



**UNIVERSIDAD
NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Calificación de Instalación y Operación de un Sistema
CLAR con Detector de Dispositivo de Diodos**

TESINA

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

PRESENTA:

JULISSA DORANTES CHOPIN

ASESOR: DR. JUAN CARLOS VÁZQUEZ LIRA

MÉXICO, D. F. ABRIL 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



AGRADECIMIENTOS

A Dios por iluminar siempre mi camino y por brindarme la oportunidad de concluir este proyecto.

A Rafa, por permanecer y recorrer juntos el camino y por apoyarme siempre y en todo momento.

A mis hijas por ser mi mayor motivación para lograr las metas propuestas y por su buen comportamiento.

A mis padres por compartir siempre conmigo su tiempo, sin pedir nada a cambio, por darme siempre toda su confianza, su cariño y el apoyo necesario para seguir adelante ante cualquier situación.

A mis hermanos por todo su apoyo incondicional.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a todos y cada uno de los profesores por todas sus enseñanzas.

Al Dr. Juan Carlos Vázquez, por darme la confianza de realizar este proyecto y por todo su apoyo.

PENSAMIENTO

El fruto del silencio es la oración

El fruto de la oración es la fe

El fruto de la fe es el amor

El fruto del amor es el servicio

El fruto del servicio es la paz

Teresa de Calcuta



ÍNDICE

	Página
I. ABREVIATURAS.....	5
II. RESUMEN.....	7
III. INTRODUCCIÓN.....	8
IV. MARCO TEÓRICO.....	10
1. Validación.....	10
1.1 Tipos de Validación.....	10
1.2 Comité de Validación.....	14
1.3 Validación de Métodos Analíticos.....	15
1.4 Actividades de Validación.....	16
2. Validación de Procesos.....	18
2.1 Etapas de la Validación de Procesos.....	18
3. Calificación de Equipos Analíticos.....	21
4. Etapas de la Calificación de Equipos Analíticos.....	25
4.1 Calificación de Diseño (CD).....	25
4.2 Calificación de Instalación (CI).....	27
4.3 Calificación Operacional (CO).....	29
4.4 Calificación del Funcionamiento o Desempeño (CF).....	30
4.5 Ciclo de Vida.....	31
4.6 Re-calificación.....	32
4.7 Clasificación de los Instrumentos Analíticos.....	34
4.8 Validación del Software.....	36
4.9 Control de Cambios.....	37
5. Calibración y Trazabilidad.....	39
6. Documentación.....	41
6.1 Desviaciones.....	44
6.2 Plan Maestro de Validación (PMV).....	45
6.3 Protocolo de Calificación.....	46
7. Cromatografía.....	47
7.1 Clasificación de las Técnicas Cromatográficas.....	47
7.2 Cromatografía de Gases (CG).....	49
7.3 Cromatografía de Fluidos Supercríticos (CFS).....	51
7.4 Cromatografía de Líquidos (CL).....	53
7.5 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)....	57
7.6 Componentes de un CLAR.....	59
7.6.1 Sistema de Bombeo.....	60
7.6.2 Sistema de Inyección.....	62
7.6.3 Detector.....	63



7.6.3.1	Detectores Universales.....	64
7.6.3.2	Detectores Selectivos.....	66
7.6.4	Columna.....	70
7.6.5	Registrador de Señales.....	72
8.	Parámetros Cromatográficos.....	73
8.1	Adecuabilidad del Sistema.....	79
V.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	80
VI.	OBJETIVOS.....	82
VII.	HIPÓTESIS.....	83
VIII.	METODOLOGÍA.....	84
IX.	RESULTADOS.....	85
X.	DISCUSIÓN.....	119
XI.	CONCLUSIÓN.....	124
XII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127



I. ABREVIATURAS

- AU:** Unidades de Absorbancia
- BPD:** Buenas Prácticas de Documentación
- BPF:** Buenas Prácticas de Fabricación
- BPL:** Buenas Prácticas de Laboratorio
- CA:** Cromatografía de Adsorción
- CAF:** Cromatografía de Afinidad
- CASCO:** Comité de Evaluación de la Conformidad
- CD:** Calificación de Diseño
- CEM:** Cromatografía de Exclusión Molecular
- CENAM:** Centro Nacional de Metrología
- CE:** Calificación de Ejecución o Desempeño
- CF:** Calificación de Funcionamiento o Desempeño
- CFN:** Cromatografía en Fase Normal
- CFR:** Cromatografía en Fase Reversa
- CFS:** Cromatografía de Fluidos Supercríticos
- CG:** Cromatografía de Gases
- CGL:** Cromatografía de Gas-Líquido
- CGS:** Cromatografía de Gas-Sólido
- CI:** Calificación de Instalación
- CII:** Cromatografía de Intercambio Iónico
- CL:** Cromatografía de Líquidos
- CLAP:** Cromatografía de Líquidos de Alta Presión
- CLAR:** Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
- CL-EM:** Cromatografía de Líquidos-Espectrometría de Masas
- CO:** Calificación Operacional
- CR:** Cromatografía de Reparto
- CV:** Coeficiente de Variación
- DAD:** Detector de Arreglo de Diodos



EDQM: Dirección Europea para la Calidad de Medicamentos y el Cuidado de la Salud

EM: Espectrometría de Masas

FAT's: Pruebas de Aceptación en Fábrica

FDA: Administración de Fármacos y Alimentos

ISO: Organización Internacional de Normalización

OMCL: Laboratorio Oficial de Control de Medicamentos

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAS: Prueba de Aptitud del Sistema

PAT: Tecnología Analítica del Proceso

PMV: Plan Maestro de Validación

PNO: Procedimiento Normalizado de Operación

RSD: Desviación Estándar Relativa

S: Desviación estándar

SAT's: Pruebas de Aceptación en Sitio

SI: Sistema Internacional

SRef: Solución de Referencia

USP: Farmacopea de los Estados Unidos

UV: Ultra Violeta



II. RESUMEN

La calificación de equipos analíticos es de suma importancia dentro de la industria farmacéutica y es necesario profundizar más acerca de estos equipos de trabajo para poder solucionar problemas durante el análisis y predecir en donde se encuentran las posibles causas.

El propósito del siguiente trabajo, es realizar una revisión teórica para establecer una metodología adecuada para la calificación de instalación y operación de un sistema CLAR (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución) con detector de dispositivo de diodos. Así como, identificar las pruebas necesarias y la responsabilidad de quien las va a llevar a cabo, ya sea por parte del área usuaria o por parte del proveedor.

Se generalizó el procedimiento con lo cual queda a criterio del usuario la aplicación de cada una de las pruebas establecidas.

Este trabajo, servirá como referencia para comprender de manera práctica y completa la forma en que debe llevarse a cabo un proceso adecuado de calificación a un sistema CLAR.

Mediante esta revisión, se logrará tener una herramienta más clara acerca de las pruebas que son factibles de realizar como analista o usuario y cuáles deben ser exclusivas del proveedor debido a que son más especializadas.

La calificación de instalación y operación de un sistema CLAR garantiza su óptimo funcionamiento para asegurar que las mediciones realizadas sean reproducibles y repetibles.



III. INTRODUCCIÓN

La elaboración de un medicamento debe cumplir siempre con un requisito indispensable: la calidad, esto solo es posible lograrlo, a través del cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) y las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), así como, de las verificaciones analíticas de los procedimientos involucrados en la manufactura del producto.

En lo que a verificaciones analíticas se refiere, las técnicas empleadas para controlar procesos y productos han venido avanzando a grandes pasos y una de ellas es la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

La mayor garantía de que un producto fue elaborado con calidad es a través de la validación del proceso pero para ello se requiere desde la calificación de proveedores, la calificación de equipos, la validación del software y la validación de los métodos analíticos esta última involucra contar con equipos analíticos calificados.

La calificación de equipos analíticos es una de las actividades de suma importancia dentro de la validación de métodos analíticos, muchas veces se diseña el protocolo lo más minuciosamente, se diseñan las pruebas necesarias para evaluar los parámetros y se ejecutan con la mayor de las precauciones para que el método analítico contenga la menor cantidad de variables posibles, sin embargo, resulta que la metodología a pesar de que es revisada adecuadamente, no brinda los resultados esperados y esto algunas veces, se debe a que es el instrumento de medición el que no está funcionando correctamente por eso, si lo ideal es obtener un método validado entonces es necesaria la calificación previa del instrumento de medición y ésta solo se logra mediante el diseño de un buen plan de trabajo que incluya las pruebas necesarias que garanticen la confiabilidad de los resultados.



Con este documento se pretende establecer una metodología que describa cómo se lleva a cabo la “calificación” de un sistema CLAR con detector de dispositivo de diodos, proporcionando recomendaciones sobre lo que debe realizarse en cada etapa de la calificación instrumental. También establece un enfoque general sobre la calificación de equipos, la cual puede ser aplicada a una amplia variedad de equipos analíticos. Aunque cabe mencionar que el usuario puede ejercer su juicio profesional para establecer el alcance a los requisitos individuales, que sean aplicables y al nivel de detalle requerido para una calificación propia del equipo.

Los equipos tienen diversas configuraciones computacionales y de software de aplicación, la validación formal de estos componentes está fuera del alcance de este documento. Cuando sea necesario, los usuarios deben solicitar evidencia documentada a los proveedores de los equipos, de que tales componentes se hayan desarrollado y fabricado bajo normas apropiadas y formalmente hayan sido validados durante su producción.

Es necesario conocer y marcar la diferencia que existe entre el término “calificación” y “validación”. La calificación está orientada y relacionada primordialmente a la especificación operacional del equipo. Mientras que la validación es una aplicación orientada y relacionada a un método o proceso de medición específico. Por lo tanto, los equipos se califican, mientras que los sistemas, procesos y métodos se validan.

Para poder dar validez al resultado obtenido de la calificación del sistema CLAR con detector de dispositivo de diodos a partir de las pruebas diseñadas y ejecutadas es necesario contar con los documentos que avalen dichas pruebas, para ello es necesario contar con los certificados de calibración de los instrumentos de prueba empleados y los certificados de calidad de las sustancias de referencia empleadas así como la evidencia de que la calificación haya sido realizado por personal perteneciente a una empresa certificada.



IV. MARCO TEÓRICO

1. VALIDACIÓN

De acuerdo a la normatividad mexicana, validación se refiere a la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones de calidad establecidas.¹

Es un programa que va más allá de lo filosófico ya que establece los controles para llevar la calidad al producto y por ende a los consumidores.

1.1 Tipos de Validación

Durante muchos años se ha hablado tradicionalmente de tres tipos de validación. En diversas empresas están presentes aún las tres, aunque en los países más avanzados, algunas han dejado de ser vigentes. En forma global y considerando antecedentes y nuevas perspectivas se puede hablar de cinco tipos de validación:

Las tradicionales:

- Validación prospectiva.
- Validación retrospectiva.
- Validación concurrente.

Las de aplicación actual en el primer mundo:

- Validación esbelta.
- Validación en tiempo real, mejor conocida como *“Verificación continua de la calidad”*.



La validación prospectiva puede definirse como el estudio que se lleva a cabo para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que está previsto, basado en resultados obtenidos antes de que el producto involucrado en ese proceso salga al mercado.

Este tipo de validación solo es válida para procesos nuevos. Es la más adecuada de las tres por su enfoque preventivo. De hecho la naturaleza de la definición de validación es bajo un ambiente prospectivo, que implícitamente incluye la prevención.

La validación retrospectiva se define como el estudio que se lleva a cabo para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que está previsto basado en resultados obtenidos con la información histórica del producto involucrado con el proceso en cuestión.

Muchas entidades sanitarias ya no la consideran válida, dado su poco enfoque preventivo. Por otra parte no está definido estadísticamente el número de lotes mínimo, válido para fundamentar históricamente la reproducibilidad de un proceso y además, estos datos obtenidos de la información histórica no se obtuvieron bajo un enfoque de validación, es decir esta información se obtuvo fabricando los productos sin saber que regulación cumplir, muchos de ellos se realizaron sin tener una norma a seguir, referente a BPF, las cuales actualmente se basan en aspectos tanto preventivos como de control.

La validación concurrente es el estudio que se lleva a cabo para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que está previsto basado en resultados obtenidos paralelamente durante la distribución del producto que involucra al proceso en cuestión.

Esto puede aplicarse bajo dos enfoques:

- a) Productos nuevos, los cuales se liberan al mercado sin tener la validación completa. Se tienen estudios a nivel desarrollo y estudios parciales de validación, pero en los primeros lotes que se distribuyen se obtiene la información complementaria de este estudio.



- b) Productos antiguos, con los cuales se ha trabajado mucho tiempo. Estratégicamente para la empresa en ocasiones no es posible detener la producción para validar el proceso involucrado sin liberar el producto al mercado, por lo cual se continúa con la producción normal y a partir de la fecha planeada se consideran ciertos lotes como parte del estudio de validación.

La validación concurrente y la prospectiva son las más aceptadas por la entidad sanitaria en nuestros días.^{2,3}

Por lo que respecta a **la validación esbelta** ésta se define como el estudio que se lleva a cabo para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que está previsto basado en resultados que consideran en su estudio la identificación de atributos críticos de calidad.

Este nuevo concepto considera los grandes errores que se han cometido al realizar la validación, en su parte más débil, la documentación. Existían documentos que hacían referencia a pruebas sin un objetivo concreto, o con base a pruebas “no críticas” o de carácter “informativo”, lo cual en ocasiones causaba que la validación de procesos se hiciera muy tediosa y larga e incluso que se llegará a perder el interés en la misma.

Considerando lo anterior, este concepto surge en la industria, con el objetivo de cumplir sin tener que salirse de los límites. Con las nuevas corrientes que enfatizan la calidad por diseño y la importancia del desarrollo farmacéutico, las empresas han vuelto sus ojos al origen del producto y a la identificación de aquellos factores que realmente afectan la calidad del mismo, denominándolos *atributos críticos de calidad*. Estos atributos críticos de calidad sirven de base para el desarrollo de la validación, puesto que esta última se tiene que centrar en el control de dichos atributos para garantizar el cumplimiento de las especificaciones.



Hoy en día la normatividad mexicana, está solicitando actividades con este mismo enfoque por lo que menciona el siguiente lineamiento: los fabricantes de medicamentos deben determinar las actividades de validación que son necesarias para demostrar el control de los aspectos críticos de sus operaciones particulares con un enfoque de análisis de riesgos.

Por lo tanto, es posible conjugar la validación prospectiva y/o concurrente con la validación esbelta.

Por otra parte la validación en tiempo real o verificación continua de la calidad, se define como el estudio que se lleva a cabo para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que está previsto basado en los resultados obtenidos lote a lote. ^{2,4}

Actualmente se habla de la Tecnología Analítica del Proceso (PAT) la cual trabaja con la filosofía de que la calidad no puede ser probada en el producto; sino que debe ser incorporada desde el diseño. La PAT se trata de un sistema para diseñar, analizar, y controlar la manufactura a través de medidas (durante el proceso) de atributos críticos de calidad y ejecutoria de los componentes y procesos con el fin de asegurar la calidad final del producto.

El término “Análisis” en PAT incluye los análisis: químico, físico, microbiológico, matemático y de riesgo de una forma integrada. ⁵



1.2 Comité de Validación

El desarrollo de un programa de validaciones para laboratorios farmacéuticos permite lograr una relación costo-beneficio más eficiente en aspectos como sistemas de apoyo crítico, optimización de procesos, recursos y actividades de mantenimiento, uso operacional de equipos entre otros. De igual forma permite una reducción en la posibilidad de fallas en los procesos y rechazos, disminución de reprocesos, reducción de análisis e incremento de la productividad.

En nuestros días, se ha entendido que la validación no la hace un solo departamento o una sola persona. Al igual que la calidad, en el éxito o fracaso de la validación participan todos los departamentos del área técnica, recordando que la validación está implícita en la calidad.

Dependiendo del organigrama y tamaño de la empresa, el número de integrantes del comité varia, sin embargo se recomienda que estén presentes las autoridades máximas de las áreas de Gerencia de Planta, Calidad, Desarrollo, Fabricación (incluye producción y acondicionamiento), Almacén, Validación, Ingeniería, Mantenimiento y Compras, así como el Responsable Sanitario de la empresa.²

Los términos “validación” y “calificación” son utilizados con frecuencia para expresar el mismo significado. Sin embargo, la “validación” es una aplicación orientada y relacionada a un método o proceso de medición específico, por ejemplo validación del proceso de limpieza, validación de un método analítico, validación del proceso de esterilización, validación de software, etc.; mientras que la “calificación” está orientada y relacionada primariamente a la especificación operacional del sistema o equipo, por lo tanto los sistemas y equipos involucrados en los procesos de manufactura se califican, por ejemplo el autoclave, el horno o túnel de despirogenización, la liofilizadora, los cromatógrafos, los espectrofotómetros, el sistema de aire, el sistema de vapor, el sistema de agua purificada, etc.⁶



Los estudios de validación constituyen una parte esencial de las buenas prácticas de fabricación y deben efectuarse conforme a protocolos definidos de antemano. Debe prepararse y archivarse un informe que resuma los resultados y las conclusiones obtenidas. Deben establecerse procesos y procedimientos sobre la base de un estudio de validación, los cuales se sometan periódicamente a una revalidación para asegurar que con ellos se puedan seguir obteniendo los resultados deseados.⁷

Los equipos se deben diseñar, construir, adaptar, ubicar y mantener de conformidad a las operaciones que se habrán de realizar. El diseño y ubicación de los equipos deben ser tales que se reduzca al mínimo el riesgo de que se cometan errores, y que se pueda efectuar eficientemente la limpieza y mantenimiento de los mismos, con el fin de evitar la contaminación cruzada, el polvo y la suciedad, y en general todo aquello que pueda influir negativamente en la calidad de los productos.^{1,7}

1.3 Validación de Métodos Analíticos

De acuerdo a las BPF así como a las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), es necesario que todos los métodos analíticos empleados estén validados.

La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación deseada: es decir cumple con su propósito.

Por otro lado, en la Industria Farmacéutica el producto final es el medicamento el cual debe reunir atributos de identidad, pureza, concentración, potencia, inocuidad y disponibilidad para cumplir con los aspectos normativos oficiales e internos y no menos importantes, los éticos, por lo que si un método analítico no es confiable se corre el grave riesgo de afectar al usuario final.



Desde este enfoque, la validación de métodos analíticos es un sistema involucrado en los procesos de fabricación en el área de calidad de la empresa y bajo la filosofía de la validación, las autoridades regulatorias verifican que las empresas sustenten estos sistemas con actividades documentadas. ⁸

Y es por eso que la normatividad mexicana establece que, los proveedores, las instalaciones, equipos, sistemas críticos y computacionales que impacten en la calidad del producto, deben estar calificados y los métodos analíticos, de limpieza y de producción y acondicionamiento, deben validarse al inicio de la operación y terminados antes de la liberación de un producto. ¹

1.4 Actividades de Validación

Como se ha visto la validación deja de ser solo una filosofía y se convierte en toda una serie de actividades dentro de las cuales se encuentra inmersa la calificación.

Un aspecto importante a considerar es el orden para realizar las actividades ya que de ello dependen los resultados, las etapas a seguir en el proceso de validación son:

- a) Elaboración del PMV.
- b) Pruebas FAT's y SAT's.
- c) Calificación de diseño de planta.
- d) Calificación de áreas.
- e) Calificación de sistemas.
- f) Calificación de equipos de producción, acondicionamiento, almacén y laboratorio.
- g) Validación de procesos de producción, acondicionamiento, almacén y laboratorio.
- h) Validación de procesos de limpieza.
- i) Validación de sistemas computarizados.



La relación de las actividades así como el orden de actividad, se representan en la pirámide de validación (figura 1), mismas que deben estar descritas en el PMV.

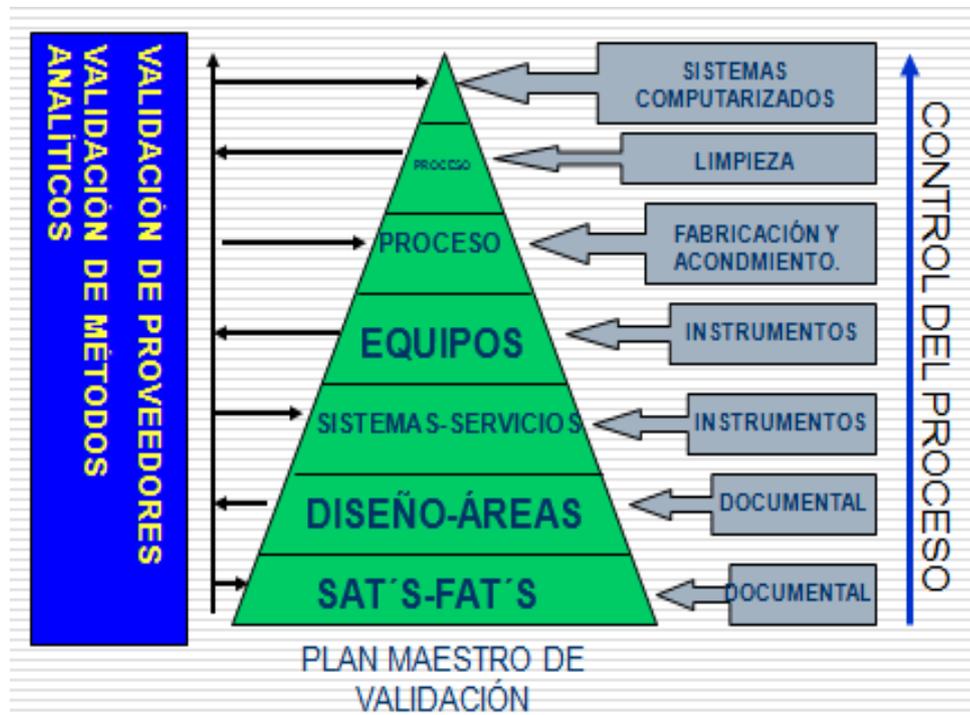


Figura 1. Pirámide de Validación.²

No se podrá continuar con la etapa siguiente si no se cuenta con un dictamen aprobatorio de la etapa que le precede. Paralelamente a las actividades de calificación y antes de la validación de procesos, tendrán que ejecutarse las actividades de validación de métodos analíticos y validación de proveedores.

Como se observa, el proceso para llegar a la última etapa de la validación no es sencillo. Durante mucho tiempo la industria pensó que lo único que tenía que ejecutar era la validación de los procesos y ahora se sabe que antes hay ciertas actividades que realizar, como lo es la calificación de instrumentos críticos, equipos, sistemas, áreas y servicios así como la validación de limpieza, proveedores, métodos analíticos y sistemas computarizados.^{2, 4, 9}



2. VALIDACIÓN DE PROCESOS

Se define a la calificación como la evidencia documentada que proporciona un alto grado de certeza de que un equipo, área o sistema producirá consistentemente un resultado dentro de especificaciones previamente establecidas.

La normatividad mexicana establece que la calificación de instalaciones, sistemas y equipos debe realizarse a equipos nuevos o modificados como parte fundamental dentro de la industria farmacéutica también explica cada una de las etapas de calificación las cuales son calificación de diseño, instalación, operación y desempeño, por lo cual cada una de ellas se evalúan de manera individual y en orden si una de estas etapas no cumple, no se continúa con la siguiente. La calificación de las instalaciones, equipos y servicios en uso deben contar con evidencia documentada de que se cumplen los parámetros y límites de operación de las variables críticas del equipo operativo. Adicionalmente, deben documentarse los procedimientos de calibración, limpieza, mantenimiento preventivo, de operación y los procedimientos y registros de capacitación del personal.¹

2.1 Etapas de la Validación de Procesos

Calificación de diseño (CD)

La calificación de diseño es la primera etapa del proceso de validación de las instalaciones nuevas, sistemas o equipos. El cumplimiento del diseño debe demostrarse y documentarse.

Calificación de instalación (CI)

La calificación de la instalación, debe realizarse en instalaciones, sistemas y equipos nuevos o modificados. La cual debe incluir (pero no se limita) lo siguiente:



- a) Construcción o modificación de áreas.
- b) Instalación del equipo, tubería, servicios e instrumentación revisados contra los planos y especificaciones vigentes de ingeniería.
- c) Recopilación y cotejo de las instrucciones de operación, trabajo y de los requerimientos de mantenimiento del proveedor.
- d) Requerimientos de calibración.
- e) Confirmar que los materiales de construcción cumplen con las especificaciones de diseño.

Calificación operacional (CO)

La calificación operacional, debe seguir a la calificación de la instalación. Debe incluir (pero no se limita) lo siguiente:

- a) Pruebas que han sido desarrolladas a partir del conocimiento de los procesos, sistemas y equipos para demostrar que se cumple con las especificaciones de diseño.
- b) Pruebas que incluyen una condición o un conjunto de condiciones que abarcan límites de operación superiores e inferiores o las condiciones del “peor caso”.
- c) La terminación de una calificación operacional satisfactoria debe permitir la ratificación o modificación de los procedimientos de calibración, operación y limpieza, la capacitación y calificación del personal y los requerimientos de mantenimiento preventivo.
- d) Debe permitir una “liberación” formal de las instalaciones, sistemas y equipo.



Calificación de la Ejecución o Desempeño (CE)

La calificación de la ejecución o desempeño, debe seguir a la terminación satisfactoria de la calificación de la instalación y la calificación operacional. Cuando se justifique podrá realizarse simultáneamente con la CO.

La CE debe incluir pruebas que han sido desarrolladas para demostrar que el equipo, sistema e instalación se desempeñan de acuerdo a los parámetros y especificaciones de los procesos y productos específicos.

La CE debe incluir (pero no se limita) lo siguiente:

- a) Pruebas, materiales usados en la producción y acondicionado, sustitutos calificados o productos simulados, que hayan sido desarrollados a partir del conocimiento del proceso, las instalaciones, sistemas o equipos.
- b) Pruebas que incluyan una condición o conjunto de condiciones que abarquen límites de operación superiores e inferiores o las condiciones del “peor caso”.
- c) Para la calificación de las instalaciones, equipos y servicios en uso debe existir evidencia documentada de que se cumplen los parámetros y límites de operación de las variables críticas del equipo operativo. Adicionalmente, deben documentarse los procedimientos de calibración, limpieza, mantenimiento preventivo, de operación y los procedimientos y registros de capacitación del personal.^{1,3,4}



3. CALIFICACIÓN DE EQUIPOS ANALÍTICOS

El requisito primario para todos los instrumentos utilizados en los laboratorios analíticos es que, deben ser suministrados de acuerdo a su propósito establecido. El proceso de calificación de instrumentos analíticos debe, por lo tanto, establecer que la especificación operacional del instrumento es apropiada para su propósito establecido y que el instrumento se desempeña de acuerdo a esa especificación. La calificación también debe establecer que un instrumento es y será, conservado en un estado de mantenimiento y calibración consistente con su uso.

La calificación es la colección de pruebas documentadas de que un equipo se desempeña adecuadamente para su uso previsto. El uso de un equipo calificado en los análisis contribuye a la confianza en la validez de los datos generados.

En la **calificación de diseño** se definen las especificaciones funcionales y operacionales del instrumento, y detalla las decisiones conscientes en la selección del proveedor.

En la **calificación de instalación** se establece que el instrumento es recibido de acuerdo a su diseño que se especificó, que está adecuadamente instalado en el ambiente que se seleccionó, y que es apropiado para la operación del instrumento.

De esta manera, la **calificación operacional** es el proceso en donde se demuestra que un instrumento funcionará de acuerdo a la especificación operacional en el ambiente seleccionado.

Por lo tanto, la **calificación de funcionamiento o desempeño** es el proceso en donde se demuestra que un instrumento se desempeña de acuerdo a la especificación adecuada para su uso rutinario.^{10, 11}



El proceso de calificación de instrumentos analíticos, debe establecer que la especificación operacional es apropiada para su propósito establecido y que el instrumento se desempeña de acuerdo a esa especificación, (figura 2). La calificación de acuerdo a la guía del CENAM (Centro Nacional de Metrología),¹⁰ está basada en cuatro etapas y debe establecer que un equipo es y será, conservado en un estado de mantenimiento y calibración consistente con su uso.

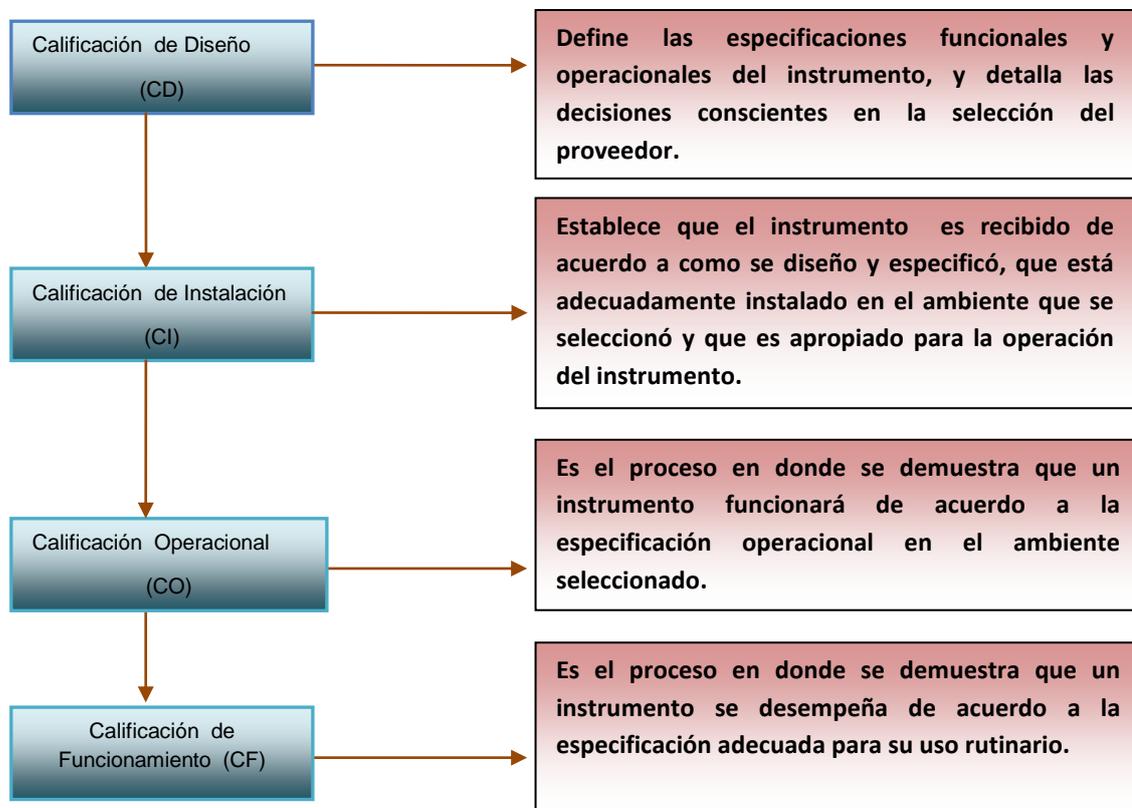


Figura 2. Proceso de calificación de instrumentos analíticos.¹⁰

Hay con frecuencia confusión con respecto a que se debe incluir en el proceso de calificación y en particular, que está cubierto en las etapas individuales de calificación (CD/CI/CO/CF). Esto surge porque los proveedores de diferentes compañías, ofrecen niveles variados de apoyo para la calificación y en la actualidad, no hay una aceptación uniforme de que es lo que se cubre en cada etapa de la calificación, ni cómo será llamada cada etapa.



La aplicación de cada etapa de la calificación, cambiará durante el tiempo de vida (ciclo de vida) de un instrumento. Las cuatro etapas serán aplicables desde la compra de un instrumento nuevo. Puede ser necesario que los aspectos de CD y CI sean efectuados nuevamente cuando existan cambios mayores en el instrumento. La CF y muchos aspectos de la CO, deberán llevarse a cabo durante toda la vida del instrumento y proporcionar una referencia contra la cual, el funcionamiento continuo del equipo pueda ser evaluado. El proceso de calificación y los requisitos de cada etapa de calificación son generales y por lo tanto aplicables a instrumentos complejos y simples. Sin embargo, las pruebas operacionales específicas llevadas a cabo durante la calificación varían, por supuesto, de acuerdo al tipo de instrumento por ejemplo las pruebas para demostrar que el automuestreador del equipo CLAR está funcionando de acuerdo a la especificación, son absolutamente diferentes de aquellas empleadas en probar un espectrofotómetro de UV-Visible.

Cada etapa del proceso de calificación, involucra el mismo enfoque general: la preparación de un plan de calificación, que incluya la definición del alcance de la calificación (por ejemplo, la prueba a llevarse a cabo y el criterio de aceptación a utilizarse); ejecución del plan (durante el cual los resultados de las pruebas sean registrados, tal y como las pruebas se llevan a cabo); y la elaboración de un informe (y si se requiere, un certificado de calificación) en el que se documentan los resultados de la calificación.

El usuario es responsable de la validación del proceso de medición, de la calidad y la confiabilidad de los datos producidos. Por lo tanto, el usuario es responsable de asegurar que un instrumento es adecuado para su uso propuesto y que está operando satisfactoriamente. De esta forma, el usuario es también responsable de la calificación.

El usuario debe establecer el nivel de calificación que se requiere, en base al propósito establecido del instrumento, también debe establecer qué aspectos de la calificación deberán hacerse en el laboratorio y cuáles deberán ser realizados por un tercero; este último puede ser el proveedor original del instrumento. El alcance de lo que llevará a cabo el usuario, dependerá de su experiencia y competencia.



El proveedor deberá proporcionar una guía clara sobre qué es lo que el usuario debe llevar a cabo, qué es lo que el usuario y proveedor pueden realizar y lo que puede ser realizado solo por el proveedor. El proveedor deberá elaborar y proporcionar documentos que estén disponibles sobre las herramientas y servicios que permitan la ejecución de la calificación y en particular, para proporcionar instrucciones claras y detalles de las pruebas que son requeridas para demostrar un desempeño satisfactorio del instrumento analítico. Tales pruebas (una parte integral de CO/CF) pueden llevarse a cabo por el proveedor o el usuario, pero deben permanecer bajo el control del usuario.

En cualquier aspecto de la calificación y/o revisión de desempeño o prueba, que se lleve a cabo por el proveedor o un tercero, el usuario debe dar aprobación, de que las pruebas fueron realizadas competentemente y correctamente (el registro de la capacitación del personal que realiza la instalación del instrumento debe ser proporcionada al usuario, con la finalidad de proveer evidencia básica de su competencia).

Los resultados de aquellas pruebas y revisiones que hayan sido llevadas a cabo por el proveedor del instrumento o por un tercero, deberán ser documentadas e informadas al usuario, con la finalidad de dar su aprobación a las mismas.

El usuario puede esperar que los proveedores lleven a cabo todos los aspectos de la calificación, pero debe aceptar que tales servicios con frecuencia incurrirán en un costo económico.

Cuando sean necesarias las operaciones de mantenimiento y de calibración, éstas deben realizarse antes de la calificación. ^{4,10}



4. ETAPAS DE LA CALIFICACIÓN DE EQUIPOS ANALÍTICOS

4.1 Calificación de Diseño (CD)

La calificación del diseño tiene que ver, con lo que se requiere hacer con el equipo, por lo que tiene que ser vinculado directamente al propósito de uso. La CD proporciona al usuario una oportunidad para demostrar que, en una etapa anticipada a la adquisición e instalación del equipo se ha considerado el propósito de su uso.

En la CD deberá, hasta donde sea posible, establecerse el uso propuesto o probable del equipo y definir las especificaciones operacionales y funcionales apropiadas. Esto puede ser un compromiso entre lo ideal y los detalles prácticos, considerando de qué se dispone. Mientras que, es responsabilidad del usuario asegurar que existan especificaciones que sean apropiadas; estas especificaciones pueden ser preparadas por el usuario, el (los) proveedor(es) o por discusión entre ambos.

La **especificación operacional** deberá definir las características claves de desempeño del equipo, los intervalos sobre los cuales se requiere operar el equipo y que se desempeñe consistentemente.

Entre tanto la **especificación funcional** deberá considerar todos los requisitos del equipo, incluyendo la especificación operacional y otros factores críticos relacionados con su uso, por ejemplo:

- a) Todas las exigencias del negocio.
- b) La documentación relacionada al uso del equipo (por ejemplo, documentación clara, manuales de operación fácil de usar, identificación por número de versión y fecha; protocolos para CI, CO y CF; PNO's, etc.).
- c) El nivel de habilidad requerida para operar el equipo y los detalles de cualquier capacitación necesaria y cursos proporcionados por el proveedor.
- d) Rendimiento de muestra, presentación y necesidades para su introducción.



- e) Necesidades de adquisición de datos, forma de procesarlos y presentarlos.
- f) Requisitos para servicios, instalaciones y consumibles (por ejemplo, electricidad, gases especiales, y su consumo esperado).
- g) Condiciones ambientales o intervalo de condiciones dentro de las cuales, el equipo debe trabajar.
- h) Sugerencias sobre los intervalos y los procedimientos para mantenimiento y calibración de instrumentos, incluyendo el costo y la disponibilidad de cualquier contrato de servicio.
- i) El periodo en el cual, pueda garantizarse para el equipo, el apoyo de calificación, mantenimiento, partes, etc.).
- j) Información sobre seguridad e higiene y asuntos o requisitos ambientales.

En la tarea de la CD, debe tomarse en cuenta la información y el conocimiento de los equipos que existen. Si un equipo es robusto en el diseño y cuenta con indicios registrados que lo prueben, esto proporciona una evidencia y confianza básica acerca de su disponibilidad para su uso. Para nuevas técnicas o equipos, la CD requerirá más esfuerzo sobre su selección.

La selección del proveedor y del equipo está completamente bajo la responsabilidad del usuario. Sin embargo, en la selección del equipo y del proveedor, el usuario debe tener en mente que los reglamentos y/o políticas internas de la institución, probablemente requieran evidencia de los siguientes puntos:

- a) Un diseño riguroso y especificaciones de los métodos a emplear.
- b) Procedimientos de control y aseguramiento de calidad completamente documentados.
- c) La disponibilidad continua de personal calificado y con experiencia.
- d) Los planes de prueba detallados a todos los niveles del sistema y la aplicación de procedimientos para cambios de control rigurosos, informes de fallas y de acciones correctivas.



Por otro lado, el usuario puede proporcionar un cuestionario adecuado, la auditoria de un tercero o la certificación independiente al proveedor, para obtener un esquema de calidad aprobado con evidencia de que los requisitos de las normas se cumplen.

Cuando esta evidencia no esté disponible, es responsabilidad del usuario llevar a cabo una calificación más extensa, con el fin de proporcionar el aseguramiento de calidad necesario que demuestre la capacidad y desempeño del instrumento para el uso que se le va a destinar.

Cuando los equipos son fabricados con el propósito de hacer mediciones que apoyen estudios para la emisión de normas, el usuario puede solicitar la confirmación al fabricante de que está preparado para permitir que las autoridades de normalización tengan acceso a los registros relacionados con la fabricación y el desarrollo del equipo, por ejemplo: código fuente; procedimientos y registros del desarrollo del equipo; documentación de calibración y calificación; registros e informes de pruebas del lote; documentos de calificación de computadoras, microprocesadores y programas de cómputo y credenciales del personal involucrado con el desarrollo del equipo.^{10,11,12}

4.2 Calificación de Instalación (CI)

Hay una línea fina entre lo que está incluido tanto en la CI como en la CO. En efecto, la línea puede dibujarse de modo diferente para todos los fabricantes y/o diferentes equipos. La CI cubre toda la instalación del equipo, incluyendo su respuesta a la aplicación inicial de energía.

La CI involucra la revisión formal para confirmar que el equipo, sus módulos y accesorios se han suministrado como se solicitaron (de acuerdo a especificaciones establecidas entre el usuario y el proveedor) y que el equipo es instalado adecuadamente en el ambiente que se seleccionó. La CI debe documentarse formalmente y deberá cumplir con lo siguiente:



- a) Que el equipo (incluyendo todos los módulos y los accesorios) se hayan entregado como se solicitó (notas de entrega, orden de compra, especificaciones acordadas) y que el equipo haya sido revisado y reportado sin daño.
- b) Que se proporcionó toda la documentación requerida y que es correcta (por ejemplo, manuales de operación, los cuales también deberán incluir su número y fecha de emisión, la especificación del proveedor y los detalles de todos los servicios y herramientas necesarias para operar el equipo).
- c) Que se haya proporcionado el servicio recomendado, como el mantenimiento, los programas e intervalos de calibración y calificación. Cuando el mantenimiento puede ser realizado por el usuario, deben establecerse métodos e instrucciones adecuadas, así como también los puntos de contacto para la realización del servicio y la adquisición de refacciones.
- d) Que se haya suministrado equipo de cómputo, licencias y programas de edición correcta.
- e) Que se haya proporcionado: la información sobre los consumibles necesarios empleados durante la operación normal del equipo y los procedimientos de encendido y apagado.
- f) Que el ambiente seleccionado para el instrumento sea el adecuado, con un espacio apropiado para su instalación, operación, servicio y servicios adecuados (electricidad, gases especiales, etc.).
Puede ahorrarse tiempo y esfuerzo significativo, si estos requisitos básicos se revisan antes de la CI formal del instrumento.
- g) Que haya sido proporcionada la información sobre seguridad e higiene y ambiente, relacionada a la operación del equipo. Es responsabilidad del proveedor proporcionar información adecuada sobre seguridad, sobre la cual el usuario debe actuar y documentar la aceptación de esta guía.
- h) Que se registre la respuesta inicial del instrumento debida a la aplicación inicial de energía, documentando que está de acuerdo a lo especificado, registrar cualquier desviación encontrada (si el sistema está diseñado para realizar cualquier diagnóstico automático o procedimientos de encendido, la respuesta a estas funciones deberán observarse y documentarse).



La CI puede ser realizada por el proveedor y/o el usuario. Sin embargo, deberá notarse que, en algunos casos la complejidad del instrumento puede excluir al usuario para que realice la CI y por otro lado, el desempaque del equipo por el usuario puede invalidar la garantía.

La CI debe llevarse a cabo por una persona competente y de acuerdo con los procedimientos e instrucciones del proveedor. El éxito o la falla de cada una de las revisiones de la CI, deberán ser registradas formalmente y los resultados de prueba de las revisiones de la CI que hayan sido realizadas por el proveedor, deberán ser informadas al usuario.^{10, 11, 13}

4.3 Calificación Operacional (CO)

El propósito de la CO es demostrar y proporcionar evidencia documentada de que el equipo funcionará de acuerdo a la especificación operacional en el ambiente seleccionado.

Normalmente para un equipo nuevo, la CO se realiza después de la CI o después de un cambio significativo en el equipo o después de realizar un cambio de un componente resultado de una reparación o servicio.

La CO puede ser llevada a cabo por el proveedor o el usuario, pero debe permanecer bajo el control del usuario. Sin embargo, para equipos de configuración compleja, solo puede ser realizada por el proveedor.

La CO debe realizarse de acuerdo a los procedimientos y las instrucciones del proveedor, utilizando los materiales y protocolos apropiados y debe satisfacer los requisitos generales establecidos en la calificación de equipo. En esta sección no es posible dar una guía general a los requisitos para la CO, porque en esta etapa, las revisiones y las pruebas necesarias para demostrar que la especificación operacional del instrumento se cumple, son específicas y varían dependiendo del tipo de equipo que esté bajo calificación.



4.4 Calificación del Funcionamiento o Desempeño (CF)

El propósito de la CF es asegurar que el equipo funciona correctamente y que la especificación es apropiada para su uso de rutina. Esta especificación puede ser la especificación operacional original o una más adecuada para su uso actual. La CF proporciona la evidencia continua del control y desempeño aceptable del equipo, durante su uso rutinario.

La frecuencia y el requerimiento para la CF, deberá ser especificada en los manuales de operación o en un PNO. Deberá basarse en el tipo de equipo y por supuesto en el desempeño previo del equipo (historial de funcionamiento), incluyendo los períodos establecidos de calibración del instrumento, basados en la práctica (gráficos de control), con la finalidad que permanezca el equipo en los límites de aceptación.

Cuando sea posible, todas las revisiones y pruebas de la CF, deberán llevarse a cabo utilizando parámetros tan cercanos, como sea posible a aquellos utilizados durante una operación de rutina normal del equipo. Para la mayoría de los equipos habrá un área “gris” entre el funcionamiento óptimo y el nivel inaceptable. Cuando este sea el caso, el usuario debe identificar un umbral (estableciendo un criterio) bajo el cual, el funcionamiento del equipo es no aceptable y por lo tanto establecer que el equipo no debe ser usado hasta que su funcionamiento sea restablecido.

Los aspectos de la calificación de desempeño son con frecuencia incluidos dentro de los procedimientos o métodos de medición analítica. Este enfoque, es con frecuencia llamado Prueba de Aptitud del Sistema PAS (System Suitability Checking, SSC), la cual demuestra que el desempeño del procedimiento de medición (incluyendo las condiciones de operación instrumental) es apropiado para una aplicación en particular. La PAS deberá utilizarse antes y durante el análisis para proporcionar una evidencia de operación satisfactoria o una evidencia de que el desempeño ya no es aceptable. ^{10, 14}



Cuando el proveedor suministra un sistema de medición completo, la CF puede realizarse por el proveedor, pero debe permanecer bajo control del usuario. En algunas circunstancias, la CF puede involucrar que se realicen varias revisiones y pruebas que son también realizadas durante la CO y por lo tanto, éstas deben realizarse por el proveedor. Sin embargo, cualquier CF llevada a cabo por el proveedor, es probable que el usuario también tenga que realizar frecuentemente la misma CF (revisiones y pruebas), para confirmar el desempeño satisfactorio y continuo del instrumento durante el uso rutinario.^{10, 15}

4.5 Ciclo de Vida

Las actividades relacionadas en la calificación se consideran bajo el concepto de un ciclo de vida. En este enfoque, el ciclo de vida considera las siguientes etapas:

- a) Detección de necesidades.
- b) Definición de especificaciones.
- c) Elaboración de protocolos.
- d) Revisión y aprobación de protocolos.
- e) Ejecución de actividades.
- f) Colección de información.
- g) Reporte de resultados.
- h) Revisión y aprobación del reporte.
- i) Control de cambios.
- j) Recalificación y reinicio del ciclo.

Para las entidades propias a calificar (equipos, sistemas y áreas) también se aplica el concepto de ciclo de vida, el cual está compuesto de:

- a) Planeación (Desarrollo del PMV y clasificación del impacto).
- b) Desarrollo de especificaciones (de usuario y funcionales).
- c) Diseño y desarrollo (instalación o construcción).
- d) Pruebas (actividades de calificación de instalación, operación y desempeño).



- e) Uso y mantenimiento.
- f) Retiro.
- g) Establecimiento de la nueva entidad y reinicio del nuevo ciclo.

Como se observa, el trabajo de validación, es una actividad continua que debe ir acorde a todas las necesidades de crecimiento de la empresa, los cambios normativos y las variantes propias a la naturaleza de los procesos y eficiencia de equipos.^{2,16}

4.6 Re-Calificación

En general, un equipo experimentará una variedad de cambios durante su vida útil (ciclo de vida). Estos pueden variar desde el reemplazo rutinario de una parte simple consumible, hasta cambios significativos que afectan el sistema completo del equipo. Los ejemplos de tales circunstancias incluyen:

- a) Movimiento o re-localización del equipo.
- b) Interrupción de los servicios o suministros.
- c) Mantenimiento de rutina y reemplazo de refacciones.
- d) Modificación (por ejemplo, actualización del equipo o mejora).
- e) Un cambio 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.

La naturaleza y la razón para cualquier cambio al equipo, en conjunto con los resultados de todas las pruebas y revisiones de la re-calificación realizada, deberán documentarse formalmente.



En la re-calificación no es necesariamente repetir todo el proceso de calificación. Sin embargo, debe cubrir el cambio realizado y re-calificar aquellas partes (refacciones y/o accesorios, equipos acoplados, entre otros) del equipo, que afecten dicho cambio.^{1,2,10}

Por ejemplo, el reemplazo de la fuente de un detector (por ejemplo, la lámpara de deuterio) requerirá re-calificar el detector, utilizando procedimientos y protocolos apropiados para CO/CF, pero sería poco probable requerir la re-calificación de otros componentes del instrumento (p. ej. el inyector o la bomba). Sin embargo, debido a que el cambio afectó al equipo como un todo, podría ser necesario llevar a cabo revisiones para la CF en todo el sistema, para demostrar su desempeño satisfactorio posterior al cambio.

Similarmente, para algunos sistemas “modulares” es posible, con frecuencia intercambiar los componentes dependiendo de la aplicación y del uso propuesto para el equipo. Los cambios en la configuración del equipo (por ejemplo, reemplazo de un detector por otro) puede no necesariamente, requerir re-calificación del módulo individual, pero requerirá re-calificación del sistema como un todo.

Cuando existan cambios significativos del equipo, por ejemplo, un componente principal o una actualización del programa de cómputo o una mejora que permita incrementar la capacidad, normalmente requerirá una re-calificación más amplia. En efecto, para tales cambios substanciales, hay con frecuencia una línea fina entre lo que es considerado que sea re-calificación y lo que constituye la calificación de un nuevo componente.

La actualización del equipo y/o su programa de cómputo, deberá documentarse completamente y describir las razones, diferencias, las nuevas características y los beneficios del cambio efectuado. Los usuarios deberán averiguar y solicitar evidencia documentada a los proveedores, de que la actualización haya sido desarrollada y fabricada de acuerdo a normas apropiadas y formalmente validada durante su producción. La actualización del programa de cómputo deberá, en lo que sea posible, ser compatible con las versiones previas y donde esto no sea posible, el proveedor deberá ofrecer una transferencia “validada” de los datos existentes al sistema actualizado.



Posterior a la instalación de actualización, el instrumento deberá re-calificarse utilizando revisiones y pruebas adecuadas. Cuando sea posible, las revisiones y pruebas utilizadas para la re-calificación deben diseñarse de tal forma, que los resultados puedan ser comparados con aquellos que se obtuvieron utilizando las versiones anteriores. Cualquier diferencia entre los resultados de prueba obtenidos por las versiones anteriores y las nuevas, deberán identificarse, documentarse y resolverse.^{1, 2, 10}

4.7 Clasificación de los Instrumentos Analíticos

Los laboratorios modernos por lo general cuentan con instrumentos y equipos variados que van desde los más simples hasta los más complejos y automatizados. Por lo tanto, aplicar una serie de principios para calificar instrumentos tan especializados sería inapropiado. Los usuarios están en capacidad de establecer el grado de calificación necesaria para un instrumento.

Según el grado necesario, conviene clasificar los instrumentos dentro de tres grupos: A, B y C, según se define a continuación y se dan algunos ejemplos a manera de ilustración por lo tanto no determina la categoría exacta de un instrumento, está la deben de determinar el usuario según sus requisitos específicos.

Grupo A

El grupo A incluye equipos estándar sin capacidad de medición o requisito habitual de calibración, donde la especificación de funcionalidad básica provista por el fabricante se acepta como requisito de usuario. La conformidad de los equipos del grupo A con los requisitos del usuario se puede verificar y documentar a través de la observación visual de su funcionamiento. Ejemplos: placa de calentamiento, placa de agitación magnética, vortex, sonicador, centrífuga.



Grupo B

El grupo B incluye equipos e instrumentos estándar que suministran valores medidos, así como equipos que controlan parámetros físicos (como temperatura, presión o flujo) por lo tanto necesitan calibración, donde los requisitos del usuario son típicamente los mismos que la especificación de funcionalidad y los límites operativos del fabricante. La conformidad de instrumentos o equipos del grupo B con los procedimientos operativos estándares para el instrumento o equipo y se documenta durante la CI y la CO. Ejemplos de instrumentos son: balanzas, aparato para medir el punto de fusión, microscopios de luz, medidores de pH, conductímetros, refractómetros, termómetros, viscosímetros, tituladores, pipetas volumétricas. Ejemplos de equipos son: muflas, hornos, refrigeradores, congeladores, baños de agua y bombas.

Grupo C

El grupo C incluye instrumentos y sistemas analíticos computarizados, donde los requisitos de usuario para la funcionalidad y los límites operativos y de desempeño son específicos para aplicación analítica. La conformidad de los instrumentos del grupo C con los requisitos del usuario se determina por pruebas de función y pruebas de desempeño específicas. La instalación de estos instrumentos puede ser una tarea complicada y puede requerir de la asistencia de especialistas. Por lo tanto, a estos instrumentos se les debe aplicar un proceso de calificación total. Ejemplos de estos instrumentos y sistemas son: espectrofotómetro de absorción atómica, calorímetros diferenciales de barrido, aparatos de disolución, microscopios electrónicos, cromatógrafo de líquidos de alta presión, espectrofotómetro de masas, espectrofotómetro de fluorescencia, detectores de arreglo de diodos, analizadores de elementos, cromatógrafo de gases, espectrofotómetros de UV/Vis, espectrofotómetros de Raman. ^{9,11}



4.8 Validación del Software

El software empleado para trabajo analítico se puede categorizar en tres partes: firmware, software para control del instrumento, adquisición de datos y procesamiento; y software autónomo.

Firmware

Los instrumentos analíticos computarizados contienen chips integrados con software de bajo nivel (firmware). Dichos instrumentos no funcionarían sin un firmware que opere adecuadamente y los usuarios por lo general no pueden alterar el diseño ni la función del firmware. Por lo tanto, el firmware se considera un componente del instrumento mismo. De hecho, la calificación del hardware no es posible sin ponerlo en funcionamiento a través de su firmware.

Por lo tanto, cuando se califica el hardware (o sea el instrumento analítico) en el sitio del usuario, también se está calificando esencialmente el firmware integrado. No es necesario calificar el firmware por separado en el sitio. Siempre que sea posible, se debe registrar la versión del firmware como parte de las actividades de la CI. Cualquier cambio que se haga a las versiones de firmware se debe rastrear a través del control de cambios del instrumento.

Software para Control del Instrumento, Adquisición de Datos y Procesamiento

En muchos de los instrumentos computarizados actuales, el software para control del instrumento, adquisición de datos y procesamiento se carga en una computadora conectada al instrumento, la operación del instrumento se controla entonces a través del software, lo cual deja pocos controles operativos en el instrumento. Además el software se necesita para la adquisición de datos y para los cálculos posteriores. Por ello, tanto el hardware como el software, con sus funciones entrelazadas, son críticos para proporcionar los resultados analíticos.



El fabricante debe efectuar la CD, validar este software y proporcionar a los usuarios un resumen de la validación. En el sitio del usuario, la calificación integral, que involucra todo el sistema del instrumento y el software, es más eficaz que la validación modular del software solo.

Software Autónomo

El proceso de validación es administrado por el desarrollador del software, quien especifica también el modelo de desarrollo apropiado para el software. La validación se lleva a cabo en una serie de actividades planeadas y ejecutadas a través de diversas etapas del ciclo del desarrollo.^{9,16}

4.9 Control de Cambios

A la evaluación y documentación de los cambios que impactan a la fabricación o a la calidad del producto se le llama “control de cambios” y, en consecuencia, tiene la principal intención de prevenir que un cambio sugerido tenga un impacto indeseable.

El control de cambios es un proceso formal para proponer, evaluar, documentar e implementar cambios en los materiales, componentes, equipo, instalaciones, métodos o controles involucrados en cualquier aspecto de la manufactura, análisis o control de un producto.

El control de cambios también considera el efecto del cambio sobre el estado de validación (o calificación según sea el caso): los cambios menores pueden no requerir ninguna validación adicional, mientras que los cambios mayores o críticos si requerirán una revalidación.^{1,3}

Los cambios a los instrumentos, incluido el software, se vuelven inevitables a medida que los fabricantes agregan nuevas características y corrigen defectos conocidos. Sin embargo, la implementación de todos esos cambios no siempre beneficia a los usuarios. Por lo tanto, los usuarios deben adoptar los cambios que consideren útiles o necesarios y deben evaluar



también los efectos de los cambios para determinar si se requiere alguna recalificación al equipo analítico, a través del proceso de control de cambios lo puede hacer.

El control de cambios puede seguir la misma secuencia CD-CI-CO-CF. Para la CD, evaluar los parámetros cambiados y determinar si la necesidad del cambio justifica su implementación. Si la implementación es necesaria, introducir el cambio al sistema durante la CI.

Evaluar cual de las pruebas de la CO existentes necesita revisión, eliminación o adición como resultado del cambio instalado. Una vez evaluadas, efectuar las pruebas relevantes afectadas por el cambio. Esto asegura el funcionamiento eficaz del instrumento después de instalar el cambio.

Evaluar cual de las pruebas de la CF existentes necesita revisión, eliminación o adición como resultado del cambio instalado. Una vez evaluadas, efectuar las pruebas después de la instalación del cambio en caso de que durante la CO no se haya efectuado una prueba similar. Posteriormente, efectuar las pruebas de CF cada que sea necesario, por ejemplo cada vez que se realiza la Prueba de Aptitud del Sistema.^{10, 11, 16}



5. CALIBRACIÓN Y TRAZABILIDAD

La Guía ISO (Organización Internacional de Normalización) 17025 ¹⁷ y las BPL establecen que, en donde sea relevante y posible, las calibraciones deberán ser trazables a patrones nacionales o internacionales. La importancia de la trazabilidad a patrones nacionales e internacionales está en el establecimiento de la exactitud, de los datos resultantes del proceso de medición. En donde esto no es relevante o posible, las bases para la calibración o el establecimiento de la exactitud de los resultados deben documentarse.

Cuando se utilizan instrumentos para medir valores absolutos de un parámetro, (por ejemplo, de temperatura, longitud de onda), el instrumento deberá ser calibrado utilizando materiales de referencia o patrones trazables a patrones nacionales o internacionales. La mayoría de los instrumentos de medición analítica no se utilizan en esta forma. En lugar de esto, el parámetro medido (por ejemplo, mV) es comparado con el valor de una magnitud conocida de medición de interés, de un material de calibración, en una forma tal, que obedezca las leyes definidas. Actualmente, está en discusión la influencia de la calibración o caracterización física del instrumento y su incertidumbre, en la incertidumbre final del valor medido de la magnitud del mensurando. En este sentido se está analizando información experimental en casos específicos, para sustentar técnicamente los argumentos de discusión. Entre tanto, se considera que la mejor aproximación a los valores verdaderos del mensurando, es la obtenida mediante el uso apropiado de los materiales de referencia certificados en cada caso.

Para muchas aplicaciones, la exactitud de los parámetros de operación del instrumento no es crítica (por ejemplo, la velocidad del flujo de la fase móvil en sistemas de CLAR) y por lo tanto la necesidad de realizar una calibración correspondiente a dicho parámetro, que sea trazable a patrones nacionales o internacionales no es importante. En tales circunstancias, la exactitud del parámetro de operación es secundaria, siempre y cuando permanezca reproducible consistentemente, durante la medición analítica de la muestra y del patrón correspondiente, adicionalmente deberá demostrarse el desempeño adecuado del instrumento de medición.



Sin embargo, en otras circunstancias, la exactitud de los parámetros de operación de un instrumento y subsecuentemente la calibración trazable a patrones nacionales e internacionales será de mayor importancia; por ejemplo: cuando un procedimiento de medición analítica es desarrollado en un laboratorio y éste se transfiere a otro laboratorio para uso rutinario o en donde la exactitud del parámetro pueda tener un impacto crítico sobre el funcionamiento del proceso de medición.

La trazabilidad a patrones nacionales e internacionales es normalmente y con frecuencia establecida más eficientemente, a través del uso de materiales de referencia certificados o patrones trazables al SI.

Los usuarios deben evitar sobre especificar requisitos de trazabilidad y/o calibración (por ejemplo, para parámetros que no son críticos en el método), porque los evaluadores tendrán justificación para exigir que el usuario demuestre, que cualquier requisito metrológico especificado en el procedimiento, debe cumplirse razonablemente.^{10, 18}



6. DOCUMENTACIÓN

Las Buenas Prácticas de Documentación (BPD) son un conjunto de lineamientos que indican las acciones a seguir para el correcto manejo de documentos o emisión de registros y que sirven de base para el adecuado funcionamiento del sistema de calidad.

Los documentos deben ser legibles, claros, permanentes, concisos, completos, confiables y precisos.

El sistema de documentación establece la necesidad de un control estricto; por ello, se debe contar con los mecanismos útiles y los procedimientos que definan la forma correcta de implantar, revisar, actualizar, identificar, mantener y eliminar (en caso de obsoletos) los documentos de la empresa. Todo sistema de calidad debe concentrarse en documentar las actividades, las operaciones y los procesos implantados en la empresa, para después establecer controles y métodos de mejora continua.

Los estudios de validación constituyen una parte esencial de las buenas prácticas de fabricación y deben efectuarse conforme a protocolos definidos de antemano. Debe prepararse y archivarse un informe que resuma los resultados y las conclusiones registradas. Deben establecerse procesos y procedimientos sobre la base de un estudio de validación/calificación, los cuales se sometan periódicamente a una revalidación/recalificación para asegurar que con ellos se puedan seguir obteniendo los resultados deseados.^{7, 18}

Tener un buen sistema de documentación es una necesidad básica para el aseguramiento de la calidad. Su propósito, es el de definir un sistema de control para prevenir errores de comunicación y asegurar que el personal siga los procedimientos correspondientes, además, permite la investigación y el rastreo de los productos.



Al implementar un sistema de documentación adecuado se obtiene:

- a) El mejoramiento en la organización de los documentos.
- b) La reducción de esfuerzos para el cumplimiento regulatorio.
- c) La eliminación de algunas auditorias.
- d) La capacitación extendida en cascada.
- e) El incremento de eficiencia y productividad.
- f) Mayor facilidad en la comunicación.

Todos los documentos deben ser diseñados, revisados y distribuidos cuidadosamente también deben ser aprobados, firmados y fechados por las personas autorizadas. Ningún documento debe modificarse sin autorización. Los documentos deben revisarse regularmente y mantenerse actualizados.

Cuando en un documento deban ingresarse datos, éstos deben ser claros, legibles e indelebles. Debe haber suficiente espacio para el ingreso de todos los datos solicitados.^{7,19}

La documentación de la calificación del equipo, puede prepararse y ser proporcionada por el usuario, el proveedor o por ambos. Cuando ésta es proporcionada por el proveedor (por ejemplo, en un protocolo de calificación), debe permanecer bajo la responsabilidad del usuario y ser escrita de tal forma, que pueda ser identificada fácilmente y entendida por el usuario. La documentación que cubre la calificación deberá satisfacer los siguientes requisitos:

- a) El equipo, todos los módulos y accesorios deben identificarse de forma única, particularmente los informes y certificados, incluyendo: nombre del proveedor, nombre del instrumento, modelo y número de serie, cualquier número de identificación asignado por el usuario, la versión y la fecha de emisión de cualquier computadora, microprocesador, licencias y programas de cómputo. Puede ser útil incluir alguna descripción del equipo y su papel en el proceso de medición.
- b) Establecer claramente los intervalos en los cuales, los aspectos de la calificación y/o revisiones y pruebas específicas, deben llevarse a cabo y el nivel de responsabilidad del operador requerido para realizar las pruebas.



- c) Proporcionar detalles de cada prueba o revisión a realizar, el criterio a emplear para la especificación y la aceptación. Esta información deberá ser suficientemente concisa, de tal forma que permita al operador hacer un juicio no ambiguo sobre los resultados de la prueba.
- d) Proporcionar suficiente información sobre los procedimientos y materiales requeridos para realizar cada revisión y prueba. Cuando exista la necesidad de establecer trazabilidad a patrones nacionales e internacionales, debe existir documentación que sugiera como podría establecerse.
- e) Cuando la calificación de un componente del instrumento es dependiente de la función correcta de otro de sus componentes, cualquier suposición establecida deberá registrarse.
- f) Establecer la fecha, en la cual, la calificación se llevó a cabo y el resultado de calificación para cada prueba y revisión.
- g) Establecer la razón para realizar la calificación, por ejemplo, posterior a la instalación de un nuevo instrumento (componente), posterior a un servicio de rutina o posterior a una falla del instrumento.
- h) Proporcionar información clara sobre la acción que deberá tomarse en caso de que falle la prueba o la calificación.
- i) Establecer las circunstancias en las cuales podría o será necesaria la re-calificación del instrumento (por ejemplo, posterior al servicio o re-calibración).
- j) Contener el nombre(s) y la firma(s) de la persona(s) quienes realizan la calificación y/o cada revisión o prueba individual. Contener el nombre y la firma del usuario, autorizando la finalización de la calificación.

Se recomienda conservar los libros de registro para todos los instrumentos. Las normas correspondientes de calidad, ponen gran énfasis en la conservación de los registros que contienen la historia del instrumento. Conservar un libro de registro actualizado con el historial del instrumento, proporciona un mecanismo conveniente para registrar la información y puede proporcionar las bases para satisfacer los requisitos de las Normas o documentos involucrados, como la Guía ISO 17025. ¹⁷



Los libros de registro de equipos e instrumentos deben identificar los módulos individuales y los accesorios que lo constituyen y deben ser utilizados para registrar la historia total del instrumento (por ejemplo, la fecha de compra, la calificación inicial, el registro del servicio, las fechas de los mantenimientos subsecuentes, fechas de calibraciones y calificaciones que se hayan realizado y la programación de las próximas). En algunas circunstancias puede ser adecuado, que toda la información relevante se documente ó anexe al libro de registro (por ejemplo, instrucciones de operación y/o PNO's; registros de calibración y mantenimiento, protocolos de calificación e informes). Por otro lado, puede ser más apropiado utilizar el libro de registro como un resumen de la información clave, cuyas referencias serán procedimientos más detallados, informes y certificados que estén disponibles para su revisión.¹⁰

No obstante, en ciertas ocasiones, el personal no cumple con lo indicado en algún documento; es decir incurre en alguna desviación.

6.1 Desviaciones

Una desviación es la falta de cumplimiento de un requisito previamente establecido (en algún documento). Las BPF y las BPD establecen que las desviaciones deben revisarse, documentarse y evaluarse para definir las acciones a seguir.

Debe contarse con un sistema que asegure que todas las desviaciones a especificaciones, procedimientos y métodos de análisis sean investigadas, evaluadas y documentadas.

El manejo de desviaciones tiene tres intenciones principales:

- a) Analizar el impacto de la desviación para decidir las acciones correctivas a tomar.
- b) Documentar los hechos y así facilitar la rastreabilidad.
- c) Investigar la causa raíz que provocó la desviación y tomar las medidas preventivas correspondientes para evitar que la desviación se vuelva a presentar en el futuro.



6.2 Plan Maestro de Validación (PMV)

El desarrollo de un programa de validaciones debe centralizarse en un grupo interdisciplinario que pueda designarse como comité de validaciones, una vez formado el grupo, tiene como primera tarea identificar las necesidades explícitas en cada campo que se planea cubrir con el proceso de validación en un PMV, definido como el documento que especifica la información referente a las actividades de validación que realizará la compañía, donde se definen detalles y escalas de tiempo para cada trabajo de validación a realizar. Así como las responsabilidades de cada área.

Las actividades de validación deben estar integradas en un PMV, el cual debe incluir la calificación de equipos, tanto los del proceso de manufactura como los equipos del laboratorio analítico. ^{1, 2, 3}

El PMV debe contener los datos de por lo menos los siguientes puntos:

- Política de validación.
- Estructura organizacional para las actividades de validación.
- Resumen de las instalaciones, sistemas, equipo y procesos a validar.
- Formato a usarse para protocolos y reportes.
- Planeación y programación.
- Control de cambios.
- Referencia a documentos existentes.
- Métodos analíticos.
- Sistemas computacionales que impactan a la calidad del producto.
- Sistemas críticos.
- Calificación de equipo de producción y acondicionamiento.
- Procesos o métodos de limpieza.
- Procesos de producción (incluyendo otros procesos como por ejemplo la esterilización en el caso de productos estériles).
- Procesos de empaque primario y acondicionado.



A su vez debe indicar:

- Vigencia.
- Alcance.
- Objetivos.
- Mantenimiento del estado validado.
- Cuando se requiera debido a la magnitud del proyecto, puede ser necesaria la creación de planes maestros de validación separados.

6.3 Protocolo de Calificación

Debe establecerse un protocolo escrito que especifique cómo se llevará a cabo la calificación. El protocolo debe especificar los pasos críticos, su programa de seguimiento de actividades y los criterios de aceptación. Antes de su ejecución, el protocolo debe ser revisado por el responsable del proceso o sistema y aprobado finalmente por el responsable de la unidad de calidad. Cualquier cambio a los protocolos debe documentarse con la justificación apropiada. Los cambios deben ser revisados por el responsable del proceso o sistema y aprobados por el responsable de la unidad de calidad.

Debe prepararse un reporte que haga referencia cruzada al protocolo de calificación, que reúna los resultados obtenidos, comentando cualquier desviación o no conformidad observada y mencionando las conclusiones obtenidas, incluyendo los cambios necesarios recomendados para corregir las deficiencias. Los reportes deben ser aprobados al menos por el responsable del proceso o sistema y por el responsable de la unidad de calidad.^{1,3}



7. CROMATOGRAFÍA

El término cromatografía (*kromos*: color, *graphos*: descripción) se debe a que las primeras separaciones se llevaron a cabo con pigmentos de plantas, en los cuales se observaban como bandas coloridas.

La cromatografía es un método fisicoquímico muy utilizado en la industria, que permite la separación, identificación y cuantificación de las sustancias químicas de interés, en mezclas complejas.

La cromatografía fue desarrollada a principios del siglo XX, y en la cual se establece, que un soluto se distribuye entre dos fases, una fija (fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido) y otra móvil (fase móvil que puede ser un gas, líquido o fluido supercrítico). La fase móvil transfiere el soluto a través del medio, hasta que finalmente emerge separado de otros componentes que eluyen antes o después.¹⁴

7.1 Clasificación de las Técnicas Cromatográficas

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar de acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas. Si la fase estacionaria es un sólido el proceso se denomina cromatografía de adsorción, mientras que si es un líquido, se llama cromatografía de reparto. La diferencia entre la cromatografía de adsorción y de reparto se puede atribuir a la naturaleza de las fuerzas que influyen en la distribución de los solutos entre las dos fases.

En la cromatografía de adsorción, la fase móvil que contiene los solutos disueltos pasa por encima de la fase estacionaria. La retención de los componentes y su consiguiente separación dependen de la capacidad de los átomos que se encuentran en la superficie para remover los solutos de la fase móvil y adsorberlos de manera temporal por medio de fuerzas electrostáticas. Si la fase móvil es un líquido, el proceso se denomina



cromatografía líquido-sólido. Pero, cuando la fase móvil es un gas, el método se llama cromatografía gas-sólido.^{20, 21}

De acuerdo a la naturaleza de la fase estacionaria, de la fase móvil y a los mecanismos de separación, ver tabla 1, la cromatografía se puede clasificar en tres grandes grupos:

- a) Cromatografía de líquidos (CL)
- b) Cromatografía de gases (CG)
- c) Cromatografía de fluidos supercríticos (CFS)

Tabla 1. Clasificación General de las Técnicas Cromatográficas.²¹

Clasificación General	Técnica	Fase Estacionaria	Tipo de Equilibrio
Cromatografía de Líquidos	Líquido-Líquido o reparto	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre líquidos inmiscibles
	Líquido-fase unida químicamente	Especies Orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Líquido-Sólido o adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio iónico	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un sólido polimérico	Distribución/exclusión
Cromatografía de gases	Gas-Líquido	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre un gas y un sólido
	Gas- fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre un líquido y una superficie enlazada
	Gas- Sólido	Sólido	Adsorción
Cromatografía de fluidos supercríticos		Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el fluido supercrítico y la superficie enlazada



7.2 Cromatografía de Gases (CG)

Las características distintivas de la cromatografía de gases son una fase móvil gaseosa y la fase estacionaria que puede ser un sólido (CGS) o un líquido (CGL). Las fases estacionarias líquidas están disponibles en columnas capilares o rellenas. En las columnas rellenas, la fase líquida se deposita en un soporte sólido finamente dividido, inerte, como por ejemplo la tierra de diatomeas, polímeros porosos o carbono grafito, con el que se rellena una columna que típicamente tiene de 2 a 4 mm de diámetro interno y de 1 a 3 m de longitud. En las columnas capilares, que no contienen relleno, la fase líquida se deposita en la superficie interna de la columna y puede unirse químicamente a ella. En la cromatografía de gas-sólido, la fase sólida es un adsorbente activo, como por ejemplo la alúmina, sílice o carbono, con el que se rellena una columna.

En la CGS el proceso de separación se lleva a cabo por adsorción entre el gas que transporta al soluto y el soporte, en la CGL la separación se lleva a cabo por el proceso de partición entre la fase estacionaria líquida y el gas que transporta al soluto.

Cuando se introduce una sustancia en la corriente del gas, ésta se volatiliza por la elevada temperatura y de esta manera es transportada por el gas transportador a lo largo de la columna donde se distribuye entre las fases sólida y líquida. La elución del compuesto se caracteriza por la constante de partición k' , un valor adimensional también llamado factor de capacidad. El cual es equivalente al cociente ya sea por la cantidad o por el tiempo de residencia de la sustancia en la fase estacionaria X_e entre la cantidad o tiempo de residencia de la sustancia en la fase móvil X_m .

$$k' = \frac{X_e}{X_m}$$

Cuando $k' = 1$, el soluto se encuentra igualmente distribuido entre las dos fases y la separación es ineficiente. Cuando el factor de capacidad para una especie es mucho menor que la unidad, la elución tiene lugar tan rápidamente que es difícil determinar con



exactitud los tiempos de retención. Si es igual o mayor a 10, los tiempos de retención son demasiado largos. Idealmente las separaciones se realizan en condiciones donde los factores de capacidad para las especies de una mezcla oscilan entre 1 y 5.

Mientras mayor tiempo pase el soluto en la fase estacionaria, mayor será el valor de k' y, por lo tanto, mayor el tiempo de retención, por lo que el valor de k' dependerá de la naturaleza química del soluto; de la naturaleza, la cantidad y la composición de la fase líquida, la temperatura de la columna y la velocidad de flujo del gas. Bajo condiciones experimentales específicas, cada compuesto tiene un factor de capacidad característico. La separación por cromatografía de gases ocurre sólo si los compuestos involucrados tienen diferentes factores de capacidad.

El aparato básico para la cromatografía de gases es un cromatógrafo de gases que consta de una fuente de gas transportador, un inyector, una columna, un detector y un dispositivo registrador. El inyector, la columna y el detector tienen una temperatura controlada. Los gases transportadores típicos son el helio, nitrógeno o hidrógeno, dependiendo de la columna y el detector en uso. El gas se administra desde un cilindro a alta presión o desde un generador de gases de alta pureza y pasa, a través de válvulas reductoras de presión y un medidor de flujo adecuados, al inyector y a la columna. La mezcla de compuestos se inyecta en la corriente gaseosa a través del inyector. Es preferible inyectar directamente la muestra en el empaque; sin embargo, en algunos casos la muestra en forma de vapor se mezcla con el gas transportador antes de entrar en la columna, en donde los diferentes componentes de la muestra vaporizada son separados debido a las interacciones con la fase estacionaria.

La columna generalmente es de vidrio o metal y está localizada en un horno que se mantiene a una temperatura seleccionada, la cual determina el tiempo de retención y en cierta manera la resolución y la eficiencia de la columna. Cuando los componentes salen individualmente de la columna, pasan a través del detector, el cual sensa la presencia de cada uno de ellos.



La temperatura del detector debe controlarse para prevenir la condensación. El uso de un determinado detector, depende de cada sustancia. Las señales del detector pasan a través de un amplificador que está conectado a un aparato automático que grafica la señal, esta gráfica resultante es el cromatograma, el cual se emplea para determinar la identidad y la concentración de cada uno de los componentes. El detector generalmente emite una señal proporcional a la concentración del soluto en el gas transportador cuando éste sale de la columna, de manera que el cromatograma para cada producto aparece como un pico en forma de campana a un determinado tiempo.

Los detectores más comúnmente utilizados en CG son los de conductividad térmica, ionización de flama, ionización de flama alcalina, captura de electrones y espectrómetro de masas.

Dependiendo de las necesidades y características del análisis se selecciona el gas. La velocidad de flujo del gas transportador, es la velocidad de flujo del gas que está saliendo de la columna y es usualmente expresada en centímetros cúbicos por minuto a la presión atmosférica y a temperatura ambiente. La velocidad de flujo se mide comúnmente con la columna operando a su temperatura adecuada mediante un medidor de flujo conectado a la salida de ésta.^{11, 14}

7.2 Cromatografía de Fluidos Supercríticos (CFS)

La temperatura crítica de una sustancia es la temperatura por encima de la cual no puede existir en fase líquida independientemente de la presión. La presión de vapor de una sustancia a su temperatura crítica es su presión crítica. Una sustancia a temperaturas y presiones por encima de su temperatura y de su presión crítica (punto crítico) se denomina supercrítico. Los fluidos supercríticos tienen densidades, viscosidades y otras propiedades que son intermedias entre las características de esa sustancia en estado gaseoso y en estado líquido.



Una propiedad importante de los fluidos supercríticos, es su notable capacidad para disolver moléculas grandes no volátiles, como polímeros y moléculas biológicas que se dispersan con más facilidad y son más estables en un líquido supercrítico que en un líquido o en un gas.

Una segunda propiedad notable de los fluidos supercríticos es que los analitos disueltos en ellos pueden ser fácilmente recuperados por el procedimiento simple de permitir que las disoluciones se equilibren con la atmósfera a temperaturas relativamente bajas. Así, un analito disuelto en dióxido de carbono supercrítico, que es el más usado frecuentemente como disolvente, puede ser recuperado sencillamente reduciendo la presión y dejando que el fluido se evapore en las condiciones ambientales del laboratorio. Esta propiedad es particularmente importante en el caso de los analitos termolábiles. Otra ventaja de muchos de los fluidos supercríticos es que son baratos, inoocuos y no son sustancias tóxicas, por lo que se pueden dejar evaporar libremente en la atmósfera sin efectos ambientales dañinos.

La CFS se basa en el uso de un líquido supercrítico como fase móvil, manteniendo a su temperatura crítica o por encima de ella. El líquido resultante posee densidad, viscosidad y difusividad características que están en un punto intermedio entre las que posee el estado gaseoso y el líquido.

La CFS es una modalidad híbrida entre la CG y la CL que combina algunas de las mejores características de cada una de ellas, por lo tanto esta técnica es de gran importancia porque permite la separación y determinación de un grupo de compuestos que no son manipulados convenientemente ni por la CG ni por la CL. Estos compuestos son: los compuestos no volátiles o termicamente lábiles para los que la cromatografía de gases es inaplicable y los compuestos que tienen grupos funcionales que no son detectables por las técnicas espectroscópicas o electroquímicas empleadas en la CL.

La fase móvil usada con más frecuencia es el dióxido de carbono que tiene una temperatura crítica de 31 °C a 73 atmósferas y es un disolvente excelente para muchos compuestos orgánicos, además de ser económico, no tóxico y no inflamable. ²¹



7.3 Cromatografía de Líquidos (CL)

En la CL se presentan procesos de migración diferencial, donde los componentes de la muestra son retenidos por una fase estacionaria. Las técnicas específicas se escogen con base en la solubilidad y el peso molecular (figura 3) para los cuales existe un mecanismo predominante. Frecuentemente se usan mecanismos de separación combinados para aumentar la selectividad ^{20, 21}

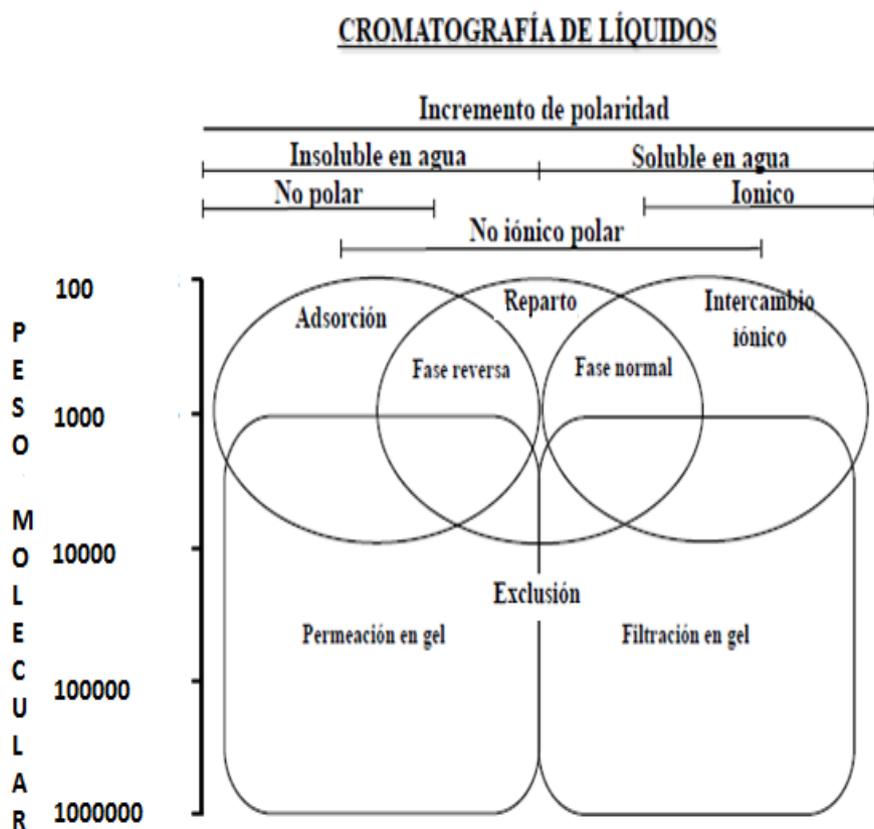


Figura 3. Selección de tipos de cromatografía de líquidos. Los métodos se escogen con base en la solubilidad y masa molecular. ²¹



Cromatografía de adsorción (CA). La fase estacionaria es un sólido en el que los componentes de la muestra son adsorbidos, la fase móvil puede ser un líquido o un gas, los componentes se distribuyen entre las dos fases a través de repetidas etapas de adsorción-desorción, lográndose así la separación de los componentes,^{22, 23} lo cual queda visualizado en la figura 4.

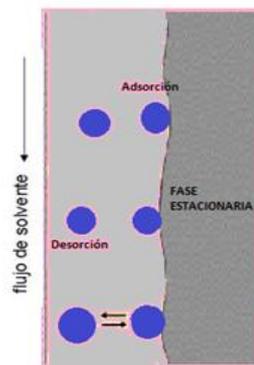


Figura 4. Mecanismo de separación en la CA.²²

Cromatografía de intercambio iónico (CII). La fase estacionaria tiene una superficie cargada iónicamente, con carga contraria a la de la muestra. La fase móvil es un amortiguador acuoso, en el que el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elución, ver figura 5. Las partículas cargadas negativamente se unen a la fase estacionaria sólida cargada positivamente y son retenidas. Las partículas cargadas positivamente son rechazadas por la fase estacionaria sólida cargada positivamente y son eluidas. La elución de las partículas cargadas negativamente se consigue cambiando el pH del disolvente hasta igualarlo a su punto isoeléctrico o hasta invertir su carga neta.

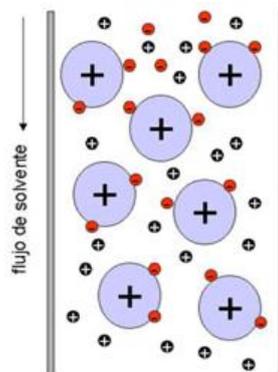


Figura 5. Mecanismo de separación en la CII.²²



Cromatografía de exclusión molecular (CEM). El relleno de la columna es un material que posee poros de dimensiones comprendidas entre ciertos límites, con lo que la muestra es retenida o filtrada según sea su tamaño molecular.

En la figura 6, se representa a la CEM, también conocida como filtración en gel, las esferas grandes representan las partículas del gel, las moléculas pequeñas penetran en los pequeños conductos del gel, donde la velocidad del flujo es menor. Las moléculas grandes incapaces de penetrar en los pequeños conductos del gel, se mueven alrededor de las partículas del gel, donde la velocidad del flujo es mayor. Como consecuencia las moléculas de mayor tamaño son eluidas antes que las de menor tamaño, lográndose así la separación de los componentes de una muestra conforme a su peso molecular.

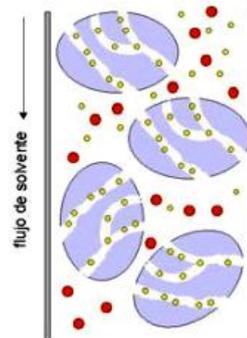


Figura 6. Mecanismo de Separación en la CEM. ²²

Cromatografía de afinidad (CAF). Este tipo de cromatografía utiliza interacciones altamente específicas entre un tipo de moléculas de soluto y una segunda molécula unida covalentemente (inmovilizada) a la fase estacionaria.

Por ejemplo, la molécula inmovilizada podría ser un anticuerpo específico para una proteína particular. En la figura 7, se esquematiza este proceso. Es una cromatografía que utiliza la alta especificidad de las reacciones biológicas del tipo antígeno-anticuerpo, hormona-receptor, etc. Para ello un ligando de afinidad se une al soporte de la fase estacionaria. Cuando la muestra atraviese la columna solo se retendrá la sustancia capaz de reaccionar con dicho ligando.



Después de lavar todos los otros solutos de la columna, la proteína deseada es desplazada del anticuerpo cambiando el pH, la fuerza iónica o la polaridad.^{21, 24}

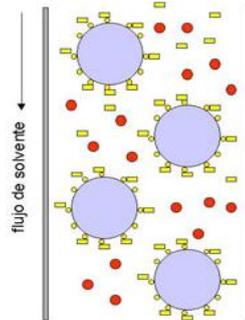


Figura 7. Mecanismo de Separación en la CAF.²²

Cromatografía de reparto (CR). La fase estacionaria de cromatografía de reparto es un líquido adsorbido o enlazado covalentemente en un sólido inerte. La separación se fundamenta en el reparto del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

En relación con las polaridades relativas de las fases móvil y estacionaria, se distinguen dos tipos de cromatografía de reparto, las cuales pueden ilustrarse en la figura 8, Los círculos representan los tipos de compuestos presentes en la muestra y su posición relativa en la dirección del flujo de la fase móvil indica su orden de elución.

Cromatografía en fase normal (CFN). La fase estacionaria es de naturaleza fuertemente polar (por ejemplo sílice) y la fase móvil es no polar (por ejemplo hexano o THF). Las muestras polares quedan retenidas en la columna durante tiempos mayores que los materiales menos polares o no polares. En este tipo de cromatografía el componente menos polar se eluye primero, debido a que relativamente es el más soluble en la fase móvil y un aumento en la polaridad de la fase móvil provoca una disminución del tiempo de elución.



Cromatografía en fase reversa (CFR). En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria es no polar, con frecuencia se trata de un hidrocarburo, y la fase móvil es relativamente polar como el agua, el metanol o el acetonitrilo.²³

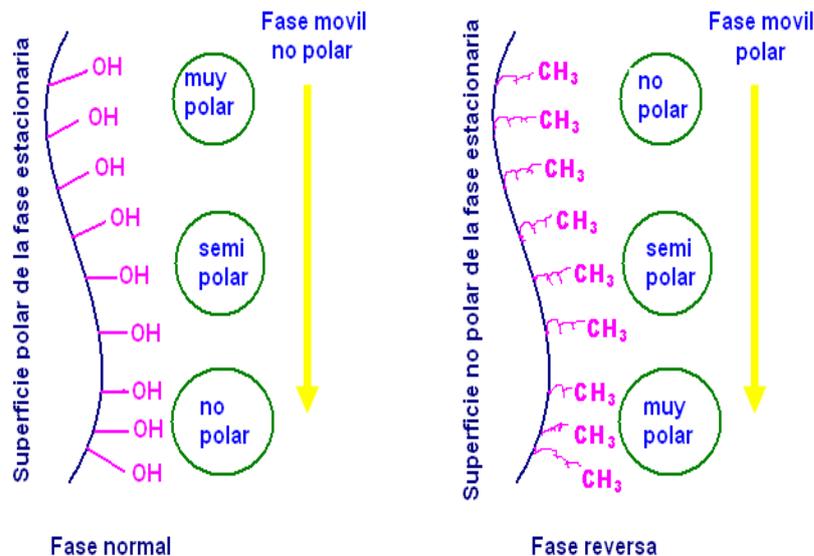


Figura 8. Ilustración gráfica de la cromatografía líquida en fase normal y en fase reversa.²³

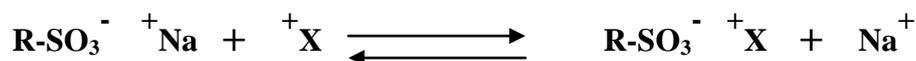
7.4 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

Esta técnica es conocida también como Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (CLAP). El éxito de la aplicación de la CLAR para un compuesto dado depende de la combinación correcta de las condiciones de operación, es decir: la preparación de la muestra, el tipo de la columna, la fase móvil, el tipo de detección, el algoritmo de integración, etc. La migración diferencial en la CLAR es resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil en el orden en que emergieron, hacia un detector donde se registra una respuesta proporcional a su cantidad, sus concentraciones y su tiempo de retención en la columna. El cromatograma 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 se mide desde el momento de la inyección hasta el momento en que aparece el máximo del pico en el cromatograma.^{14, 25, 26,27}

Los mecanismos o procesos de separación que dan como resultado la retención de las moléculas de una muestra por parte de la fase estacionaria dan lugar a los diferentes métodos de cromatografía líquida; esto es: líquido-líquido o de partición, que consta de una fase estacionaria líquida de composición diferente a la de la fase móvil e inmiscibles. Las moléculas de la muestra se distribuyen entre ambas fases como sucedería en una extracción líquido-líquido. La CLS o de absorción incluye partículas de gran área superficial donde las moléculas son atraídas, y por lo tanto, retenidas. La CII, en la cual la fase estacionaria contiene grupos iónicos fijos como $-\text{SO}_3^-$, junto con iones de carga opuesta (contraión). Estos últimos están presentes en la fase móvil en forma de sales. De esta manera las moléculas de muestras iónicas son retenidas en la columna por el intercambio iónico, como lo muestra el siguiente ejemplo:



Por último, la CEM, en la cual el empaque es un material poroso donde el tamaño del poro está bien definido. De esta manera, las moléculas que son demasiado grandes para el poro eluyen entre las partículas y salen rápidamente de la columna, mientras que las que son pequeñas penetran en los poros aumentando su recorrido y prolongando su tiempo de elución. Este tipo de cromatografía es muy empleado para separar compuestos por su tamaño molecular.

La separación entre dos picos, o resolución, depende tanto de la selectividad como de la eficiencia cromatográfica.^{11,14}



7.6 Componentes de un CLAR

Esencialmente un cromatógrafo de líquidos se considera un sistema modular integrado por: un sistema de bombeo, un sistema de inyección, un detector, una columna y un registrador de señales. En la figura 9, se esquematiza en forma general cada uno de los componentes del cromatógrafo.

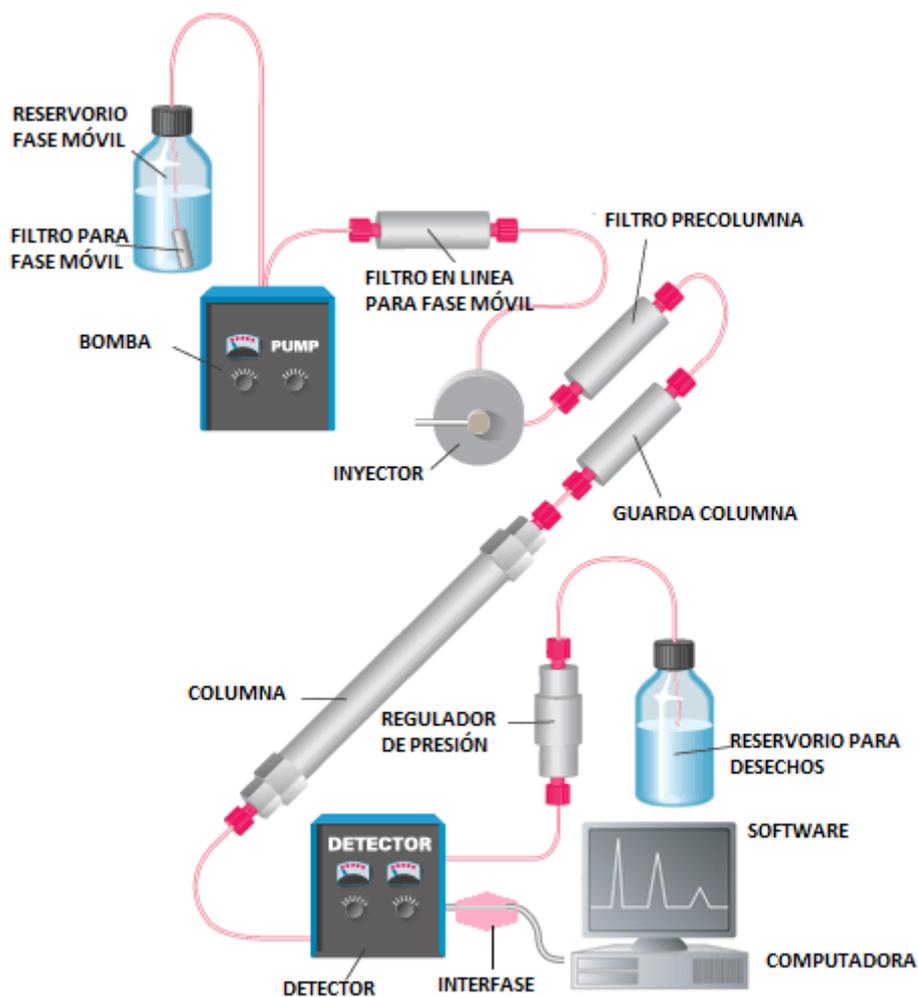


Figura 9. Esquema de un cromatógrafo de líquidos básico modular.²³



7.6.1 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 laminar y de velocidad constante. La fase móvil debe ser suministrada a la columna en un intervalo amplio de gastos (o flujos) y presiones. Para poder emplear una variedad de disolventes orgánicos e inorgánicos, la bomba, sus sellos y todas las conexiones deben de estar hechos de materiales químicamente resistentes a la fase móvil. Si el sistema no está libre de pulsos, se necesita alguna forma de amortiguación de pulsos. Se requiere de un desgasificador para remover del disolvente el aire y otros gases disueltos. Otra característica deseable en el sistema de suministro del disolvente es la capacidad de generar un gradiente de disolvente.

Una bomba debe ser capaz de operar por lo menos a 100 atm (1500 Psi), una presión adecuada para los cromatógrafos más económicos. De todas formas, 400 atm (6000 Psi) es un límite de presión más deseable.²⁴

Las bombas están construidas de materiales muy resistentes tanto al ataque químico como al desgaste mecánico. Los componentes en contacto con el disolvente son acero inoxidable, zafiro, rubí y teflón. En general el acero inoxidable se utiliza como “cuerpo” de toda la bomba, para la construcción de tuberías, conectores y cabezales de los pistones. Cuando el acero inoxidable resulta incompatible con el tipo de muestra, debe ser reemplazado por titanio.

Habitualmente los pistones están contruidos de zafiro y las válvulas de retención (tanto las de entrada como las de salida de los cabezales bombeo) por una pequeña esfera de rubí que apoya en un asiento de zafiro y una malla o retentor de acero inoxidable que retiene la esfera en sus movimientos.²⁰



Existen básicamente dos tipos de sistemas de bombeo (con bombas de flujo constante y con bombas de presión constante), cada sistema tiene sus ventajas y desventajas.

Las **bombas de flujo constante** mantienen una velocidad de flujo de la fase móvil constante. Entre éstas se encuentran las “bombas reciprocantes”, que funcionan a base de pistones en número par, los cuales impulsan el disolvente que entra a las cámaras con una capacidad de volumen pequeña; estas bombas pueden generar pulsaciones de la fase móvil que producen perturbaciones en la línea base; las pulsaciones se corrigen mediante dispositivos especiales.

Otro tipo de bombas de flujo constante son las bombas de desplazamiento positivo que pueden tener dos formas: como jeringa o como amplificador hidráulico. La primera es parecida a una jeringa cuyo émbolo actúa mediante una espiral que empuja el disolvente y en la segunda amplifica la presión del disolvente mediante un sistema hidráulico. Este tipo de bomba reduce las pulsaciones del disolvente.

Entre tanto, las **bombas de presión constante**, tienen la desventaja de que es necesario mantener la viscosidad del disolvente, la temperatura de la columna y la presión constantes. La ventaja es que si estos parámetros se mantienen, se controlan totalmente las pulsaciones. La forma más sencilla de estas bombas emplea presión de gas inerte para presurizar el disolvente. El problema es que parte del gas se disuelve en el disolvente y esto forma burbujas en el sistema. Otro sistema para estas bombas emplea un amplificador neumático que reduce el efecto del gas utilizando un pistón, reduciendo de esta manera el contacto del disolvente con el gas comprimido.

Éstos normalmente son sistemas isocráticos, es decir, que mantienen constante la proporción de los disolventes en la fase móvil, sin embargo, estos sistemas generalmente no son aplicables a separaciones en mezclas de solutos con valores muy variables de k' , en donde es necesario utilizar sistemas de elución con gradiente. Estos sistemas utilizan dos bombas que son programables para modificar, en forma lineal o exponencial (gradiente cóncavo o convexo), las proporciones iniciales de los disolventes. En estos casos los disolventes que componen la fase móvil se encuentran separados y alimentando



cada uno a su respectiva bomba. Los disolventes se mezclan en la proporción deseada en una cámara que se encuentra antes de la columna. El inconveniente del gradiente es que su uso es muy difícil con ciertos detectores como los refractómetros.^{20, 21, 24}

7.6.2 Sistema de Inyección

Un factor muy importante para obtener una buena resolución en la separación es la adecuada introducción de la muestra en el sistema. La manera ideal de introducir o inyectar la muestra es en forma de “paquete” pequeño ya que esto ayuda en la obtención de picos simétricos y angostos.

Existen varios mecanismos de inyección. El más sencillo consiste en introducir la muestra mediante una jeringa; ésta tiene que atravesar un septo y soportar la presión del sistema, la precisión del volumen de inyección depende de la jeringa empleada y de la persona que realiza el llenado de la misma y la inyección de la muestra.

Un segundo y mejor consiste en inyectoros con asas intercambiables de volumen fijo, las cuales pueden llenarse con un exceso de muestra; estos dispositivos desvían el flujo del disolvente mientras se introduce la muestra reanudándolo posteriormente a través del inyector y arrastrando un volumen constante de muestra. Estos sistemas son más precisos, pero se tienen que estar cambiando cuando es necesario inyectar volúmenes diferentes en un análisis.

Un tercer sistema que minimiza errores en la introducción de la muestra consiste en un inyector automático. Este dispositivo ayuda a mantener la reproducibilidad entre inyecciones y elimina el error en la medición del volumen por inyectar mediante el uso de un mecanismo servo-regulado. Con estos sistemas se pueden inyectar volúmenes diferentes a lo largo de una corrida, con alto grado de precisión y exactitud.^{14, 20, 24}



7.6.3 Detector

La función del detector es monitorear la fase móvil que emerge de la columna. La salida del detector es una señal eléctrica que es proporcional a algunas propiedades de la fase móvil y/o los solutos.

Las características importantes que debe poseer el detector ideal son:

- a) Sensibilidad alta y respuesta constante de la muestra.
- b) Responder a todos los solutos o tener especificidad constante (respuesta universal o selectiva).
- c) Tener un rango amplio de linealidad.
- d) No ser afectado por cambios de temperatura y flujo de la fase móvil.
- e) Responder independientemente de la fase móvil.
- f) No contribuir al ensanchamiento del pico.
- g) Ser confiable, conveniente, fácil de usar y económico.
- h) Respuesta que incremente en linealidad con la cantidad del soluto.
- i) No destruir el soluto.
- j) Proveer información cuantitativa del pico detectado.
- k) Respuesta rápida.

A continuación se describen algunas propiedades generales de los detectores:

Respuesta. Puede ser universal o selectiva según la capacidad que tenga el detector de trabajar con todo tipo de muestra o sólo con una en específica. En general, los detectores universales son los más deseables, sin embargo los selectivos suelen ser más sensibles, efectúan mejor el análisis de muestras complejas porque detectan ciertos componentes a muy bajas concentraciones.

Sensibilidad. Se define la sensibilidad de un detector como la razón entre la señal generada y la cantidad de muestra que produce dicha señal. Éste es un término relativo puesto que a partir de un mismo detector, la señal obtenida puede ser muy diferente para diversas muestras. Por otra parte, la sensibilidad no da una idea clara acerca de la cantidad



mínima detectable, puesto que ésta puede ser severamente limitada por el nivel de ruido del instrumento.

Linealidad. Para utilizar la señal generada por el detector como una medida cuantitativa, dicha señal debe guardar una relación lineal con la concentración de la muestra: esta propiedad se conoce como linealidad. El intervalo lineal de un detector se puede definir como la razón entre las concentraciones máximas y mínimas respecto a las cuales la respuesta del detector es lineal. Conforme se aumenta la cantidad de muestra, se llega a un nivel a partir del cual todo detector se vuelve no lineal.

Estabilidad. Un buen detector debe ser sensible a los cambios de temperatura y a la variación de flujo a la vez que ser compatible con programaciones de la fase móvil. Los detectores que miden propiedades de la solución y que requieren compensación por efecto del disolvente, suelen ser más difíciles de estabilizar, en especial cuando se realizan programaciones con la fase móvil.

La selección del detector estará basada en las propiedades del o los solutos que se deseen analizar. Los detectores pueden clasificarse en dos tipos universales y selectivos.

7.6.3.1 Detectores Universales

Miden alguna propiedad de la fase móvil. Son completamente inespecíficos y detectan variaciones en la propiedad en particular (refracción o conductividad) de la fase móvil, y cualquier cambio de la fase producido por viscosidad, temperatura o luz puede alterar el comportamiento del detector.^{20, 21, 24}

Entre este tipo de detectores se encuentran:

El **detector de índice de refracción.** Este detector mide la diferencia del índice de refracción entre el disolvente puro y el disolvente que contiene la muestra. Es un detector universal y no destructivo, su ventaja es que responden a casi todos los solutos. Son



detectores universales análogos a los detectores de llama o de conductividad térmica en cromatografía de gases. Además son confiables y no dependen de la tasa de flujo. Sin embargo son muy sensibles a los cambios de temperatura y tienen que estar a temperatura constante. Por otra parte, no son tan sensibles como la mayoría de los otros detectores y son incompatibles con los métodos de elución por gradiente. Existen tres tipos diferentes de detectores de índice de refracción: Fresnel, Deflexión y el interferométrico.²¹

El detector de conductividad eléctrica. En algún tiempo se consideró que era un detector electroquímico y fue incluido en el grupo de los detectores que miden alguna propiedad del soluto. Actualmente, se considera en el grupo de los que miden alguna propiedad de la fase móvil ya que miden la diferencia de conductividad eléctrica entre el disolvente puro y la fase móvil junto con el soluto. La desventaja es cuando se emplean soluciones amortiguadoras como fase móvil ya que entonces la conductividad no sería debida sólo al soluto sino también a los iones provenientes de la fase móvil.

Los detectores de conductividad pueden tener una elevada sensibilidad, son universales para las especies cargadas y, como norma general, responden de una forma predecible a los cambios de concentración. Además dichos detectores son sencillos y baratos de fabricación y mantenimiento, por lo común son robustos y de prolongada duración. La única limitante de los detectores de conductividad proviene de la elevada concentración de electrólito que se requiere para eluir la mayoría de los iones del analito en un tiempo razonable. En consecuencia, la conductividad de los componentes de la fase móvil tiende a enmascarar la de los analitos, y por ello se reduce considerablemente la sensibilidad del detector.

El detector de conductividad eléctrico es un detector no específico y usado extensamente en la cromatografía de intercambio iónico.^{21, 24}



7.6.3.2 Detectores Selectivos

Miden alguna propiedad del analito. Son muy específicos y miden alguna propiedad intrínseca de la molécula a medir. Por ejemplo absorbancia o fluorescencia.

Los **detectores de absorbancia** se pueden dividir en: longitud de onda fija, longitud de onda variable y los de dispositivo de diodos.

Los detectores de absorción UV más simples son los fotómetros de filtros con una lámpara de mercurio como fuente. Se consideran de longitud de onda fija ya que lo más común en estos casos es aislar la línea intensa a 254 nm por medio de filtros; en algunos equipos también se pueden utilizar las líneas a 250, 313, 334 y 365 nm empleando otros filtros. Resulta obvio que este tipo de detector se utiliza de forma restringida para aquellos solutos que absorben a alguna de estas longitudes de onda.

Los detectores de absorbancia ultravioleta con monocromadores, consisten en un espectrofotómetro de barrido con una red entre sus componentes ópticos. Algunos se limitan a la radiación ultravioleta, mientras que otros abarcan la radiación ultravioleta y la visible. Se pueden elegir varios modos operacionales. Se consideran de longitud variable ya que por ejemplo, se puede obtener el cromatograma completo a una sola longitud de onda, o alternativamente, cuando los picos que eluyen están eficientemente separados en el tiempo, se puede elegir distinta longitud de onda para cada tipo. En este caso, debe emplearse el control por ordenador para seleccionar la mejor longitud de onda para cada compuesto eluido.

La fase móvil de la columna es pasada por una pequeña celda de flujo en el rayo de radiación de un fotómetro o espectrofotómetro UV/Visible. Estos detectores son muy selectivos, ya que únicamente detectan solutos que absorben la radiación UV o Vis (190-700 nm), por ejemplo, alquenos aromáticos y compuestos que tienen enlaces múltiples entre C y O, N o S. la fase móvil que se emplea puede absorber ligeramente o no la radiación. Estos detectores no son sensibles a cambios de temperatura. ^{14, 20, 21, 24}



El **detector de arreglo de diodos** es de los últimos adelantos en los detectores UV es el denominado de ordenamiento de fotodiodos. En los dispositivos “convencionales”, la red de difracción se ubica antes de la celda, la que recibe luz monocromática seleccionada por la red. En los detectores de ordenamiento de fotodiodos se emplea un sistema óptico invertido: la celda se ilumina con luz “blanca”, es decir, no monocromada y la luz emergente de la celda llega a la red de difracción y allí es dispersada hacia el elemento fotosensible. En lugar de una fotocelda se emplea un conjunto de fotodiodos montados en un chip de silicio. De esta forma, se consigue medir no sólo la luz transmitida a una longitud de onda, sino todo el espectro de absorción del eluído en tiempo real.

Para poder controlar y procesar toda esta información es necesario la presencia de una computadora con el software adecuado. Los primeros equipos eran muy caros, pero la reducción de costos de la electrónica los ha colocado en valores razonables.

Es un detector muy útil para realizar el desarrollo de los métodos analíticos por CLAR, ya que permite asegurar, dentro de ciertos límites, la integridad de un pico cromatográfico.

En este detector la radiación policromática después de pasar por la muestra, es dispersada por una rejilla fija y cae a un arreglo de fotodiodos. Cada diodo mide una banda angosta de longitudes de onda en el espectro, de esta forma el detector tiene datos en paralelo y tiene todos los puntos en el espectro, ya que son medidos simultáneamente. Los fotodiodos presentan un intervalo espectral que va de 190 a 1,100 nm aproximadamente.²⁰

Entre tanto el **detector de fluorescencia** es muy sensible y selectivo para solutos fluorescentes porque tiene la habilidad de medir la energía emitida por ciertos solutos excitados con radiación UV.

En la mayoría de los casos la fluorescencia se detecta por medio de un detector fotoeléctrico colocado perpendicularmente respecto al haz de excitación. Los detectores más sencillos utilizan una fuente de excitación de mercurio, y uno o más filtros para aislar la radiación emitida. Los instrumentos más sofisticados consisten en una fuente de radiación de xenón y emplean un monocromador de red para aislar la radiación fluorescente.

Los compuestos fluorescentes están con frecuencia relacionados con el análisis de materiales de interés farmacéutico, clínico, productos naturales y del petróleo. Muchas



veces el número de especies fluorescentes puede aumentarse mediante tratamientos previos de las muestras con reactivos que originan derivados fluorescentes. Por ejemplo, el cloruro de dansilo (cloruro de 5-(dimetilamino)-1-naftalensulfonilo), que reacciona con las aminas primarias y secundarias, aminoácidos y fenoles para dar compuestos fluorescentes, se ha utilizado ampliamente para la detección de aminoácidos en los hidrolizados de proteínas.^{14, 21, 24}

El **detector electroquímico** mide la corriente asociada con la oxidación o reducción de una cantidad pequeña del soluto.

Los fabricantes de instrumentos proporcionan en la actualidad varios tipos de detectores electroquímicos. Estos dispositivos se basan en la amperometría, la voltametría, la coulombimetría y la conductimetría.

Aunque los procedimientos electroanalíticos no se han explotado todavía tanto como los detectores ópticos, en muchos casos parecen ofrecer ventajas de una elevada sensibilidad, sencillez, adecuación y una extensa aplicabilidad. Requieren que las fases móviles estén libres de oxígeno disuelto y de iones metálicos reducibles. Se debe asegurar que el pH, la fuerza iónica y la temperatura de la fase móvil permanezcan constantes.^{21, 24}

Un detector más fino y específico es un **espectrómetro de masas**; la combinación de CL con la EM pareciera ser una fusión ideal de separación y detección. Cuando se combinan con cromatografía de líquidos, los sistemas de espectrometría de masas en tándem reciben el nombre de instrumento de CL-EM.

La espectrometría de masas es una técnica cuantitativa muy sensible y altamente selectiva. El tamaño de la muestra en general está en el espectro en cantidades de μg a nanogramos y los patrones de fragmentación son altamente reproducibles, incluso en el caso de mezclas de varios componentes. Las principales limitantes es cuanto al costo elevado, su necesidad de un extenso análisis de datos computarizados, la manipulación a cargo de profesionales hábiles en el uso y el mantenimiento apropiado del espectrómetro de masas, como también para la interpretación correcta de los datos de los espectros de masas. Sin embargo, los recientes adelantos en computación han hecho posible la superación de estas



limitaciones y en el presente los datos obtenidos con la espectrometría de masas se están convirtiendo en una herramienta importante casi de rutina en los espectros de infrarrojo y de resonancia magnética nuclear.

En la espectrometría de masas, la muestra, en general en forma de vapor, por medio de diferentes técnicas de enfoque magnético es bombardeada por un haz de electrones, lo que la lleva a un estado iónico gaseoso constituido por un ion madre y diversos fragmentos iónicos de la molécula original. Luego los iones son separados de acuerdo con su relación masa/carga (m/e). El espectro de masas registra la cantidad de diferentes tipos de iones formados en condiciones específicas graficadas contra la relación m/e . El espectro es característico de cada compuesto y por lo tanto puede proporcionar información valiosa en cuanto a su estructura química y en muchos casos hasta una medición muy exacta de su peso molecular.

El principio se basa en la generación de iones (principalmente de moléculas orgánicas) positivos (negativos en algunas técnicas), la separación de estos iones de acuerdo con su masa (carga) y la recolección y el registro de la cantidad de iones de cada especie. Las moléculas con una masa de hasta 500 pueden ser analizadas por instrumentos con foco único (enfoque magnético). Los aparatos con doble foco, en los cuales se aplica una combinación de campos electrostáticos y magnéticos, tienen mayor resolución. Por medio de estos últimos instrumentos puede obtenerse un peso molecular exacto (de hasta seis cifras significativas).²³

Por otro lado, el **detector de dispersión evaporativo láser** que se coloca en el efluente de la columna, funciona primero en una etapa de nebulización donde se transforma en una fina niebla mediante un flujo de nitrógeno o aire. Las finas gotitas se conducen por un tubo a temperatura controlada donde tiene lugar la evaporación de la fase móvil, lo que origina unas finas partículas de analito. La nube de partículas de analito pasa a través de un haz láser, la radiación dispersada se detecta en dirección perpendicular al flujo mediante un fotodiodo de silicio.



La ventaja de este detector es que su respuesta es casi igual para todos los solutos no volátiles; la desventaja es que las composiciones de la fase móvil están limitadas sólo a componentes volátiles.^{21, 24}

7.6.4 Columna

Se considera a la columna como la parte fundamental de la cromatografía ya que es en ésta, donde se va a llevar a cabo la separación. El material de empaque seleccionado dependerá básicamente de la separación que se desee hacer y las características serán mencionadas posteriormente.

Las dimensiones de una columna dependerán también del tipo de separación que se desee hacer. Si el objeto de la separación es aislar sustancias de una mezcla, se emplean columnas preparativas en las que las partículas del empaque son de dimensiones mayores que en las columnas analíticas y tanto la longitud como el diámetro interno son mayores ya que deben tener la capacidad de contener cantidades elevadas de la muestra. Las más comunes con las fabricadas con acero inoxidable aunque también las hay de vidrio. La longitud puede ser de 10 cm a 1 m. Al aumentar la longitud aumenta el número de platos teóricos y por lo tanto, se obtiene una mayor resolución aunque en ocasiones es más importante el tipo de empaque y el tamaño de partícula de éste, ya que al elevar el área de superficie del empaque, se aumenta la interacción del soluto con la fase estacionaria.

La eficiencia de las columnas se ha elevado con dispositivos y técnicas de empaque que mejoran el contacto del soluto con la fase estacionaria en su paso en la fase móvil. Uno de estos sistemas consiste en la compresión radial de una columna hecha de un material flexible disminuyendo así los espacios vacíos que quedan entre la pared de la columna y las partículas.



Por lo que respecta a las columnas analíticas y su relleno, éste puede ser a base de partículas de una cerámica inorgánica (sílica o alúmina) o un polímero orgánico (poliestireno-divinilbenceno o metacrilatos). Se debe considerar la influencia de la geometría de la partícula en el empacamiento de la columna y por tanto en la eficiencia de la separación (partícula irregular o esférica). Se debe considerar también la porosidad de la partícula y la influencia que el tamaño del poro puede tener, sobre todo en separaciones fundamentales en la diferencia de pesos moleculares. Se considera que el tamaño promedio de un poro de partículas de sílice para aplicaciones analíticas es de $100 \text{ \AA} \pm 20 \text{ \AA}$. Aunado al tamaño de poro está la cantidad de poros que cada partícula presenta, lo cual le va a dar cierto grado de rigidez (poco porosa será mecánicamente muy resistente; muy porosa presentará mayor superficie de separación pero será más frágil). Una sílice con un volumen de poro específico de 1 mL/g se considera un material promedio.

Otro parámetro importante asociado a la partícula es su tamaño; generalmente partículas de gran tamaño se emplean en cromatografía preparativa, en tanto que partículas pequeñas se emplean en separaciones muy rápidas. Los tamaños de partícula disponibles comercialmente son:

>10 μm , para técnicas preparativas.

10 μm , cromatografía semi-preparativa.

3-5 μm , es el tamaño más común en técnicas analíticas empleadas para separaciones muy rápidas.

En el caso de los materiales empleados en la fase reversa, se debe considerar también la densidad de cadenas alifáticas unidas a la sílica base, de grupos silanoles libres y si estos han tenido un tratamiento posterior para desactivarlos.

Las dimensiones de las columnas analíticas van de los 30 mm a los 300 mm de longitud, y de los 0.5 mm a los 4.6 mm de diámetro.

Otra manera de mejorar la eficiencia y resolución es el empleo de hornos que mantienen una temperatura constante a lo largo de la columna. Cuando se tienen valores de k' muy



semejantes entre dos o más analitos, es conveniente el empleo de temperatura para lograr buenas separaciones. ^{11, 14}

7.6.5 Registrador de Señales

Al eluir un compuesto ya separado en la columna y pasar por el detector, la señal que provoca en éste, debe ser registrada por un graficador, un integrador o un sistema computarizado de procesamiento de datos.

En el caso del graficador es necesario ajustar la velocidad de la carta y la ganancia de la señal para obtener un cromatograma adecuado, y calcular manualmente la intensidad de la respuesta generada por cada pico. El método más sencillo de medición es mediante la altura de los picos desde la línea base hasta el máximo del pico, aunque es deseable tener una línea base estable para obtener la máxima precisión. Otros métodos de medición involucran el cálculo del área bajo el pico. Dicha área puede calcularse de muy diversas maneras: si el pico es simétrico puede medirse el área por triangulación prolongando los lados hasta la línea base midiendo el ancho y la altura del pico. Otra forma es utilizando un planímetro o bien, recortando y pesando el área obtenida.

El uso de integradores electrónicos evita los errores en la medición de las áreas. Estos integradores registran las señales e imprimen el área de los picos en forma numérica.

Por último, el empleo de una computadora y el software adecuado puede facilitar el procesamiento de los datos, desde el algoritmo empleado para la integración, hasta la construcción de curva de calibración y cuantificación de los picos. Dichos programas deben cumplir con ciertos criterios de aseguramiento de la calidad. ^{11, 14, 16}



8. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS

Cromatograma. Es una imagen que traduce visualmente en una pantalla o en un papel la evolución, en función del tiempo, de un parámetro que depende de la concentración del soluto a la salida de la columna, el tiempo se representa en las abscisas, y la intensidad de la señal detectada en el eje de las ordenadas. En la figura 10 se esquematizan algunos de los parámetros más relevantes que definen de forma matemática las características del proceso cromatográfico y que pueden obtenerse del cromatograma.²⁸

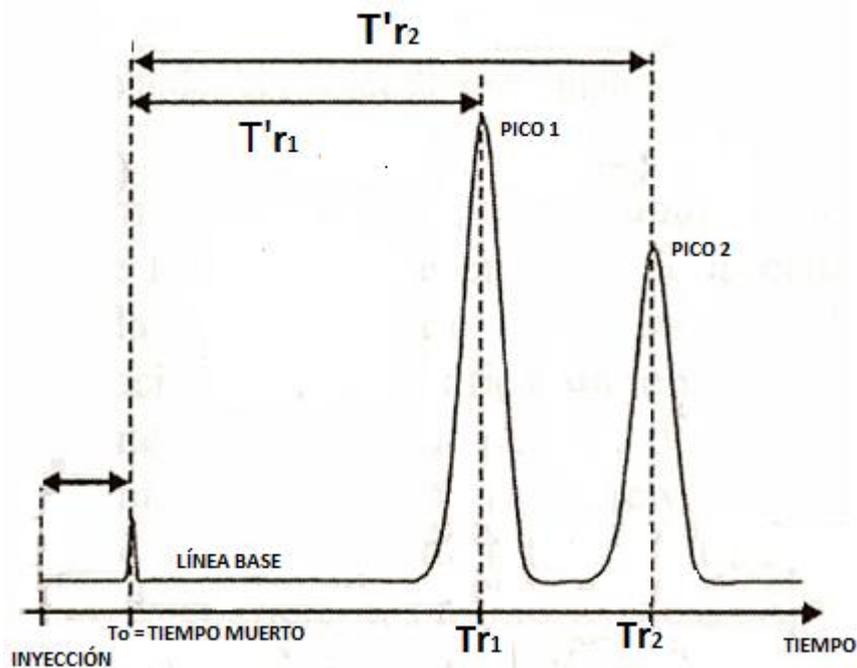


Figura 10. Esquema de un cromatograma.²⁶

Línea base. Corresponde al trazado obtenido en el cromatograma que registra la respuesta del detector donde, solo se aprecia la elución de la fase móvil en ausencia del analito de interés.

Ruido de la línea base. Es la variación instantánea de la respuesta del detector, provocada por fluctuaciones eléctricas, presencia de impurezas en la fase móvil o vibraciones mecánicas de la base del equipo.



Deriva de la línea base. Es el cambio gradual de la línea base que la desvía de su valor, la deriva puede ser negativa o positiva. ^{26,29}

Tiempo de retención. En el cromatograma se representa por un pico para cada compuesto existente en la mezcla, un componente se caracteriza por su tiempo de retención, que representa el tiempo transcurrido entre el instante de la inyección y el determinado cuando el pico correspondiente en el cromatograma alcanza su máximo.

Tiempo muerto. El tiempo muerto es el tiempo transcurrido entre la inyección y la elución de un soluto no retenido, por ejemplo un disolvente que no sea afín con la fase estacionaria.

Velocidad lineal (u): La velocidad a la cual la fase móvil se desplaza a través de la columna no es sólo función del caudal sino también de la sección interna de la misma, la comparación de métodos que emplean columnas de diferente diámetro interno, hace preferible la expresión de la velocidad lineal en lugar del caudal. Si "L" es la longitud de la columna expresada en cm y t_0 es el tiempo muerto medido en minutos, la velocidad lineal puede expresarse en cm/min y se refiere a la longitud de la columna atravesada por la fase móvil en un minuto y puede calcularse como sigue:

$$u = \frac{L}{T_0}$$

Donde:

u = Velocidad lineal

L = Longitud de la columna

T_0 = Tiempo muerto

Tiempo de retención ajustado (T'_r): Tiempo que el componente permanece en la fase estacionaria y se define por:

$$T'_r = T_r - T_0$$



Donde:

T'_r = Tiempo de retención ajustado

T_r = Tiempo de retención

T_o = Tiempo muerto

Volumen muerto (V_o): Es el volumen total de la fase móvil entre el punto de inyección y el de detección. Comprende al volumen que la fase móvil puede ocupar en la columna. Se calcula como sigue:

$$V_o = \frac{0.65\pi D^2 L}{4}$$

Donde:

V_o = volumen muerto en mL

0.65 = porosidad de la columna

π = 3.1416

D^2 = Diámetro de la columna en cm

L = Longitud de la columna en cm

Volumen de retención (V_r): Volumen de fase móvil necesaria para que se produzca la elución de un soluto y pueda ser detectado. Teniendo en cuenta que el flujo volumétrico de la fase móvil por unidad de tiempo (F) es constante, entonces el volumen de retención se calcula como sigue:

$$V_r = t_o F$$

Donde:

V_r = Volumen de retención en mL

t_o = Tiempo muerto en min

F = Velocidad de flujo mL/min

Plato teórico. Es el volumen dentro de la columna cromatográfica, en el cual se alcanza el equilibrio del soluto entre las fases móvil y estacionaria. ^{26,29}



Reproducibilidad. Consiste en inyectar seis veces de manera consecutiva una muestra o solución de referencia. Se calcula la media, la desviación estándar y la desviación estándar relativa (coeficiente de variación), con la siguiente fórmula:

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

Donde:

CV= Coeficiente de variación en por ciento

\bar{y} = Media de una serie de determinaciones

S = Desviación estándar

El límite permisible para el coeficiente de variación es: $CV \leq 2 \%$

Factor de coleo. Algunas veces es útil establecer un factor de coleo (T) para limitar el máximo permisible con relación a la asimetría del pico. Se define como la relación de la distancia de ancho del pico hacia el lado izquierdo del pico. Estas distancias deben medirse a un punto que corresponda a un 5 por ciento de la altura partiendo de la línea base (figura 11). Para un pico simétrico el factor de coleo es la unidad y el valor de T aumenta conforme el coleo va siendo más pronunciado.^{14, 30}

El cálculo se expresa por la fórmula siguiente: $Factor\ de\ Coleo = T = \frac{w_{0.05}}{2f}$

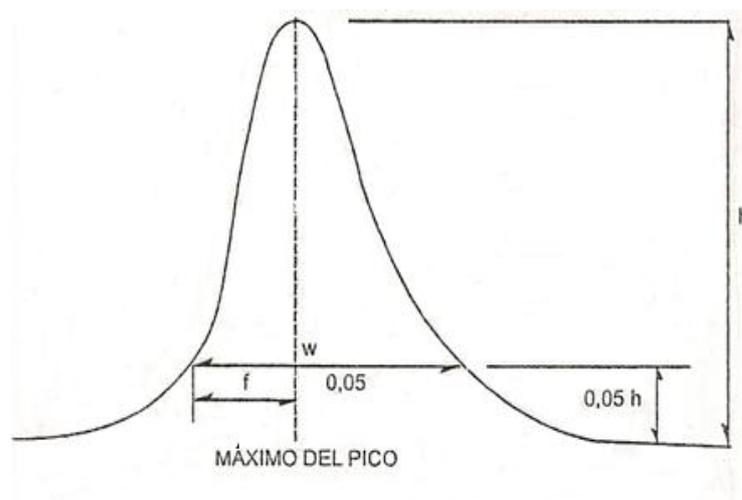


Figura 11. Pico cromatográfico asimétrico.¹⁴



El límite permisible para el factor de coleo (T), también conocido como factor de asimetría (As) es:

$$As \leq 2.0 \%$$

Eficiencia. Una medida de la eficiencia de una columna en particular se puede conocer calculando el número de platos teóricos (N) en la columna con la siguiente fórmula: ²⁸

$$N = 5.54 \left(\frac{t_r}{W_h} \right)^2$$

Donde:

N= Número de platos teóricos

T_r = Tiempo de retención

w_h = Ancho del pico a la mitad de la altura del pico

El valor de N es dependiente de la sustancia que está siendo analizada y de las condiciones de operación tales como la velocidad de flujo, la temperatura, la cantidad del empaque de la columna y la uniformidad de éste.

El valor permisible para medir la eficiencia de la columna es:

$$N \geq 2000$$

Selectividad. La relación que existe entre el tiempo que tardan las moléculas del analito en la fase móvil y en la fase estacionaria se denomina factor de capacidad de retención (k') ¹⁴ y se expresa mediante la siguiente fórmula:

$$K' = \frac{\text{Tiempo que pasa el soluto en la fase estacionaria}}{\text{Tiempo que pasa el soluto en la fase móvil}}$$

El factor de selectividad (α) se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$



Donde:

$$K = K_D \text{ o } K'$$

K_D = Constante de distribución

K' = Factor de capacidad de retención

El valor permisible para el factor de capacidad K' es:

$$K' \geq 2$$

Resolución. Como una medida de la eficiencia de la separación de dos componentes en una mezcla es la resolución (R). El factor de resolución R es importante para asegurar la separación de dos componentes que eluyen muy cercano uno del otro y para establecer la eficiencia del sistema (figura 12).^{26, 30}

La resolución entre dos picos de dos componentes puede ser calculado a partir de la siguiente fórmula:

$$R = \frac{1.18(T_{r2} - T_{r1})}{W_{h1} + W_{h2}}$$

Donde:

Tr_2 y Tr_1 = Tiempo de retención del compuesto 1 y 2 adyacentes

W_{h1} y W_{h2} = Ancho del pico a la mitad de la altura.

El valor permisible para la resolución es:

$$R \geq 2$$

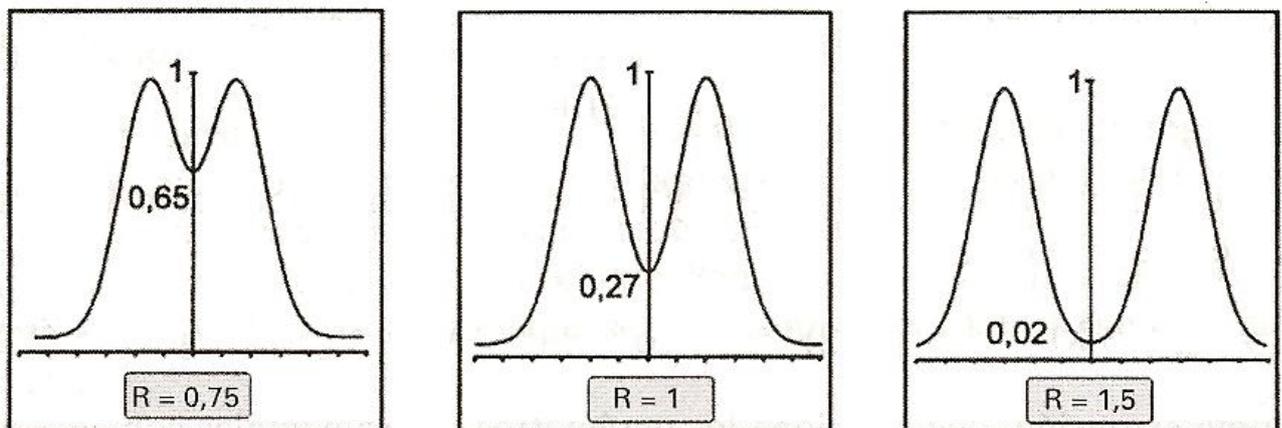


Figura 12. Factor de resolución. Simulación de picos cromatográficos. A partir de $R = 1.5$ se considera que los picos están resueltos.²⁶



8.1 Adecuabilidad del Sistema

El buen funcionamiento de un sistema cromatográfico se verá reflejado en la calidad del análisis.

Para asegurar la efectividad del sistema, es necesario someterlo a una prueba antes de utilizarse. La esencia de este tipo de pruebas es el concepto de que el equipo en general, las partes electrónicas, las operaciones analíticas y la muestra, constituyen un sistema analítico completo el cual puede someterse a una prueba general de funcionamiento del sistema.

Las pruebas se basan en el concepto de que el equipo, los componentes electrónicos, las operaciones analíticas y las muestras a analizar constituyen un sistema integral que puede evaluarse como tal. Entre los parámetros más importantes a determinar se encuentran la reproducibilidad, la eficiencia, la resolución, el tiempo de retención, el número de platos teóricos y el factor de coe los cuales ya se definieron y que a continuación se enlistan con sus respectivos valores de referencia.^{11, 14, 28}

- | | |
|-----------------------------------------|------------------|
| 1. Factor de asimetría | $As \leq 2.0 \%$ |
| 2. Resolución | $R \geq 2$ |
| 3. Factor de capacidad | $K' \geq 2$ |
| 4. Número de platos teóricos | $N \geq 2000$ |
| 5. Coeficiente de variación (inyección) | $CV \leq 2 \%$ |



V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La salud es muy importante y se deben cuidar todos los aspectos que involucra la fabricación de un medicamento. Un requisito importante que se debe de cumplir en la adquisición de un medicamento es sin duda que cumpla con calidad que en una sola palabra es sinónimo de satisfacción, es decir que fue fabricado con un sistema de calidad adecuado, el cual se basa en las BPF, en las BPL así como en las BPD, lo que garantiza que se obtenga un medicamento con calidad, el cual va a satisfacer las necesidades del cliente, este último puede ser desde el médico, la enfermera, el boticario hasta el enfermo que va a tener la confianza y plena garantía de que va recuperar su salud.

La falta de calidad en un medicamento afectaría no sólo la salud del usuario, sino también el rechazo del producto, problemas legales, multas, desprestigio de la empresa y por último la salida del producto del mercado y que al final de cuentas son pérdidas económicas considerables, que se verán reflejadas en la economía del país y lo que menos se quiere en este momento es la pérdida de empleos por lo tanto hay que apegarnos a normas y cumplirlas para eliminar todos los riesgos posibles que puedan impactar en la calidad del producto, se debe contar con trabajo en equipo y mucha comunicación no solo verbal sino escrita como evidencia documentada que demuestra que el medicamento cumple con todos los atributos necesarios que garantizan su efectividad y la confianza para consumirlo.

El tener procesos validados es lo que finalmente demuestra que el proceso está controlado y da lugar a productos con calidad y para poder validar esos procesos es necesario contar con técnicas analíticas que demuestren con resultados de laboratorio que las especificaciones del producto se encuentran dentro de lo permitido y para asegurar que esos resultados son los correctos es necesario contar con métodos analíticos validados, muchos de los cuales emplean la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución por lo tanto, es de suma importancia contar con la documentación que avale que el cromatógrafo de líquidos está calificado y genera resultados confiables, precisos y exactos.



Debido al desarrollo de nuevas tecnologías y de equipos sofisticados, la industria farmacéutica se ha provisto de equipos más veloces y reproducibles lo cual involucra mayor capacitación del personal, mantenimiento y mejor conocimiento de nuestros equipos de trabajo. Hoy en día se sabe que todo equipo analítico ya viene combinado con su sistema de cómputo para aumentar aún más la capacidad de los sistemas en exactitud y precisión. Por lo tanto, ahora para validar un proceso es necesario validar también el software y tener calificado el equipo.

El propósito de este trabajo, es contar con una metodología general que describa las pruebas adecuadas para la calificación de instalación y operación de un sistema CLAR con detector de dispositivo de diodos y la importancia que tiene conocer el equipo, para que si en un momento dado se presenta algún problema, se tenga la capacidad de decidir qué cambios puede realizar el usuario o el técnico de servicio. También, comprender en qué casos es necesaria una recalificación y con qué frecuencia hay que realizarla para no afectar el estado validado de algún proceso o método.

La OMCL³¹ y el CENAM¹⁰ han publicado guías que contienen enfoques generales de cómo llevar a cabo una calificación de un sistema CLAR y sugieren algunas metodologías, pero en sí, es el proveedor del equipo el que tiene y proporciona al usuario el protocolo de calificación que indica las pruebas a realizar, sin embargo es el usuario el que debe decidir la profundidad de las pruebas ya que algunas veces por desconocimiento sólo actuamos como observadores y nos limitamos a lo que el proveedor ofrece, y como no hay una norma que establezca las pruebas mínimas necesarias para realizar la calificación a los equipos, debido a que éstos son específicos para cada aplicación analítica. Es de ahí la importancia de este trabajo que consiste en consultar las diferentes fuentes y así comprender y establecer como usuario una metodología que describa las pruebas mínimas necesarias para la calificación de un sistema CLAR y de esta manera en conjunto con el proveedor definir las pruebas que si aporten valor y den soporte al sistema para garantizar su buen funcionamiento.



VI. OBJETIVOS

Objetivo General

Describir las diferentes etapas del proceso de calificación de un sistema CLAR con detector de dispositivo de diodos, la secuencia de las pruebas analíticas así como la “importancia” y “sugerencias” para cada una de ellas, con la finalidad de obtener resultados confiables.

Objetivos Específicos

- 1) Conocer las pruebas oficiales de algunos organismos internacionales o nacionales en cuanto a la calificación de un sistema CLAR con detector de dispositivo de diodos.
- 2) Describir una metodología general de acuerdo a guías oficiales y proveedores de equipos, para la calificación de un sistema CLAR con detector de dispositivo de diodos.
- 3) Determinar criterios de aceptación para cada una de las pruebas analíticas establecidas.
- 4) Establecer la documentación que avalen los resultados de las pruebas que se realizan en una calificación de un sistema CLAR con detector de dispositivo de diodos así como sugerir formatos de trabajo para la descarga de resultados.

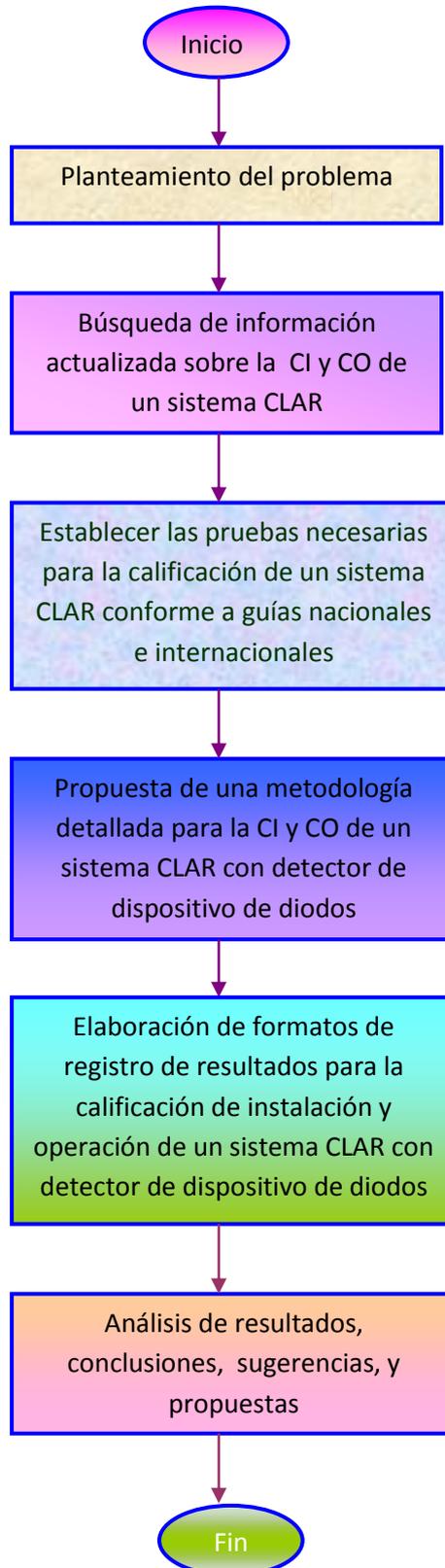


VII. HIPÓTESIS

Con base en las pruebas oficiales y de proveedores de equipos CLAR con detector de dispositivo de diodos es posible establecer una metodología que indique las diferentes pruebas a realizar para verificar que cada componente cumple su propósito para el cual fue diseñado y con apoyo de los documentos que avalen dichos resultados como evidencia, el equipo operará correctamente al brindar resultados constantes, confiables y reproducibles.



VIII. METODOLOGÍA





IX. RESULTADOS

El proceso completo de Calificación de un Sistema CLAR consta de cuatro etapas:

- Calificación de Diseño (CD)
- Calificación de Instalación (CI)
- Calificación Operacional (CO)
- Calificación del Funcionamiento o Desempeño (CF)

La primera etapa del proceso de Calificación de Equipos es la **Calificación de Diseño**.

La CD describe los requerimientos de usuario y define las especificaciones funcionales y operacionales del sistema cromatográfico, en base a sus necesidades analíticas y a la oferta del mercado se debe decidir cuál es el más adecuado. Por otro lado, la diversidad de la oferta actual en todas las áreas de la instrumentación analítica y los continuos avances tecnológicos hace que a veces la elección sea muy difícil. Se debe garantizar que el sistema cromatográfico cuente con las funciones necesarias requeridas para el buen desempeño del sistema.

Para poder establecer una metodología para la calificación de diseño del sistema CLAR se propone el siguiente escenario:

El sistema CLAR se utilizará para el análisis de productos farmacéuticos y materias primas, para la liberación de producto a granel, producto terminado y para estudios de estabilidad. La mayoría de las muestras para ser analizadas en el laboratorio se pueden ejecutar en modo isocrático, pero algunas requieren de un análisis con gradiente. La mayor parte de las muestras pueden ser detectadas con una señal de UV de longitud de fija, sin embargo algunas requieren también el análisis de pureza del pico, empleando un detector ultravioleta con dispositivo de diodos, algunas muestras son termolábiles y necesitan ser manipuladas con control de temperatura. para el control de los instrumentos, adquisición y procesamiento de datos. En la tabla 2, se enlistan los elementos que deben ser considerados en la calificación de diseño de un sistema CLAR.

**Tabla 2.** Calificación de Diseño para un Sistema CLAR

CONDICIONES	ESPECIFICACIÓN
Especificaciones de uso Especificación de requerimientos de usuario para el análisis por CLAR	<ul style="list-style-type: none">• Análisis de productos farmacéuticos, materias primas y sus impurezas.• Análisis automatizado para más de 100 muestras por día, considerar también el análisis por la noche.• Confirmación automatizada de la identidad y pureza de pico con detección de arreglo de diodos.• Automatización en la cuantificación del compuesto y la impresión del cromatograma.• Cumplimiento de BPL's en cada una de las etapas: Información permanente del uso del instrumento.
Especificaciones funcionales Bomba	<ul style="list-style-type: none">• Cuaternaria, rango de presión: 0 – 5000 psi con una velocidad de flujo de hasta 5 mL/min.• Suministro de disolventes: isocrático o por gradiente.• Detección de fugas, manejo seguro y de fácil conexión.• Sistema de purga y lavado automático.• Desgasificador en línea de cuatro canales, integrado a la bomba, que permita su uso simultáneamente.
Detector	<ul style="list-style-type: none">• UV / Vis con arreglo de diodo, 190-600 nm.• Exactitud de la longitud de onda: ± 1 nm.
Inyector	<ul style="list-style-type: none">• Capacidad para mínimo 100 viales de 2.0 mL.• Volumen de inyección: desde 0.5 μL – 2000 μL.
Horno	<ul style="list-style-type: none">• Temperatura controlada de 15-60 ° C.• Capacidad para alojar mínimo 2 columnas.



Tabla 2. Calificación de Diseño para un Sistema CLAR (continuación)

CONDICIONES	ESPECIFICACIÓN
Especificaciones funcionales Software	<ul style="list-style-type: none">• Software de control del sistema, adquisición de datos para las señales y los espectros, integración de los picos, cuantificación, evaluación de la pureza espectral del pico y confirmación del compuesto.• Guardar todos los cromatogramas generados por el sistema.• Computadora con las siguientes especificaciones mínimas: procesador Pentium IV de 2.8 GHz, RAM de 512 MB, 80 GB en disco duro, unidad floppy de 3.5", CD ROM de 40X, quemador DVD-CD ROM, Windows XP professional, mouse, teclado y monitor a color SVGA de 17" e impresora a color.
Especificaciones operacionales	<ul style="list-style-type: none">• Detector: ruido de la línea base: $<2 \times 10^{-3}$ AU• Inyector: precisión en el volumen de inyección: <0.5 % RSD• Carry over: <0.1 %• Exactitud en la composición del gradiente $<1\%$• Bomba: precisión en el tiempo de retención: <0.5 % RSD
Instrucciones de usuario	<ul style="list-style-type: none">• Operación manual.• Instrucciones programadas en la computadora.
Calificación	<ul style="list-style-type: none">• Que el proveedor proporcione los procedimientos y servicios para la CI y la CO.
Mantenimiento	<ul style="list-style-type: none">• Que el proveedor brinde los procedimientos y servicios de mantenimiento preventivo y correctivo de acuerdo a un programa y en horarios establecidos.
Capacitación	<ul style="list-style-type: none">• Que el proveedor brinde los servicios de inducción y capacitación sobre el manejo y aplicaciones del sistema cromatográfico.



La segunda etapa del proceso de Calificación de Equipos es la **Calificación de Instalación**.

La calificación de instalación establece que el instrumento se recibe según lo diseñado y especificado, que se ha instalado correctamente en el lugar adecuado, y que las condiciones ambientales son propicias para el buen funcionamiento y desempeño del instrumento. La Tabla 3, muestra los pasos que se recomiendan para antes y durante la instalación. La CI debe incluir el análisis de una muestra seleccionada por el usuario. Una ejecución exitosa de una muestra verifica la correcta instalación eléctrica de todos los módulos que integran el sistema cromatográfico así como la correcta conexión de los fluidos.

Tabla 3. Calificación de Instalación para un Sistema CLAR

CONDICIONES	ACCIONES
Antes de la instalación	<ul style="list-style-type: none">• Obtener recomendaciones del fabricante de los requerimientos del lugar para la adecuada instalación del sistema cromatográfico.• Verificar que el lugar cumpla con las recomendaciones del fabricante tales como conexiones eléctricas y condiciones controladas de humedad y temperatura.• Contar con espacio suficiente para: el libre flujo de materiales y de personal; la operación y limpieza del sistema cromatográfico, así como para colocar las bitácoras, los PNO's y manuales de los instrumentos y del software.
Durante la instalación	<ul style="list-style-type: none">• Comparar los módulos recibidos contra la orden de compra (incluyendo el software accesorios y refacciones).• Verificar la documentación complementaria (manuales, protocolos de CI, CO, certificados).• Verificar la adecuada instalación de los módulos, computadora, accesorios, tuberías para la columna y cables del suministro de energía.



Tabla 3. Calificación de Instalación para un Sistema CLAR (continuación)

CONDICIONES	ACCIONES
Durante la instalación	<ul style="list-style-type: none">• Realizar una descripción del sistema cromatográfico, incluyendo las características técnicas (datos de fábrica), condiciones físicas y dimensiones, considerando para ello aspectos tales como: marca, modelo, serie, material de construcción, integridad de materiales, acabados y limpieza. Se pueden tomar fotografías para una mejor descripción y localización de cada uno de los módulos que integran el sistema cromatográfico.• Conectar el sistema cromatográfico al regulador de voltaje que está conectado a la energía eléctrica y encender cada uno de los módulos en el orden indicado por el fabricante.• Ejecutar una prueba inicial de autodiagnóstico.• Realizar una prueba de arranque con el análisis de una muestra seleccionada para verificar que todos los módulos están instalados correctamente y concluir con la impresión del cromatograma.• Preparar un reporte de la instalación que incluya los resultados de las pruebas, números de serie de los módulos, versión del software y firmware, localización de cada componente y obtener las firmas de aprobación de todo el personal involucrado en la calificación del sistema cromatográfico.



La tercera etapa del proceso de Calificación de Equipos es la **Calificación Operacional**.

La calificación operacional es el proceso para demostrar que el sistema cromatográfico funciona y opera de acuerdo a los requerimientos especificados en la calificación de diseño.

En sistemas modulares como es el caso del CLAR se realizan las pruebas de forma integral y no en forma individual.

tabla 4, incluye los parámetros de prueba para cada módulo, los procedimientos y los límites establecidos por el fabricante.

Tabla 4. Calificación Operacional para un Sistema CLAR

MÓDULO	PARÁMETROS A EVALUAR	PROCEDIMIENTO	LÍMITES
Detector	Exactitud de la longitud de onda ³¹	Medir la absorbancia a la longitud de onda máxima de una solución de cafeína en metanol (50 µg/mL). Realizar la prueba por triplicado.	272 ± 2 nm 244 ± 2 nm RSD ≤ 0.5
	Linealidad del detector ³¹	Inyectar 5 estándares de cafeína en metanol (0.5 µg/mL, 1 µg/mL, 5 µg/mL, 25 µg/mL y 50 µg/mL). Graficar los valores Concentración vs Absorbancia.	$r^2 \geq 0.999$
	Reproducibilidad del detector ³⁴	Inyectar seis veces un estándar de cafeína en metanol (50 µg/mL).	RSD ≤ 1.0
	Ruido de la línea base (Baseline noise) ³³	Monitorear la línea base durante 20 min y calcular el baseline noise a partir del software.	< 0.001 AU
	Deriva (drift) ³³	Monitorear la línea base durante 1 hora y calcular el drift a partir del software.	Drift < ±0.002 AU/h

**Tabla 4.** Calificación Operacional para un Sistema CLAR (continuación)

MÓDULO	PARÁMETROS A EVALUAR	PROCEDIMIENTO	LÍMITES DE USUARIO
Bomba	Velocidad de flujo ³⁴	A una velocidad de flujo determinada y empleando agua como fase móvil colectar el disolvente proveniente de la tubería en un matraz volumétrico de 10 mL y con un cronómetro calibrado registrar el tiempo que tarda en llenarse el matraz. Realizar por triplicado.	$D < \pm 5 \%$
	Precisión en la velocidad de flujo ³¹	Determinar el tiempo de retención de seis inyecciones de 10 μ L de etilparabeno (20 μ g/mL).	$RSD \leq 1.0$
	Composición del gradiente ³¹	Probar las cuatro líneas a una velocidad de flujo de 2 mL/min con una solución de 5.6 mg/mL de propilparabeno en metanol. Programar gradientes de 0 %, 10% y 100%. Determinar las alturas relativas de los picos (ARP), considerando la altura del pico de la mezcla de propilparabeno/metanol como el 100%.	Altura Relativa de los Picos $10 \% \pm 0.5 \%$
Inyector	Ubicación del vial ³¹	Colocar un frasco vial con septo no utilizado en las posiciones programadas.	Los septos de los viales son perforados
	Precisión de la inyección ³¹	Determinar el área de los picos provenientes de 6 inyecciones (10 μ L) de una solución de etilparabeno (20 μ g/mL).	$RSD 1.0$

**Tabla 4.** Calificación Operacional para un Sistema CLAR (continuación)

MÓDULO	PARÁMETROS A EVALUAR	PROCEDIMIENTO	LÍMITES DE USUARIO
Inyector	Exactitud de la inyección ³⁴	Determinar por sextuplicado el volumen de inyección, mediante la diferencia de peso de un vial.	$50 \pm 1 \mu\text{L}$
	Linealidad ³¹	Inyectar 5, 10, 40 y 80 μL de una solución de etilparabeno (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$).	$r^2 \geq 0.999$
	Carryover (remanente de muestra) ^{31,32}	Inyectar 80 μL de un blanco de metanol seguida de la inyección de 80 μL de la solución de etilparabeno (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en metanol.	$\text{ARB} \leq 0.1 \%$
Horno porta columna	Exactitud en la temperatura ³²	Checar la temperatura del horno de la columna con un termómetro calibrado y compararla con la temperatura programada. Realizar por triplicado para cada temperatura.	$30 \pm 2^\circ\text{C}$ $50 \pm 2^\circ\text{C}$
	Precisión en la temperatura ³⁴	Monitorear durante 20 minutos la temperatura del horno, registrar la temperatura cada minuto y determinar la desviación (D) de temperatura.	$D \pm 0.5^\circ\text{C}$

La cuarta y última etapa del proceso de Calificación de Equipos es la **Calificación de funcionamiento o desempeño**.

La Calificación de Funcionamiento o Desempeño (CF) es el proceso para demostrar que el sistema cromatográfico cumple consistentemente con las condiciones adecuadas para su uso rutinario. La frecuencia de la prueba es mucho mayor que la CO. La CF siempre debe



realizarse bajo condiciones que son similares a los análisis de muestras de rutina. Por lo tanto, se utilizará la misma columna, las mismas condiciones de análisis y se aplica para el análisis de compuestos similares o iguales.

La CF debe realizarse a diario o cada vez que el instrumento se utiliza. Los criterios de evaluación y la frecuencia deben ser determinadas durante el desarrollo y la validación del método de análisis.

En la práctica la CF se evalúa mediante la prueba de Adecuabilidad del sistema, donde el sistema es evaluado y comparado contra límites establecidos.

Por ejemplo, se puede inyectar de 5 a 6 veces un estándar y se calcula el CV (RSD), este se compara contra un valor establecido. Las pruebas de desempeño son aplicaciones específicas para cada método. Otro ejemplo, si los límites de detección y / o cuantificación son críticos, entonces la intensidad de la lámpara o el ruido de línea base debe ser evaluado. Se debe utilizar la misma columna y los mismos disolventes que se utilizan para la preparación de las muestras.

La tabla 5, muestra las pruebas para la calificación de desempeño y los límites aceptables³³, estos valores son obtenidos con el manejo del software.

Tabla 5. Calificación de Funcionamiento o Desempeño para un Sistema CLAR

PARÁMETROS A EVALUAR	LÍMITES DE ACCIÓN
Repetibilidad (RSD) respuesta del pico	≤ 1.5 RSD para muestras en general
	5-15 RSD para trazas
	≤ 5 RSD para muestras biológicas
Resolución (R)	≥ 2.0 para muestras en general
Factor de coileo (T)	≤ 2.0
Número de platos teóricos (N)	$\geq 2,000$
Factor de capacidad (k)	>2 (recomendable 2 a 8)



A continuación se describen los procedimientos para la Calificación de Instalación y Operación de un Sistema CLAR con Detector de Dispositivo de Diodos.

CALIFICACION DE INSTALACIÓN (CI)

1. Ubicación del Sistema Cromatográfico

Se registran los datos del lugar donde se encuentra instalado el sistema cromatografico, tales como nombre de la empresa, departamento, dirección y los usuarios responsables del sistema. **Anexo 1.**

Criterio de Aceptación: El registro de ubicación del sistema CLAR debe corresponder al lugar donde se realizará la calificación de instalación.

2. Registro de la Documentación

Se registra la documentación asociada a la calificación de instalación y operación del sistema CLAR tales como: especificaciones de diseño, orden de compra, certificados de calidad, manuales de instalación y funcionamiento, diagramas de instalación, guías rápida del usuario, programas de calibración y mantenimiento preventivo, listas de refacciones, PNO's de limpieza, mantenimiento y entrenamiento de usuarios. **Anexo 2.**

Criterio de Aceptación: Toda la documentación técnica, (procedimientos, manuales, certificados, diagramas, etc.) relacionados con la calificación del sistema CLAR deben estar registrados, disponibles, vigentes y actualizados.



3. Identificación de los Módulos

Se identifica cada módulo que integra el Sistema CLAR, se realiza una descripción de las características técnicas, condiciones físicas y dimensiones del equipo también, se registra la marca, modelo, serie y material de construcción del equipo. **Anexo 3.**

Criterio de Aceptación: El sistema CLAR deberá estar correctamente identificado y presentar las características técnicas correspondientes al manual de operación u otro documento asociado.

4. Evaluación de las Condiciones Ambientales

Se evalúa que el lugar donde se encuentra instalado el sistema CLAR cumpla con los requerimientos ambientales y servicios auxiliares indicados por el fabricante, para demostrar que el sistema funciona de acuerdo a las especificaciones preestablecidas. **Anexo 4.**

Criterio de Aceptación: El lugar donde se encuentra instalado el sistema CLAR cumple con las condiciones ambientales adecuadas y con los servicios auxiliares necesarios para el buen funcionamiento del sistema.

5. Verificación de la Instalación

Se inspecciona la apariencia física externa del sistema CLAR y se verifica que no presente signos de golpes, contaminación, reparaciones provisionales u otras anomalías.

Se enciende el sistema CLAR en el orden especificado por el fabricante y se verifica que no presente problemas de comunicación entre módulos, ni mensajes de error.

Se programa el sistema, se realiza una prueba de arranque con el análisis de una muestra seleccionada y se imprime el cromatograma correspondiente. **Anexo 5.**



Criterio de Aceptación: El sistema debe cumplir con la integridad física, no debe presentar problemas de fugas, problemas de comunicación entre módulos, ni mensajes de error y debe proporcionar un resultado de la muestra analizada.

CALIFICACION OPERACIONAL (CO)

6. Registro de la Calibración de los Instrumentos de Prueba

Se anota la información correspondiente a la calibración de los instrumentos de prueba que se utilizan en la calificación operacional, tales como cronómetro, multímetro, termopar, balanza analítica y matraz volumétrico así como los certificados de calidad correspondiente a los estándares y a la columna empleada. **Anexo 6.**

Criterio de Aceptación: Todos los instrumentos críticos empleados en la calificación operacional deben estar calibrados, contar con su etiqueta de calibración vigente y ser trazable a un organismo oficial responsable de calibraciones.

7. Exactitud de la Longitud de Onda

Se determina la exactitud de la longitud de onda del detector con dispositivo de diodos. Para esto se utiliza una solución de 1.0 µg/mL de antraceno en agua y se programan tres inyecciones de la misma solución. Se obtienen los espectros correspondientes, se calcula el RSD y se registran los resultados obtenidos. **Anexo 7.** Se espera la presencia de un pico máximo y un pico mínimo.

Condiciones:

Fase móvil: Acetonitrilo en agua (15:65)

Columna: C18, 3.5 µm 75 x 4.6 mm

Temperatura: 25 °C



Velocidad de flujo: 1 mL /min

Longitud de onda: escaneo de 230 a 290 nm

Volumen de inyección: 20 μ L

Criterio de Aceptación:

272 \pm 2 nm

244 \pm 2 nm

RSD \leq 0.5

8. Linealidad del Detector

Se determina la linealidad del detector con dispositivo de diodos, empleando una serie de estándares de cafeína.

Primeramente se colocan en el carrusel del automuestreador, los viales con las soluciones estándar y el blanco, posteriormente se programan las inyecciones. Se comienza con la inyección del blanco, después el estándar 1, 2, 3, 4 y por último el estándar 5. Se obtienen los cromatogramas correspondientes, con los cuales se construye una gráfica de concentración vs área y se registran los resultados obtenidos. **Anexo 8.**

Soluciones:

Blanco: metanol grado HPLC

Estándar 1: 0.5 μ g/mL de cafeína en metanol grado HPLC

Estándar 2: 1.0 μ g/mL de cafeína en metanol grado HPLC

Estándar 3: 5.0 μ g/mL de cafeína en metanol grado HPLC

Estándar 4: 25 μ g/mL de cafeína en metanol grado HPLC

Estándar 5: 50 μ g/mL de cafeína en metanol grado HPLC

Condiciones:

Columna: C18, 3.5 μ m 75 x 4.6 mm

Fase móvil: Metanol grado HPLC

Temperatura: 25 °C



Velocidad de flujo: 1 mL /min

Longitud de onda: 273 nm

Volumen de inyección: 20 μ L

Criterio de Aceptación:

$r^2 \geq 0.999$

9. Reproducibilidad del Detector

Se inyecta, seis veces una solución estándar de cafeína en metanol (50 μ g/mL) y se calcula el RSD para el tiempo de retención, la altura del pico y el ABC. **Anexo 9.**

Condiciones:

Columna: C18, 3.5 μ m 75 x 4.6 mm

Fase móvil: Metanol grado HPLC

Temperatura: 25 °C

Velocidad de flujo: 1 mL /min

Longitud de onda: 273 nm

Volumen de inyección: 20 μ L

Criterio de Aceptación:

RSD \leq 1.0

10. Ruido en la Línea Base (Baseline noise)

Se monitorea la línea base durante 20 min y se calcula el valor del ruido (R) de la línea base a partir del software. **Anexo 10.**

Condiciones:

Columna: C18, 3.5 μ m 75 x 4.6 mm



Fase móvil: Metanol grado HPLC

Temperatura: 25 °C

Velocidad de flujo: 1 mL /min

Longitud de onda: 273 nm

Criterio de Aceptación:

$R \leq 0.001$ AU

11. Estabilidad de la Línea Base

Se monitorea la línea base durante 1 hora y se calcula la deriva (drift) a partir del software. Existen derivas positivas y negativas de acuerdo a la forma en que se presenten ya que pueden ser por arriba de la línea base o por debajo de esta. **Anexo 11.**

Condiciones:

Columna: C18, 3.5 μ m 75 x 4.6 mm

Fase móvil: Metanol grado HPLC

Temperatura: 25 °C

Velocidad de flujo: 1 mL /min

Longitud de onda: 273 nm

Criterio de Aceptación:

Drift < ± 0.002 AU/hr

12. Verificación de la Velocidad de Flujo

Se purga la línea que va a ser empleada y se colecta el volumen de fase móvil proveniente de la tubería de la bomba y antes de la entrada a la columna, en un matraz volumétrico de 10 mL seco y con un cronómetro calibrado se registra el tiempo que tarda en llegar al aforo



el solvente en el matraz, se realiza la determinación por triplicado en cada longitud de onda que necesite ser evaluada. **Anexo 12.**

Se calcula la velocidad de flujo con la siguiente fórmula:

$$f = \frac{V}{t}$$

Donde:

f = velocidad de flujo calculada en mL/min

V = Volumen del matraz en mL

t = tiempo en minutos que tarda en llegar al aforo el disolvente

Calcular la desviación con la siguiente fórmula:

$$D = 100 * \frac{f - F}{F}$$

Donde:

D = Desviación en %

f = Velocidad de flujo calculada

F = Velocidad de flujo establecida

Condiciones:

Columna: desconectada

Fase móvil: Agua grado HPLC

Velocidad de flujo: 0.5 mL/min, 1 mL/min y 2 mL/min

Criterio de Aceptación:

$D < \pm 5 \%$



13. Precisión en la Velocidad de Flujo

Se determina la precisión en la velocidad de flujo, mediante el tiempo de retención obtenido cuando se emplea una solución de etilparabeno a una concentración de 20 µg/mL. Se inyecta 6 veces la misma solución y se registran los tiempos de retención. **Anexo 13.**

Condiciones:

Columna: C18, 3.5 µm 75 x 4.6 mm

Fase móvil: Metanol agua (60:40)

Velocidad de flujo: 1 mL/min

Longitud de onda: 254 nm

Volumen de inyección: 10 µL

Criterio de Aceptación:

RSD ≤ 1.0

14. Composición del Gradiente

Se llenan los reservorios para las líneas A y B con la fase móvil 1 y también los reservorios para las líneas C y D con la fase móvil 2.

Se purgan las cuatro líneas para poder evaluar los cuatro canales en una sola corrida, para ello se programa el sistema a 18 minutos y de acuerdo a la tabla 6:

Tiempo (min)	A	B	C	D
0.0	50	50	0	0
2.0	0	0	50	50
6.0	50	50	0	0
10	45	45	10	0
12	50	50	0	0
14	45	45	0	10
16	50	50	0	0
18	50	50	0	0

Tabla 6. Programación para la Composición de Gradiente.



Se determinan las alturas relativas de los picos, considerando que la altura del pico de la mezcla de propilparabeno/ metanol corresponde al 100 por ciento. Se imprime el cromatograma correspondiente y se anexa al reporte. En la figura 13 se muestra una gráfica, a manera de ejemplo, de la impresión de una corrida exitosa. **Anexo 14.**

Condiciones:

Columna: capilar de acero inoxidable

Fase móvil 1: Metanol grado HPLC

Fase móvil 2: Metanol con una concentración de 5.6 mg/mL de propilparabeno

Velocidad de flujo: 2 mL/min

Longitud de onda: 254nm

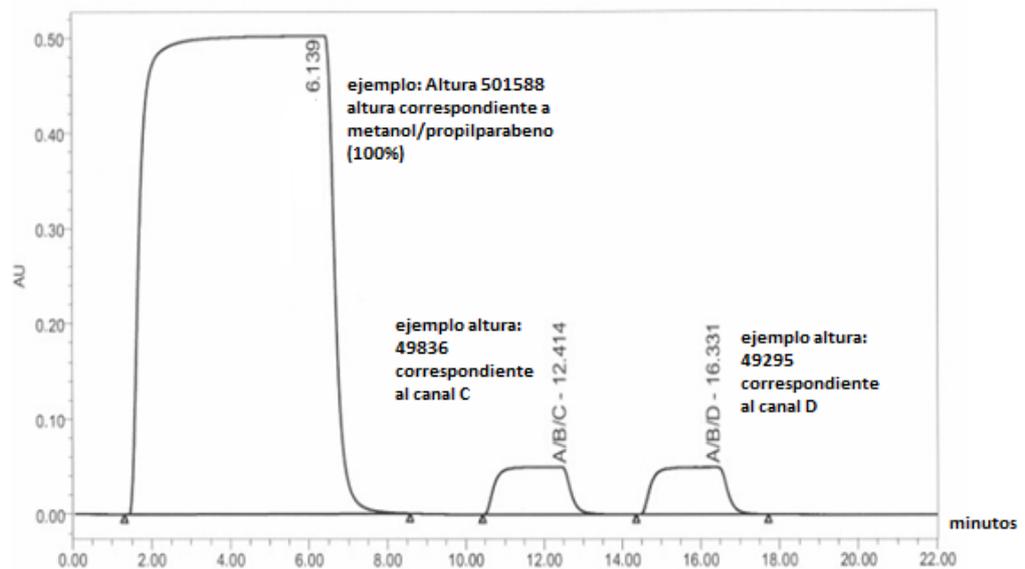


Figura 13. Ejemplo de una impresión de una prueba exitosa de gradiente.

Criterio de Aceptación:

Altura relativa de los picos 10 % \pm 0.5 %



15. Ubicación del Vial

Se coloca un frasco vial con septo no utilizado en cada una de las siguientes posiciones: 1, 10, 50, 80 y 100. Se programa el sistema y se ingresan las posiciones establecidas en una secuencia diseñada previamente. Se acciona el sistema y se observa la operación del mismo. De igual forma se coloca intencionalmente un vial en una posición incorrecta y se registran los resultados obtenidos. **Anexo 15.**

Condiciones:

Columna: C18, 3.5 μm 75 x 4.6 mm

Fase móvil: Metanol grado HPLC

Velocidad de flujo: 1 mL/min

Volumen de inyección: 0 μL

Criterio de Aceptación:

Los frascos viales colocados en las posiciones 1, 10, 50, 80 y 100 se observan con septo perforado.

El sistema manda un aviso de alerta de que el vial no se ha encontrado.

16. Precisión del Inyector

Se programa el sistema para 6 inyecciones de 10 μL provenientes de una solución de etilparabeno (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se registran las áreas de los picos y se calcula la reproducibilidad de la inyección. **Anexo 16.**

Condiciones:

Columna: C18, 3.5 μm 75 x 4.6 mm

Fase móvil: Metanol agua (60:40)

Velocidad de flujo: 1 mL/min

Longitud de onda: 254 nm

Volumen de inyección: 10 μL



Criterio de Aceptación:

RSD \leq 1.0

17. Exactitud de la Inyección

Empleando un par de guantes de latex, se llena un frasco vial con capacidad de 2 mL, con 1.5 mL de agua desgasificada grado HPLC, se tapa el frasco y se procede a pesarlo cuidadosamente en una balanza analítica. Se registra el peso del frasco (W1) y se coloca en la posición uno del automuestreador. Se programa el sistema para 6 inyecciones provenientes del mismo frasco vial. Se acciona el sistema y al término de la secuencia, se pesa cuidadosamente el frasco y se registra el peso (W2). **Anexo 17.** Se utiliza agua para fines prácticos de conversión de unidades ya que se considera que la densidad del agua a temperatura ambiente es igual a 1 g/mL.

Se calcula el volumen promedio de inyección con la siguiente fórmula:

$$\text{volumen de inyección} = \frac{W1 - W2}{6} * 1000$$

Donde:

W1 = peso inicial del frasco

W2 = peso final del frasco

6 = número de inyecciones

1000 es un factor de conversión para expresar el resultado en μ L

Condiciones:

Columna: C18, 3.5 μ m 75 x 4.6 mm

Fase móvil: Metanol grado HPLC

Velocidad de flujo: 1 mL/min

Volumen de inyección: 50 μ L



Criterio de Aceptación:

$50 \pm 1 \mu\text{L}$

18. Linealidad del Inyector

Se llena un frasco vial con 1.5 mL de una solución de etilparabeno (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se inyectan del mismo vial 5, 10, 20, 40 y 80 μL . Se obtienen los cromatogramas correspondientes, con los cuales se construye una gráfica de volumen vs área y se registran los resultados obtenidos. **Anexo 18.**

Condiciones:

Columna: C18, 3.5 μm 75 x 4.6 mm

Fase móvil: Metanol agua (60:40)

Velocidad de flujo: 1 mL/min

Longitud de onda: 254 nm

Volumen de inyección: 5 μL , 10 μL , 20 μL , 40 μL y 80 μL

Criterio de Aceptación:

$r^2 \geq 0.999$

19. Carry Over (Remanente de Muestra)

Se inyectan 80 μL de una solución de etilparabeno (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se obtiene el cromatograma correspondiente y se determina el ABC la cual, será considerada como el 100 por ciento, enseguida se inyectan 80 μL de fase móvil, se obtiene el cromatograma correspondiente, se determina el ABC (si hubiese) y se calcula el porcentaje del área relativa del pico en el blanco (ARB) correspondiente al etilparabeno. **Anexo 19.**



Condiciones:

Columna: C18, 3.5 μ m 75 x 4.6 mm

Fase móvil: Metanol agua (60:40)

Velocidad de flujo: 1 mL/min

Longitud de onda: 254 nm

Volumen de inyección: 80 μ L

Criterio de Aceptación:

ARB \leq 0.1 %

20. Exactitud de la Temperatura del Horno

Se coloca un sensor de temperatura en el horno porta columna, se programa en el sistema una elución a 30 °C, se dejan 10 minutos para estabilizar el sistema al cabo de este tiempo, se verifica la temperatura indicada en el sensor de temperatura contra la programada por el sistema. Se repite el procedimiento modificando la temperatura a 50 °C, la prueba se realiza por triplicado para cada temperatura evaluada y se registran los resultados obtenidos. **Anexo 20.**

Condiciones:

Columna: C18, 3.5 μ m 75 x 4.6 mm

Fase móvil: Metanol agua (60:40)

Velocidad de flujo: 0.1 mL/min

Longitud de onda: 254 nm

Volumen de inyección: 0 μ L

Temperatura: 30 °C y 50 °C

Criterio de Aceptación:

30 \pm 2°C

50 \pm 2°C



21. Precisión de la Temperatura del Horno

Se coloca un sensor de temperatura en el horno porta columna posteriormente, se programa en el sistema una elución a 30 °C (o la seleccionada por el usuario), se deja que el sistema se estabilice durante 10 minutos y se procede a monitorear la temperatura minuto a minuto, durante 20 minutos más. Se registran los resultados y se determina la diferencia (D) en temperatura entre la temperatura especificada en el sistema y la temperatura registrada minuto a minuto por el sensor. **Anexo 21.**

Condiciones:

Columna: C18, 3.5 µm 75 x 4.6 mm

Fase móvil: Metanol agua (60:40)

Velocidad de flujo: 0.1 mL/min

Longitud de onda: 254 nm

Volumen de inyección: 0 µL

Temperatura: 30 °C (o la seleccionada)

Criterio de Aceptación:

$D \pm 0.5 \text{ °C}$



REGISTRO DE LA CALIFICACIÓN DE INSTALACIÓN

Anexo 1 UBICACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

El registro de ubicación del sistema CLAR debe corresponder al lugar donde se realizará la calificación de instalación.

Empresa:	
Filial:	
Área o Sector:	
País/Ciudad	
Dirección:	
Responsable del Sistema:	
Usuarios del Sistema:	

CONCLUSIÓN: _____

Realizó: _____

Fecha: _____

Revisó: _____

Fecha: _____

Anexo 2 REGISTRO DE LA DOCUMENTACIÓN

CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

Toda la documentación técnica, (procedimientos, manuales, certificados, diagramas, etc.) relacionados con la calificación del sistema CLAR deben estar registrados, disponibles, vigentes y actualizados.

Tipo de Documentación recibida	Título del documento	Código	Edición	Vigencia	Idioma	Ubicación del documento (responsable)

CONCLUSIÓN: _____

Realizó: _____

Fecha: _____

Revisó: _____

Fecha: _____



**Anexo 3
IDENTIFICACIÓN DE LOS MÓDULOS**

CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

El sistema CLAR deberá estar correctamente identificado y presentar las características técnicas correspondientes al manual de operación u otro documento asociado.

Módulo	Marca/ Modelo	No. Serie/ firmaware	No. Inventario	Ubicación	Dimensiones	Material de construcción	Fotografía
Detector							
Bomba							
Inyector							
Horno							
Software/ PC							

CONCLUSIÓN: _____

Realizó: _____

Fecha: _____

Revisó: _____

Fecha: _____

**Anexo 4
EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES**

CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

El lugar donde se encuentra instalado el sistema CLAR cumple con las condiciones ambientales adecuadas y con los servicios auxiliares necesarios para el buen funcionamiento del sistema.

Módulo	Lugar de instalación		Humedad ambiente		Temperatura		Alimentación eléctrica	
	Especificación	R	Especificación	R	Especificación	R	Especificación	R
Detector Bomba Inyector Horno Software/ PC	Libre de polvo y de sustancias corrosivas	C NC NA	Entre 45 y 85 % de humedad relativa	C NC NA	Entre 15 y 35 °C	C NC NA	220 V ± 10 % 50 Hz Puesta a tierra adecuada	C NC NA

R = Resultado C= cumple NC= No Cumple NA= No Aplica

CONCLUSIÓN: _____

Realizó: _____

Fecha: _____

Revisó: _____

Fecha: _____



Anexo 5
VERIFICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

El sistema debe cumplir con la integridad física, no debe presentar problemas de fugas, problemas de comunicación entre módulos, ni mensajes de error y debe proporcionar un resultado de la muestra analizada.

Especificación	Resultado
Libre de signos de golpes, contaminación, reparaciones provisionales u otras anomalías.	
Conexión adecuada del Sistema CLAR al suministro eléctrico.	
Instalación adecuada de accesorios.	
Libre de fugas.	
Encendido correcto, sin mensajes de error.	
El análisis de una muestra seleccionada fue realizado sin problemas, obteniéndose el cromatograma correspondiente impreso.	

CONCLUSIÓN: _____

Realizó: _____

Fecha: _____

Revisó: _____

Fecha: _____



REGISTRO DE LA CALIFICACIÓN OPERACIONAL

Anexo 6

REGISTRO DE LA CALIFICACIÓN DE LOS INSTRUMENTOS DE PRUEBA

CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

Todos los instrumentos críticos empleados en la calificación operacional deben estar calibrados, contar con su etiqueta de calibración vigente y ser trazable a un organismo oficial responsable de calibraciones.

Instrumento de prueba	Características del instrumento (identificación, marca, modelo, serie)	Vigencia de la calibración	No. informe	Responsable de la calibración	Dictamen
Cronómetro					
Termohigrómetro					
Balanza analítica					
Sensor de temperatura					
Multímetro					
Matraz volumétrico					

CONCLUSIÓN: _____

Realizó: _____ Fecha: _____

Revisó: _____ Fecha: _____

Anexo 7

EXACTITUD DE LA LONGITUD DE ONDA

CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

272 ± 2 nm
244 ± 2 nm
RSD ≤ 0.5

Valor teórico	Valor experimental	RSD
272	1)	
	2)	
	3)	
244	1)	
	2)	
	3)	

CONCLUSIÓN: _____

Realizó: _____ Fecha: _____

Revisó: _____ Fecha: _____



**Anexo 8
LINEALIDAD DEL DETECTOR**

CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

$r^2 \geq 0.999$

Solución	Concentración	ABC obtenida
Blanco	0	
Estándar 1	0.5 µg/mL	
Estándar 2	1.0 µg/mL	
Estándar 3	5.0 µg/mL	
Estándar 4	25 µg/mL	
Estándar 5	50 µg/mL	
Parámetro	$r^2 =$	

CONCLUSIÓN: _____

Realizó: _____ Fecha: _____

Revisó: _____ Fecha: _____

**Anexo 9
REPRODUCIBILIDAD DEL DETECTOR**

CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

$RSD \leq 1.0$

No. inyección	Tiempo de retención	Altura del pico	ABC
1			
2			
3			
4			
5			
6			
\bar{x}			
S			
RSD			

\bar{x} = media aritmética S= desviación estándar RSD= desviación estándar relativa

CONCLUSIÓN: _____

Realizó: _____ Fecha: _____

Revisó: _____ Fecha: _____



Anexo 10
RUIDO DE LA LINEA BASE (BASELINE NOISE)

CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

$R \leq 0.001$ AU

Tiempo (min)	Valor ruido (AU)
0	
5	
10	
15	
20	

CONCLUSIÓN: _____

Realizó: _____

Fecha: _____

Revisó: _____

Fecha: _____

Anexo 11
ESTABILIDAD DE LA LÍNEA BASE

CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

Drift $< \pm 0.002$ AU/hr

Tiempo (min)	Ruido (AU)	Drift (AU)
0		
10		
20		
30		
40		
50		
60		

CONCLUSIÓN: _____

Realizó: _____

Fecha: _____

Revisó: _____

Fecha: _____



**Anexo 12
VERIFICACIÓN DE LA VELOCIDAD DE FLUJO**

CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

$D < \pm 5 \%$

Velocidad de flujo establecida	Tiempo transcurrido (min)	Velocidad de flujo calculada mL/min	Desviación (D)
0.5 mL/min	1)		
	2)		
	3)		
1 mL/min	1)		
	2)		
	3)		
2 mL/min	1)		
	2)		
	3)		

CONCLUSIÓN: _____

Realizó: _____

Fecha: _____

Revisó: _____

Fecha: _____

**Anexo 13
PRECISIÓN DE LA VELOCIDAD DE FLUJO**

CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

$RSD \leq 1.0$

No. inyección	Tiempo de retención (min)
1	
2	
3	
4	
5	
6	
\bar{x}	
S	
RSD	

\bar{x} = media aritmética S= desviación estándar RSD= desviación estándar relativa

CONCLUSIÓN: _____

Realizó: _____

Fecha: _____

Revisó: _____

Fecha: _____



**Anexo 14
COMPOSICIÓN DEL GRADIENTE**

CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

Altura relativa de los picos 10 % \pm 0.5 %

Pico	Composición	Canal evaluado	Tiempo de retención	% altura relativa (teórico)	Altura obtenida	% altura relativa (experimental)
1	0 % A + 0 % B + 50 % C + 50 % D	C + D		100		
2	45 % A + 45 % B + 10 % C + 0 % D	C		10		
3	45 % A + 45 % B + 0 % C + 10 % D	D		10		

CONCLUSIÓN: _____

Realizó: _____

Fecha: _____

Revisó: _____

Fecha: _____

**Anexo 15
UBICACIÓN DEL VIAL**

CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

Los frascos viales colocados en las posiciones 1, 10, 50, 80 y 100 se observan con septo perforado. El sistema manda un aviso de alerta de que el vial no se ha encontrado.

Posición del vial programada	Posición del vial	Observaciones/mensajes encontrados
1	1	
10	10	
50	50	
80	80	
100	100	
5	15	

CONCLUSIÓN: _____

Realizó: _____

Fecha: _____

Revisó: _____

Fecha: _____



**Anexo 16
PRECISIÓN DEL INYECTOR**

CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

RSD ≤ 1.0

No. inyección	ABC
1	
2	
3	
4	
5	
6	
\bar{x}	
S	
RSD	

\bar{x} = media aritmética S= desviación estándar RSD= desviación estándar relativa

CONCLUSIÓN: _____

Realizó: _____

Fecha: _____

Revisó: _____

Fecha: _____

**Anexo 17
EXACTITUD DE LA INYECCIÓN**

CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

50 ± 1 µL

No. determinación	W ₁	W ₂	Volumen de Inyección* (µL)
1			
2			
3			

*Considerando que la densidad del agua a t° ambiente es de 1 g/mL W₁= Peso 1 W₂= Peso 2

CONCLUSIÓN: _____

Realizó: _____

Fecha: _____

Revisó: _____

Fecha: _____



Anexo 18
LINEALIDAD DEL INYECTOR

CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

$r^2 \geq 0.999$

Volumen inyección (µL)	ABC obtenida
5	
10	
20	
40	
80	
Parámetro $r^2 =$	

CONCLUSIÓN: _____

Realizó: _____

Fecha: _____

Revisó: _____

Fecha: _____

Anexo 19
CARRY OVER (REMANENTE DE MUESTRA)

CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

$ARB \leq 0.1 \%$

Muestra	Volumen inyección (µL)	Área obtenida	Área relativa
Solución etilparabeno			100 %
Blanco de metanol			

CONCLUSIÓN: _____

Realizó: _____

Fecha: _____

Revisó: _____

Fecha: _____



**Anexo 20
EXACTITUD DE LA TEMPERATURA DEL HORNO**

CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

30 ± 2°C
50 ± 2°C

Temperatura programada en el sistema	Temperatura registrada en el sensor
30 °C	1)
	2)
	3)
50 °C	1)
	2)
	3)

CONCLUSIÓN: _____

Realizó: _____

Fecha: _____

Revisó: _____

Fecha: _____

**Anexo 21
PRECISIÓN DE LA TEMPERATURA DEL HORNO**

CRITERIO DE ACEPTACIÓN:

D ± 0.5 °C

Temperatura programada	Tiempo (min)	Temperatura registrada por el sensor	Diferencia (D)
30 °C	1		
	2		
	3		
20		
Seleccionada	1		
	2		
	3		
20		

CONCLUSIÓN: _____

Realizó: _____

Fecha: _____

Revisó: _____

Fecha: _____



X. DISCUSIÓN

Se consultaron diferentes fuentes de información que describían la calificación de un sistema CLAR, algunos autores coincidían en la manera de realizar algunas pruebas, otros sólo mencionaban las características generales dejando libre la parte del desarrollo de la prueba, algunas fuentes manejaban un mayor número de pruebas y diferían en especificaciones sugiriendo que el usuario las establezca siempre y cuando sean fundamentadas, precisas y que se documenten, por lo tanto sólo se seleccionó la información aplicable y se complementaron todas para así poder establecer una metodología general para la CI y CO de un Sistema CLAR con Detector de Dispositivo de Diodos. Cabe mencionar que se consideró importante realizar la investigación completa del proceso de calificación en sus cuatro etapas debido a la relación existente entre cada una de ellas, sin embargo, sólo se profundizó en las etapas de calificación de instalación y calificación operacional ya que se consideran etapas importantes para el buen conocimiento de la partes que integran el sistema así como la habilidad de operar y aprovechar todas sus funciones y sobre todo es retar al equipo en la parte analítica lo cual nos brinda una idea general de cómo se va a desempeñar en el análisis rutinario, por lo tanto, se garantiza que el sistema se va a comportar de manera adecuada y que va a brindar resultados exactos, precisos y confiables.

La calificación es la evidencia documentada de la capacidad de un instrumento, equipo y/o sistema de operar consistentemente dentro de límites preestablecidos para un proceso. El calificar significa evaluar las cualidades o características de todo aquello que pueda afectar la calidad del producto, es decir: los materiales, los equipos, los sistemas e instalaciones, el personal y los procedimientos de operación, en base a criterios establecidas previamente. Esta revisión está enfocada hacia la calificación de un sistema CLAR. Las evaluaciones que se le realizan, permiten evaluar las cualidades o características del equipo (como un sistema integral) y verificar que éstas cumplan con los requerimientos de la operación que se va a realizar en dicho sistema cromatográfico.



Es necesario contar con un PMV, el cual es un documento que especifica la información referente a las actividades de validación así como los propósitos o intenciones de la compañía para alcanzar sus objetivos, además se definen detalles y escalas de tiempo para cada trabajo de validación a realizar, así como las responsabilidades de cada área. Dentro de los puntos que integran el PMV y dentro de las actividades de validación se encuentra la calificación de equipos, por lo tanto en el PMV se organiza la ejecución de las fases de la calificación y de la documentación implicada.

Es necesario elaborar el protocolo de calificación el cual es un documento que establece los pasos que debemos seguir para calificar. Es un plan escrito que propone como se va a llevar a cabo la validación, e incluye los parámetros (criterios de aceptación) para decidir si los resultados de los pruebas son aceptados o rechazados.

El desarrollo de un protocolo de calificación constituye el primer paso en cualquier proceso de calificación. La importancia de este primer paso es absoluta, ya que es necesario establecer por adelantado el programa, definiendo que es lo que se va a hacer, como se van a manejar los datos y cuáles son los resultados esperados.

Los protocolos pueden tener muchas formas diferentes, pero todos deben contener esencialmente la misma información (objetivo, alcance, responsabilidades, descripción o características del equipo, procedimiento de las pruebas a seguir, recursos a utilizar como son materiales, estándares, reactivos e instrumentos según aplique, diagramas de flujo, criterios de aceptación específicos, control de cambios y no conformidades.

Es muy deseable que las actividades de validación así como los protocolos se desarrollen y revisen con una base multidisciplinaria de tal manera que representen diferentes perspectivas, todas enfocadas hacia la realización del objetivo final, el cual es el de operar dentro de un estado validado de control. Típicamente las disciplinas envueltas son ingeniería, fabricación y control de calidad, adicionalmente, mantenimiento, investigación y desarrollo, servicios técnicos y otras disciplinas claves pueden también participar y contribuir al estudio. También es deseable envolver al departamento de compras y al de procesamiento de datos en el caso de sistemas automatizados con computadoras.



En la tabla 2, se enlistaron a manera de ejemplo los elementos que deben ser considerados en la calificación de diseño de un sistema CLAR, ya que es el área usuaria la que determina con claridad sus especificaciones funcionales y operacionales, de acuerdo a la criticidad de sus análisis, al presupuesto que disponga, a las políticas de la empresa, etc. El saber qué se necesita, qué posibilidades presenta el mercado, qué prestaciones y cómo satisfacen o no las necesidades y, en función de la evaluación llevada a cabo, qué es lo que debe modificarse, constituirá la evidencia documentada de que la calidad es tomada en cuenta y construida desde su diseño.

Es imprescindible la colaboración de los departamentos de ingeniería, producción, garantía de calidad y del proveedor. Se deben incluir las especificaciones adecuadas al equipo: operacionales, eléctricas, ambientales y físicas y asegurar que el proveedor entregará el manual de operación de cada módulo, que incluya requerimientos y procedimientos de instalación del sistema así como el entrenamiento y la capacitación necesaria.

En la tabla 3, se presentaron en forma general los parámetros a evaluar durante la calificación de instalación, para una mejor comprensión, esta etapa suele dividirse en dos, la primera se refiere a las acciones que deben llevarse a cabo antes de la instalación del sistema y en la cual hay que verificar si se cuenta con las condiciones adecuadas y los servicios auxiliares necesarios para la instalación del sistema y si no es así entonces solicitar el apoyo de otras áreas para acondicionar y/o modificar el área. También en esta etapa es muy importante el apoyo del proveedor ya que es quien tiene la experiencia para sugerir las condiciones adecuadas y los servicios auxiliares necesarios para la instalación del sistema.

La segunda etapa es durante la calificación en sitio y consiste en revisar la documentación correspondiente, la integridad del sistema así como evaluar y demostrar que el sistema fue instalado de manera correcta. A manera de ejemplo se propusieron las actividades a realizar para evaluar la calificación de instalación. La profundidad de las pruebas son a criterio del usuario y estas deben de ir relacionadas con las especificaciones diseñadas



para cada equipo en particular. También se sugieren los criterios de aceptación así como los formatos para el registro de la calificación de instalación.

En la tabla 4, se presentaron en forma general los parámetros a evaluar durante la calificación operacional de un sistema CLAR. Estos parámetros fueron seleccionados y complementados de acuerdo a las fuentes consultadas, posteriormente se describieron cada uno de ellos, se establecieron condiciones de prueba, criterios de aceptación y formatos para el registro de los resultados obtenidos durante la calificación operacional de un sistema CLAR.

El Sistema CLAR consta de varios componentes por lo que se describieron las pruebas aplicables para cada uno de ellos sin embargo, es necesario recalcar que se trata de un sistema integral por lo tanto se está calificando a todo el sistema como tal. Cada módulo no puede darnos un resultado de modo independiente, es necesario que todos los módulos estén conectados para poder dar un valor, por lo tanto el resultado obtenido de un análisis rutinario va a depender de que todos los módulos se encuentren en las condiciones adecuadas para su uso. Por la misma razón es necesario que cuando el sistema requiera el cambio de algún instrumento, accesorio o condición de operación se lleve a cabo un estudio de control de cambios en el cual hay que evaluar el impacto que tendría ese cambio sobre los resultados analíticos y de esta manera establecer si es necesaria una recalificación total o parcial y sobre que parámetros se tiene que poner atención para demostrar que se mantiene en estado calificado del sistema.

En la prueba 6, que se refiere al registro de la calibración de los instrumentos de prueba, es necesario que además de registrarlos en el anexo correspondiente, se anexasen al reporte de calificación los certificados de calibración de los instrumentos de prueba, con el nombre del organismo oficial responsable de la calibración, la certificación de la persona que está llevando a cabo la calificación del sistema que puede ser por parte del mismo proveedor u otro soporte técnico. También, deben anexarse los certificados de calidad de las sustancias de referencia y de la columna utilizada para la calificación operacional del sistema.



En la tabla 5, se mencionan las pruebas necesarias para evaluar la calificación de funcionamiento, la cual va a ser específica para cada metodología empleada y en la cual se va a demostrar que el sistema se desempeña de forma adecuada y cumple con los parámetros establecidos por organizaciones oficiales. Estos parámetros se engloban en lo que se denomina Adecuabilidad del sistema y son calculados por el software. Se manejan ciertos límites de aceptación los cuales están basados en las formulas establecidas por la USP.



XI. CONCLUSIÓN

Se cumplieron los objetivos planteados en este trabajo ya que se establecieron las diferentes etapas que conforman el proceso de calificación de un sistema CLAR con detector de dispositivo de diodos. En cada etapa se describieron los parámetros a evaluar así como las actividades a realizar.

Se estableció una metodología general para la CI y CO de un Sistema CLAR con detector de dispositivo de diodos en el cual se describieron los procedimientos, las condiciones analíticas y los criterios de aceptación, de acuerdo a las guías oficiales y fuentes de información consultadas, además se crearon en forma general los formatos para el registro de la calificación de instalación y operación de un sistema CLAR con detector de dispositivo de diodos.

Este método le podría servir a los alumnos así como al usuario que tenga relación con un sistema CLAR, para tener una visión más clara acerca de las pruebas analíticas que involucra la calificación de instalación y operación de un sistema CLAR con detector de dispositivo de diodos e incluso le sirve de base para aplicarlo en futuras calificaciones de algún otro equipo de cromatografía.

Se realizó la revisión completa de cada una de las etapas que conforman el proceso de calificación de un sistema CLAR con detector de dispositivo de diodos y se describió la importancia y relación entre cada una de ellas ya que para continuar con una etapa es necesario haber concluido la etapa anterior y haber obtenido un resultado favorable. El orden de trabajo requiere de una programación adecuada para lograr los objetivos y es un trabajo multidisciplinario, que requiere el apoyo y participación de otros departamentos para concluirse en tiempo y sin interrumpir la programación del área de producción así como para mantener el estado calificado del sistema.



Para fines de este trabajo sólo se describieron a profundidad las etapas de calificación de instalación y calificación operacional debido a la importancia en el conocimiento de las partes que integran el sistema y la importancia del aspecto analítico que integran la etapa de la calificación operacional en la cual se realizan pruebas para retar el equipo con sustancias de referencia para así garantizar que el sistema proporcionará resultados exactos, precisos, lineales y confiables durante el análisis rutinario o durante la validación de una metodología analítica. Por lo tanto, si la calificación operacional es concluida sin problemas es posible llevar a cabo la calificación funcional o de desempeño la cual va a ser más específica relacionada con el activo que se esté analizando.

El propósito de la calificación es proporcionar un alto grado de seguridad de que el sistema funciona o continúa funcionando, de acuerdo con el diseño del proveedor en términos de precisión, linealidad y exactitud. No se trata de una prueba completa de todas las especificaciones del sistema sino de las seleccionadas por el usuario en común acuerdo con el proveedor y más en concreto se trata de realizar una evaluación exhaustiva de las funciones básicas del sistema.

En conjunto las pruebas realizadas en el proceso de calificación de instalación y calificación operacional no garantizan que el sistema sea el adecuado para un análisis en específico. Esto sólo se logra al realizar las pruebas de adecuabilidad del sistema que van a estar relacionadas con el método de análisis específico. La importancia de las pruebas de la calificación radica en cumplir con los requisitos normativos como son las buenas prácticas de laboratorio en temas relacionados con la calibración de aparatos automáticos, mecánicos o electrónicos. Y con el cumplimiento se va a lograr garantizar la confiabilidad de los resultados y por lo tanto la calidad del producto que se esté evaluando.

Es importante mencionar la importancia de que al momento de recibir el sistema cromatográfico también se reciba la documentación que certifica la validación del software ya que dentro del alcance de la calificación de instalación, operación y desempeño sólo se está calificando el hardware y no se incluyen pruebas específicas para el software y se da por hecho de que este se encuentra validado.



La calificación del sistema debe realizarse en dos situaciones: la primera como actividad previa al uso del sistema es decir durante la instalación en sitio del hardware y el software cuya acción la realiza el ingeniero de soporte técnico por tratarse de actividades especializadas. La otra situación es cuando se le realiza al sistema alguna reparación de mantenimiento o el reemplazo de algún componente importante.

El período de recalificación del sistema va a depender de la situación en la cual se encuentre el sistema es decir si se trata de una calificación previa al uso o después del uso. Sin embargo, los especialistas sugieren recalificar el sistema entre 12 y 15 meses después de su instalación y en períodos sucesivos establecidos por el propietario del sistema y en cuya decisión va a influir la frecuencia de uso que se le dé al mismo.

Cabe mencionar, que los procedimientos, condiciones, criterios de aceptación y formatos de registro propuestos, son los que comúnmente se describen en la parte de desarrollo de un protocolo de calificación de un sistema cromatografico, sólo que en forma más específica y a detalle para el sistema en particular, en el protocolo además deben especificarse responsabilidades y fechas de recalificación. Sin embargo, cada empresa y/o proveedor tienen formas diferentes de llevar a cabo el proceso de calificación, pero el papel que desempeña el usuario es de suma importante ya que es quien propone, determina y exige la profundidad con la que desea que se realice el proceso de calificación, es por esta razón la importancia de conocer más a fondo los equipos y aprovechar en su totalidad sus funciones además de predecir y si es posible corregir algún error que el sistema esté detectando.

Por lo tanto, con el procedimiento de calificación establecido y con los documentos generados es posible realizar la CI y CO de un sistema CLAR con detector de dispositivo de diodos. Además, podría servir de base para otro equipo de cromatografía.



XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos: 3.88, 14.1, 14.2, 14.3, 14.4, 14.10
2. Comisión Internacional de Buenas Prácticas de Fabricación. Guía de Buenas Prácticas de Fabricación. Buenas prácticas de Validación. Monografía Técnica No. 24. México: CIPAM; 2006: 18-25, 54-68.
3. World Health Organization. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. 43th Report. Geneva: WHO, Technical Report Series 937, 2006: 108-119.
4. International Conference on Harmonisation. Guidance for Industry. Q7A Good Manufacturing Practice Guidance for Active Pharmaceutical Ingredients. ICH; 2001: 31-33.
5. Pharmaceutical CGMP's. Guidance for Industry. PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance. FDA, 2004: 2-5
6. Chaloner-Larsson G. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements, Part 2 : Validation. Geneva: WHO, Global Programme for Vaccines and Immunization, 1997: 3-8.
7. Organización Mundial de la Salud. Comité de Expertos de la OMS en Especificaciones para las Preparaciones Farmacéuticas. 32º Informe. Ginebra: OMS, Serie de informes técnicos 823, 1992: 4, 21,26.



8. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A.C. Guía de Validación de Métodos Analíticos. México: CNQFB, 2002: 2,3, 20, 21.
9. Engineering Pharmaceutical Innovation. GAMP Good Practice Guide: Validation of Laboratory Computerized Systems. USA: ISPE, 2005: 39-42.
10. Centro Nacional de Metrología. Guía sobre la Calificación de Equipos Analíticos. México: CENAM, 2004: 6-15.
11. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Edición en español. USA: USP-NF, 2009: 553-557.
12. Dong MW. Modern HPLC for Practicing Scientist. New Jersey: Jonh Wiley and Sons, Inc., 2006: 225-235.
13. Cámara C, Fernández HP, Martín-Esteban A, Pérez-Conde C, Vidal M. Toma y Tratamiento de Muestras. España: Editorial Síntesis, 2002: 56-60.
14. Secretaria de Salud. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 9ª ed. México: SSA, 2008: 276-291, 2427-2434.
15. Aguirre OL y col. Validación de Métodos Analíticos. España: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001: 34-36.
16. Department Of Health and Human Services. General Principles of Software Validation: Final Guidance for Industry and FDA Staff. USA: FDA, 2002: 5-11.
17. Organización Nacional de Normalización. Norma ISO/IEC 17025. 2ª ed. Suiza: ISO/CASCO, 2005: 14-19.



18. Bliesner DM. Validating Chromatographic methods. A Practical Guide. New Jersey: Jonh Wiley and Sons, Inc., 2006: 72-76.
19. Comisión Interinstitucional de Prácticas Adecuadas de Manufactura. Buenas Prácticas de Documentación, Monografía técnica No. 13. México: CIPAM, 2004: 11, 15, 31.
20. Quattrocchi OA, Andrizzi SA, Laba RF. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Buenos Aires: Oscar Quattrocchi, Sara Abelaira, Raúl Laba, 1992: 5-10.
21. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Principios de Análisis Instrumental. 5ª ed. España: Mc Graw-Hill, 2001: 786-800.
22. GRUPO AMERICANO DE INTERCAMBIO S.A. MWR [en línea], 2011 [fecha de acceso 15 Febrero 2011]; GAISA URL disponible en: <http://www.viarural.com.ar/viarural.com.ar/insumosagropecuarios/agricolas/riego/gaisa/resinas-de-intercambio.htm>
23. Yost R, Ettre L, Colon R. Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica. Estados Unidos de America: Perkin-Elmer, 1980: 3-5.
24. Willard HH. Métodos Instrumentales de Análisis. México: Grupo Editorial Iberoamérica; 1991: 505-515, 603-606.
25. Remington. Farmacia. 20ª ed. México: Editorial Panamericana, 2003. 686, 687, 688, 692, 693, 699-708.
26. Rouessac F, Rouessac A. Análisis Químico. Métodos y Técnicas Modernas. España: McGraw-Hill/Interamericana, 2003: 57- 61.



27. Noa PM, Pérez FN, Díaz GG, Vega LS. Cromatografía de Gases y de Líquidos de alta Resolución. Aplicación en el análisis de alimentos. Serie Académicos CBS. México: UAM, 2005: 163-175.
28. Farmacopea Europea. 6ª ed. 2007: 72-76.
29. Kazakevich Y, LoBrutto R. HPLC for Pharmaceutical Scientists. EUA: Jonh Wiley and Sons, Inc., 2007: 25-34.
30. Center for Drug Evaluation and Research. Reviewer Guidance Validation of Chromatographic Methods. USA: FDA, 1994: 2-8.
31. OMCL. Qualification of Equipment. Annex 1: Qualification of HPLC Equipment. EDQM, 2007.
32. Dong M. Modern HPLC for Practicing Scientists. EUA: Wiley-Interscience, 2006:221-229, 235, 236.
33. Chow Ch, Lam H, Lee Y. Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification. EUA: Jonh Wiley and Sons, Inc., 2004: 173-184.
34. Case Study Design Qualification Operational Qualification HPLC Equipment by Lab Compliance. MWR [en línea], 2001 [fecha de acceso 10 Enero 2011]; URL disponible en: <http://www.gmpua.com/Validation/HPLC/case-study-dq-oq.pdf>