El Detector 2487 utiliza componentes ópticos, con un sistema de iluminación que permite obtener un alto rendimiento, lo que mejora la linealidad.

2.2.2. Componentes

Los componentes ópticos del Detector de absorción Waters 2487 doble λ se basan en un monocromador ajustable Fastie Ebert e incluyen lo siguiente:

- Lámpara de deuterio (D2).
- Dos espejos: uno elipsoidal descentrado y uno esférico.
- Obturador, filtro de calibración de longitud de onda y filtro de segundo orden.
- Ranura de entrada.
- Rejilla de difracción holográfica plana espejada.
- Separador de haz.
- Fotodiodos de muestra y referencia.
- Celda de flujo Waters TaperSlit. (Su entrada es la ranura de salida del monocromador).
- Soporte de cubeta.

Los componentes electrónicos del Detector 2487 controlan los siguientes componentes:

Placa preamplificadota: Recoge y procesa las señales de entrada analógicas enviadas por los fotodiodos al microprocesador para su mayor acondicionamiento. Las señales de muestra y referencia se integran y se realiza su conversión analógica-digital (A/D) en forma simultánea. De esta manera, se obtiene el máximo rechazo de ruido en modo común en los dos haces y, en consecuencia, una línea de base sumamente silenciosa.
Placa de control: Recibe datos de la placa preamplificadora, el teclado y eventos externos, y controla los subsistemas de posicionamiento de los componentes ópticos y la alimentación de la lámpara.
Interfaz IEEE-488: La comunicación IEEE-488 permite al Detector 2487 comunicarse con otros módulos Waters que tengan la capacidad de interfaz IEEE-488 y el software adecuado.
Teclado: Permite al usuario acceder al sistema de control, programar métodos, calibrar y solucionar los problemas del Detector 2487.
Alimentación de la lámpara: Es controlada por el CPU para permitir el funcionamiento estable de la lámpara de deuterio.
Alimentación de CC: Proporciona tensión para los circuitos analógicos y digitales. Es la fuente de alimentación continua del detector.

2.3. Automuestreador 717Plus.

2.3.1. Descripción.

El automuestreador 717Plus inyecta muestras dentro del sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. El automuestreador, puede ser utilizado como una unidad estacionaria única o como un componente en un Sistema HPLC basado en una interfase IEEE-488.

2.3.2. Componentes y Subsistemas.

Panel frontal: Contiene una pantalla, teclas, y funciones clave, y provee acceso al sistema de control.
Controlador del Automuestreador: contiene un microprocesador y memoria para el control de todos los componentes del automuestreador.
Sistema de Transporte de la Muestra: Posición de las muestras en el vial, bajo el inyector.
Empaquetado del Líquido: Contiene todos los componentes involucrados en la fase móvil y muestra directamente en la columna. Desarrolla purgas y pruebas de compresión de la fase móvil.
Inyector: Toma de la muestra (alícuota) del vial de la muestra, y llevada en el inyector hasta la fase móvil.
Jeringa: arrastra la muestra y comprime la fase móvil durante la prueba.
Sistema de Lavado de la Aguja: Limpia la salida de la aguja para prevenir la contaminación-arrastre de las muestras.

2.4. Sistema de Entrega Multisolvente 600E.

2.4.1. Descripción

El modulo Waters 600E, es un sistema de entrega multisolvente para cromatografía de líquidos de alta resolución. Su función principal es el mezclado de las fases o eluentes colocados en el reservorio, proporciona el movimiento de la muestra dentro del sistema para su separación y cuantificación.

2.4.2. Componentes

El Sistema de Entrega Multisolvente 600E esta dividido en dos componentes:

Controlador 600 (unidad electrónica): Controla automáticamente la elusión del gradiente, velocidad de flujo, temperatura del compartimiento de la columna, eventos externos.
Provee terminales en las conexiones y puertos de comunicación para la operación y control externo de otros módulos, tal como detectores, automuestreadores, y sistema de cómputo.

Bomba 600E: Contiene los componentes requeridos para mezclar y para entregar los eluentes del reservorio de los solventes para el inyector y la columna. Tiene la capacidad de mezclar cuatro eluentes (automezclado). Consiste de los siguientes componentes:

- Cabezal de la bomba: con 225 µL o 100 µL de volumen.
- Montaje de la válvula de proporción de eluente.
- Inyector manual.
- Válvula de descarga.

3. RECEPCIÓN DEL SISTEMA

Propósito: Revisión para confirmar que el equipo, sus módulos y accesorios se han suministrado como se solicitaron, en ausencia de presencia de algún daño.

Instrucciones:

1) Desempaca los componentes del sistema de las cajas.
2) Revisa los componentes del sistema recibido contra la orden de compra.
3) Revisa que los módulos, periféricos y sistema de cómputo, se encuentren en buenas condiciones.

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/x*	*Iniciales/ Fecha*
1.	**Detector 2487 doble λ.**	El detector 2487 doble λ se encuentra sin daño físico visible.	*El detector 2487 doble λ se encuentra sin daño físico visible.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
2.	**Automuestreador 717Plus**	El Automuestreador 717Plus, se encuentra sin daño físico visible.	*El Automuestreador 717Plus, se encuentra sin daño físico visible.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
3.	**Sistema de Entrega Multisolvente 600E.**	El Sistema de Entrega Multisolvente 600E, se encuentra sin daño físico visible.	*El Sistema de Entrega Multisolvente 600E, se encuentra sin daño físico visible.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
4.	**Monitor Compaq**	El monitor del sistema de cómputo, se encuentra sin daño físico visible.	*El monitor del sistema de cómputo, se encuentra sin daño físico visible.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
5.	**CPU Compaq**	El CPU del sistema de cómputo, se encuentra sin daño físico visible.	*El CPU del sistema de cómputo, se encuentra sin daño físico visible.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
6.	**Teclado y Mouse Compaq**	El teclado y mouse, se encuentra sin daño físico visible.	*El teclado y mouse, se encuentra sin daño físico visible.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
7.	**Software Millenium[32]**	Se cuenta con CD del software Millenium[32].	*Se cuenta con CD del software Millenium[32].*	√	*JLGG 08/Ago/04*
Verificó:	*JAL*		*08/Ago/04*		
	Iniciales		**Fecha**		

Nota: *(√) significa "Cumple" y (x) No cumple.*

4. REQUERIMIENTOS DEL SITIO DE INSTALACIÓN

Propósito: Verifica que las condiciones de instalación sean adecuadas para el Sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, para comprobar que su ambiente de operación no afecte su funcionamiento.

Instrucciones:

1. Verifica el Sitio de Instalación.

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/x*	*Iniciales/ Fecha*
1.	**Dimensiones del banco de Instalación**	Longitud mínima 130cm x Ancho 90cm.	*Longitud 154cm x Ancho 104cm.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
2.	**Localización**	El sistema no debe encontrarse en un espacio cerrado, bajo un estante o cerca de una fuente de calor.	*El sistema se encuentra en un espacio abierto sobre una mesa.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
3.	**Temperatura**	Entre 4 a 40° C de temperatura.	*22° C*	√	*JLGG 08/Ago/04*
4.	**Humedad Relativa**	Máxima 80% HR.	*43% HR*	√	*JLGG 08/Ago/04*
5.	**Voltaje**	110 ± 10V AC	*119.3volts*	√	*JLGG 08/Ago/04*
6.	**Frecuencia**	50/60Hz	*60.04Hz*	*x*	*JLGG 08/Ago/04*
7.	**Servicio de Red**	La red está Instalada.	*La red se encuentra instalada*	√	*JLGG 08/Ago/04*
8.	**Desechos de Reactivos**	Sistema de Desechos Instalado.	*El sistema de desechos esta instalado.*	√	*JLGG 08/Ago/04*

Verificó: *JAL* — **Iniciales** ; *08/Ago/04* — **Fecha**

Nota: *(√) significa "Cumple" y (x) No cumple.*

Instrumento de Prueba Utilizado	*Modelo*	*No. de Serie*	*Fecha de Calibración/ Fecha de Próxima Calibración*	*Iniciales/ Fecha*
Termohigrómetro Digital Vaisala (Sensor Temperatura)	HMP35E	W3320004	30/Abr/04 / 30/Abr/05	*JLGG 08/Ago/04*
Termohigrómetro Digital Vaisala (Lector Temperatura)	HMI38	V2050010	30/Abr/04 / 30/Abr/05	*JLGG 08/Ago/04*
Termohigrómetro Digital Vaisala (Sensor Humedad Relativa)	HMP35E	W3320004	29/Abr/04 / 29/Abr/05	*JLGG 08/Ago/04*
Termohigrómetro Digital Vaisala (Lector Humedad Relativa)	HMI38	V2050010	29/Abr/04 / 29/Abr/05	*JLGG 08/Ago/04*
Multímetro Digital Fluke	187	775000269	29/May/05 / 29/May/05	*JLGG 08/Ago/04*

5. INSTALACIÓN DEL SISTEMA DE COMPUTADORA Y MODULOS CROMATOGRÁFICOS.

Instrucciones

1. Desempaqué y coloque la estación de trabajo en el lugar designado.
2. Instalar el teclado y ratón.
3. Instalar el sistema de computadora y el monitor.
4. Conecte la estación de trabajo directamente con los módulos cromatográficos usando la tarjeta de interfase busLAC/E (interfase IEEE-488). Asegurar que la tarjeta este instalada correctamente en la Unidad de Procesamiento Central del sistema de la estación de trabajo.
5. Conectar los módulos cromatográficos en la tarjeta busLAC/E usando la interfase del cable IEEE-488.
6. Conectar y configurar los periféricos (Impresora).

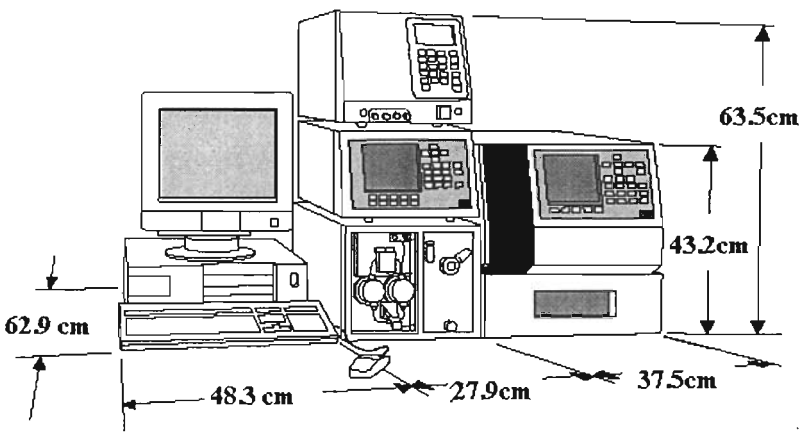


Figura 1. Esquema de la Instalación del Sistema HPLC.

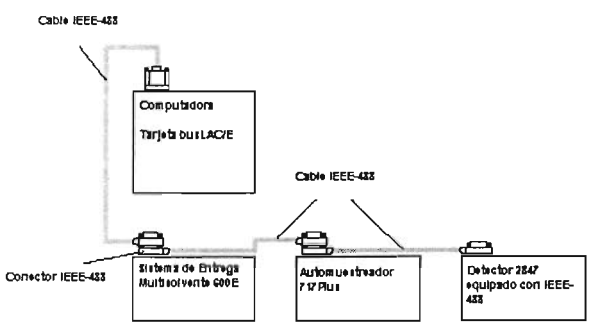


Figura 2. Esquema de las conexiones de los módulos al Sistema de Computo.

5.1. Verificación de la Instalación de las Conexiones del Sistema.

Propósito: Verifica y documenta que la instalación de las conexiones entre los módulos del sistema de computo, se encuentren adecuadamente conectados.

Instrucciones:

1. Verifica la Instalación de las Conexiones del Sistema.

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/x*	*Iniciales/ Fecha*
1.	**Cable de energía a la Unidad de Procesamiento Central (CPU).**	El cable de energía se encuentra conectado de la parte trasera del CPU a la alimentación eléctrica.	*El cable de energía está conectado en la parte trasera del CPU a la alimentación eléctrica.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
2.	**Tarjeta busLAC/E**	Se encuentra en la parte trasera de la unidad de Procesamiento Central.	*Se encuentra en la parte trasera de la unidad de Procesamiento Central.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
3.	**Red**	Se encuentra en la salida del MODEM de la Unidad de Procesamiento Central.	*Se encuentra en la salida del MODEM de la Unidad de Procesamiento Central.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
4.	**Monitor**	Se encuentra conectado a la salida RS-232 de la Unidad de Procesamiento Central	*Se encuentra conectado a la salida RS-232 de la Unidad de Procesamiento Central*	√	*JLGG 08/Ago/04*
5.	**Impresora**	El cable de energía se encuentra conectado de la parte trasera del monitor a la alimentación eléctrica.	*El cable de energía se encuentra conectado de la parte trasera del monitor a la alimentación eléctrica.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
		Se encuentra conectada en la salida del puerto paralelo de la Unidad de Procesamiento Central.	*Se encuentra conectada en la salida del puerto paralelo de la Unidad de Procesamiento Central.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
6.	**Sistema de Entrega Multisolvente 600E**	El cable de energía se encuentra conectado de la parte trasera del sistema de entrega multisolvente a la alimentación eléctrica.	*El cable de energía se encuentra conectado de la parte trasera del sistema de entrega multisolvente a la alimentación eléctrica.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
		Conectado por un cable IEEE-488, de la tarjeta busLAC/E a un conector IEEE-488 del controlador de la bomba.	*Conectado por un cable IEEE-488, de la tarjeta busLAC/E a un conector IEEE-488 del controlador de la bomba.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
7.	**Automuestreador 717Plus**	El cable de energía se encuentra conectado de la parte trasera del automuestreador a la alimentación eléctrica.	*El cable de energía se encuentra conectado de la parte trasera del automuestreador a la alimentación eléctrica.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
		Conectado por un cable IEEE-488, del Sistema de Entrega Multisolvente al conector IEEE-488 del Automuestreador 717Plus.	*Conectado por un cable IEEE-488, del Sistema de Entrega Multisolvente al conector IEEE-488 del Automuestreador 717Plus.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
8.	**Detector 2487 doble λ.**	El cable de energía se encuentra conectado de la parte trasera del detector a la alimentación eléctrica.	*El cable de energía se encuentra conectado de la parte trasera del detector a la alimentación eléctrica.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
		Conectado por un cable IEEE-488, del Automuestreador 717Plus al Detector 2487 doble λ.	*Conectado por un cable IEEE-488, del Automuestreador 717Plus al Detector 2487 doble λ.*	√	*JLGG 08/Ago/04*

Verificó: *JAL* — **Iniciales** ; *08/Ago/04* — **Fecha**

Nota: *(√) significa "Cumple" y (x) No cumple.*

6. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA.

6.1. Sistema de Entrega Multisolvente 600E.

Propósito: Verifica y documenta las características de diseño e identificación del Sistema de Entrega Multisolvente 600E.

Instrucciones:

1. Verifica las características del Sistema de Entrega Multisolvente 600E.

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/x*	*Iniciales/ Fecha*
1.	**Nombre del Modulo**	Sistema de Entrega Multisolvente, Serie 600.	*Sistema de Entrega Multisolvente, Serie 600.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
2.	**Marca**	Waters	*Waters*	√	*JLGG 08/Ago/04*
3.	**Modelo**	600E	*600E*	√	*JLGG 08/Ago/04*
4.	**Número de Serie de la bomba**	J9960F007M	*J9960F007M*	√	*JLGG 08/Ago/04*
5.	**Número de serie del controlador**	M996CE318T	*M996CE318T*	√	*JLGG 08/Ago/04*
6.	**Número de Revisión del Firmware**	4.2	*4.2*	√	*JLGG 08/Ago/04*
7.	**Localización**	Cuarto 512	*Cuarto 512*	√	*JLGG 08/Ago/04*
8.	**Uso**	Entrega de solvente, para cromatografía de líquidos de alta resolución.	*Entrega de solvente, para cromatografía de líquidos de alta resolución.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
9.	**Dimensiones de la Bomba**	22.8x 55.8x 27.9cm (Altura, longitud y ancho).	*22.8x 55.8x 27.9cm (Altura, longitud y ancho).*	√	*JLGG 08/Ago/04*
10.	**Dimensiones del Controlador**	17.7x 53.9x 28.5cm. (Altura, longitud y ancho).	*17.7x 53.9x 28.5cm. (Altura, longitud y ancho).*	√	*JLGG 08/Ago/04*
11.	**Manuales**	Guía del Instalación y Mantenimiento. Sistema de Entrega Multisolvente Waters 600E, Guía del Usuario. Sistema de Entrega Multisolvente Waters 600E y Guía de Inicio Rápido. Sistema de Entrega Multisolvente Waters 600E.	*Guía del Instalación y Mantenimiento. Sistema de Entrega Multisolvente Waters 600E, Guía del Usuario. Sistema de Entrega Multisolvente Waters 600E y Guía de Inicio Rápido. Sistema de Entrega Multisolvente Waters 600E.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
Verificó:	*JAL*		*08/Ago/04*		
	Iniciales		**Fecha**		

Nota: *(√) significa "Cumple" y (x) No cumple.*

6.2. Detector de Absorbancia 2487 Doble λ.

Propósito: Verifica y documenta las características de diseño e identificación del Detector de Absorbancia 2487 doble λ.

Instrucciones:

1. Verifica los componentes del Detector de Absorbancia 2487 doble λ.

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/×*	*Iniciales/ Fecha*
1.	**Nombre del Modulo**	Detector de absorbancia.	*Detector de absorbancia.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
2.	**Marca**	Waters.	*Waters.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
3.	**Modelo**	2487 doble λ.	*2487 doble λ.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
4.	**Número de Serie**	M99487214M	*M99487214M*	√	*JLGG 08/Ago/04*
5.	**Número de Revisión del Firmware**	1.01	*1.01*	√	*JLGG 08/Ago/04*
6.	**Localización**	Cuarto 512	*Cuarto 512*	√	*JLGG 08/Ago/04*
7.	**Uso**	Detector del Analito de Interés.	*Detector del Analito de Interés.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
8.	**Dimensiones del Detector**	20.8x 50.3x 28.4cm. (Altura, longitud y ancho).	*20.8x 50.3x 28.4cm. (Altura, longitud y ancho).*	√	*JLGG 08/Ago/04*
9.	**Manuales**	Guía del Usuario. Detector de absorbancia Waters 2487 doble λ.	*Guía del Usuario. Detector de absorbancia Waters 2487 doble λ.*	√	*JLGG 08/Ago/04*

Verificó: *JAL* — **Iniciales** ; *08/Ago/04* — **Fecha**

Nota: *(√) significa "Cumple" y (×) No cumple.*

6.3. Automuestreador 717Plus.

Propósito: Verifica y documenta las características de diseño e identificación del Automuestreador 717Plus.

Instrucciones:

1. Verifica los componentes del Automuestreador 717Plus.

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/x*	*Iniciales/ Fecha*
1.	**Nombre del Modulo**	Automuestreador 717Plus	*Automuestreador 717Plus*	√	*JLGG 08/Ago/04*
2.	**Marca**	Waters	*Waters*	√	*JLGG 08/Ago/04*
3.	**Modelo**	717Plus.	*717Plus.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
4.	**Número de Serie**	AOO71P030M	*AOO71P030M*	√	*JLGG 08/Ago/04*
5.	**Número de Revisión del Firmware**	3.1	*3.1*	√	*JLGG 08/Ago/04*
6.	**Localización**	Cuarto 512	*Cuarto 512*	√	*JLGG 08/Ago/04*
7.	**Uso**	Inyección de las Muestras.	*Inyección de las Muestras.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
8.	**Dimensiones del Automuestreador**	8.8x 59x.53cm. (Altura, longitud y ancho).	*8.8x 59x.53cm. (Altura, longitud y ancho).*	√	*JLGG 08/Ago/04*
9.	**Manuales**	Manual del Usuario. Automuestreador Waters 717Plus.	*Manual del Usuario. Automuestreador Waters 717Plus.*	√	*JLGG 08/Ago/04*

Verificó: *JAL* — **Iniciales** — *08/Ago/04* — **Fecha**

Nota: *(√) significa "Cumple" y (x) No cumple.*

6.4. Hardware.

Propósito: Verifica y documenta las características de diseño e identificación del Hardware del Sistema de Computo.

Instrucciones:

1. Verifica los Componentes de la Computadora.
2. Verifica los aparatos periféricos.

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/×*	*Iniciales/ Fecha*
1.	**Modelo del CPU**	Compaq BLS	*Compaq BLS*	√	*JLGG 08/Ago/04*
2.	**No. de Serie del CPU**	6943BZL2K155	*6943BZL2K155*	√	*JLGG 08/Ago/04*
3.	**Procesador**	Mayor a 166MHz	*1115MHz*	√	*JLGG 08/Ago/04*
4.	**Memoria RAM**	Mínimo 64Mb	*254Mb*	√	*JLGG 08/Ago/04*
5.	**Capacidad Total de Disco Duro**	Mínimo 2.5Gb	*8Gb*	√	*JLGG 08/Ago/04*
6.	**Monitor**	SVGA 800x600 píxeles, Conexión RS232.	*SVGA 800x600 píxeles, Conexión RS232.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
7.	**Teclado**	Compaq, conexión PS/2	*Compaq, conexión PS/2*	√	*JLGG 08/Ago/04*
8.	**Mouse**	Compaq, Conexión PS/2	*Compaq, Conexión PS/2*	√	*JLGG 08/Ago/04*
9.	**Disquete**	3.5 Pulgadas 1.44Mb	*3.5 Pulgadas 1.44Mb*	√	*JLGG 08/Ago/04*
10.	**Impresora**	HP Lasser, conexión en Paralelo.	*HP Lasser, conexión en Paralelo.*	√	*JLGG 08/Ago/04*

Verificó: *JAL* — **Iniciales** — *08/Ago/04* — **Fecha**

Nota: *(√) significa "Cumple" y (×) No cumple.*

6.5. Software Millenium[32].

Propósito: Verifica y documenta las características de diseño e identificación del software y la Instalación del Software Millenium[32], versión 3.20.

Instrucciones:

1. Instalar la configuración Estación de trabajo, y verificar que los componentes son apropiadamente instalados.
2. El software Millenium[32] ha sido apropiadamente instalado, siguiendo el procedimiento de la sección 6.6.
3. Los archivos del software Millenium[32] han sido instalados en el sistema y no están dañados y son idénticos a los archivos de WATERS.
4. Verificar los archivos del software.
   - Durante la instalación del software millenium[32], la corrida automática del software verifica la integridad de los archivos. Esta verifica que los archivos del disco no estén dañados durante la instalación.
5. Si se detecta algún archivo dañado, la instalación es abortada. Para esto se tendrá que volver a correr la instalación y la verificación de archivos.
6. Verificar el éxito de la Instalación del Software Millenium[32] (Archivo IQ.TXT).
   - El programa esta configurado para realizar una verificación de los archivos, durante la instalación, y crea una bitácora de verificación de archivos con el nombre IQ.TXT.
   - En una instalación exitosa, el archivo IQ.TXT no presenta errores (archivos perdidos, cambios en la hora, fecha, o cambios en el tamaño de los archivos).
   - Guarda una copia del archivo IQ.TXT para verificar que la instalación del software ha sido llevada acabo satisfactoriamente.

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/x*	*Iniciales/ Fecha*
1.	**Nombre del Software**	Millenium[32].	*Millenium[32].*	√	*JLGG 08/Ago/04*
2.	**Versión**	3.20	*3.20*	√	*JLGG 08/Ago/04*
3.	**Licencia del software cromatográfico.**	Cuenta con licencia.	*Cuenta con licencia.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
4.	**Sistema Operativo**	Windows NT	*Windows NT*	√	*JLGG 08/Ago/04*
5.	**Versión**	4.0	*4.0*	√	*JLGG 08/Ago/04*
6.	**Copia de Respaldo del Software**	Se cuenta con copia de respaldo del software.	*Se cuenta con copia de respaldo del software.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
7.	**Archivo IQ.TXT**	Indica una Instalación del Software exitosa.	*Indica una Instalación del Software exitosa.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
8.	**Disquete**	3.5 Pulgadas 1.44Mb	*3.5 Pulgadas 1.44Mb*	√	*JLGG 08/Ago/04*
9.	**Impresora**	HP Lasser, conexión en Paralelo.	*HP Lasser, conexión en Paralelo.*	√	*JLGG 08/Ago/04*
Verificó:	*YAL*		*08/Ago/04*		
	Iniciales		**Fecha**		

Nota: *(√) significa "Cumple" y (x) No cumple.*

6.5.1. Instalación del Software Millenium[32].

1. Cerrar todas las aplicaciones que se estén utilizando y reiniciar la computadora.
2. Verificar que el espacio en disco duro sea adecuado para instalar el software Millenium[32].
3. Insertar el CD dentro de la unidad de CD-ROM. La instalación del programa comienza automáticamente, y aparece la pantalla Bienvenido (figura 3).

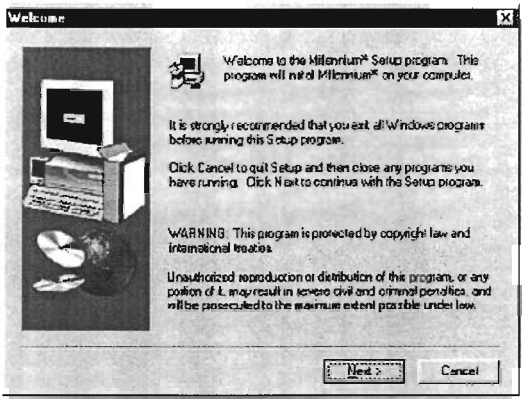


Figura 3. Mensaje de bienvenida del software Millenium[32].

4. Hacer clic en **Next.** Aparece la caja de dialogo de contrato de la licencia del software.
5. Lee el contrato, haz clic en **Yes** para aceptar el contrato. La información que aparece en la caja de dialogo es importante para la información de instalación.
6. Lee el cuadro de dialogo leeme y posteriormente haz clic en **Next**, aparece la caja de dialogo.
7. Haz clic en **Tipical** para instalar el software Millenium[32]. La instalación de los archivos comunes DLLs aparece.
8. Para instalar todos los archivos DLLs, hacer click en **Yes** (recomendado), llena los espacios con los datos solicitados.
9. Haz clic en **Next**. Confirma el registro en el cuadro de dialogo que aparece, presiona **Yes**.
10. Haz clic en **Yes**. La caja de dialogo de la instalación del controlador busLAC/E aparece.
11. Seleccione el tipo de instalación apropiada para el BusLAC/E, entonces haz clic en **Next**. La caja de dialogo de instalación del sistema DLLs aparece.
12. Haz clic en **Yes**. La caja de dialogo del programa directorio, selecciona el disco duro para la instalación de los archivos del programa Millenium[32], posteriormente hacer click en **Next**.
13. Selecciona el disco duro para la instalación de la base de datos de Millenium[32], entonces haz clic en Next. El programa seleccionado de la caja de dialogo Selección del programa.
14. Haz clic en Next. La pantalla de configuración de MIllenium[32] aparece (figura 4).
15. Después que los archivos del software Millenium[32] hayan sido instalados, en la computadora. Haz clic en Yes, I want to restart my computer now, entonces haz clic en Finish para reiniciar la computadora y terminar la instalación.

16. Después que la estación de trabajo ha sido iniciada, un comando en la ventana aparece, indicando que los archivos DLLs han sido registrados.

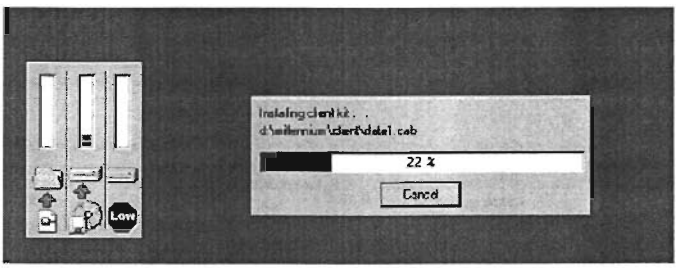


Figura 4. Pantalla de configuración del Software Millenium[32].

7. REPORTE DE NO CONFORMIDADES.

No. de No Conformidad	Referencia de Prueba	Prueba/ Parámetro	Resolución	Firma/ Fecha
1	3. Requerimientos del sitio de instalación. Etapa No. 6	Frecuencia Especificación: 50/60Hz Resultado: 60.04Hz	No existe impacto en el desempeño de los componentes del sistema conectados a la energía ya que los Hz se refieren al número de ondas de luz.	*JLGG 08/Ago/04*
N/A				*JLGG 08/Ago/04*

8. ANEXOS.

APENDICE IV. PROTOCOLO DE CALIFICACIÓN DE OPERACIÓN

[redacted]

Protocolo de Calificación de Operación

Sistema:	Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución		
Marca:	Waters	**Revisión:**	1.0
Fecha:	09/Agosto/2004	**Paginas Totales:**	26
Realizado por:	Juan Luis García Guzmán	**Revisado por:**	Ramón Rodríguez Hernández
Verificado por:	Yanet Angélica Lizarraga		

Tabla de Contenido

1. INTRODUCCIÓN 3
   1.1 Propósito 3
   1.2 Alcance 3
   1.4 Instrucciones 3

2. PRERREQUISITOS 4

3. SOFTWARE MILLENIUM[32] 5
   3.1 Inicio del Software Millenium[32] 5

4. VERIFICACIÓN DE OPERACIÓN DEL SISTEMA DE ENTREGA MULTISOLVENTE 600E 6
   4.1 Encendido del Sistema de Entrega Multisolvente 600E 6
   4.2 Verificación de la Exactitud de la Presión 6
   4.3 Prueba de Exactitud de la Velocidad de Flujo 7
   4.4 Prueba de Proporción de Gradiente 9

5. VERIFICACIÓN DE OPERACIÓN DEL AUTOMUESTREADOR 717Plus 11
   5.1 Encendido del Automuestreador 717Plus 11
   5.2 Prueba de Exactitud del Volumen de Inyección 12
   5.3 Prueba de Exactitud y Estabilidad de la Temperatura de la Columna 14

6. VERIFICACIÓN DE OPERACIÓN DEL DETECTOR 2487 DOBLE λ 15
   6.1 Encendido del Detector 2487 doble λ 15
   6.2 Verificación de la Respuesta de un Plco 15
   6.3 Prueba de Calibración de la Longuitud de Onda 16
   6.4 Prueba de la Exactitud de la Longuitud de Onda 17
   6.5 Linealidad de Respuesta del Detector 18

7. REPORTE DE NO CONFORMIDADES 19

8. ANEXOS 20

1. INTRODUCCIÓN

La Calificación de Operación del Sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución Marca Waters, debe demostrar y proporcionar evidencia documentada, de que cada modulo del sistema funciona de acuerdo a la especificaciones operacionales de fabricante, en el ambiente seleccionado de instalación.

1.1. Propósito

Este protocolo aplica a la Calificación de Operación, del Sistema "Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución" Marca Waters.

1.2. Alcance

Este protocolo cubre los requerimientos críticos para verificar, evaluar y documentar, la operación correcta de cada componente del sistema.

1.3. Instrucciones

1) Registrar las instrucciones que deban ser seguidas para ejecutar este documento.
2) El Protocolo de Calificación de Instalación del Sistema debe estar cerrado para poder continuar con el presente Protocolo de Calificación de Operación.
3) El Protocolo de Calificación de Operación del Sistema debe estar completo y aceptado con base en el Cumplimiento de las condiciones siguientes:

- Las pruebas de operación del sistema, cumple con las especificaciones o criterios de aceptación.
- Cuando proceda, todas las no conformidades han sido documentadas adecuadamente en el Reporte y Resueltas (sección 7).
    - Una no conformidad se presenta cuando no alcanza o no iguala el criterio de aceptación.
    - Se cambia el criterio de aceptación.
    - No se sigue el procedimiento o instrucciones de prueba.
- Firma y fecha cada apartado de prueba una vez realizada la acción, es decir, en el momento en que se genera.
- Para su Aprobación Final, todas las no conformidades deben estar cerradas (o ausencia de toda no conformidad).

3) El protocolo ha sido concluido de acuerdo con las Buenas Prácticas de Documentación.

2. PRERREQUISITOS.

Propósito: Antes de realizar y ejecutar las pruebas de la Calificación de Operación debe haber sido completada la Calificación de Instalación, para evitar alguna contribución de error, al método de prueba, que pueda tener impacto en los resultados de la Calificación de Operación y Desempeño.

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/×*	*Iniciales/ Fecha*
1.	**Hardware, instalado.**	El Hardware está instalado.	*El Hardware está instalado.*	√	*JLGG 09/Ago/04*
2.	**Software Millenium®², instalado.**	El Software Millenium®² esta instalado.	*El Software Millenium®² esta instalado.*	√	*JLGG 09/Ago/04*
3.	**Sistema de Entrega Multisolvente 600E, instalado.**	Sistema de Entrega Multisolvente 600E está instalado.	*Sistema de Entrega Multisolvente 600E está instalado.*	√	*JLGG 09/Ago/04*
4.	**Detector 2487 doble λ, instalado.**	Detector 2487 doble λ está instalado.	*Detector 2487 doble λ está instalado.*	√	*JLGG 09/Ago/04*
5.	**Automuestreador 717 Plus, instalado.**	Automuestreador 717 Plus está instalado.	*Automuestreador 717 Plus está instalado.*	√	*JLGG 09/Ago/04*
6.	**Protocolo de Calificación de Instalación completado.**	Protocolo de Calificación de Instalación completado	*Protocolo de Calificación de Instalación completado.*	√	*JLGG 09/Ago/04*
7.	**Mantenimiento Preventivo, realizado.**	Mantenimiento Preventivo terminado.	*Mantenimiento Preventivo terminado.*	√	*JLGG 09/Ago/04*

Verificó: *YAL* — **Iniciales** ; *09/Ago/04* — **Fecha**

Nota: *(√) significa "Cumple" y (×) No cumple.*

3. SOFTWARE MILLENIUM[32].

3.1. Inicio del Software Millenium[32].

Propósito: Verifica y comprueba que el software de aplicación Millenium[32] inicia correctamente, mediante el ingreso a la aplicación y revisión de la configuración de los instrumentos cromatográficos asociados al sistema HPLC.

Instrucciones:

1. Encienda los instrumentos como a continuación se indica.
2. Instrumentos Cromatográficos (rutinas de diagnostico).
3. Dispositivos periféricos (impresora).
4. Estación de trabajo Millenium[32].
5. Haga clic en el Botón **Start** (inicio) del software Millenium[32], que se encuentra en la barra de tareas.
6. Seleccionar **programs** (programas) Millenium[32] y a continuación Millenium[32] **Login** (iniciar sesión).
7. Ingresar **User** (Usuario) y **Password** (Contraseña).
8. Verificar la configuración de los sistemas Cromatográficos.
9. Posicionarse con el puntero en **Configure System** y con el botón derecho del mouse seleccionar **acquisition**.
10. Verificar los instrumentos cromatográficos configurados.

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/x*	*Iniciales/ Fecha*
1.	**Inicio del Software de Aplicación Millenium[32].**	Inicia la sesión automáticamente el software Millenium[32].	*Inicia la sesión el software Millenium32.*	√	*JLGG 09/Ago/04*
2.	**Ingreso de *User* y *Password* para acceder el sistema.**	El acceso al sistema es exitoso y se visualiza la pantalla de **Run Samples**.	*El acceso al sistema es exitoso y se visualiza la pantalla de Run Samples.*	√	*JLGG 09/Ago/04*
3.	**Verificación de los instrumentos cromatográficos configurados.**	Aparece el sistema cromatografico configurado: **600 717 2487 System**.	*Aparece el sistema cromatografico configurado: 600 717 2487 System.*	√	*JLGG 09/Ago/04*

Verificó: *JAL* — **Iniciales** ; *09/Ago/04* — **Fecha**

Nota: *(√) significa "Cumple" y (x) No cumple.*

4. VERIFICACIÓN DE OPERACIÓN DEL SISTEMA DE ENTREGA MULTISOLVENTE 600E.

4.1. Encendido del Sistema de Entrega Multisolvente 600E.

Propósito: Verifica que el modulo inicia correctamente mediante el encendido y desarrollo de los autodiagnósticos de rutina.

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/x*	*Iniciales/ Fecha*
1.	Asegure que el cable de energía del panel posterior se encuentre conectado a la fuente de alimentación, del sistema 600E.	El cable de energía se encuentra conectado a la fuente de alimentación.	*El cable de energía se encuentra conectado a la fuente de alimentación.*	√	*JLGG 09/Ago/04*
2.	Presiona el botón de encendido *On/ Off*, en la posición encendido (ON).	El sistema automáticamente realiza un autodiagnóstico y en la pantalla aparece el indicador "**Power up Diagnostic Status: OK**". **600E Gradient Controller**	*El sistema automáticamente realiza un autodiagnóstico y en la pantalla aparece el indicador "Power up Diagnostic Status: OK". 600E Gradient Controller*	√	*JLGG 09/Ago/04*
3.	Después que aparezca el indicador "*Power up Diagnostic Status: OK*", presionar la tecla *Setup* en la pantalla del controlador, presionar *System Configuration.*	Aparece en la pantalla el sistema configurado con el automuestreador 717Plus y Detector 2487 doble λ.	*Aparece en la pantalla el sistema configurado con el automuestreador 717Plus y Detector 2487 doble λ.*	√	*JLGG 09/Ago/04*
Verificó:	*YAL*	*09/Ago/04*			
	Iniciales	Fecha			

Nota: *(√) significa "Cumple" y (x) No cumple.*

4.2. Verificación de la Exactitud de la Presión.

Propósito: Verifica y comprueba la calibración de la presión a 0psi, como diagnostico de funcionamiento del sistema de entrega multisolvente 600E.

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/x*	*Iniciales/ Fecha*
1.	Seleccionar en la bomba flujo de 0mL/min., en el menú *main*, presionar la tecla *Diag Page.*	Aparece la pantalla **Diagnostic**.	*Aparece la pantalla Diagnostic.*	√	*JLGG 09/Ago/04*
2.	Presionar la tecla *User Main page.*	Aparece la pantalla **User Maintenance**.	*Aparece la pantalla User Maintenance.*	√	*JLGG 09/Ago/04*
3.	Presionar la tecla *Cal Page.*	Aparece la página **Calibration**.	*Aparece la página Calibration.*	√	*JLGG 09/Ago/04*
4.	Presionar la tecla *Autozero page.*	Aparece la página **AutoZero**.	*Aparece la página AutoZero.*	√	*JLGG 09/Ago/04*
5.	Presionar *Autozero Pressure.*	La presión final del sistema mostrada en la pantalla es **0psi**.	*La presión final es 0psi.*	√	*JLGG 09/Ago/04*
Verificó:	*YAL*	*09/Ago/04*			
	Iniciales	Fecha			

Nota: *(√) significa "Cumple" y (x) No cumple.*

4.3. Prueba de Exactitud de la Velocidad de Flujo

Propósito: Verifica y documenta que el modulo de entrega de solvente tiene la capacidad de mantener exacta y consistentemente el flujo de la fase móvil preseleccionado, para proveer interacciones estables y repetibles entre los analitos y la fase estacionaria. Ya que una exactitud pobre en la velocidad de flujo puede afectar los tiempos de retención en la separación de un analito.

Instrucciones:

1) El sistema de entrega multisolvente debe encontrarse encendido.
2) Coloca 2000mL de agua grado HPLC e inserta las cuatro líneas A, B, C y D, previamente filtrada (filtro de 0.45micras) y desgasificada (desgasificación con helio por 45 minutos).
3) En el controlador de la bomba, selecciona para cada línea 25%.
4) Selecciona velocidad de flujo de 4mL/min.
5) Después de 10 minutos reduce la velocidad de flujo a 0.0mL/min.
6) Coloca un vaso de precipitado de 100mL, a la salida de la tubería antes de insertarlo a la columna del automuestreador 717 Plus.
7) Verifica que el desgasificador se encuentre encendido, selecciona velocidad de purga 100% A.
8) Establece un flujo de 0.25mL/min, en el campo de velocidad de flujo en la pantalla **status**, y presionar **Enter**.
9) Cuando el flujo y la presión son estables, paralelamente inserta a la salida de la línea una probeta graduada de 50mL y mide el tiempo con un cronometro.
10) Para el cronometro hasta colectar el volumen descrito en la siguiente tabla.
11) Registra el tiempo en minutos. Y registra la presión del sistema.
12) Calcula la velocidad de flujo utilizando la siguiente ecuación y regístrala; repite nuevamente la prueba para cada una de las siguientes velocidades de flujo por duplicado.

Velocidad de Flujo = mL de agua colectados en la probeta/ tiempo en minutos.

Prueba No.	*Descripción de Prueba*	*Presión del Sistema (Psi)*	*Tiempo (Min)*	*Flujo Calculado (mL/Min)*	*Promedio (mL/min)*
1.	**Velocidad de Flujo 0.25mL/min. Colección de Volumen 5mL.**	*35*	*19.85*	*0.252*	*0.2515*
2.		*35*	*19.92*	*0.251*	
1.	**Velocidad de Flujo 1.0mL/min. Colección de Volumen 10mL.**	*82*	*9.93*	*1.007*	*1.0095*
2.		*83*	*9.88*	*1.012*	
1.	**Velocidad de Flujo 2.5mL/min. Colección de Volumen 20mL.**	*172*	*8.08*	*2.475*	*2.469*
2.		*174*	*8.12*	*2.463*	
1.	**Velocidad de Flujo 5mL/min. Colección de Volumen 50mL.**	*272*	*9.94*	*5.030*	*5.043*
2.		*275*	*9.89*	*5.056*	

Revisó:	*JLGG*	*09/Ago/04*
	Iniciales	**Fecha**
Verificó:	*JAL*	*09/Ago/04*
	Iniciales	**Fecha**

[redacted]

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/x*	*Iniciales/ Fecha*
1.	**Velocidad de Flujo 0.25mL/min. Colección de Volumen 5mL.**	0.25± 0.0025mL/min.	*0.2515*	√	*JLGG 09/Ago/04*
2.	**Velocidad de Flujo 1.0mL/min. Colección de Volumen 10mL.**	1.0± 0.01mL/min.	*1.0095*	√	*JLGG 09/Ago/04*
3.	**Velocidad de Flujo 2.5mL/min. Colección de Volumen 20mL.**	2.5± 0.025mL/min.	*2.469*	√	*JLGG 09/Ago/04*
4.	**Velocidad de Flujo 5mL/min. Colección de Volumen 50mL.**	5± 0.05mL/min.	*5.043*	√	*JLGG 09/Ago/04*

Verificó: *JAL* — **Iniciales** | *09/Ago/04* — **Fecha**

Nota: *(√) significa "Cumple" y (×) No cumple.*

Instrumento de Prueba Utilizado	*Modelo*	*No. de Serie*	*Fecha de Calibración/ Fecha de Próxima Calibración*	*Iniciales/ Fecha*
Cronometro Cole Parmer	*94410-20*	*S/N*	*24/May/05*	*JLGG 09/Ago/04*

4.4. Prueba de Proporción del Gradiente.

Propósito: Comprueba y documenta la capacidad de la bomba para trabajar con perfiles de gradiente, al proporcionar una mezcla de las líneas de solventes de manera gradual, en un intervalo de tiempo definido.

Instrucciones:

1. Crea un Método de instrumento en Millenium[32], para desarrollar la prueba de proporción de gradiente de acuerdo a las siguientes composiciones.

Etapa	*Tiempo (min.)*	*Velocidad de Flujo (mL/min.)*	*Prueba 1*		*Prueba 2*	
			% Línea A	*% Línea B*	*% Línea C*	*% Línea D*
1	0.0	2.0	100	0	100	0
2	3.0	2.0	0	100	0	100
3	6.0	2.0	20	80	20	80
4	9.0	2.0	40	60	40	60
5	12.0	2.0	60	40	60	40
6	15.0	2.0	80	20	80	20
7	18.0	2.0	100	0	100	0
8	21.0	2.0	100	0	100	0
9	24.0	2.0	100	0	100	0

2. Haz clic en la lista de instrumento en el automuestreador 717Plus y selecciona **Off**.
3. Guarda el método como **Prueba de Proporción de Gradiente (A/B y C/D)**.
4. Coloca en la línea de entrega A y C, 500mL de metanol al 100%, y en la línea B y D coloca una solución de propilparabeno (0.0056mg/ mL) en Metanol 500mL.
5. Coloca una tubería para conectar el sistema.
6. Purga todas las líneas por 10 minutos a una velocidad de flujo de 2mL/min.
7. Desarrolla un inyección sencilla de 1µL de metanol de 24 minutos de tiempo de corrida usando los iconos **Prepare** (preparar) e **Inyector** (Inyectar).
8. Proceso de resultados: Llevar el **channel** dentro de **Review**. Haz click en **Processing Method Wizard.**
9. Con el ratón verifica que los resultados de AU (Unidades de absorbancia) en el cromatograma.
10. Realiza los cálculos de proporción de gradiente, tomando como base el 100% de la AU (unidades de absorbancia) del pico máximo del cromatograma.

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado AU (Unidades de Absorbancia)*	*Resultado Actual*	*Cumple √/x*	*Iniciales/ Fecha*
1.	**Proporción de gradiente línea A/B etapa inicial.**	100%	*0.5004*	*100%*	√	*JLGG 09/Ago/04*
2.	**Proporción de gradiente línea A/B, etapa 1.**	80 ± 2%	*0.4089*	*81.7%*	√	*JLGG 09/Ago/04*
3.	**Proporción de gradiente línea A/B, etapa 2.**	60 ± 2%	*0.3074*	*61.4%*	√	*JLGG 09/Ago/04*
4.	**Proporción de gradiente línea A/B, etapa 3.**	40 ± 2%	*0.2091*	*41.7%*	√	*JLGG 09/Ago/04*
5.	**Proporción de gradiente línea A/B, etapa 4.**	20 ± 2%	*0.1057*	*21.1%*	√	*JLGG 09/Ago/04*
6.	**Proporción de gradiente línea A/B, etapa 5.**	0 ± 2%	*0.0010*	*0.19%*	√	*JLGG 09/Ago/04*

Verificó: *JAL* — *09/Ago/04*

Iniciales — **Fecha**

Nota: *(√) significa "Cumple" y (×) No cumple.*

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado AU (Unidades de Absorbancia)*	*Resultado Actual*	*Cumple √/×*	*Iniciales/ Fecha*
7.	**Proporción de gradiente línea C/D etapa inicial.**	100%	*0.5010*	*100%*	√	*JLGG 09/Ago/04*
8.	**Proporción de gradiente línea C/D, etapa 1.**	80 ± 2%	*0.4092*	*81.6%*	√	*JLGG 09/Ago/04*
9.	**Proporción de gradiente línea C/D, etapa 2.**	60 ± 2%	*0.3086*	*61.5%*	√	*JLGG 09/Ago/04*
10.	**Proporción de gradiente línea C/D, etapa 3.**	40 ± 2%	*0.2098*	*41.8%*	√	*JLGG 09/Ago/04*
11.	**Proporción de gradiente línea C/D, etapa 4.**	20 ± 2%	*0.1067*	*21.2%*	√	*JLGG 09/Ago/04*
12.	**Proporción de gradiente línea C/D, etapa 5.**	0 ± 2%	*0.0009*	*0.17%*	√	*JLGG 09/Ago/04*
Verificó:	*YAL*		*09/Ago/04*			
	Iniciales		**Fecha**			

Nota: *(√) significa "Cumple" y (×) No cumple.*
Nota$_2$: Ver resultados de la Prueba de Proporción de Gradiente, Anexo 1.

5. VERIFICACIÓN DE OPERACIÓN DEL AUTOMUESTREADOR 717Plus.

5.1. Encendido del Automuestreador 717Plus.

Propósito: Verificar y comprobar que el modulo opera correctamente mediante el encendido y el desarrollo de los autodiagnósticos de rutina.

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/×*	*Iniciales/ Fecha*
1.	**Antes de encender el modulo Automuestreador 717Plus, asegúrese de que el cable de energía del panel posterior se encuentre conectado a la fuente de alimentación.**	El cable de energía se encuentra conectado a la fuente de alimentación.	*El cable de energía se encuentra conectado a la fuente de alimentación.*	√	*JLGG 09/Ago/04*
2.	**Presiona el botón de encendido/Apagado *I/O* en la posición encendido (*I*), del panel frontal.**	El sistema automáticamente realiza un autodiagnóstico y en pantalla aparece el indicador "OK".	*El sistema automáticamente realiza un autodiagnóstico y en pantalla aparece el indicador "OK".*	√	*JLGG 09/Ago/04*
3.	**Esperar a que se complete la secuencia inicial y el mensaje *IDLE* debe aparecer en la esquina superior izquierda, como indicador de que el autodiagnóstico resulto exitoso.**	Aparece el mensaje **IDLE** en la esquina superior izquierda de la pantalla.	*Aparece el mensaje IDLE en la esquina superior izquierda de la pantalla.*	√	*JLGG 09/Ago/04*
Verificó:	*JAL*	*09/Ago/04*			
	Iniciales	**Fecha**			

Nota: *(√) significa "Cumple" y (×) No cumple.*

5.2. Prueba de Exactitud del Volumen de Inyección.

Propósito: Verifica y comprueba la capacidad del inyector para introducir la cantidad de muestra preseleccionada de manera exacta y la misma cantidad de muestra en inyecciones repetidas. Si la variabilidad de la muestra y el estándar que es inyectado dentro de la columna no es controlada estrictamente, el principio básico para la cuantificación del estándar externo es seriamente comprometido. Una comparación significativa entre las respuestas de la muestra y el estándar no puede ser realizado.

Instrucciones:

1) Colocar en la línea A, agua grado HPLC 100%.
2) Purgar el inyector, verificar que no exista alguna presencia de burbujas.
3) Colocar en un vial 4.0mL de agua grado HPLC con una pipeta volumétrica, colocar su tapa.
4) Pesar el vial con agua en una balanza analítica, registrar el peso P1.
5) Colocar el vial pesado previamente en la posición 1 del carrusel del automuestreador 717Plus.
6) Colocar la salida del automuestreador a un contenedor de desechos.
7) Colocar el flujo de la bomba a 1.0mL/min.
8) Presionar la tecla **Main Page**.
9) Programar la tecla **Stat Page**.
10) Presiona la tecla de la pantalla **Direct Funtion**.
11) Selecciona la función **Inject samples** en la pantalla de inyección de muestras.
12) Selecciona los siguientes valores en la pantalla **Inject samples**.

Parámetro	*Especificación*		
Rango de viales	1	2	3
Inyecciones por vial	16	8	4
Tiempo de corrida	0.5min.	0.5min	0.5min.
Volumen de inyección	25µL	50µL	100µL

13) Presionar la tecla **OK** para comenzar la corrida.
14) Una vez terminada la corrida remover los viales, pesarlos y registrar el peso P2, de cada uno.
15) Usar la siguiente formula para calcular el volumen promedio de agua inyectado por inyección.

(P1-P2)/ Inyecciones por Vial x 1000 = mg de agua por inyección = µL por inyección. El agua usada para esta prueba tiene una densidad de 0.99823 g/mL a 20° C y 0.99707 g/mL a 25° C, introduce un error de 0.3% entonces el volumen es igual al peso en gramos (gramosx1000 = µL).

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Peso Inicial del Vial*	*Peso Final del Vial*	*µL por Inyección*
1.	**Inyecciones de 25µL**	*8.1512*	*7.7477*	*25.2188*
		8.1624	*7.7564*	*25.375*
		8.1763	*7.7694*	*25.4313*
2.	**Inyecciones de 50µL**	*8.1879*	*7.7827*	*50.650*
		8.1612	*7.7578*	*50.425*
		8.1756	*7.7694*	*50.775*
3.	**Inyecciones de 100µL**	*8.1698*	*7.7644*	*101.35*
		8.1589	*7.7553*	*100.90*
		8.1817	*7.7793*	*100.60*

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/x*	*Iniciales/ Fecha*
1.	**Exactitud de la Inyección 25µL**	25 ± 0.5µL	*25.34µL*	√	*JLGG 09/Ago/04*
2.	**Exactitud de la Inyección 50µL**	50 ± 1.0µL	*50.62µL*	√	*JLGG 09/Ago/04*
3.	**Exactitud de la Inyección 100µL**	100 ± 2.0µL	*100.95µL*	√	*JLGG 09/Ago/04*
Verificó:	*YAL*	*09/Ago/04*			
	Iniciales	**Fecha**			

Nota: *(√) significa "Cumple" y (x) No cumple.*

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/x*	*Iniciales/ Fecha*
4.	**Precisión de la Inyección 25µL**	< 0.5% CV	*0.43% CV*	√	*JLGG 09/Ago/04*
5.	**Precisión de la Inyección 50µL**	< 0.5% CV	*0.35% CV*	√	*JLGG 09/Ago/04*
6.	**Precisión de la Inyección 100µL**	<0.5% CV	*0.37% CV*	√	*JLGG 09/Ago/04*
Verificó:	*YAL*	*09/Ago/04*			
	Iniciales	**Fecha**			

Nota: *(√) significa "Cumple" y (x) No cumple.*

Instrumento de Prueba Utilizado	*Modelo*	*No. de Serie*	*Fecha de Calibración/ Fecha de Próxima Calibración*	*Iniciales/ Fecha*
Balanza Analítica	*AT201*	*1118361951*	*Nov/04 / Nov/05*	*JLGG 09/Ago/04*

5.3. Prueba de Exactitud y Estabilidad de la Temperatura de la Columna.

Propósito: Verifica y comprueba que la temperatura del compartimiento de la columna es exacta, con respecto al valor seleccionado en la pantalla del controlador 600E; y que la temperatura es capaz de mantenerse estable durante un periodo de tiempo determinado. Para demostrar que el sistema no afecta los tiempos de retención y la respuesta del detector.

1. Coloca la sonda de un termohigrómetro patrón calibrado, a la mitad del compartimiento de la columna.
2. Con el teclado del controlador presiona **Set up** la pantalla de configuración de la bomba aparece.
3. Ingresa los siguientes parámetros de prueba en la pantalla **Pump Setup**.
   Reservoir sparge: disable.
   Pump Col. Temp. Heater Limit: 15° C.
   Press Limits: Low: 0 **High:** 4000Psi.
   Chart Out: No.
   Flow Factor: 1.00.
   Autostart: Enable.
4. Coloca un flujo de 1ml/ min en la velocidad de flujo.
5. Verifica que la presión del sistema no varié en más de ± 120psi.
6. Espera a que se estabilice la temperatura por 15 minutos.
7. Registra la temperatura tres veces cada 3 minutos.
8. Realiza los pasos 2 a 7 nuevamente para la temperatura de 25° C y 40° C.
9. Calcula el promedio de las tres mediciones y regístralo en el formato de resultados.
10. Para la prueba de estabilidad de temperatura de la columna, realiza los pasos 2 a 6.
11. Para cada temperatura (15° C, 25° C y 40° C), monitorear la temperatura a intervalos de 1 minuto, durante 30 minutos.
12. Calcula el promedio de las temperaturas y regístralo en el formato de resultados.

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado de la Medición (°C)*	*Resultado Actual*	*Cumple √/x*	*Iniciales/ Fecha*
1.	**Exactitud de Temperatura Punto 1**	15 ± 1° C.	15.34	15.32 °C	√	JLGG 09/Ago/04
			15.18			
			15.45			
2.	**Exactitud de Temperatura Punto 2**	25 ± 1° C.	25.17	25.20 °C	√	JLGG 09/Ago/04
			25.24			
			25.19			
3.	**Exactitud de Temperatura Punto 3**	40 ± 1° C.	40.25	40.22 °C	√	JLGG 09/Ago/04
			40.13			
			40.29			

Verificó: JAL — 09/Ago/04
Iniciales — **Fecha**

Nota: *(√) significa "Cumple" y (x) No cumple.*

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/x*	*Iniciales/ Fecha*
1.	**Estabilidad de Temperatura Punto 1**	15 ± 0.5° C.	*15.38*	√	*JLGG 09/Ago/04*
2.	**Estabilidad de Temperatura Punto 2**	25 ± 0.5° C.	*25.33*	√	*JLGG 09/Ago/04*
3.	**Estabilidad de Temperatura Punto 3**	40 ± 0.5° C.	*40.36*	√	*JLGG 09/Ago/04*

Nota: *(√) significa "Cumple" y (×) No cumple.*
Nota2: Ver resultados de la Prueba de Estabilidad de la Temperatura de la Columna, Anexo 2.

Instrumento de Prueba Utilizado	*Modelo*	*No. de Serie*	*Fecha de Calibración/ Fecha de Próxima Calibración*	*Iniciales/ Fecha*
Termohigrómetro Digital Vaisala (Sensor Temperatura)	*HMP35E*	*W3320004*	*30/Abr/04 / 30/Abr/05*	*JLGG 09/Ago/04*
Termohigrómetro Digital Vaisala (Lector Temperatura)	*HM138*	*V2050010*	*30/Abr/04 / 30/Abr/05*	*JLGG 09/Ago/04*
Cronometro Cole Parmer	*94410-20*	*S/N*	*30/Abr/04 / 24/May/05*	*JLGG 09/Ago/04*

6. VERIFICACIÓN DE OPERACIÓN DEL DETECTOR 2487 DOBLE λ.

6.1. Encendido del Detector 2487 doble λ.

Propósito: Verifica y comprueba que el detector opera correctamente mediante el encendido y el desarrollo de los autodiagnósticos de rutina.

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/x*	*Iniciales/ Fecha*
1.	**Antes de encender el detector 2487 doble λ, asegúrese de que el cable de energía del panel posterior se encuentre conectado a la fuente de alimentación.**	El cable de energía se encuentra conectado a la fuente de alimentación.	*El cable de energía se encuentra conectado a la fuente de alimentación.*	√	*JLGG 09/Ago/04*
2.	**Presiona el botón de encendido/Apagado *On/Off* en la posición encendido (*On*).**	El sistema emite tres tonos y automáticamente realiza un autodiagnóstico, cuando termina a aparece en la pantalla "**Absorbance**".	*El sistema emite tres tonos y automáticamente realiza un autodiagnóstico, cuando termina a aparece en la pantalla "Absorbance".*	√	*JLGG 09/Ago/04*
3.	**En caso de fallo de uno o más de los autodiagnósticos de inicialización, el detector muestra un mensaje de error.**	No se muestra ningún mensaje de error.	*No se muestra ningún mensaje de error.*	√	*JLGG 09/Ago/04*

Verificó: *JAL* — Iniciales; *09/Ago/04* — Fecha

Nota: *(√) significa "Cumple" y (x) No cumple.*

6.2. Verificación de la Respuesta de un Pico.

Propósito: Verifica y comprueba que el detector es capaz de obtener una respuesta de un pico.

Instrucciones

1. Defina la longitud de onda en 254nm en la pantalla **Absorbance** y presione **Enter**.
2. Presione **Enter** nuevamente para activar el campo **Sensitivity**.
3. Defina la sensibilidad en 2.0 **AUFS**.
4. Defina la velocidad de flujo de la bomba en su sistema HPLC en 1.0mL/min.
5. Inyecte 1mL de propilparabeno.
6. Cuando la prueba se realiza con éxito, el detector mostrara un pico.

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/x*	*Iniciales/ Fecha*
1.	**Inyección de la muestra de propilparabeno.**	El detector muestra un pico a 254nm.	*El detector muestra un pico a 254nm.*	√	*JLGG 09/Ago/04*

Verificó: *JAL* — Iniciales; *09/Ago/04* — Fecha

Nota: *(√) significa "Cumple" y (x) No cumple.*

6.3. Prueba de Calibración de Longitud de Onda.

Propósito: Verifica y comprueba que el detector desarrolla correctamente la auto- calibración de la longitud de onda.

Instrucciones

1. Presione **Calibrate** (**Shift DIAG**) en el teclado del Detector 2487.
2. Presione **Enter** para continuar el ciclo de calibración.
3. Para verificar que la calibración fue desarrollada adecuadamente, emite tres tonos y muestra el error máximo en nanómetros de la mayor variación de calibración.
4. Presione **Enter** para completar la calibración.

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/×*	*Iniciales/ Fecha*
1.	**Variación de Calibración**	Menor a ± 1nm.	*0.09nm.*	√	*JLGG 09/Ago/04*
2.	**Verificación de la Calibración Completa**	Aparece el mensaje **Calibration complete**, y se muestra la pantalla **absorbance.**	*Aparece el mensaje Calibration complete, y se muestra la pantalla absorbance.*	*Cumple*	*JLGG 09/Ago/04*

Verificó: *JAL* — **Iniciales** — *09/Ago/04* — **Fecha**

Nota: *(√) significa "Cumple" y (×) No cumple.*

6.4. Prueba de la Exactitud de la Longitud de Onda.

Propósito: Verifica y comprueba que el detector no presenta desviación en la lectura de la longitud de onda contra la banda de una longitud de onda conocida.

Instrucciones

1. Encienda el detector 2487 doble λ, por 60 minutos antes de desarrollar las pruebas.
2. Purgar el detector 2487 con metanol grado HPLC, por lo menos 15 minutos.
3. Correr un **Scan cero** colocando agua dentro de la celda de flujo.
4. Presionar **SCAN**, 1, **New Scan**, entonces presionar 2, **Zero Scan**.
5. Presionar **Next** para avanzar el segundo parámetro de la pantalla **Zero Scan.**
6. Introducir 257nm y presionar **Enter**.
7. Especificar 100nm/min en el campo de velocidad de barrido.
8. Presionar la tecla **Next** e introducir 2 en el valor de **AUFS** y presionar **Enter.**
9. Presionar **Run** para comenzar el barrido.
10. Limpie la cubeta para asegurar que no se encuentre sucia y la lectura sea incorrecta.
11. Pesar exactamente 40mg de propilparabeno y colocarlo en un matraz volumétrico de 200mL; disolver y aforar con metanol grado HPLC.
12. Llenar la celda con la solución de propilparabeno de 0.2mg/mL.
13. Esperar 15 minutos y correr el barrido de la solución en el detector 2487, como sigue:
14. Presionar **SCAN**, 1, **New Scan**, entonces presionar 1, **Sample Scan.**
15. Asegurarse de que los parámetros sean los mismos de cuando se corrió el **Scan cero.**
16. Ajustar el rango de barrido de190nm a 600nm.
17. Presionar **Run** para iniciar el barrido.
18. Al concluir el barrido, el detector despliega el espectro de propilparabeno.
19. Presionar **Next** para desplegar la longitud de onda con absorbancia máxima.

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/x*	*Iniciales/ Fecha*
1.	**Longitud de Onda de Absorción Máxima de Propilparabeno.**	256 ± 2nm	*257nm*	√	*JLGG 09/Ago/04*
Verificó:	*JAL*	*09/Ago/04*			
	Iniciales	**Fecha**			

Nota: *(√) significa "Cumple" y (x) No cumple.*

Estándar de Prueba Utilizado	*Marca*	*Lote*	*Fecha de caducidad*	*Iniciales/ Fecha*
Propilparabeno	*Merck Co, Inc.*	*L-000510208-000V006*	*31/May/05*	*JLGG 09/Ago/04*

6.5. Linealidad de Respuesta del Detector

Propósito: Verifica y comprueba que el detector es capaz de mostrar una respuesta lineal a diferentes concentraciones del analito.

Instrucciones

1. Preparación de soluciones estándar de propilparabeno.
   - Pesar exactamente 25mg de propilparabeno y colocarlo en un matraz aforado de 250mL y aforar con agua grado HPLC.
   - Tomar una alícuota de 5, 10, 20, 30, 40mL de esta solución y colocar cada una de estás alícuotas en un matraz volumétrico de 100mL diferente (etiquetar cada solución como estándar de concentración de 5, 10, 20, 30 y 40mg/L, respectivamente).
2. Colocar metanol 100% en la celda de flujo y colocar en cero la lectura del detector.
3. Colocar la longitud de onda en el detector a 272nm.
4. Registrar la lectura de absorbancia obtenida en la pantalla.
5. Colocar 3mL de la primera solución de prueba (5mg/mL) y colocarlos en la celda de flujo. Esperar 15 segundos para estabilizar la lectura.
6. Registrar la lectura de absorbancia
7. Colocar 3mL de la segunda solución de prueba (10mg/mL) y colocarlos en la celda de flujo. Esperar 15 segundos para estabilizar la lectura.
8. Realizar los mismos pasos para las soluciones de prueba restantes (20mg/mL, 30mg/mL y 40mg/mL).
9. Calcular la linealidad de respuesta.

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Sensibilidad= Abs/Conc*
1.	**Blanco**	0 mg/mL	*0*	*N/A*
2.	**Concentración de la solución 1.**	5mg/mL	*0.4563*	*0.09126*
3.	**Concentración de la solución 2.**	10mg/mL	*0.9172*	*0.09172*
4.	**Concentración de la solución 3.**	20mg/mL	*1.8167*	*0.09084*
5.	**Concentración de la solución 4.**	30mg/mL	*2.6254*	*0.08751*
6.	**Concentración de la solución 5.**	40mg/mL	*3.4468*	*0.08611*

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/×*	*Iniciales/ Fecha*
7.	**Linealidad de Respuesta**	< 5% CV de la Sensibilidad	*2.81% CV*	√	*JLGG 09/Ago/04*

Verificó: *YAL* — **Iniciales** *09/Ago/04* — **Fecha**

Nota: *(√) significa "Cumple" y (×) No cumple.*

Estándar de Prueba Utilizado	*Marca*	*Lote*	*Fecha de caducidad*	*Iniciales/ Fecha*
Propilparabeno	*Merck Co, Inc.*	*L-000510208-000V006*	*31/May/05*	*JLGG 09/Ago/04*

7. REPORTE DE NO CONFORMIDADES

No. de No Conformidad	Prueba/ Parámetro	Resolución	Firma/ Fecha
N/A			JLGG 09/Ago/04

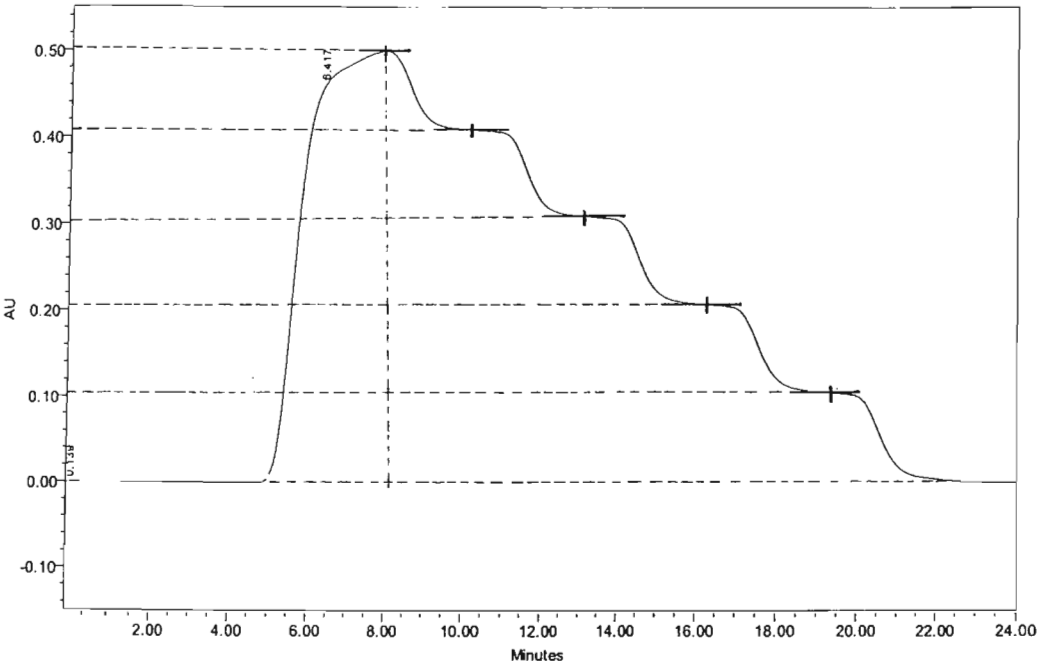
8. ANEXOS.

Anexo I.

Resultados de la Prueba de Proporción de Gradiente.

Calificación de operación
Prueba de Proporción de Gradiente, lineas A/B
Estándar: Propil Parabeno
Realizó: Juan Luis Garcia G.
Cromatografo de líquidos de alta resolución: Waters
Software: Millennium 32 Versión: 3.20

CROMATOGRAMAS



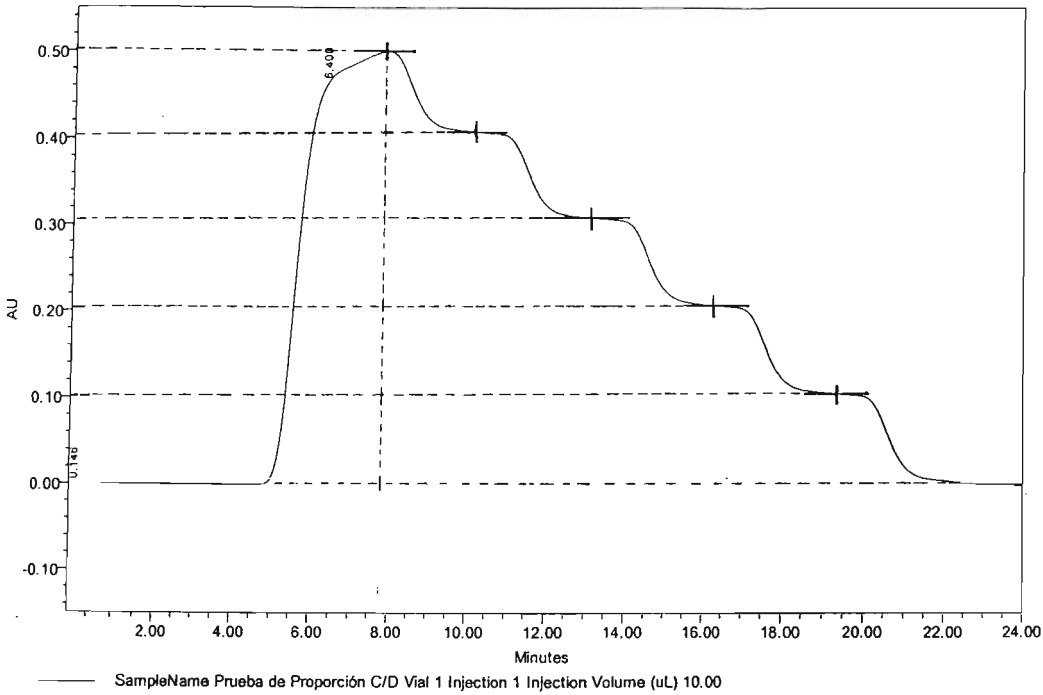
SampleName Prueba de Proporción A/B Vial 1 Injection 2 Injection Volume (uL) 10.00

	Nombre de la muestra	Tiempo de retención (min)	Area	Altura
1	Prueba de Proporción A/B	0.1	5338	562.7
2	Prueba de Proporción A/B	6.4	67078286	355794.7

20/08/04

Calificación de operación
Prueba de Proporción de Gradiente, lineas C/D
Estándar: Propil Parabeno
Realizó: Juan Luis García G.
Cromatografo de líquidos de alta resolución: Waters
Software: Millennium 32 Versión: 3.20

CROMATOGRAMAS



SampleName Prueba de Proporción C/D Vial 1 Injection 1 Injection Volume (uL) 10.00

20/08/04

Anexo II.

Resultados de la Prueba de Estabilidad de Temperatura de la Columna.

CALIFICACIÓN DE OPERACIÓN

PRUEBA DE ESTABILIDAD DE LA TEMPERATURA DE LA COLUMNA
Realizo: Juan Luis García G.

Condiciones Ambientales		Inicial	Final
	Temperatura	16° C.	16°C
	Humedad Relativa	55% HR.	57% HR

Instrumento de Medición	Marca	Modelo	Número de Serie
Termohigrómetro Digital (Sensor Temperatura)	Vaisala	HMP35E	W3320004
Termohigrómetro Digital (Lector Temperatura)	Vaisala	HMI38	V2050010
Cronometro	Cole Parmer	94410-20	S/N

	FECHA	TIEMPO (Minutos)	Temperatura (°C)	Medición (°C)	Temperatura (°C)	Medición (°C)	Temperatura (°C)	Medición (°C)
Verificación de Temperatura	09/08/2004	0.00	15	15.34	25	25.43	40	40.20
Verificación de Temperatura	09/08/2004	1.00	15	15.46	25	25.37	40	40.41
Verificación de Temperatura	09/08/2004	2.00	15	15.27	25	25.33	40	40.34
Verificación de Temperatura	09/08/2004	3.00	15	15.45	25	25.39	40	40.29
Verificación de Temperatura	09/08/2004	4.00	15	15.36	25	25.34	40	40.22
Verificación de Temperatura	09/08/2004	5.00	15	15.28	25	25.32	40	40.38
Verificación de Temperatura	09/08/2004	6.00	15	15.45	25	25.41	40	40.42
Verificación de Temperatura	09/08/2004	7.00	15	15.29	25	25.35	40	40.35
Verificación de Temperatura	09/08/2004	8.00	15	15.42	25	25.32	40	40.32
Verificación de Temperatura	09/08/2004	9.00	15	15.39	25	25.20	40	40.29
Verificación de Temperatura	09/08/2004	10.00	15	15.27	25	25.36	40	40.43
Verificación de Temperatura	09/08/2004	11.00	15	15.47	25	25.33	40	40.40
Verificación de Temperatura	09/08/2004	12.00	15	15.37	25	25.21	40	40.39
Verificación de Temperatura	09/08/2004	13.00	15	15.46	25	25.36	40	40.32
Verificación de Temperatura	09/08/2004	14.00	15	15.45	25	25.28	40	40.41
Verificación de Temperatura	09/08/2004	15.00	15	15.35	25	25.32	40	40.40
Verificación de Temperatura	09/08/2004	16.00	15	15.29	25	25.29	40	40.28
Verificación de Temperatura	09/08/2004	17.00	15	15.41	25	25.24	40	40.21
Verificación de Temperatura	09/08/2004	18.00	15	15.29	25	25.34	40	40.39
Verificación de Temperatura	09/08/2004	19.00	15	15.45	25	25.32	40	40.42
Verificación de Temperatura	09/08/2004	20.00	15	15.39	25	25.47	40	40.30
Verificación de Temperatura	09/08/2004	21.00	15	15.27	25	25.32	40	40.39
Verificación de Temperatura	09/08/2004	22.00	15	15.47	25	25.29	40	40.41
Verificación de Temperatura	09/08/2004	23.00	15	15.43	25	25.32	40	40.39
Verificación de Temperatura	09/08/2004	24.00	15	15.27	25	25.35	40	40.33
Verificación de Temperatura	09/08/2004	25.00	15	15.46	25	25.28	40	40.43
Verificación de Temperatura	09/08/2004	26.00	15	15.37	25	25.26	40	40.39
Verificación de Temperatura	09/08/2004	27.00	15	15.26	25	25.39	40	40.40
Verificación de Temperatura	09/08/2004	28.00	15	15.45	25	25.28	40	40.37
Verificación de Temperatura	09/08/2004	29.00	15	15.27	25	25.42	40	40.39
Verificación de Temperatura	09/08/2004	30.00	15	15.49	25	25.30	40	40.44
Promedio				**15.38**		**25.33**		**40.36**

Nota: La temperatura, corresponde a la seleccionada en la pantalla del automuestreador 717 Plus, y la medición se refiere a la temperatura obtenida en el termohigrometro patrón. Las lecturas fueron registradas después de 15 minutos de estabilización.

Realizó: *JLGG 09/Ago/04*

Verificó: *YAL 09/Ago/04*

APENDICE V. PROTOCOLO DE CALIFICACIÓN DE DESEMPEÑO

[redacted]

Protocolo de Calificación de Desempeño

Sistema:	Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución		
Marca:	Waters	**Revisión:**	1.0
Fecha:	15/Agosto/2004	**Paginas Totales:**	27
Realizado por:	Juan Luis García Guzmán	**Revisado por:**	Ramón Rodríguez Hernández
Verificado por:	Yanet Angélica Lizarraga		

Tabla de Contenido

1. INTRODUCCIÓN 3
   1.1 Proposito 3
   1.2 Alcance 3
   1.3 Instrucciones 3

2. PRERREQUISITOS 4

3. OPERACIÓN DEL SOFTWARE MILLENIUM[32] 4

   3.1 Creación del Proyecto 7
   3.2 Creación del Método de Instrumento 8
   3.3 Secuencia de Muestras 9
   3.4 Creación del Método de Proceso 10
   3.5 Generación y Diseño de Informes 13
   3.6 Administración de la Configuración 14
      3.6.1 Respaldo de Proyectos 14
      3.6.2 Recuperación de Proyectos 14

4. PRUEBAS DE DESEMPEÑO DEL SISTEMA DE CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN 15
   4.1 Estándar de Acido Benzoico 15
   4.2 Estándar de Metilparabeno 16
   4.3 Estándar de Propilparabeno 17

5. REPORTE DE NO CONFORMIDADES 18

6. ANEXOS 19

1. INTRODUCCIÓN

La Calificación de desempeño, del sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución, contiene las pruebas críticas para evaluar la integridad del sistema, a través de los requerimientos para su uso rutinario.

1.1. Propósito

Este protocolo aplica a la Calificación de Desempeño, para el Sistema "Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución" Marca Waters.

1.2. Alcance

Este protocolo cubre los requerimientos críticos de desempeño, para la evaluación del sistema completo a ser verificado y evaluado.

1.3. Instrucciones

1) Registrar las instrucciones que deban ser seguidas para ejecutar este documento.

2) El Protocolo de Calificación de Instalación y Operación del Sistema debe estar terminado para poder continuar con el presente Protocolo de Calificación de Desempeño.

3) El Protocolo de Calificación de Desempeño del Sistema debe ser completado y aceptado con base en el Cumplimiento de las condiciones siguientes:

- Las pruebas de Desempeño del sistema cumple con las especificaciones.
- Cuando proceda, todas las no conformidades han sido documentadas adecuadamente en el Reporte de No Conformidades y Resueltas (apartado 11).
    - Una no conformidad se presenta cuando no alcanza o no iguala el criterio de aceptación.
    - Se cambia el criterio de aceptación.
    - No se sigue el procedimiento o instrucciones de prueba.
- Firma y fecha cada apartado de prueba una vez realizada la acción, es decir, en el momento en que se genera.
- Para su Aprobación Final, todas las no conformidades deben estar cerradas (o ausencia de toda no conformidad).

3) El protocolo ha sido concluido de acuerdo con las Buenas Prácticas de Documentación.

2. PRERREQUISITOS

Propósito: Antes de realizar y ejecutar las pruebas de la Calificación de Desempeño, debe haber sido completada la Calificación de Instalación y Operación, para evitar no conformidades e impacto en los resultados de la Calificación de Desempeño.

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/x*	*Iniciales/ Fecha*
1.	**Protocolo de Calificación de Instalación**	Completado	*Completado*	√	*JLGG 15/Ago/04*
2.	**Protocolo de Calificación de Operación**	Completado	*Completado*	√	*JLGG 15/Ago/04*
Verificó:	*JAL*	*16/Ago/04*			
	Iniciales	**Fecha**			

3. OPERACIÓN DEL SOFTWARE MILLENIUM[32].

Propósito: Verificar y comprobar que el software opera adecuadamente al desarrollar los operaciones requeridas en una corrida cromatográfica.

1. Para verificar y comprobar que el software opera correctamente deben ser seguidas y desarrolladas las etapas 3.1 a 3.7; y documentadas en la tabla de este apartado.
2. Después de realizar la introducción de datos en las pruebas de operación del software Millenium[32], se realizarán las pruebas de calificación de desempeño, con las etapas previas, para generar una corrida cromatográfica y evaluar la funcionalidad del sistema completo.
3. Antes de iniciar la verificación de operación del software es necesario preparar el sistema de cromatografía para realizar la prueba de desempeño, subsecuentemente.

4. Preparación de la fase móvil.

    a. Fase móvil A: Mezclar 2000mL de agua grado HPLC con 2mL de ácido fosforico (H_3PO_4).
    b. Fase móvil B: Mezclar 2000mL de acetonitrilo grado HPLC con 2mL de ácido fosforico (H_3PO_4).
    c. Filtrar cada fase móvil por un filtro de 0.45 Micras.
    d. Desgasifica cada fase móvil durante 30 minutos con helio.

5. Preparación de la mezcla de prueba de los estándares de propilparabeno, metilparabeno y ácido benzoico.

    a. Preparar una solución de 0.08mg/mL de propilparabeno con 0.04mg/mL de metilparabeno y 0.5mg/mL de ácido benzoico.
    b. Pesar exactamente 50mg del estándar de ácido benzoico y colocarlo en un matraz volumétrico de 100mL, disolver con 50mL de agua grado HPLC y sonicar por 30 minutos.
    c. Pesar exactamente 40mg de propilparabeno y colocarlo en un matraz volumétrico de 25mL; disolver con agua grado HPLC a una temperatura de 40° C aproximadamente y sonicar por 30 minutos; aforar y transferir 5mL de está solución a la solución de ácido benzoico.

d. Pesar exactamente 50mg del estándar de metilparabeno y colocarlo en un matraz volumétrico de 50mL, disolver con 25mL de agua grado HPLC y sonicar por 30 minutos; aforar y transferir 4mL de está solución con una pipeta graduada al matraz volumétrico del estándar de acido benzoico.
e. Aforar el matraz con la mezcla de estándares, con agua grado HPLC.
f. Coloca la fase móvil en la línea A, y sumerge completamente el filtro de la línea.
g. Coloca la fase móvil en la línea B, y sumerge completamente el filtro de la línea.

6. Crear un proyecto con el nombre **Calificación_PQ**, seguir lo descrito en la sección 3.1 Creación del proyecto.
7. Crear el método de instrumento tomando en cuenta las condiciones de prueba descritas en la sección 3.2 Creación del Método de Instrumento.
   a. Conectar una columna Symmetry® C_{18} (3.9 x 150mm) 5µ y estabilizar el sistema a flujo de 0.5mL/min durante 30 minutos.
   b. Verifica que la presión se estabilice y que no presente fluctuaciones de ± 120psi.
   c. Enciente todos los módulos y espera 30 minutos a que la lámpara del detector se estabilice.
   d. Coloca 6 viales con la mezcla de prueba de estándares.

8. Realizar la secuencia de muestras de los estándares a procesar, según lo descrito en la sección 3.3 Secuencia de Muestras.
   a. Hacer clic en **setup**.
   b. Cuando la barra de estado indique que el sistema esta inactivo, haga clic en **Monitor** y aparecerá una línea base en tiempo real.
   c. Cuando la línea base se haya estabilizado, haga clic en la herramienta **abort** para detener el proceso.
   d. Haga clic en el botón **inject** para iniciar la adquisición de datos.

9. Crear un método de proceso de datos de acuerdo a la sección 3.4 Creación de un Método de Proceso.
10. Siga los descrito en la sección 3.5 Revisión de resultados y Crear una curva de calibración de cada estándar procesado, con base en las áreas.
11. Crear un Informe personalizado de acuerdo a la sección 3.6 Generación y diseño de Informes.
12. Una vez que se ha llevado acabo la adquisición, se procesan datos y el software genera automáticamente un informe impreso.
13. Comprobar que el respaldo y recuperación de los datos electrónicos generados en una corrida cromatográfica, a través del software Millenium[32], seguir las instrucciones de prueba y operación del software de la sección 3.7.

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/x*	*Iniciales/ Fecha*
1.	**Creación del Proyecto**	El software Millenium opera correctamente al crear un proyecto (**Calificación_PQ**).	*El software Millenium crea el proyecto Calificación_PQ.*	√	*JLGG 15/Ago/04*
2.	**Creación del Método de Instrumento**	El software Millenium opera correctamente al crear el método de instrumento (**Calificación_PQ**).	*El software Millenium crea el método de instrumento Calificación_PQ.*	√	*JLGG 15/Ago/04*
3.	**Secuencia de Muestras.**	El software Millenium opera correctamente al crear la secuencia de muestras.	*El software Millenium crea la secuencia de muestras.*	√	*JLGG 15/Ago/04*
4.	**Creación del Método de Proceso.**	El software Millenium opera correctamente al crear el método de proceso.	*El software Millenium crea el método de proceso.*	√	*JLGG 16/Ago/04*

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/×*	*Iniciales/ Fecha*
5.	**Creación de una curva de calibración de cada estándar.**	El software Millenium opera correctamente al crear una curva de calibración de cada estándar.	*El software Millenium crea una curva de calibración de cada estándar.*	√	*JLGG 16/Ago/04*
6.	**Generación y Diseño de Informes.**	El software Millenium opera correctamente al generar el Informe de Resultados.	*El software Millenium genera el Informe de Resultados.*	√	*JLGG 16/Ago/04*
7.	**Administración de la Configuración**	El software Millenium realiza correctamente el respaldo de información mediante el uso de copias de seguridad.	*El software Millenium respalda de información mediante el uso de copias de seguridad.*	√	*JLGG 16/Ago/04*
8.		El software Millenium realiza correctamente la recuperación de proyectos resguardados como respaldo de información mediante en copias de seguridad.	*El software Millenium recupera los proyectos resguardados como respaldo de información mediante en copias de seguridad.*	√	*JLGG 16/Ago/04*
9.	**Creación de Audit Trail (registro de modificaciones)**	El software Millenium crea un registro de modificaciones al final de la corrida.	*El software Millenium crea un registro de modificaciones al final de la corrida.*	√	*JLGG 16/Ago/04*

Verificó: *JAL* *16/Ago/04*

Iniciales **Fecha**

Nota: *(√) significa "Cumple" y (×) No cumple.*

Estándar de Prueba Utilizado	*Marca*	*Lote*	*Fecha de caducidad*	*Iniciales/ Fecha*
Ácido Benzoico	*Merck Co, Inc.*	*L-000481100-000J022*	*30/Abr/07*	*JLGG 15/Ago/04*
Metilparabeno	*Merck Co, Inc.*	*L-000474898-000V009*	*30/Jun/08*	*JLGG 15/Ago/04*
Propilparabeno	*Merck Co, Inc.*	*L-000510208-000V006*	*31/May/05*	*JLGG 15/Ago/04*

3.1. Creación del Proyecto.

Propósito: Verifica la creación de un proyecto para la colección de métodos, resultados, campos personalizados y datos sin procesar en el software cromatografico Millenium[32].

Instrucciones.

1. Haga clic con el botón derecho del ratón en **Configure System** en la ventana **login** de Millenium y seleccione **Projects** del menú contextual.

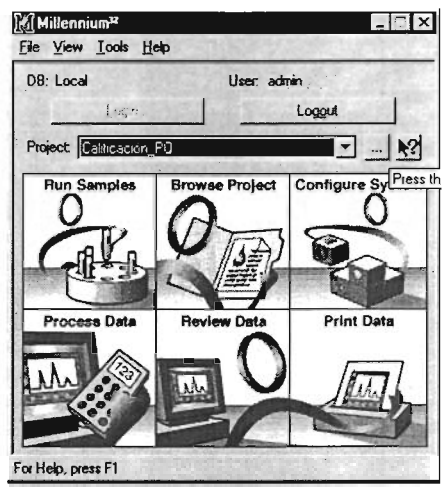


Figura 1. Página de acceso al proyecto Calificación_PQ.

2. Haga clic con el botón derecho del ratón en el recuadro de árbol de la ventana **configuration Manager**, seleccione **New** del menú contextual y, a continuación, seleccione **Project** del menú de cascada. Se activará **New Project Wizard**. Aparecerá la página **Tablespace**.
3. Acepte la selección propuesta por defecto de 10Mb.
4. Haga clic en la casilla de **Full Audit Trail Support** (Registro obligatorio de modificaciones). Para crear un registro de datos de todos los cambios que se han realizado en los elementos del proyecto.
5. Haga clic en **Next**. Aparecerá la página **New Project Wizard Access Control**.
6. La página Access control establece el nivel de acceso que tendrán los usuarios al proyecto, introduzca la información necesaria y haga clic en **Next**. Aparecerá la página **New Project Wizard- Copy Selection** (Seleccionar que copiar).
7. Haga clic en **Next**, aparecerá la página **New Project Wizard- Name Entry**.
8. Introduzca el nombre de proyecto **Calificación_PQ**, en el campo **Project Name**.
9. Haga clic en **Finish**. Volverá aparecer el **Configuration Manager**.

3.2. Creación del Método de Instrumento.

Propósito: Verifica y comprueba que el método de instrumento controla los instrumentos cromatográficos del sistema. Mediante la introducción de los parámetros de prueba requeridos en una corrida cromatográfica.

Instrucciones:

1. En **Run Samples** en la ficha **single** seleccione **Develop Methods** (Desarrollar métodos).
2. Aparece la página **New Method Set**, seleccione **Create New**, para editar el método de instrumento, aparecerá la ventana **Method Instrument Editor**, haga clic en **General** (muestra los módulos configurados).
3. Haga clic en el icono del Sistema de Entrega Multisolvente 600E, y a continuación en la ficha **Flow** (Flujo).
4. En los límites de presión bajos y altos seleccione 0 y 4000psi.
5. Seleccione el modo de bomba gradiente y velocidad de flujo de 1mL/min.
6. Programe un gradiente automático de 0 a 80% de B en 40 minutos: Introduzca la siguiente tabla de gradiente:

Etapa	*Tiempo (min)*	*Flujo (mL/min)*	*%A*	*%B*
1	0	1.0	100.0	0.0
2	40	1.0	20.0	80.0
3	41	1.0	50.0	50.0
4	45	1.0	100.0	0.0
5	50	1.0	100.0	0.0

7. En la ficha **Degas** verifique que se encuentre sin desgasificar.
8. Haga clic en el icono del detector 2487, aparece la ficha de propiedades **General**, seleccione **Enable** (activar) en la sección **Channel 1**.
9. Seleccione la ficha **Channel 1**, y especificar 254nm en los parámetros de longitud de onda (**wavelength**) y acepte los valores predeterminados.
10. Haga clic en la herramienta **Save** (guardar). Aparecerá el cuadro de dialogo **Save Current Instrument Method** (guardar actual método de instrumento).
11. Guarde el método como **Calificación_PQ**.
12. Cierre el editor de método de instrumento. Aparecerá la página **New Method Set- Select Instrument Method** (Nuevo conjunto de métodos – Seleccionar Método de Instrumento).
13. Seleccione el nombre del método de Instrumento: Calificación_PQ y haga clic en **Next** (siguiente).
14. Aparece la página **Select Default Methods** (seleccionar métodos por defecto), presione **Next** (siguiente).
15. Aparecerá en la página **Name Method Set** (Nombre de Conjuntos de Método).
16. Teclee el nombre **Calificación_PQ**, añada los comentarios pertinentes y haga clic en **Finish** para salir. Volverá a aparecer la ventana de **run samples**.

3.3. Secuencia de Muestras.

Propósito: Comprueba la operación del software al editar una secuencia de muestras utilizando las aplicaciones para realizar inyecciones múltiples y la adquisición de datos.

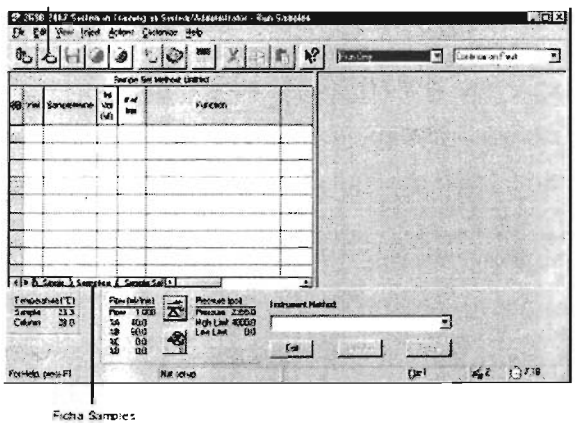


Figura 2. Run samples con información procedente del asistente del editor de secuencias de muestras.

1. Acceda a **Run Samples** y haga clic en la ficha **Samples** (Muestras). Aparecerá la ficha de la ventana **Samples**.
2. En la lista de selección de modalidad seleccione **Run only** (solo corrida).
3. Seleccione en la lista de selección del **Instrument Method: Calificación_PQ**.
4. Introduzca la siguiente secuencia de muestras:

Vial	*Nombre de la Muestra*	*Volumen de Inyección (µL)*	*# de Inyecciones*
1	Blanco-1	20.0	2
2	Estandar-1	20.0	1
3	Estandar-2	20.0	1
4	Estandar-3	20.0	1
5	Estandar-4	20.0	1
6	Estandar-5	20.0	1
7	Estandar-6	20.0	1
8	Blanco-2	20.0	1

5. Verifique que en el apartado **Run time** (tiempo de análisis) 50.0 minutos.
6. Haga clic en el botón **Inject** (Inyectar).
7. En el recuadro de la gráfica de tiempo real se visualiza la línea base y el desarrollo de la corrida cromatografica.
8. En la parte baja de la ventana **samples**, se visualiza el cambio de gradiente automático a través del tiempo.

3.4. Creación del Método de Proceso.

Propósito: La creación de un método de proceso, debe ser comprobada para evaluar el procesamiento de datos mediante el software Millenium[32]; Para indicar al software como:

- Integrar datos.
- Calibrar estándares.
- Cuantificar muestras problema.

Instrucciones:

1. Después que se hayan eluido los picos de interés, acceda a la ventana **Project**, haga clic en la ficha **channel** para poder acceder a los datos de los canales no procesados.

Calificacion_PQ in Calificación_PQ as admin/Administrator - Sample Set Method Editor

File Edit View Help

	Vial	SampleName	Inj Vol (ul)	# of Injs	Function	Method Set / Report Method	Run Time (Minutes)
1	91	BLANCO PBA	20.0	3	Inject Samples	Calificacion_PQ	50.00
2	1	BLANCO-1	20.0	1	Inject Samples	Calificacion_PQ	50.00
3	2	ESTANDAR-1	20.0	1	Inject Samples	Calificacion_PQ	50.00
4	3	ESTANDAR-2	20.0	1	Inject Samples	Calificacion_PQ	50.00
5	4	ESTANDAR-3	20.0	1	Inject Samples	Calificacion_PQ	50.00
6	5	ESTANDAR-4	20.0	1	Inject Samples	Calificacion_PQ	50.00
7	6	ESTANDAR-5	20.0	1	Inject Samples	Calificacion_PQ	50.00
8	7	ESTANDAR-6	20.0	1	Inject Samples	Calificacion_PQ	50.00
9	8	BLANCO-2	20.0	1	Inject Samples	Calificacion_PQ	50.00
10					Condition Column	LAVADO	50.00

For Help, press F1

Figura 3. Ventana principal Results, previo al desarrollo del método de proceso.

2. Seleccione todas las muestras adquiridas y haga clic en la herramienta **Review** para transferir las muestras a **Review**.
3. Haga clic en la herramienta **Set Method Peak Width**. El software determina automáticamente el valor del ancho de pico del método de proceso (auto- peak width).
4. Haga clic en la herramienta **Set Method Threshold** (Definir el umbral de método). El software determina automáticamente el valor el valor del umbral del método de proceso (auto-Threshold).
5. Haga clic en la herramienta **Integrate** para integrar el cromatograma utilizando las configuraciones Peak width y Threshold.
6. Haga clic en la herramienta **Processing Method** para acceder a la ventana **Processing Method**. Si fuera necesario, haga clic en la ficha **Integration**.
7. En la ficha **Integration**, seleccione en **Time**: 0.0, **Stop**: 50.0 y **Type**: Valley to Valley.

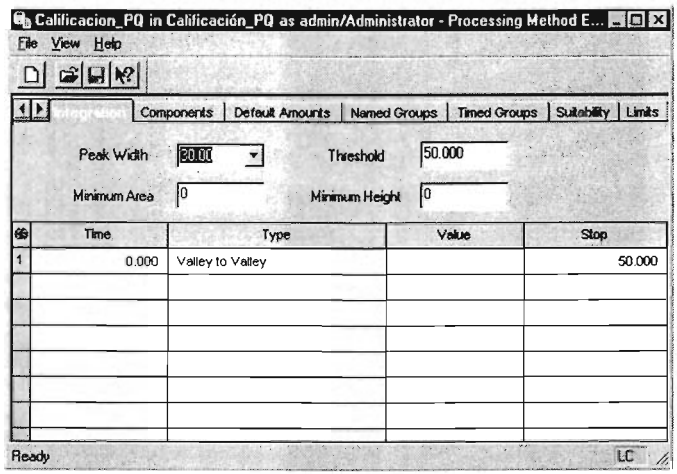


Figura 4. Ventana Processing Method, ficha Integration

8. Haga clic en la ficha de propiedades **Components.** Aparecerá la ficha de propiedades de los componentes.
9. Haga clic en la herramienta **Fill from Results** (rellenar con los resultados), para introducir los parámetros de calibración en la tabla con los picos de integración actual. Cambie los nombres por los siguientes:

Pico 1: Acido Benzoico.
Pico 2: Metilparabeno.
Pico 3: Propilparabeno.

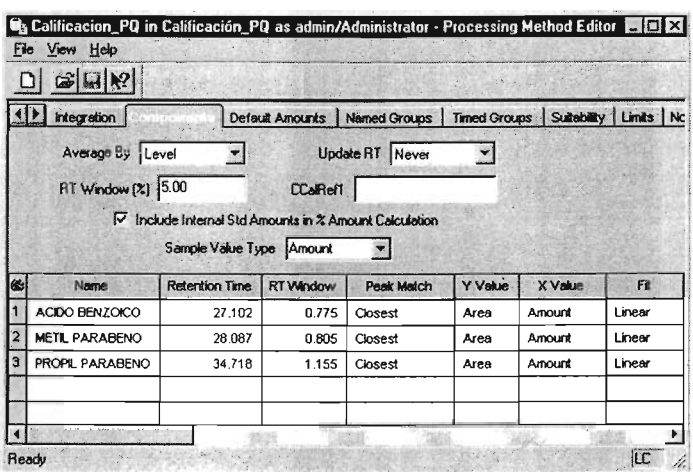


Figura 5. Ventana Processing Method, ficha de propiedades Components.

10. Haga clic en la herramienta **Review Main Window**. Aparecerá la ventana principal de **Review**.
11. Guarde el método de proceso, como **Calificación_PQ** en el campo nombre y escriba el comentario actualización.

3.5. Generación y Diseño de Informes.

Propósito: Verifica y comprueba que los datos procesados son presentados en un informe de resultados.

1. Acceda a la ventana **Project** y haga clic en la ficha de visualización **Results**.
2. Seleccionar los resultados y haga clic en la herramienta **Preview** (Vista preeliminar). Aparecerá el cuadro de dialogo **Open Report Method** (Abrir Método de Reporte).

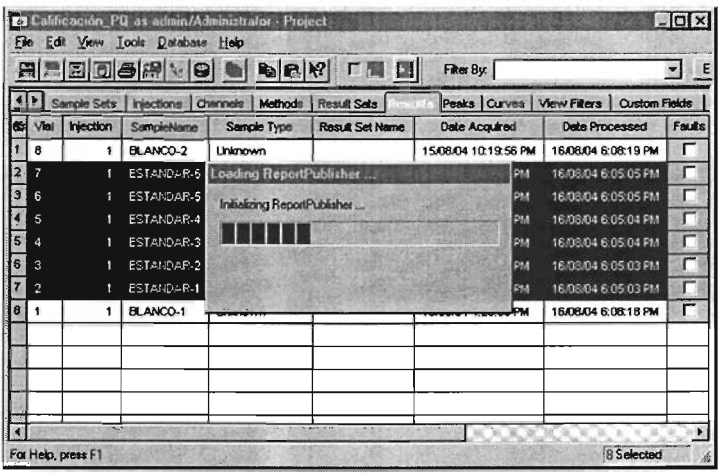


Figura 6. Ventana Results, procesando la vista preeliminar del informe.

3. Seleccionar **Use the following Report Method** (Utilizar el siguiente método de informe), seleccione el método de informe **Calificación_PQ** de la lista desplegable, haga clic en **OK**. Aparece la ventana **Report Publisher Preview** (Vista preeliminar del editor de informes) y mostrara los datos cromatográficos en el formato de informe especificado.
4. Haga clic en la herramienta **Print**, aparecerá el cuadro de dialogo **Print** y haga clic en **OK**.

3.6. Administración de la Configuración (Configuration Manager).

3.6.1. Respaldo de Proyectos.

Propósito: Comprueba que el respaldo de la información, es realizado mediante el uso de copias de seguridad que aseguren la integridad y mantenimiento de los datos ante un posible falló en el sistema. Archivar la información de un proyecto inactivo, con la finalidad de liberar espacio en disco duro, y archivar los datos fuera del sistema y borrándolos en el disco duro.

1. Para realizar la copia de seguridad de un proyecto (**Backup**), hacer clic con el botón derecho del ratón en **configure System** de la ventana **Login** de Millenium[32] y seleccione **Projects** del menú contextual.
2. Del recuadro **visualización**, seleccione el proyecto que desee copiar.
3. Haga clic con el botón derecho del ratón en los proyectos y seleccione **Backup Project** (Copia de seguridad del proyecto). Aparecerá la página **Backup Project Wizard-Comment Entry**, introduzca los datos solicitados y haga clic en **Next** (Siguiente).
4. Aparecera la página **Backup Project Wizard- Select Destination** (Asistente para realizar copias de seguridad-seleccionar destino).
5. Haga clic en el botón **browse**, (previamente crear una carpeta de respaldo en el disco duro), y a continuación haga clic en **Next**. Y los datos son exportados, una vez terminada la operación haga clic en **Finish**. Volverá aparecer el **Configuration Manager** (Administrador de la Configuración).
6. Copie esta carpeta en discos de 3 1/2 con ayuda del programa Winzip 8.0.

3.6.2. Recuperación de Proyectos.

Propósito: Comprobar que la información de respaldo guardada en copias de seguridad, se puede recuperar, para comprobar la integridad y mantenimiento de lo datos.

1. Antes de recuperar el proyecto utilice el explorador de windows, para examinar la unidad A ejecutable y buscar los directorios y subdirectorios de la copia de **back up** del proyecto.
2. Para realizar la recuperación de un proyecto se debe acceder a la pantalla de Administrador de la configuración.
3. Haga clic con el botón derecho del ratón en el recuadro de árbol del **Configuration Manager** y seleccione **Restore Project** del menú contextual. Aparecerá la página **Restore Project Wizard- Start Software**.
4. Inicie el programa de **backup** para recuperar la copia de seguridad del proyecto, haga clic en **Start Backup Software**, y haga clic en **Next**. Aparecerá la página **Restore Project Wizard-Couta Entry**.
5. Modifique si es necesario los campos **Project Name** (Nombre del Proyecto) y **Tablespace details** (Detalle del Espacio de la Tabla). Realice los cambios necesarios y a continuación haga clic en **Next**. Aparecerá la página **Restore Project Wizard- Restore Display** y haga clic en **Finish**.
6. Aparecerá el proyecto recuperado en la visualización **Projects** del Administrador de la Configuración mediante la selección **Refresh** del menú **View**.

4. PRUEBAS DE DESEMPEÑO DEL SISTEMA DE CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.

Propósito: Verifica y comprueba que el sistema es capaz de desarrollar una prueba de integración del sistema, al realizar y controlar las actividades de proceso rutinario, mediante la medición de los parámetros: precisión del tiempo de retención, como parámetro primario de la identificación de los picos cromotagraficos, (evalúa la capacidad de la bomba para entregar la fase móvil a la velocidad seleccionada y la estabilidad de la temperatura de la columna); precisión del área y la altura del pico cromatografico como respuesta a la integración del software y la capacidad del autoinyector de introducir volúmenes reproducibles de las muestras.

Instrucciones

1. Una vez que haya desarrollado las etapas de la sección 3. Operación del Software Millenium[32]; calcular con el software los resultados de la corrida cromatográfica de prueba.

4.1. Estándar de Ácido Benzoico.

Muestra	*Tiempo de Retención*	*Área del Pico*	*Altura del Pico*	*Iniciales/ Fecha*
1	27.1	4940114	446423.7	JLGG 16/Ago/04
2	27.1	4944445	447572.8	JLGG 16/Ago/04
3	27.1	4954248	447793.5	JLGG 16/Ago/04
4	27.1	4959247	446869.3	JLGG 16/Ago/04
5	27.1	4956893	448969.3	JLGG 16/Ago/04
6	27.1	4958712	448878.4	JLGG 16/Ago/04
Promedio	27.1	4952276.6	447751.2	JLGG 16/Ago/04
% Coeficiente de Variación.	0.1	0.2	0.2	JLGG 16/Ago/04

Verificó: YAL — Iniciales; 16/Ago/04 — Fecha

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/x*	*Iniciales/ Fecha*
1.	Precisión del Tiempo de Retención	% CV ≤ 1.0	0.1% CV	√	JLGG 16/Ago/04
2.	Precisión de las Áreas del Pico	% CV ≤ 1.0	0.2% CV	√	JLGG 16/Ago/04
3.	Precisión de la Altura del Pico	% CV ≤ 1.0	0.2% CV	√	JLGG 16/Ago/04
4.	Arrastre del Estándar en Áreas	% con respecto al promedio de las áreas ≤ 0.20	No Detectada	√	JLGG 16/Ago/04
5.	Arrastre del Estándar en Altura	% con respecto al promedio de las alturas ≤ 0.40	No Detectada	√	JLGG 16/Ago/04

Verificó: YAL — Iniciales; 16/Ago/04 — Fecha

4.2. Estándar de Metilparabeno.

Muestra	*Tiempo de Retención*	*Área del Pico*	*Altura del Pico*	*Iniciales/ Fecha*
1	*28.1*	*6795397*	*804165.7*	*JLGG 16/Ago/04*
2	*28.1*	*6798019*	*804594.2*	*JLGG 16/Ago/04*
3	*28.1*	*6784834*	*799946.5*	*JLGG 16/Ago/04*
4	*28.1*	*6798970*	*802852.6*	*JLGG 16/Ago/04*
5	*28.1*	*6822977*	*796738.6*	*JLGG 16/Ago/04*
6	*28.1*	*6809515*	*798145.4*	*JLGG 16/Ago/04*
Promedio	*28.1*	*6801618.8*	*801073.8*	*JLGG 16/Ago/04*
% Coeficiente de Variación.	*0.1*	*0.2*	*0.4*	*JLGG 16/Ago/04*

Verificó: *JAL* — Iniciales; *16/Ago/04* — Fecha

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/x*	*Iniciales/ Fecha*
1.	Precisión del Tiempo de Retención	% CV ≤ 1.0	*0.1% CV*	√	*JLGG 16/Ago/04*
2.	Precisión de las Áreas del Pico	% CV ≤ 1.0	*0.2% CV*	√	*JLGG 16/Ago/04*
3.	Precisión de la Altura del Pico	% CV ≤ 1.0	*0.4% CV*	√	*JLGG 16/Ago/04*
4.	Arrastre del Estándar en Áreas	% con respecto al promedio de las áreas ≤ 0.20	*No Detectada*	√	*JLGG 16/Ago/04*
5.	Arrastre del Estándar en Altura	% con respecto al promedio de las alturas ≤ 0.40	*No Detectada*	√	*JLGG 16/Ago/04*

Verificó: *JAL* — Iniciales; *16/Ago/04* — Fecha

Nota: *(√) significa "Cumple" y (x) No cumple.*

4.3. Estándar de Propilparabeno.

Muestra	*Tiempo de Retención*	*Área del Pico*	*Altura del Pico*	*Iniciales/ Fecha*
1	34.7	10051446	1457073.1	JLGG 16/Ago/04
2	34.7	10075884	1455109.6	JLGG 16/Ago/04
3	34.8	9984155	1453026.3	JLGG 16/Ago/04
4	34.8	9997069	1445381.0	JLGG 16/Ago/04
5	34.8	10141936	1457800.5	JLGG 16/Ago/04
6	34.7	10030953	1453468.2	JLGG 16/Ago/04
Promedio	34.7	10046907.3	1453643.1	JLGG 16/Ago/04
% Coeficiente de Variación.	0.1	0.6	0.3	JLGG 16/Ago/04

Verificó: JAL — Iniciales; 16/Ago/04 — Fecha

Etapa No.	*Descripción de Prueba*	*Resultado Esperado*	*Resultado Actual*	*Cumple √/x*	*Iniciales/ Fecha*
1.	Precisión del Tiempo de Retención	% CV ≤ 1.0	0.1% CV	√	JLGG 16/Ago/04
2.	Precisión de las Áreas del Pico	% CV ≤ 1.0	0.6% CV	√	JLGG 16/Ago/04
3.	Precisión de la Altura del Pico	% CV ≤ 1.0	0.3% CV	√	JLGG 16/Ago/04
4.	Arrastre del Estándar en Áreas	% con respecto al promedio de las áreas ≤ 0.20	0.044% CV	√	JLGG 16/Ago/04
5.	Arrastre del Estándar en Altura	% con respecto al promedio de las alturas ≤ 0.40	0.041% CV	√	JLGG 16/Ago/04

Verificó: JAL — Iniciales; 16/Ago/04 — Fecha

Nota: *(√) significa "Cumple" y (x) No cumple.*
Nota2: Ver Reporte de Resultados y Cromatógramas, Anexo 1.

5. REPORTE DE NO CONFORMIDADES.

No. de No Conformidad	Prueba/ Parámetro	Resolución	Firma/ Fecha
N/A			JLGG 08/Ago/04

6. ANEXOS.

Anexo I.

Resultados de la Prueba de Desempeño del Sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

a) Tabla de Resultados
b) Cromatógramas.

Calificación de Desempeño
Estandares: Acido Benzoico, Metil Parabeno y Propil Parabeno
Realizó: Juan Luis García G.
Cromatografo de líquidos de alta resolución: Waters
Software: Millennium 32 Versión: 3.20

TABLA DE RESULTADOS

	Nombre de la Muestra	Nombre	Vial	Vol (ul)	Inj	Area	Altura	Tiempo de Retención
1	ESTANDAR-1	ACIDO BENZOICO	2	20	1	4940114	446423.7	27.1
2	ESTANDAR-2	ACIDO BENZOICO	3	20	1	4944445	447572.8	27.1
3	ESTANDAR-3	ACIDO BENZOICO	4	20	1	4954248	447793.5	27.1
4	ESTANDAR-4	ACIDO BENZOICO	5	20	1	4959247	446869.3	27.1
5	ESTANDAR-5	ACIDO BENZOICO	6	20	1	4956893	448969.3	27.1
6	ESTANDAR-6	ACIDO BENZOICO	7	20	1	4958712	448878.4	27.1
Mean						4952276.6	447751.2	27.1
% RSD						0.2	0.2	0.1

	Nombre de la Muestra	Nombre	Vial	Vol (ul)	Inj	Area	Altura	Tiempo de Retención
1	ESTANDAR-1	METIL PARABENO	2	20	1	6795397	804165.7	28.1
2	ESTANDAR-2	METIL PARABENO	3	20	1	6798019	804594.2	28.1
3	ESTANDAR-3	METIL PARABENO	4	20	1	6784834	799946.5	28.1
4	ESTANDAR-4	METIL PARABENO	5	20	1	6798970	802852.6	28.1
5	ESTANDAR-5	METIL PARABENO	6	20	1	6822977	796738.6	28.1
6	ESTANDAR-6	METIL PARABENO	7	20	1	6809515	798145.4	28.1
Mean						6801618.8	801073.8	28.1
% RSD						0.2	0.4	0.1

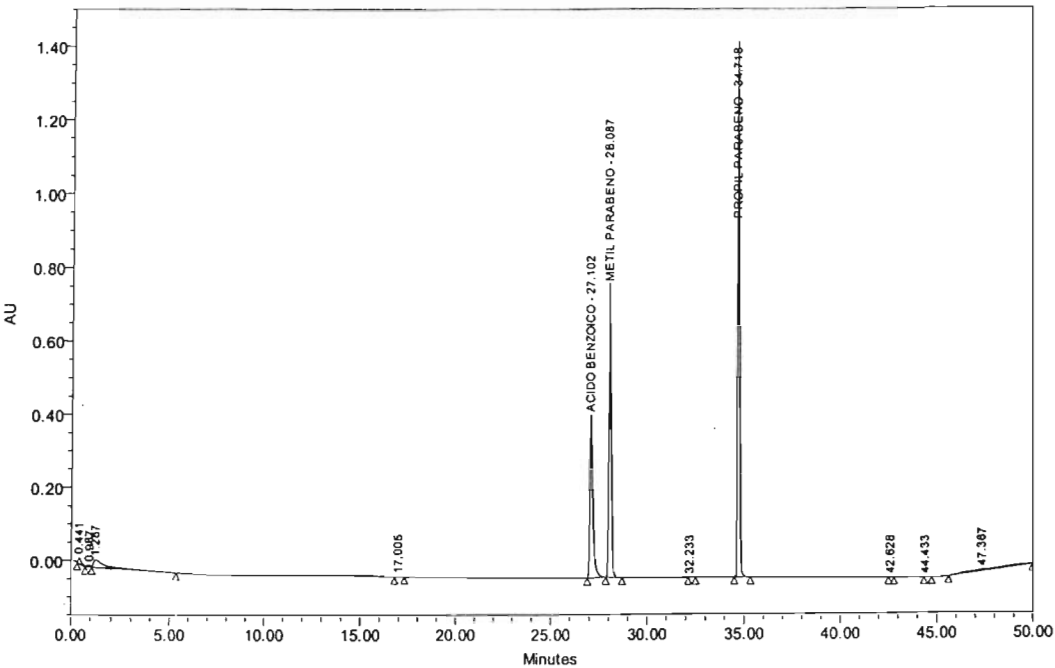
	Nombre de la Muestra	Nombre	Vial	Vol (ul)	Inj	Area	Altura	Tiempo de Retención
1	ESTANDAR-1	PROPIL PARABENO	2	20	1	10051446	1457073.1	34.7
2	ESTANDAR-2	PROPIL PARABENO	3	20	1	10075884	1455109.6	34.7
3	ESTANDAR-3	PROPIL PARABENO	4	20	1	9984155	1453026.3	34.8
4	ESTANDAR-4	PROPIL PARABENO	5	20	1	9997069	1445381.0	34.8
5	ESTANDAR-5	PROPIL PARABENO	6	20	1	10141936	1457800.5	34.8
6	ESTANDAR-6	PROPIL PARABENO	7	20	1	10030953	1453468.2	34.7
Mean						10046907.3	1453643.1	34.7
% RSD						0.6	0.3	0.1

21/08/04

Calificación de Desempeño

CROMATOGRAMAS

Estandares: Acido Benzoico, Metil Parabeno y Propil Parabeno
Realizó: Juan Luis García G.
Cromatografo de líquidos de alta resolución: Waters
Software: Millennium 32 Versión: 3.20



——— SampleName ESTANDAR-1 Vial 2 Injection 1 Injection Volume (uL) 20.00

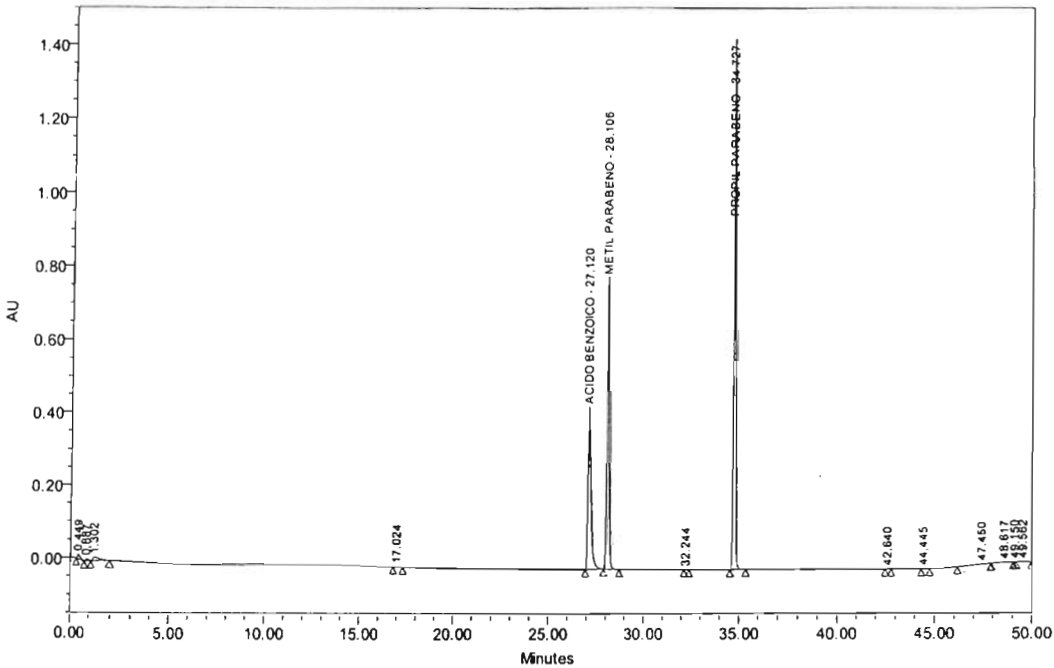
	Nombre de la muestra	Nombre	Tiempo de retención (min)	Area	Altura
1	ESTANDAR-1		0.4	193542	18026.8
2	ESTANDAR-1		1.0	73245	5558.7
3	ESTANDAR-1		1.3	884788	21741.6
4	ESTANDAR-1		17.0	16682	1184.1
5	ESTANDAR-1	ACIDO BENZOICO	27.1	4940114	446423.7
6	ESTANDAR-1	METIL PARABENO	28.1	6795397	804165.7
7	ESTANDAR-1		32.2	2255	338.0
8	ESTANDAR-1	PROPIL PARABENO	34.7	10051446	1457073.1
9	ESTANDAR-1		42.6	2926	413.7
10	ESTANDAR-1		44.4	2292	329.1
11	ESTANDAR-1		47.4	803336	4267.7

21/08/04

Calificación de Desempeño

CROMATOGRAMAS

Estandares: Acido Benzoico, Metil Parabeno y Propil Parabeno
Realizó: Juan Luis Garcia G.
Cromatografo de liquidos de alta resolución: Waters
Software: Millennium 32 Versión: 3.20



SampleName ESTANDAR-2 Vial 3 Injection 1 Injection Volume (uL) 20.00

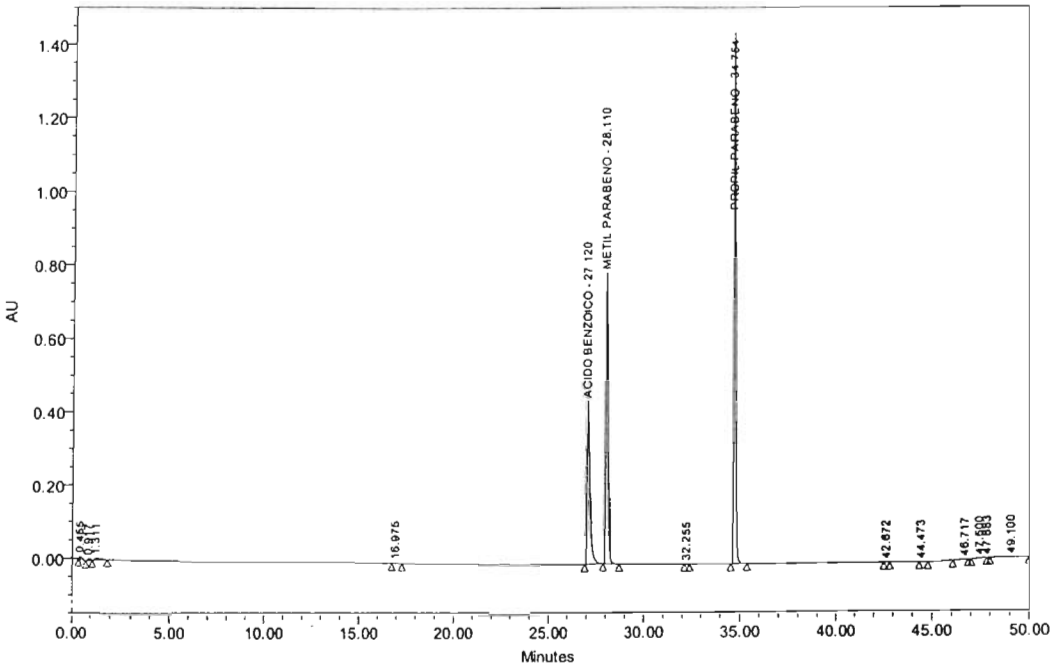
	Nombre de la muestra	Nombre	Tiempo de retención (min)	Area	Altura
1	ESTANDAR-2		0.4	142265	12804.2
2	ESTANDAR-2		0.9	75127	6240.7
3	ESTANDAR-2		1.3	223433	9606.6
4	ESTANDAR-2		17.0	16567	1175.4
5	ESTANDAR-2	ACIDO BENZOICO	27.1	4944445	447572.8
6	ESTANDAR-2	METIL PARABENO	28.1	6798019	804594.2
7	ESTANDAR-2		32.2	1939	312.3
8	ESTANDAR-2	PROPIL PARABENO	34.7	10075884	1455109.6
9	ESTANDAR-2		42.6	2948	421.6
10	ESTANDAR-2		44.4	2984	357.6
11	ESTANDAR-2		47.5	33986	858.8
12	ESTANDAR-2		48.6	10056	260.3
13	ESTANDAR-2		49.1	139	41.8
14	ESTANDAR-2		49.6	10812	374.0

21/08/04

Calificación de Desempeño

CROMATOGRAMAS

Estandares: Acido Benzoico, Metil Parabeno y Propil Parabeno
Realizó: Juan Luis Garcia G.
Cromatografo de liquidos de alta resolución: Waters
Software: Millennium 32 Versión: 3.20



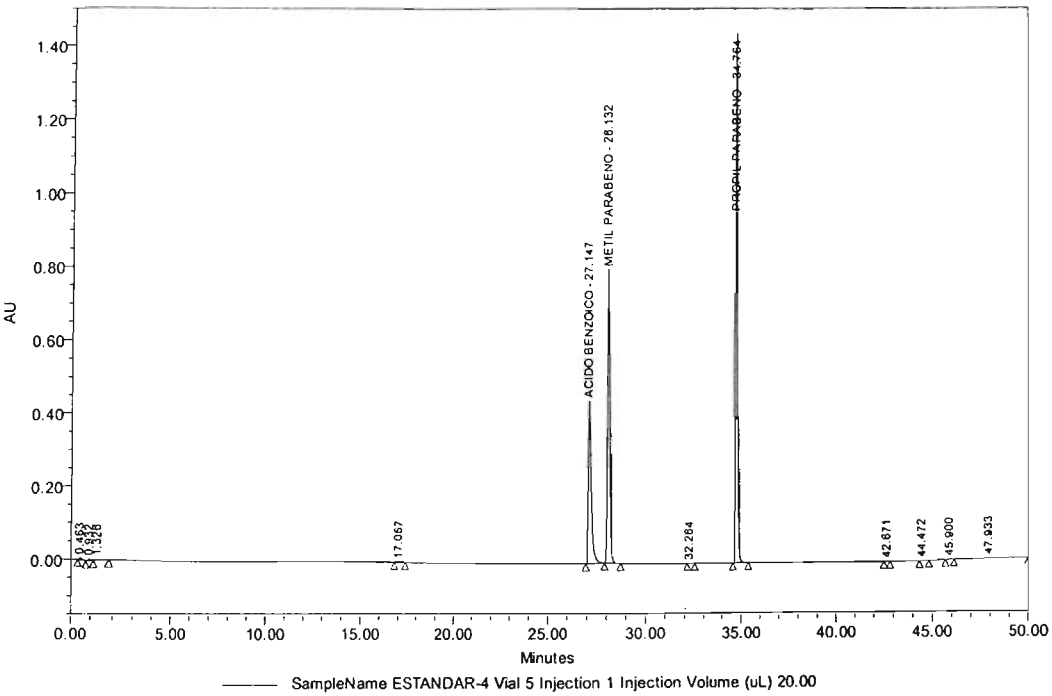
	Nombre de la muestra	Nombre	Tiempo de retención (min)	Area	Altura
1	ESTANDAR-3		0.5	103804	8718.7
2	ESTANDAR-3		0.9	64599	5670.0
3	ESTANDAR-3		1.3	121473	5388.1
4	ESTANDAR-3		17.0	17307	1199.1
5	ESTANDAR-3	ACIDO BENZOICO	27.1	4954248	447793.5
6	ESTANDAR-3	METIL PARABENO	28.1	6784834	799946.5
7	ESTANDAR-3		32.3	2041	331.6
8	ESTANDAR-3	PROPIL PARABENO	34.8	9984155	1453026.3
9	ESTANDAR-3		42.7	2945	438.1
10	ESTANDAR-3		44.5	3134	371.6
11	ESTANDAR-3		46.7	2419	110.3
12	ESTANDAR-3		47.5	12237	494.4
13	ESTANDAR-3		47.9	263	51.3
14	ESTANDAR-3		49.1	75502	967.7

21/08/04

Calificación de Desempeño

CROMATOGRAMAS

Estandares: Acido Benzoico, Metil Parabeno y Propil Parabeno
Realizó: Juan Luis García G.
Cromatografo de liquidos de alta resolución: Waters
Software: Millennium 32 Versión: 3.20



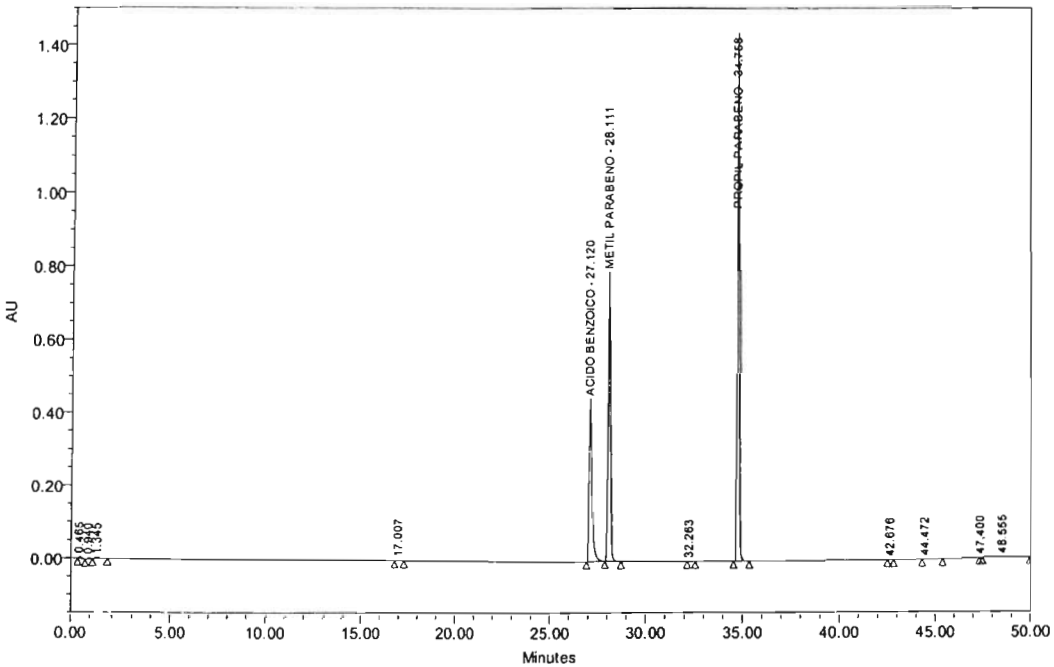
	Nombre de la muestra	Nombre	Tiempo de retención (min)	Area	Altura
1	ESTANDAR-4		0.5	81518	6424.9
2	ESTANDAR-4		0.9	57544	5045.0
3	ESTANDAR-4		1.3	87143	3840.6
4	ESTANDAR-4		17.1	17741	1227.7
5	ESTANDAR-4	ACIDO BENZOICO	27.1	4959247	446869.3
6	ESTANDAR-4	METIL PARABENO	28.1	6798970	802852.6
7	ESTANDAR-4		32.3	2415	354.8
8	ESTANDAR-4	PROPIL PARABENO	34.8	9997069	1445381.0
9	ESTANDAR-4		42.7	2888	424.9
10	ESTANDAR-4		44.5	3039	366.4
11	ESTANDAR-4		45.9	2344	185.9
12	ESTANDAR-4		47.9	255928	1954.6

21/08/04

Calificación de Desempeño

CROMATOGRAMAS

Estandares: Acido Benzoico, Metil Parabeno y Propil Parabeno
Realizó: Juan Luis García G.
Cromatografo de líquidos de alta resolución: Waters
Software: Millennium 32 Versión: 3.20



——— SampleName ESTANDAR-5 Vial 6 Injection 1 Injection Volume (uL) 20.00

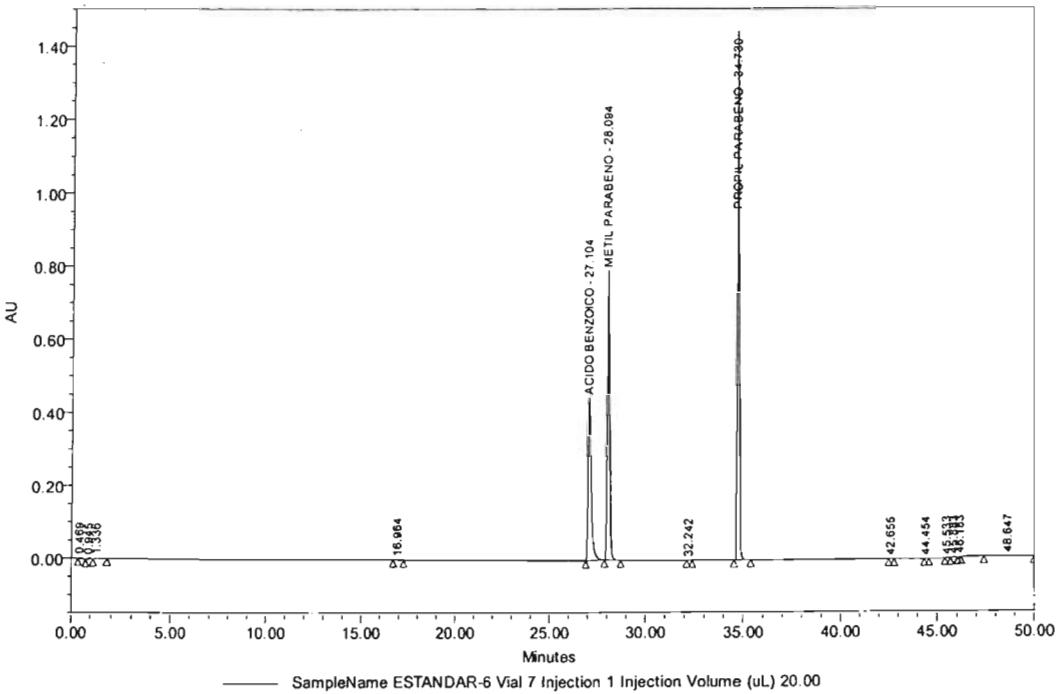
	Nombre de la muestra	Nombre	Tiempo de retención (min)	Area	Altura
1	ESTANDAR-5		0.5	67085	5142.3
2	ESTANDAR-5		0.9	47717	4236.4
3	ESTANDAR-5		1.3	68019	2991.0
4	ESTANDAR-5		17.0	16453	1175.3
5	ESTANDAR-5	ACIDO BENZOICO	27.1	4956893	448969.3
6	ESTANDAR-5	METIL PARABENO	28.1	6822977	796738.6
7	ESTANDAR-5		32.3	2494	377.1
8	ESTANDAR-5	PROPIL PARABENO	34.8	10141936	1457800.5
9	ESTANDAR-5		42.7	2933	415.5
10	ESTANDAR-5		44.5	12401	463.6
11	ESTANDAR-5		47.4	267	47.2
12	ESTANDAR-5		48.6	88160	844.4

21/08/04

Calificación de Desempeño

CROMATOGRAMAS

Estandares: Acido Benzoico, Metil Parabeno y Propil Parabeno
Realizó: Juan Luis García G.
Cromatografo de liquidos de alta resolución: Waters
Software: Millennium 32 Versión: 3.20



——— SampleName ESTANDAR-6 Vial 7 Injection 1 Injection Volume (uL) 20.00

	Nombre de la muestra	Nombre	Tiempo de retención (min)	Area	Altura
1	ESTANDAR-6		0.5	57493	4324.4
2	ESTANDAR-6		0.9	44342	3921.0
3	ESTANDAR-6		1.3	60723	2689.1
4	ESTANDAR-6		17.0	17113	1180.8
5	ESTANDAR-6	ACIDO BENZOICO	27.1	4958712	448878.4
6	ESTANDAR-6	METIL PARABENO	28.1	6809515	798145.4
7	ESTANDAR-6		32.2	2329	370.1
8	ESTANDAR-6	PROPIL PARABENO	34.7	10030953	1453468.2
9	ESTANDAR-6		42.7	2772	423.1
10	ESTANDAR-6		44.5	2073	353.4
11	ESTANDAR-6		45.5	757	98.7
12	ESTANDAR-6		45.9	1527	138.4
13	ESTANDAR-6		46.2	103	17.8
14	ESTANDAR-6		48.6	92216	834.8

21/08/04