



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

**“VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA
CUANTIFICAR 1, 3,5-TRIHIDROXIBENCENO, 1, 3,5-TRIMETOXIBENCENO Y
CLONIXINATO DE LISINA EN CÁPSULAS”**

TESINA

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO QUÍMICO**

PRESENTA:

RAFAEL GONZÁLEZ REYNOSO

ASESOR: I.Q. J. MARIANO RAMOS OLMOS

LO HUMANO
EJE
DE NUESTRA REFLEXION

MÉXICO, D.F. MARZO 2012



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 la Universidad Nacional Autónoma de México, y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, al cuerpo de maestros por transmitirme sus conocimientos y experiencias.

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 y a mi familia por apoyarme en todo momento.

ÍNDICE

	PÁGINA
1. RESUMEN.....	5
2. INTRODUCCIÓN.....	6
3. ANTECEDENTES TEÓRICOS.....	8
3.1.1 PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DE UNA VALIDACIÓN ANALÍTICA.....	9
3.1.1.1 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA.....	9
3.1.1.2 PRECISIÓN DEL SISTEMA.....	9
3.1.1.3 LINEALIDAD DEL SISTEMA.....	10
3.1.1.4 ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO.....	10
3.1.1.5 EXACTITUD DEL MÉTODO.....	10
3.1.1.6 LINEALIDAD E INTERVALO DEL MÉTODO.....	11
3.1.1.7 PRECISIÓN DEL MÉTODO.....	11
3.1.1.8 LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO.....	12
3.1.1.9 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO.....	12
3.1.2.0 ROBUSTEZ DEL MÉTODO.....	13
3.1.2.1 TOLERANCIA DEL MÉTODO.....	13
3.2 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.....	13
3.2.1 FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA.....	13
3.2.2 APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS.....	14
3.2.3 REQUISITOS Y LIMITACIONES DE LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS..	14
3.2.4 INSTRUMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE HPLC.....	14
3.3 1,3,5-TRIHIDROXIBENCENO; 1,3,5-TRIMETOXIBENCENO Y CLONIXINATO DE LISINA CAPSULAS.....	21
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
5. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA.....	25
6. OBJETIVOS.....	26
6.1 OBJETIVO GENERAL.....	26
6.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
7. HIPÓTESIS.....	27
8. MATERIAL, EQUIPOS Y CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.....	27
9. METODOLOGÍA.....	28

9.1	ADECUABILIDAD DEL SISTEMA.....	29
9.2	PRECISIÓN DEL SISTEMA.....	29
9.3	LINEALIDAD DEL SISTEMA.....	29
9.4	ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO.....	31
9.5	EXACTITUD Y REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO.....	31
9.6	LINEALIDAD DEL MÉTODO.....	32
9.7	PRECISIÓN DEL MÉTODO.....	34
9.8	ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA.....	34
9.9	MÉTODO DE ESTABILIDAD DE LA MUESTRA A DIFERENTES pH.....	35
9.10	ROBUSTEZ DEL MÉTODO.....	35
9.11	TOLERANCIA DEL MÉTODO.....	36
10.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	37
10.1	LINEALIDAD DEL SISTEMA.....	37
10.2	PRECISIÓN DEL SISTEMA.....	44
10.3	ADECUABILIDAD DEL SISTEMA.....	45
10.4	ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO.....	46
10.5	EXACTITUD Y REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO.....	52
10.6	LINEALIDAD DEL MÉTODO.....	55
10.7	PRECISIÓN DEL MÉTODO (REPRODUCIBILIDAD DIA/ANALISTA.....	66
10.8	ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.....	70
10.9	MÉTODO DE ESTABILIDAD DE LA MUESTRA A DIFERENTES pH.....	76
10.10	ROBUSTEZ DEL MÉTODO.....	77
10.11	TOLERANCIA DEL MÉTODO.....	82
11.	CONCLUSIONES.....	86
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	87
13.	ANEXO.....	89

1. RESUMEN

Este trabajo consiste en la Validación de la Metodología Analítica empleada en el laboratorio para la Cuantificación de 1, 3,5-Trihidroxibenceno; 1, 3,5-Trimetoxibenceno y Clonixinato de lisina en cápsulas por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Tiene como propósito validar un método analítico que cumpla con los parámetros establecidos de cromatografía y requerimientos de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 10^a ed.

El diseño de este nuevo método sirve de guía a la Industria Farmacéutica para la cuantificación de tres principios activos como materia prima y en producto terminado; basándose en la cromatografía líquida de alta resolución como una técnica automatizada que permite analizar de forma rápida y eficiente la separación, cuantificación y detección de las muestras por medio de la identificación de los picos en los cromatogramas.

Para determinar que la metodología es exacta y precisa se verificó el cumplimiento de ciertos parámetros de validación que incluyen la adecuabilidad, precisión y linealidad del sistema, así como la especificidad, exactitud, precisión intermedia, repetibilidad, linealidad, estabilidad, robustez y tolerancia del método que fueron evaluados durante todo el proceso analítico.

Se utilizaron las siguientes condiciones cromatográficas: Cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Waters, columna analítica Xterra Waters RP18, 4.6x150 mm, 5 micras, fase móvil metanol HPLC, agua HPLC y ácido acético glacial en proporción (7.4: 2.5:0.1), flujo 1.0 mL/min, longitud de onda de 265 nm y 20 µL de volumen de inyección. Se prepararon estándares y muestras a diferentes concentraciones.

La metodología analítica cumple con los parámetros de adecuabilidad del sistema, linealidad, exactitud, precisión (repetibilidad y precisión intermedia) para la cuantificación de los principios activos 1, 3,5-Trihidroxibenceno; 1, 3,5-Trimetoxibenceno y Clonixinato de lisina en cápsulas.

El método analítico validado es efectivo y reproducible, cumple con las especificaciones necesarias para su aplicación si se realiza a las mismas condiciones de laboratorio y con los mismos principios activos, permitiendo que se obtengan resultados satisfactorios y confiables.

2. INTRODUCCIÓN

El adquirir conocimientos científico-tecnológicos contribuye a satisfacer una de las demandas de la sociedad, proporcionar solución a problemas de salud, por medio de fármacos que en las últimas décadas son reemplazados por fármacos específicos. Dichos medicamentos son elaborados por grandes laboratorios e industrias farmacéuticas; quienes tienen que prestar atención y cumplir con Buenas Prácticas de Manufactura y de Laboratorio, así también el control de calidad del producto fabricado es esencial para garantizar al consumidor final un medicamento confiable y seguro.

El constante crecimiento y expansión del mercado exige que las empresas se preparen y busquen la calidad en sus productos y procesos, para utilizarlo como una ventaja competitiva. Lo anterior, aumenta la necesidad de obtener certificaciones que garanticen la calidad del producto y dentro de sus requisitos se encuentra que los productos deben tener metodologías de análisis validadas.

Los métodos de análisis utilizados en el control de calidad de productos farmacéuticos que no se traten de métodos oficiales de análisis (registrados o contemplados en farmacopea), deben validarse previamente a su uso de rutina y tiene como finalidad demostrar la idoneidad de dicho método para llevar a cabo un análisis determinado.

Con la cromatografía líquida de alta resolución que presenta ventajas sobre los métodos tradicionales se pretende mejorar la eficacia de la técnica analítica obteniendo tiempos de análisis rápidos, separación de sustancias de mezclas complejas con alta resolución, ejecución de análisis con facilidad y exactitud, obteniendo errores relativos menores al 1%. Además el beneficio de la tecnología al brindar un sistema automatizado que inyecta la muestra, realiza la separación, imprime la identificación de cada pico y su concentración para luego repetir el ciclo con la muestra siguiente.

El químico analista en la industria farmacéutica es una de las personas fundamentales para llevar a cabo adecuadamente las pruebas fisicoquímicas de fármacos. La validación de métodos analíticos es una de las funciones que realiza el químico analista.

Otras de las funciones que lleva a cabo este profesional son:

- Efectuar análisis de acuerdo a procedimientos operativos y métodos analíticos previamente aprobados.
- Proponer modificaciones a procedimientos y metodología analítica que mejoren las condiciones establecidas vigentes.
- Emitir los resultados analíticos.

El presente trabajo se deriva de la experiencia adquirida durante siete años laborando en la industria farmacéutica en un laboratorio farmacéutico en el área de control de calidad como químico analista. Este trabajo consistió en validar el método analítico por HPLC para cuantificar 1,3,5- Trihidroxibenceno; 1,3,5- Trimetoxibenceno y Clonixinato de lisina en cápsulas, esto para demostrar que el método de análisis utilizado cumple con cada uno de los parámetros de desempeño que debe llevar una validación analítica y con ello garantizar que es confiable y preciso.

La formulación presente dentro de la forma farmacéutica de cápsula combina estos principios activos por su actividad terapéutica y compatibilidad química para actuar como antiespasmódico y analgésico que actúa a nivel estomago. El método de cromatografía de líquidos de alta resolución logra el análisis de estos principios activos con eficacia al lograr identificarlos y separarlos en una mezcla.

Los resultados fueron aceptables ya que cumplieron con todos los criterios de aceptación que especifica cada parámetro de desempeño, lo que asegura la validación del método analítico.

3. ANTECEDENTES

3.1 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de un método analítico es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio; que los parámetros de desempeño del método cumplen los requisitos adecuados de exactitud y confiabilidad para las aplicaciones analíticas previstas. Los parámetros de desempeño analítico habituales que deben considerarse en la validación de un método analítico son adecuabilidad del sistema, precisión del sistema, linealidad del sistema, especificidad del método, exactitud del método, linealidad e intervalo del método, precisión del método, límite de detección del método, límite de cuantificación del método, robustez del método y tolerancia del método.

En el caso de métodos farmacopeicos, puede resultar necesaria una nueva validación en las siguientes circunstancias: presentación a la USP de un método analítico revisado o utilización de un método general establecido con un nuevo producto o materia prima.

Los documentos de la Conferencia Internacional Tripartita sobre Armonización (ICH) aconsejan sobre la necesidad de realizar una nueva validación en las siguientes circunstancias: cambios en la síntesis del fármaco, cambios en la composición del producto farmacéutico y cambios en el procedimiento analítico.

Cualquier método de análisis requiere su validación. El método descrito debe incluir los principios en los que se basa y las referencias bibliográficas correspondientes, las especificaciones de los instrumentos y del equipo, los requisitos del material a analizar, incluidas las condiciones de almacenamiento, los diferentes reactivos, su procedencia comercial y el grado de pureza, su preparación y sus concentraciones expresadas en las unidades adecuadas, la descripción detallada de todos los pasos (especialmente de los críticos), cualquier precaución acerca de la seguridad en la manipulación de las muestras, la eliminación de los residuos, el procedimiento de calibración de los instrumentos, el cálculo de los resultados, las descripciones de los compuestos de referencia (estándar) y el intervalo analítico (intervalo de concentraciones de los compuestos en la muestra para el que puede aplicarse el método sin modificación).

En la elección de métodos de análisis, los estudios de estabilidad requieren detectar pequeños cambios que pueden ser significativos a lo largo del tiempo de almacenamiento. La cromatografía de gases (CG) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), los métodos espectrométricos, las valoraciones gravimétricas, volumétricas y electroquímicas, son capaces de tal precisión.

El control de calidad del producto final (para su comercialización) requiere la especificación muy estrecha de los límites de pureza y concentración, para lo que se usa la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), por su sencillez, velocidad, buena especificidad y excelente precisión.^{1,2}

3.1.1 PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DE UNA VALIDACIÓN ANALÍTICA

Para asegurar la calidad de los resultados en un proceso de validación se requiere del cumplimiento de ciertos parámetros de laboratorio que satisfacen los requerimientos de la aplicación deseada.

3.1.1.1 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

Las pruebas de adecuabilidad del sistema se basan en el concepto de que: el equipo e instrumentos de medición, las operaciones analíticas y las muestras que van a ser analizadas constituyen un sistema integral, que puede ser evaluado como tal, es decir para verificar que el sistema funcione correctamente con base en criterios establecidos previamente. La adecuabilidad del sistema permite establecer la confiabilidad del sistema, antes del procesamiento de las muestras durante el uso rutinario del método.

3.1.1.2 PRECISIÓN DEL SISTEMA

El sistema: analista, equipo e instrumentos de medición, soluciones de referencia, etc, originan una variabilidad inherente asociada a la respuesta analítica, que en general es aditiva a la del método, por lo que, es importante verificar que su valor no sea una fuente importante de la variabilidad, por lo tanto la precisión del sistema es el grado de concordancia relativa de la respuesta analítica de soluciones de referencia de concentración o magnitud conocida.

3.1.1.3 LINEALIDAD DEL SISTEMA

La linealidad del sistema es la verificación de que la respuesta analítica y la concentración del analito (puede ser una sustancia de referencia) se ajustan al modelo matemático en un intervalo de concentraciones pertinentes a la aplicación analítica.

Cuando la relación entre la concentración y la respuesta del analito no es lineal dentro del intervalo de trabajo, dará lugar a inexactitud del método analítico, por lo que, es conveniente verificarlo bajo las condiciones del laboratorio. Este concepto generalmente es llamado curva de calibración y es parte esencial de varios métodos analíticos en las determinaciones cuantitativas del analito.

3.1.1.4 ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO

Es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra, que pueden estar presentes o que se pudieran presentar por efectos ambientales y/o de interacción con los mismos componentes tales como: impurezas, productos de degradación o componentes de la misma muestra. La falta de especificidad de un método analítico individual puede compensarse usando otros procedimientos analíticos complementarios. En análisis cualitativos (pruebas de identificación), debe demostrarse la capacidad de distinguir compuestos de estructura estrechamente relacionada cuya presencia resulta probable. Esta capacidad debería confirmarse mediante la obtención de resultados positivos a partir de muestras que contengan el analito (quizás mediante comparación con un material de referencia conocido), junto con resultados negativos de muestras que no contengan dicho analito, y mediante la confirmación de que no se obtiene una respuesta positiva de materiales con estructura similar o estrechamente relacionada a la del analito.

3.1.1.5 EXACTITUD DEL MÉTODO

La exactitud de un método analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese método, y el valor verdadero. La exactitud de un método analítico debe establecerse en todo su intervalo. En la valoración de un fármaco, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del método analítico con respecto a un analito de pureza conocida (por ejemplo, un estándar de referencia), o comparando los resultados del método con los de un segundo método bien caracterizado, cuya exactitud se haya comprobado o definido.

En la valoración de un fármaco en un producto formulado, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del método analítico a mezclas sintéticas de los componentes del producto farmacéutico al que se hayan añadido cantidades conocidas de analito dentro del intervalo del método.

3.1.1.6 LINEALIDAD E INTERVALO DEL MÉTODO

La linealidad de un método analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración del analito en muestras en un intervalo dado.

El intervalo de un método analítico es la amplitud entre la concentración inferior y superior de analito (incluyendo dichas concentraciones) en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el método según se describe por escrito. El intervalo se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de la prueba (por ejemplo porcentaje, partes por millón, partes por billón, mg/g, etc.) obtenidos mediante el método analítico.

La linealidad debe establecerse en el intervalo completo del procedimiento analítico. Debería establecerse inicialmente mediante examen visual de un gráfico de señales como función de concentración de analito del contenido. Si parece existir una relación lineal, los resultados de la prueba deberían establecerse mediante métodos estadísticos adecuados (por ejemplo, mediante el cálculo de una línea de regresión por el método de los cuadrados mínimos).

3.1.1.7 PRECISIÓN DEL MÉTODO

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el método repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. La precisión de un método analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad del método analítico en condiciones normales de operación. La repetibilidad se refiere a la utilización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un período de tiempo corto realizado por el mismo analista con el mismo equipo. La precisión de un método analítico se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea que permita calcular

estadísticamente estimaciones válidas de la desviación estándar o de la desviación estándar relativa (coeficiente de variación).

3.1.1.8 LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO

El límite de detección es una característica de las pruebas de límite. Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede detectarse, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas. Las pruebas de límite simplemente comprueban que la cantidad de analito se encuentra por encima o por debajo de un nivel determinado. El límite de detección se expresa habitualmente en forma de concentración de analito (por ejemplo porcentaje, partes por millón, partes por billón, mg/g, etc.) en la muestra. Para métodos no instrumentales, el límite de detección se determina generalmente mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo del analito que puede detectarse confiablemente. Para procedimientos instrumentales, se puede utilizar el mismo método que para los no instrumentales.

3.1.1.9 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO

El límite de cuantificación es una característica de las valoraciones cuantitativas de compuestos que se encuentran en baja concentración en la matriz de una muestra, como por ejemplo: impurezas en fármacos a granel y productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas. El límite de cuantificación se expresa habitualmente en forma de concentración de analito (por ejemplo porcentaje, partes por millón, partes por billón, mg/g, etc.) en la muestra.

Para métodos no instrumentales, el límite cuantitativo se determina habitualmente mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo del analito que se puede determinar con exactitud y precisión aceptables.

Para procedimientos instrumentales, se puede utilizar el mismo método que para los no instrumentales.

3.1.2.0 ROBUSTEZ DEL MÉTODO

La robustez de un método analítico es una medida de su capacidad para no resultar afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método; además proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal, en otras palabras se refiere a la influencia de factores internos del método que pudiesen afectar la exactitud del método.

3.1.2.1 TOLERANCIA DEL MÉTODO

La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados de las pruebas obtenidos mediante el análisis de las mismas muestras en diversas condiciones, como por ejemplo en diferentes laboratorios, con diferentes analistas, instrumentos, lotes de reactivos, tiempo transcurrido durante la valoración, temperaturas de valoración o días. La tolerancia se expresa normalmente como la carencia de influencia de las variables operativas y ambientales del método analítico sobre los resultados de las pruebas. La tolerancia es una medida de la reproducibilidad de los resultados de las pruebas sometidas a la variación de condiciones que se esperarían normalmente entre distintos laboratorios o distintos analistas.

La tolerancia de un método analítico se determina mediante el análisis de alícuotas de lotes homogéneos en diferentes laboratorios, por diferentes analistas, utilizando condiciones operativas y ambientales que pueden ser diferentes pero que continúan encontrándose dentro de los parámetros especificados del análisis, es decir se refiere a factores externos al método que pueden impactar en la reproducibilidad de éste.^{3,4}

3.2 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

3.2.1 FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es actualmente la técnica de separación más ampliamente utilizada debido a su versatilidad y amplio campo de aplicación. Los componentes de la muestra, previamente disueltos en un disolvente adecuado (fase móvil), son forzados a atravesar la columna cromatográfica gracias a la aplicación de altas presiones.

El material interno de la columna (fase estacionaria), está constituido por un relleno capaz de retener de forma selectiva los componentes de la mezcla. La resolución de esta separación depende de la interacción entre la fase estacionaria y la fase móvil, pudiendo ser manipulada a través de la elección de diferentes mezclas de disolventes y distintos tipo de relleno. Como resultado final, los componentes de la mezcla salen de la columna separados en función de sus tiempos de retención en lo que constituye el cromatograma. A través del cromatograma se puede realizar la identificación cualitativa y cuantitativa de las especies separadas.

3.2.2 APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

El campo de aplicación de esta técnica es muy extenso. Algunas de las aplicaciones se nombran a continuación:

- Productos farmacéuticos: antibióticos, sedantes, esteroides, analgésicos.
- Bioquímica: aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos.
- Alimentación: edulcorantes artificiales, antioxidantes, aditivos.
- Contaminantes: plaguicidas, herbicidas, fenoles, PCBs.
- Química forense: drogas, venenos, alcohol en sangre, narcóticos.
- Medicina clínica: ácidos biliares, metabolitos de drogas, extractos de orina, estrógenos.

3.2.3 REQUISITOS Y LIMITACIONES DE LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

- Las muestras se proporcionarán debidamente filtradas.
- La cantidad mínima para realizar el ensayo es 0.5 ml.
- Con la entrega de la muestra se entregarán los patrones preparados en las mismas condiciones que esta.
- El rango de volumen de inyección que cubre el equipo es de 10 a 100 μ L.

3.2.4 INSTRUMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE HPLC

Los componentes básicos de un sistema para HPLC son:

- A) Depósito para la fase móvil (disolventes)
- B) Sistema de bombeo para proporcionar presión a la fase móvil
- C) Sistema de inyección de muestras
- D) Columna cromatográfica
- E) Termostato para la columna

F) Detector

G) Sistema para el tratamiento de datos y registrador

La figura 1 muestra los componentes de un HPLC y la figura 2 el diagrama del sistema:

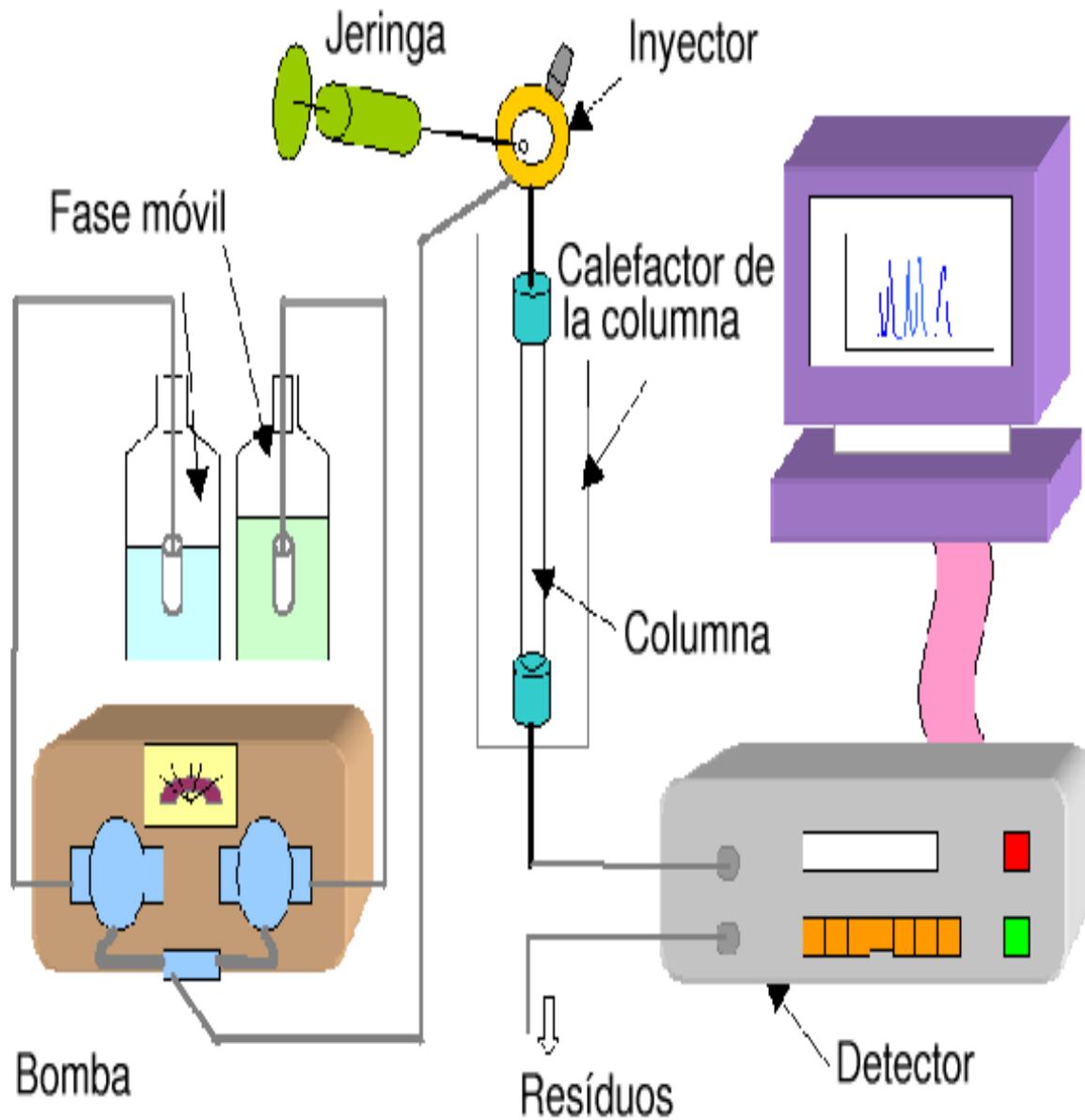


Figura 1. Componentes de un HPLC²

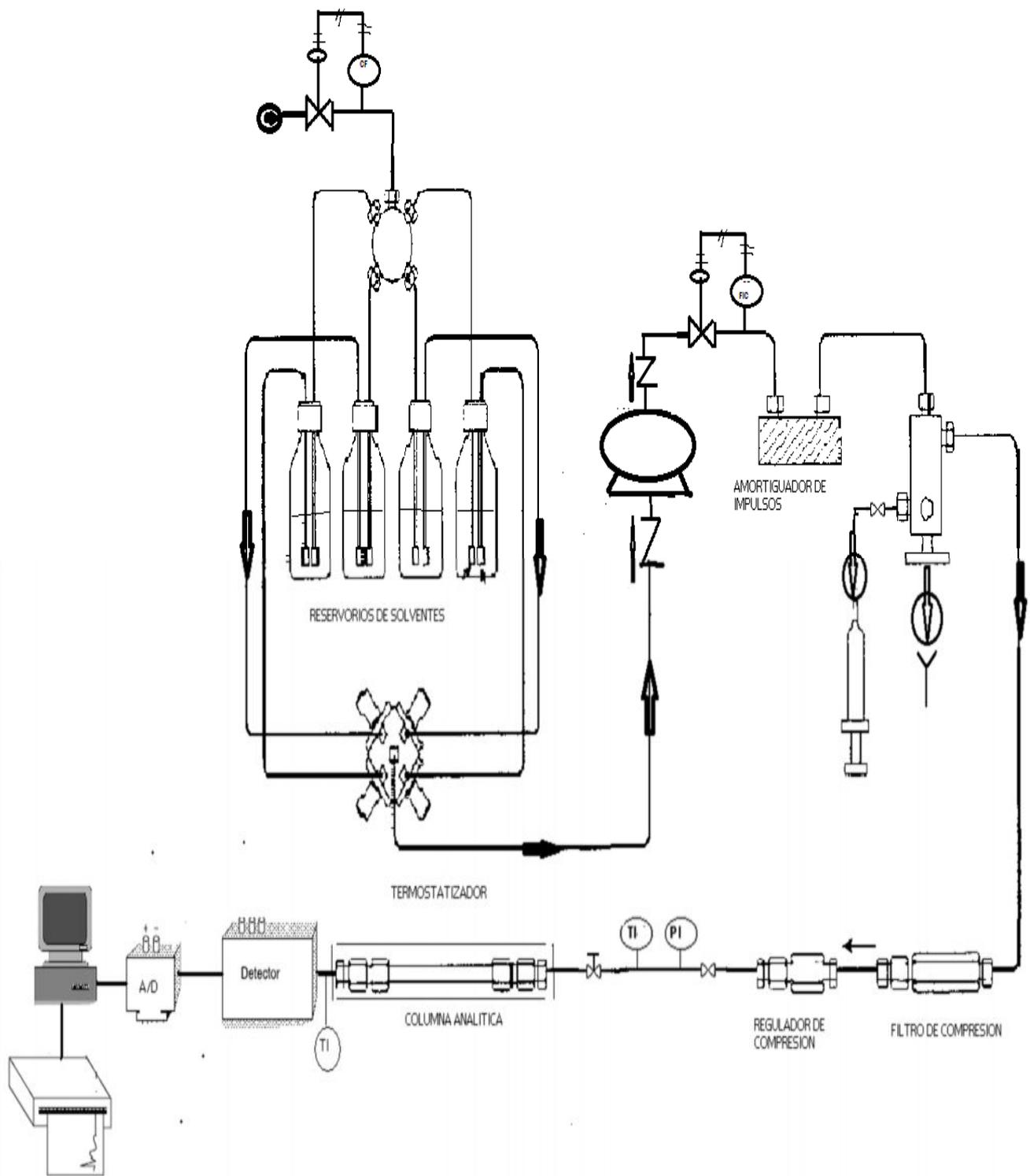


Figura 2 Diagrama del sistema de HPLC

Como algunas de las fases móviles usadas en HPLC pueden ser químicamente activas como ácidos, bases o líquidos corrosivos, es esencial que los componentes del sistema estén fabricados con materiales resistentes, por lo que la mayoría de las partes en contacto con la fase móvil suelen estar fabricadas con acero inoxidable. Los disolventes más usados en HPLC son agua, disoluciones tampón acuosas y disolventes orgánicos como el metanol, acetonitrilo, isopropanol. Deben ser espectroscópicamente puros (grado HPLC), exentos de partículas sólidas y desgasificados, esto se lleva a cabo con un gas inerte poco soluble como el helio o bien mediante un baño de ultrasonido.

Como fase estacionaria lo más común es usar partículas microporosas esféricas de sílice muy puro, que son permeables al disolvente. A continuación se describe cada uno de los componentes del sistema HPLC:

A. Los recipientes que se utilicen para almacenar la fase móvil tienen que ser inertes, es decir, el disolvente no deberá extraer especie alguna del material con el que estén contruidos. Suelen ser botellas de vidrio y tubos de teflón.

Están provistos de unos filtros, indispensables para eliminar los gases disueltos y partículas que pueda contener la fase móvil.

B. Debido a las elevadas presiones de trabajo y al pequeño tamaño de las partículas de la fase estacionaria, se utiliza una bomba que es la encargada de introducir la fase móvil o disolvente a través de la columna. Los sistemas de bombeo deberán reunir las siguientes características:

- Generar presiones superiores a 5000 psi.
- Capaces de cubrir un amplio rango de flujo entre 0,1 y 10 mL/min con una precisión del 0,5% y que esté libre de pulsaciones.
- Contruidos con materiales inertes respecto a los disolventes empleados.

Las bombas empleadas en HPLC son de tres tipos:

a).- Bombas recíprocas o de vaivén, son las más utilizadas. Están formadas por una pequeña cámara cilíndrica que se llena y luego se vacía por oscilación de un pistón de zafiro. El bombeo produce un flujo pulsado que después debe amortiguarse. Sus principales ventajas son que se consiguen presiones elevadas y se suministra un caudal constante, consiguiéndose adaptar a la técnica de elución con gradiente, debido a su pequeño volumen interno.

b).- Bombas neumáticas o de presión constante, hacen uso de la presión de un gas aplicado al recipiente conteniendo la fase móvil. Son sencillas, no provocan pulsaciones pero están limitadas a presiones relativamente bajas.

c).- Bombas de desplazamiento o tipo jeringa, consisten en una cámara equipada con un mecanismo de tornillo. Suministran un flujo libre de pulsaciones pero con una capacidad limitada a unos 250 mL.

C. Los volúmenes que se inyectan de muestra deberán ser pequeños para evitar la sobrecarga de la columna. Hay varios tipos: El método más simple es la utilización de una jeringa de alta presión con un diafragma (septum) a la entrada de la columna. Está limitado a una presión máxima de 1500 psi. Las válvulas de inyección con bucles de volumen conocido, es el método más utilizado.

D. En las columnas cromatográficas es donde se produce la velocidad diferencial de los solutos que permite su separación. El material de las columnas cromatográficas suele ser de acero inoxidable cuya longitud varía de 5 a 30 cm y un diámetro de 1 a 5 mm. La eficiencia de las columnas aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria. El tamaño típico de las partículas es de 3-10 μm .

Las columnas son caras y se degradan con facilidad, por eso, se protege la entrada de la columna con otra más corta, la precolumna, que retiene por adsorción las impurezas de forma irreversible.

E. No es necesario el control estricto de la temperatura de la columna, pero las separaciones resultan más reproducibles cuando la temperatura se mantiene constante. Los instrumentos comerciales modernos están equipados con calentadores u hornos que regulan la temperatura de la columna.

F. El papel del detector es indicar los momentos de aparición de los componentes, y proporcionar indicación cuantitativa y cualitativa de los mismos. El detector utilizado depende de la naturaleza de la muestra y deberá reunir una serie de características como son, tener una sensibilidad elevada, buena estabilidad y reproducibilidad. Amplio margen de respuesta lineal, insensible a cambios en la presión y la temperatura. El detector se coloca al final de las columnas, responde a la concentración del soluto y se registra en

función del tiempo y obteniéndose una serie de picos, generándose un gráfico que se denomina cromatograma. La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra.

Los detectores basados en una propiedad del soluto que no la suele presentar la fase móvil, suelen ser selectivos y sensibles, los cuales son:

- Detectores de absorbanza ultravioleta, son los más utilizados. Su fundamento es la espectrofotometría de absorción de luz visible y ultravioleta de un componente a una determinada longitud de onda. Los más potentes son los que utilizan un montaje de fotodiodos para registrar el espectro completo de cada soluto que pasa por el detector. Los datos de absorbanza se representan en función de la longitud de onda y del tiempo.
- Detectores de fluorescencia, son muy sensibles y selectivos, el principio de operación se basa en la irradiación con la luz UV al componente de interés y la posterior medida de la luz fluorescente emitida por éste.
- Detectores electroquímicos, ofrece ventajas debido a su especificidad, sensibilidad y amplia aplicabilidad, especialmente para compuestos orgánicos. Responde a analitos que puedan oxidarse o reducirse. Es el ejemplo de fenoles, aminas, peróxidos (pueden detectarse por oxidación) y cetonas, aldehídos (detectados por reducción). Las técnicas electroquímicas más utilizadas con esta finalidad son la amperometría, voltamperometría y coulombimetría.

Los detectores basados en una propiedad de la disolución, responden a un conjunto amplio de solutos, pero suelen ser poco sensibles:

- Detectores de índice de refracción, está formado por una celda con dos compartimentos, en uno se introduce el disolvente puro y en el otro la muestra, se hace pasar luz visible paralela. Cuando entra en la celda un soluto de distinto índice de refracción al disolvente el haz se desvía y varía la señal dada por la fotocelda. El principal inconveniente es que son muy sensibles a los cambios de temperatura y no resultan apropiados para trabajar con la modalidad de elusión con gradiente.
- Detectores de conductividad, son los más utilizados cuando los solutos eluidos son iónicos, como ácidos y bases, así como cationes y aniones inorgánicos después de su separación por cromatografía de cambio iónico. Tienen elevada sensibilidad, baratos y de larga duración.

VENTAJAS DE LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN:

- Sensibilidad de la técnica.
- Fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas.
- Idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles.
- Gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general.

DESVENTAJAS DE LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN:

- Por las presiones altas que se manejan en HPLC, el equipo necesario tiende a ser más sofisticado y caro que el que se utiliza en otros tipos de cromatografía.
- El solvente se debe filtrar a través de una membrana antes de utilizarse.
- Utilizar solventes de grados HPLC o de alta pureza lo que eleva los costos.
- El detector de fluorescencia es limitado por ciertas sustancias ya que no todas las sustancias fluorescen.^{5,6}

3.3 1,3,5-TRIMETOXIBENCENO; 1,3,5-TRIHIDROXIBENCENO Y CLONIXINATO DE LISINA, CÁPSULAS.

1,3,5-TRIMETOXIBENCENO

Usos. El 1,3,5-trimetoxibenceno o también conocido como trimetilfloroglucinol como nombre comercial pertenece al grupo de medicamentos antimuscarínicos sintéticos, los cuales poseen una acción relajante directa no específica sobre el músculo liso sin antagonizar a la acetilcolina. Este mecanismo de acción se traduce como una acción terapéutica analgésica en el dolor de tipo cólico o espástico en el tracto digestivo y genitourinario. El 1,3,5-trimetoxibenceno ejerce una acción inhibitoria del músculo liso y tiene acción sobre el esfínter de Oddi al que relaja. Es más activo que el 1,3,5-trihidroxibenceno y su actividad es de larga duración.

Propiedades físico-químicas.

Estado físico: Escamas pequeñas.

Apariencia: Color blanco a blanco cremoso.

Olor: Suave característico.

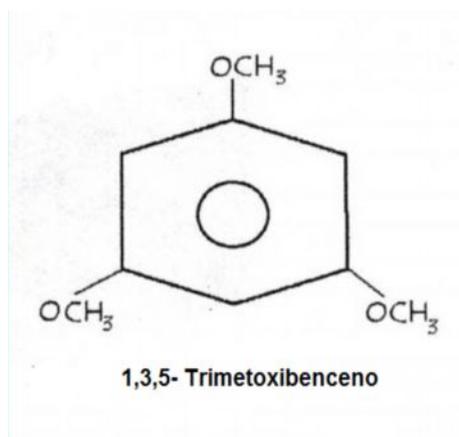
Punto de fusión: 50-52 °C

Solubilidad: Soluble en metanol, insoluble en agua fría

Fórmula molecular: C₉H₁₂O₃

Peso molecular: 168.19 g/mol

Fórmula desarrollada³:



1,3,5-TRIHIDROXIBENCENO

Usos. El 1,3, 5-trihidroxibenceno también conocido como floroglucinol como nombre comercial, también pertenece al grupo de medicamentos antimuscarínicos sintéticos, los cuales poseen una acción relajante directa no específica sobre el músculo liso sin antagonizar a la acetilcolina. Este mecanismo de acción se traduce como una acción terapéutica analgésica en el dolor de tipo cólico o espástico en el tracto digestivo y genitourinario. El 1,3,5-trihidroxibenceno, es un antiespasmódico de predominio muscular con acción fugaz secundaria a su rápida biotransformación. El 1,3,5-trimetoxibenceno y el 1,3,5-trihidroxibenceno poseen un amplio rango de seguridad y se han empleado con éxito en el alivio del dolor cólico vesicular y biliar, en patología ureteral litiásica y en pacientes dismenorreicas y en trabajo de parto.

Propiedades físico-químicas.

Estado físico: Polvo fino.

Apariencia: Color blanco o casi blanco.

Olor: Inodoro, de sabor dulce.

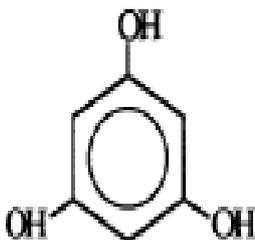
Punto de fusión: 217-219 °C

Solubilidad: Soluble en agua (1:100), soluble en metanol, éter, acetona, etanol (1:10), piridina (1:5), insoluble en cloroformo, benceno.

Fórmula molecular: C₆H₆O₃

Peso molecular: 126.11 g/mol

Fórmula desarrollada³:



1,3,5-Trihidroxibenceno

CLONIXINATO DE LISINA

Usos: El clonixinato de lisina es un medicamento analgésico tipo antiinflamatorio no esteroideo (AINE) con mayor eficacia en el área analgésica que en la antiinflamatoria, con buena tolerancia y con efectos similares a otros AINEs inhibidores de ambas ciclooxigenasas. Se absorbe rápidamente después de la administración oral, metabolizándose casi en su totalidad sin acumularse aun con administración crónica.

Propiedades físico-químicas.

Estado físico: Polvo fino.

Apariencia: Color ligeramente amarillento.

Olor: Ligeramente picante.

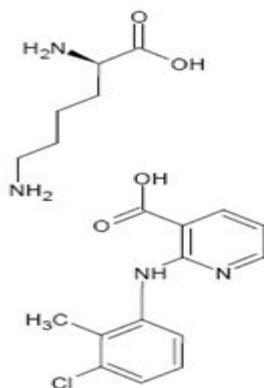
Punto de fusión: 205-210 °C

Solubilidad: Soluble en agua, metanol, cloroformo, ligeramente soluble en alcohol, insoluble en soluciones comunes neutras.

Fórmula molecular: $C_{13}H_{11}Cl N_2O_2 \cdot C_6H_{14}N_2O_2$

Peso molecular: 408.89 g/mol^{7,8,9,10}

Fórmula desarrollada⁷:



Clonixinato de lisina

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una de las responsabilidades de la industria farmacéutica mexicana es asegurar la calidad de los medicamentos, esto se logra a través del cumplimiento de las buenas prácticas de fabricación y de laboratorio, así como contar con métodos analíticos validados, ya que la validación de métodos analíticos es el proceso mediante el cual queda establecido a través de pruebas de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. De tal forma que cualquier técnica analítica empleada en el control y liberación de un producto debe estar validada conforme a la normatividad vigente. Las técnicas analíticas presentes en las farmacopeas para cuantificar la pureza de los principios activos presentes en un medicamento resultan a veces difíciles de realizar, algunas solo son para uno o dos principios activos o en su defecto no existen, para estos últimos casos es necesario realizar la validación interna del método analítico por parte del laboratorio farmacéutico para garantizar la calidad del mismo. Estas validaciones de métodos analíticos por lo regular se llevan a cabo por espectrofotometría UV-Visible o por Cromatografía de Líquidos de alta resolución (HPLC).

Para este caso en especial se cuenta con un método analítico alternativo por espectrofotometría UV, para cuantificar a los principios activos 1,3,5-Trimetoxibenceno; 1,3,5-Trihidroxibenceno y Clonixinato de lisina presentes en cápsulas como forma farmacéutica, sin embargo el método no es específico para los tres principios activos, ya que solo se identifican y cuantifican dos, por lo tanto, se desarrolló una metodología por la técnica de HPLC, la cual separa, identifica y cuantifica a los tres componentes presentes en el medicamento. El presente trabajo consiste en llevar a cabo la validación del método analítico por HPLC para tener la evidencia documentada que demuestre que el método analítico puede ser utilizado por el departamento de control de calidad de una forma segura y confiable para controlar y liberar el producto farmacéutico.

5. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

En la actualidad existen medicamentos que contienen en su formulación más de dos principios activos lo cual implica mayor tiempo de análisis y mayor cantidad de reactivos, en el caso de que se tuvieran que cuantificar por separado, sin embargo debido al desarrollo de nuevas tecnologías y de equipos sofisticados, la industria farmacéutica se ha provisto de sistemas más veloces y reproducibles y una técnica que ha venido creciendo es la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) desplazando en algunos casos a la técnica por espectrofotometría ultravioleta-visible.

Por otra parte la Secretaría de Salud es el organismo encargado de regular a la industria farmacéutica, entre otras instituciones dedicadas a la salud, por lo que es necesario que la industria farmacéutica cuente con métodos analíticos que sean rápidos, confiables y consistentes, esto significa que deben estar validados para cumplir con la normatividad vigente.

Es por ello que el presente trabajo consiste en demostrar a través de pruebas de laboratorio que el método analítico por HPLC para la cuantificación de 1,3,5-trihidroxibenceno; 1,3,5-trimetoxibenceno y clonixinato de lisina presentes en un medicamento en forma farmacéutica de cápsulas cumple su propósito.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Validar el método analítico por HPLC para cuantificar 1,3,5-Trihidroxibenceno; 1,3,5-Trimetoxibenceno y Clonixinato de Lisina en cápsulas y demostrar que cumple con los criterios de aceptación predeterminados para los parámetros de desempeño del método analítico.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el desempeño del sistema mediante los parámetros de Adecuabilidad, Precisión y Linealidad del Sistema.
- Demostrar la Especificidad del Método.
- Evaluar el desempeño y la Reproducibilidad del método mediante los parámetros de Exactitud, Repetibilidad, Linealidad del Método y Precisión Intermedia.
- Establecer la Estabilidad analítica de la muestra.
- Determinar la capacidad del método para ser reproducible a variaciones pequeñas pero deliberadas en las condiciones normales de operación.
- Determinar la tolerancia del método utilizando diferentes equipos de HPLC.
- Aplicar el método validado para la liberación y control del producto terminado.

7. HIPÓTESIS

Sí el método analítico por HPLC para cuantificar a los principios activos 1,3,5-Trihidroxibenceno; 1,3,5-Trimetoxibenceno y Clonixinato de lisina en cápsulas cumple con los parámetros de desempeño tales como Linealidad y Precisión del Sistema, Especificidad, Exactitud, Repetibilidad, Linealidad del método, Precisión intermedia, Estabilidad analítica de la muestra, Tolerancia y Robustez, se asegurará su desempeño y capacidad analítica.

8. MATERIAL, EQUIPOS Y CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

Se utilizo el siguiente material, equipo y condiciones cromatográficas.

EQUIPO

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Waters modelo 1515
- Columna analítica Xterra Waters RP C18, 5 µm, 4.6x150 mm.
- Balanza analítica Mettler Toledo XS204, Máx 220 g, d= 0.1mg
- Baño de ultrasonido.

MATERIAL

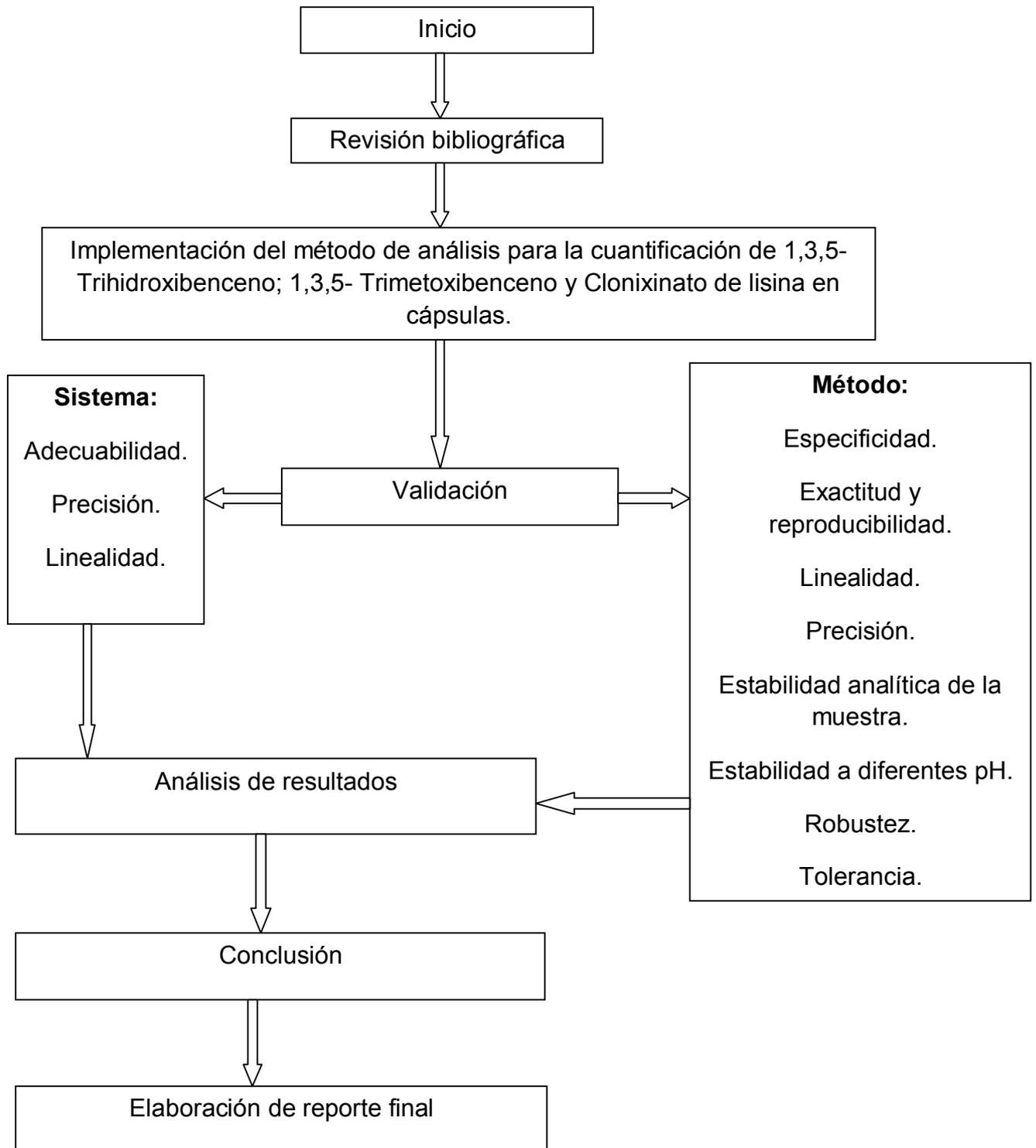
- Estándar secundario de 1, 3,5 Trihidroxibenceno, Pureza: 100.0% BH
- Estándar secundario de 1, 3,5 Trimetoxibenceno, Pureza: 99.99% BH
- Estándar secundario de Clonixinato de lisina, Pureza: 99.39% BH
- Matraces aforados, pipetas volumétricas y bureta volumétrica de 10 mL.
- Viales transparentes de 2 mL con tapa.
- Acrodiscos millipore millex- LCR Hydrophilic PTFE de 0.45 µm.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

- Flujo: 1.0 mL/min.
- Longitud de onda: 265 nm.
- Volumen de inyección: 20 microlitros.
- Temperatura de la columna: 25°C
- Fase móvil: Metanol HPLC marca tecsiquim: Agua HPLC marca tecsiquim: Acido acético glacial marca tecsiquim (740mL: 250mL: 10mL).

9. METODOLOGÍA

DIAGRAMA DE FLUJO



9.1 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

Preparar un estándar de referencia con los tres principios activos correspondiente al nivel del 100% (32 µg/mL de 1,3,5-Trihidroxibenceno, 32 µg/mL de 1,3,5-Trimetoxibenceno y 50 µg/mL de Clonixinato de lisina), inyectar por sextuplicado al HPLC, reportar el área obtenida para cada inyección y calcular el CV (Coeficiente de Variación) de estos datos. De acuerdo a los resultados obtenidos determinar si cumple la prueba de adecuabilidad.

Criterio de aceptación: El CV para las 6 inyecciones debe ser $\leq 2.0\%$

9.2 PRECISIÓN DEL SISTEMA

Preparar por sextuplicado soluciones del estándar de referencia a la concentración del analito que represente la concentración del 100% (32 µg/mL de 1,3,5-Trihidroxibenceno, 32 µg/mL de 1,3,5-Trimetoxibenceno y 50 µg/mL de Clonixinato de lisina) preparadas por dilución a partir de una solución stock concentrada. Reportar la cantidad pesada y la respuesta analítica para cada análisis y calcular el CV de la respuesta analítica. De acuerdo a los resultados obtenidos, determinar si es preciso.

Criterio de aceptación: $CV \leq 1.5\%$

9.3 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Realizar el siguiente procedimiento para la linealidad del sistema, preparar por triplicado 5 niveles de concentración. La concentración central debe ser igual a la que se prepara la solución de referencia en el método o la que represente el 100% en la muestra procesada para su medición. Preparar una solución stock de 1,3,5-Trihidroxibenceno a una concentración de 320 µg/mL , 1,3,5-Trimetoxibenceno a una concentración de 320 µg/mL y una de Clonixinato de lisina a una concentración de 500 µg/mL, pesando 32 mg de 1,3,5-Trihidroxibenceno, 32 mg de 1,3,5-Trimetoxibenceno y 50 mg de Clonixinato de lisina y llevándolos a un matraz volumétrico de 100 mL a partir del cual se hacen las diluciones adecuadas para obtener las concentraciones correspondientes a los niveles de concentración elegidos de acuerdo con lo indicado en las siguientes tablas:

Tabla1. Diluciones de la solución stock de 1,3,5-Trihidroxibenceno; 1,3,5-Trimetoxibenceno.

Nivel de concentración (%)	Alícuota tomada de la solución stock (mL)	Volumen de aforo (mL)	Concentración final µg/mL
60	3.0	50	19.2
80	4.0	50	25.6
100	5.0	50	32.0
110	5.5	50	35.2
120	6.0	50	38.4

Tabla2. Diluciones de la solución stock de Clonixinato de lisina.

Nivel de concentración (%)	Alícuota tomada de la solución stock (mL)	Volumen de aforo (mL)	Concentración final µg/mL
60	3.0	50	30
80	4.0	50	40
100	5.0	50	50
110	5.5	50	55
120	6.0	50	60

Medir y reportar las respuestas analíticas de cada análisis para los diferentes niveles de concentración bajo las mismas condiciones de medición. Elaborar la gráfica de concentración del analito contra la respuesta obtenida, determinar el coeficiente de correlación e intervalo de confianza para la pendiente. De acuerdo a los resultados obtenidos de la curva comparar con los criterios de aceptación y se determina si el sistema es lineal.

Criterio de aceptación:

Coeficiente de determinación: $r^2 \geq 0.98$.

Intervalo de confianza para la pendiente: IC (β_1) no debe incluir el cero.

9.4 ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO

Preparar un placebo analítico que contenga todos los componentes de la formulación excepto los principios activos y analizar por triplicado conforme al método analítico. Evaluar y reportar la respuesta del placebo analítico al método bajo las mismas condiciones de análisis, de acuerdo a esto determinar si es específico o no.

Criterio de aceptación: Confirmar que el método es capaz de separar las sustancias de interés de cualquier interferencia presente, obteniéndose solamente respuesta del analito de interés.

La formulación por cápsula es:

Principios activos:

1,3,5- Trihidroxibenceno	80 mg
1,3,5- Trimetoxibenceno	80 mg
Clonixinato de lisina	125 mg
Excipientes	195 mg
Peso total:	480 mg

9.5 EXACTITUD Y REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO.

A la cantidad del placebo analítico (195.0 mg de excipientes) equivalente a una muestra analítica se le adicionan la cantidad de principios activos presentes en una cápsula (80.0 mg 1,3,5-Trihidroxibenceno, 80.0 mg 1,3,5-Trimetoxibenceno y 125.0 mg de Clonixinato de lisina) para obtener el placebo cargado con un peso promedio de 480.0 mg. Preparar por sextuplicado este placebo cargado (activos más excipientes) de acuerdo a la formulación, así como un estándar de referencia. Hacer las diluciones de la muestra y estándar para obtener las concentraciones de 32 µg/mL de 1,3,5-Trihidroxibenceno, 32 µg/mL de 1,3,5- Trimetoxibenceno y 50 µg/mL de Clonixinato de lisina) analizar bajo las mismas condiciones estándar y muestra.

Reportar la cantidad pesada, pureza y respuesta analítica obtenida del estándar; así como las cantidades pesadas y respuesta de las determinaciones del placebo cargado. Se toma como referencia el resultado del estándar para determinar la cantidad recuperada del analito y calcular el porcentaje de recobro. Calcular la media aritmética, desviación estándar, CV, intervalo de confianza para la media poblacional del porcentaje de recobro. Se comparan los resultados obtenidos con los criterios de aceptación para saber si el método es exacto y repetible.

Criterio de aceptación: El IC (μ) (Intervalo de confianza de la media poblacional) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo de 98%-102%.

El CV del porciento de recobro \leq 2.0%.

9.6. LINEALIDAD DEL MÉTODO.

Preparar un placebo cargado de la siguiente manera: a la cantidad de placebo analítico (195.0 mg excipientes) equivalente a una muestra analítica adicionarle la cantidad de activos correspondientes al 100%, es decir 80.0 mg 1, 3,5-Trihidroxibenceno, 80.0 mg 1,3,5-Trimetoxibenceno, y 125.0 mg de Clonixinato de lisina), llevarlo a un matraz volumétrico de 25 mL, esta es la solución stock de placebo cargado. Seleccionar dos niveles tanto superior como inferior de la cantidad del analito adicionado correspondiente al 100%. Preparar por triplicado, 5 niveles de concentración por dilución a partir de la solución stock del placebo cargado, de acuerdo con las tablas 3 y 4, además preparar un estándar de referencia al nivel de concentración al 100% (32 $\mu\text{g/mL}$ de 1,3,5-Trihidroxibenceno, 32 $\mu\text{g/mL}$ de 1,3,5-Trimetoxibenceno y 50 $\mu\text{g/mL}$ de Clonixinato de lisina) tratado bajo las mismas condiciones analíticas que las muestras.

Tabla 3. Diluciones de la solución stock del placebo cargado de 1,3,5-Trihidroxibenceno; 1,3,5-Trimetoxibenceno.

Nivel de concentración (%)	Alícuota tomada de la solución stock (mL)	Volumen de aforo (mL)	Concentración final µg/mL
60	0.6	100	19.2
80	0.8	100	25.6
100	1.0	100	32.0
110	1.1	100	35.2
120	1.2	100	38.4

Tabla 4. Diluciones de la solución stock del placebo cargado de Clonixinato de lisina.

Nivel de concentración (%)	Alícuota tomada de la solución stock (mL)	Volumen de aforo (mL)	Concentración final µg/mL
60	0.6	100	30
80	0.8	100	40
100	1.0	100	50
110	1.1	100	55
120	1.2	100	60

Reportar la cantidad pesada, pureza y respuesta obtenida del estándar; así como cantidades pesadas y respuesta analítica de las determinaciones de los niveles de concentración. Tomar como referencia el resultado del estándar secundario para determinar la cantidad recuperada del analito y calcular el porcentaje de recobro.

Criterio de aceptación: Coeficiente de determinación $r^2 \geq 0.98$.

IC (β_0) debe incluir el cero.

IC (β_1) debe incluir la unidad.

IC (μ) debe incluir el 100% o que el promedio aritmético del porcentaje de recobro se incluya en el intervalo de 98%-102%.

El CV del porciento de recobro debe ser $\leq 2\%$

9.7 PRECISIÓN DEL MÉTODO

Preparar un placebo cargado correspondiente al 100% (32 µg/mL de 1, 3,5-Trihidroxibenceno, 32 µg/mL de 1,3,5- Trimetoxibenceno y 50 µg/mL de Clonixinato de lisina) analizar por triplicado por dos analistas diferentes en dos días diferentes. Utilizando la misma sustancia de referencia, los mismos instrumentos y los mismos equipos, analizar también un estándar preparado a la concentración del 100%.

Reportar la cantidad pesada, pureza y respuesta obtenida del analito; así como cantidades pesadas y respuesta analítica de las determinaciones del placebo. Calcular el contenido de los tres analitos en todas las muestras. Calcular la media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación del contenido, empleando todos los resultados obtenidos.

Criterio de aceptación: El Coeficiente de variación (CV) \leq 2.0% para métodos cromatográficos.

9.8 ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA.

Preparar un placebo cargado correspondiente al 100% (32 µg/ml de 1, 3,5-Trihidroxibenceno, 32 µg/ml de 1,3,5- Trimetoxibenceno y 50 µg/ml de Clonixinato de lisina), realizar el análisis por triplicado obteniendo una comparación de resultados del análisis inicial de las tres muestras, con los resultados obtenidos con las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones. Es importante que cada lectura obtenida a diferente condición sea comparada con una solución estándar al 100% (32 µg/ml de 1,3,5-Trihidroxibenceno, 32 µg/ml de 1,3,5- Trimetoxibenceno y 50 µg/ml de Clonixinato de lisina) preparada al momento de leer las muestras.

Condición 1. Temperatura 25°C y sin protección a la luz durante 3 horas.

Condición 2. Temperatura 25°C y sin protección a la luz durante 24 horas.

Condición 3. En refrigeración a 8°C y sin protección a la luz durante 24 horas.

Reportar la cantidad pesada, pureza y respuesta obtenida del estándar: así como cantidades pesadas y respuesta analítica de las determinaciones a las diferentes condiciones. Tomar como referencia el resultado del estándar para determinar la cantidad recuperada del analito y calcular el porcentaje de recobro. Calcular la media aritmética del análisis inicial y de cada condición de almacenaje respecto del análisis inicial.

Criterio de aceptación: La diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto del análisis inicial $|d_i| \leq 2.0\%$.

9.9 MÉTODO DE ESTABILIDAD DE LA MUESTRA A DIFERENTES pH.

Preparar un placebo cargado correspondiente al 100% (32 $\mu\text{g/ml}$ de 1, 3,5-Trihidroxibenceno, 32 $\mu\text{g/ml}$ de 1,3,5-Trimetoxibenceno y 50 $\mu\text{g/ml}$ de Clonixinato de lisina), realizar el análisis por triplicado y realizar los aforos con ácido fosfórico 1.0N. Preparar un estándar de referencia al nivel de concentración al 100% (32 $\mu\text{g/ml}$ de 1,3,5-Trihidroxibenceno, 32 $\mu\text{g/ml}$ de 1, 3,5-Trimetoxibenceno y 50 $\mu\text{g/ml}$ de Clonixinato de lisina) preparado a las condiciones normales. En caso de no observar una disminución en la respuesta analítica, usar NaOH 1.0N.

Criterio de aceptación: Se debe observar una reducción considerable en las áreas. De observar esta situación la muestra es sensible a cambios de pH.

9.10 ROBUSTEZ DEL MÉTODO

Preparar un placebo cargado correspondiente al 100% (32 $\mu\text{g/mL}$ de 1, 3,5-Trihidroxibenceno, 32 $\mu\text{g/mL}$ de 1,3,5-Trimetoxibenceno y 50 $\mu\text{g/mL}$ de Clonixinato de lisina), realizar por triplicado. Preparar un estándar de referencia al nivel de concentración al 100% (32 $\mu\text{g/mL}$ de 1,3,5-Trihidroxibenceno, 32 $\mu\text{g/mL}$ de 1,3,5-Trimetoxibenceno y 50 $\mu\text{g/mL}$ de Clonixinato de lisina) preparado a las condiciones normales.

Llevar a cabo el análisis variando las siguientes condiciones internas:

- Flujo normal 1.0 mL/min, manteniendo constantes las demás condiciones de análisis.
- Flujo de 0.7 mL/min en vez de 1.0 mL/min, manteniendo constantes las demás condiciones de análisis.
- Flujo de 1.4 mL/min en vez de 1.0 mL/min, manteniendo constantes las demás condiciones de análisis.

En cada condición de operación distinta; así como la condición normal, analizar la misma muestra por triplicado. Reportar el contenido del analito para las muestras en condición normal de operación y para las muestras de las otras condiciones de operación expresadas como %.

Criterios de aceptación: diferencia absoluta= $|d_i| \leq 2\%$.

9.11 TOLERANCIA DEL MÉTODO

Preparar un placebo cargado correspondiente al 100% (32 µg/mL de 1, 3,5-Trihidroxibenceno, 32 µg/mL de 1,3,5-Trimetoxibenceno y 50 µg/mL de Clonixinato de lisina), realizar por triplicado. Preparar un estándar de referencia al nivel de concentración al 100% (32 µg/mL de 1,3,5-Trihidroxibenceno, 32 µg/mL de 1,3,5-Trimetoxibenceno y 50 µg/mL de Clonixinato de lisina) preparado a las condiciones normales.

Llevar a cabo el análisis variando la siguiente condición:

- HPLC WATERS modelo 510, inyección manual en vez de HPLC WATERS modelo 1515, inyección automatizada.

Analizar una misma muestra por triplicado y el estándar de referencia a la condición anterior. Reportar el contenido analítico de todas las muestras. Así como calcular la media aritmética, desviación estándar y CV del contenido de los activos.

Criterios de aceptación: $CV \leq 2\%$

10. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

10.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Se obtuvieron los resultados que se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 5. Resultados linealidad del sistema 1,3,5-Trihidroxibenceno.

Nivel	Concentración teórica (µg/mL)	Concentración real (%) X	Área muestra Y	XY	X ²	Y ²
60%	19.2	58.37	73053	4263753.21	3406.4970	5336740809
	19.2	58.5	73017	4271657.52	3422.5112	5331482289
	19.2	58.01	72774	4221818.11	3365.4764	5296055076
80%	25.6	83.37	104352	8699964.96	6950.7785	10889339904
	25.6	83.28	103943	8656432.55	6935.6538	10804147249
	25.6	82.71	103754	8581371.90	6840.7505	10764892516
100%	32.0	99.8	124915	12466517.00	9960.0400	15603757225
	32.0	99.8	124561	12431187.80	9960.0400	15515442721
	32.0	99.8	125194	12494361.20	9960.0400	15673537636
110%	35.2	113.78	142415	1620493.38	12946.2314	20282032225
	35.2	114.24	142582	16288378.76	13050.4749	20329626724
	35.2	113.63	142539	1619648.85	12911.0471	20317366521
120%	38.4	123.59	154692	19118405.02	15274.5212	23929614864
	38.4	123.75	154457	19114530.97	15314.8272	23856964849
	38.4	123.15	154485	19024780.74	15165.8475	23865615225
Σ		1435.78	58.37	73053	145464.736	227796615833
n =15	Σ ²	2061466.46	3228249473289			

Resultados estadísticos de la linealidad del sistema.

Todos los resultados obtenidos en la presente validación fueron calculados en una hoja de cálculo de Excel, versión Microsoft office 2006, Windows XP.

Pendiente (b_1).

$$b_1 = 1251.3159$$

Ordenada al origen (b_0).

$$b_0 = 7.8433$$

Coefficiente de determinación (r^2).

$$r^2 = 0.99992$$

Intervalo de confianza: $IC(\beta_1) = b_1 \pm (t_{n-2, 0.975}) S_{b1}$.

$$S_{b1} = 3.06$$

$$t_{13, 0.975} = 2.16$$

$$IC(\beta_1) = 1251.3159 + 2.16 \times 3.06 = 1257.9315$$

$$IC(\beta_1) = 1251.3159 - 2.16 \times 3.06 = 1244.7003.$$

El intervalo de confianza no incluye el cero.

Tabla 6. Resultados linealidad del sistema 1,3,5-Trimetoxibenceno.

Nivel	Concentración teórica (µg/mL)	Concentración real (%) X	Área muestra Y	XY	X ²	Y ²
60%	19.2	62.53	63848	3992120.70	3909.4236	4076567104
	19.2	62.50	64029	4001918.44	3906.4568	4099712841
	19.2	63.05	64214	4048936.39	3975.7811	4123437796
80%	25.6	83.57	85340	7132049.44	6984.3085	7282915600
	25.6	82.46	84474	6965638.21	6799.4801	7135856676
	25.6	83.50	85034	7100136.93	6971.8532	7230781156
100%	32.0	99.89	102003	10189079.67	9978.0121	10404612009
	32.0	99.89	102331	10221843.59	9978.0121	10471633561
	32.0	99.89	101728	10161609.92	9978.0121	10348585984
110%	35.2	113.95	116361	13259402.62	12984.7331	13539882321
	35.2	113.47	116238	13188975.23	12874.3659	13511272644
	35.2	114.15	116251	13270121.58	13030.3598	13514295001
120%	38.4	124.51	127145	15830974.18	15503.0343	16165851025
	38.4	123.95	126981	15739548.88	15364.0983	16124174361
	38.4	124.52	126815	15791477.25	15506.1602	16082044225
Σ		1451.83	1482792	150893833.03	147744.091	154111622304
n =15	Σ ²	2107819	2198672115264			

Resultados estadísticos de la linealidad del sistema.

Pendiente (b₁).

b₁= 1021.2175

Ordenada al origen (b₀).

b₀= 10.3230

Coeficiente de determinación (r^2).

$$r^2 = 0.99988$$

Intervalo de confianza: $IC(\beta_1) = b_1 \pm (t_{n-2, 0.975}) S_{b1}$.

$$S_{b1} = 3.09$$

$$t_{13, 0.975} = 2.16$$

$$IC(\beta_1) = 1021.2175 + 2.16 \times 3.09 = 1027.8982$$

$$IC(\beta_1) = 1021.2175 - 2.16 \times 3.09 = 1014.5367$$

El intervalo de confianza no incluye el cero.

Tabla 7. Resultados linealidad del sistema Clonixinato de Lisina.

Nivel	Concentración teórica (µg/mL)	Concentración real (%) X	Área muestra Y	XY	X ²	Y ²
60%	30	62.12	890219	55296900.04	3858.405	792489867961
	30	62.11	887489	55118621.35	3857.187	787636725121
	30	61.83	885578	54757246.72	3823.222	784248394084
80%	40	83.25	1193082	99322502.64	6930.342	1423444658724
	40	83.28	1190066	99109317.12	6935.645	1416257084356
	40	82.96	1188165	98569255.25	6882.234	1411736067225
100%	50	99.39	1424412	141572308.68	9878.372	2028949545744
	50	99.39	1420268	141160436.52	9878.372	2017161191824
	50	99.39	1423491	141480770.49	9878.372	2026326627081
110%	55	113.92	1632626	185986098.35	12977.395	2665467655876
	55	114.00	1629082	185719830.55	12996.627	2653908162724
	55	113.70	1628479	185162181.98	12928.265	2651943853441
120%	60	123.92	1775934	220069932.63	15355.634	3153941572356
	60	124.02	1772273	219803007.73	15381.759	3140951586529
	60	123.84	1773685	219654928.10	15336.593	3145958479225
Σ		1447.12	20714849	2102783338.14	146898.430	30100421472271
n =15	Σ ²	2094152.54	429104969092801			

Resultados estadísticos de la linealidad del sistema.

Pendiente (b₁).

$$b_1 = 14314.3852$$

Ordenada al origen (b₀).

$$b_0 = 15.6337$$

Coefficiente de determinación (r²).

$$r^2 = 0.99997$$

Intervalo de confianza para la pendiente: IC (β_1)= $b_1 \pm (t_{n-2,0.975}) S_{b1}$.

$S_{b1} = 22.27$

$t_{13, 0.975} = 2.16$

IC (β_1)= $14314.3852 + 2.16 \times 22.27 = 14362.4899$

IC (β_1)= $14314.3852 - 2.16 \times 22.27 = 14266.2804$

El intervalo de confianza no incluye el cero.

Gráfico1. Linealidad del sistema de 1,3,5-Trihidroxibenceno.

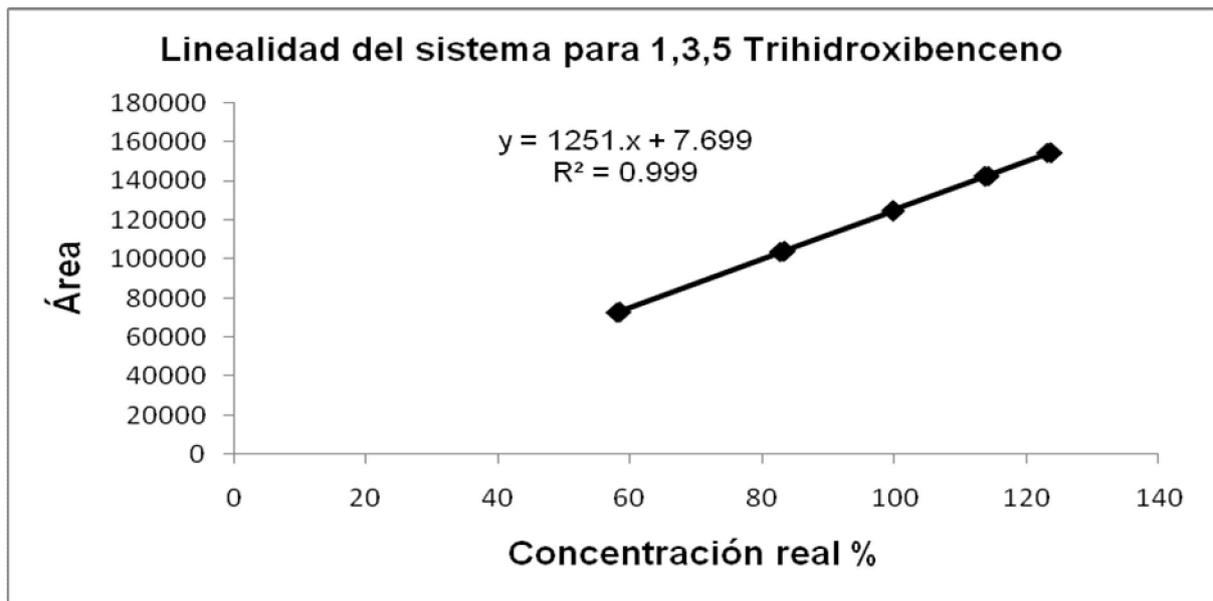


Gráfico2. Linealidad del sistema de 1,3,5 -Trimetoxibenceno.

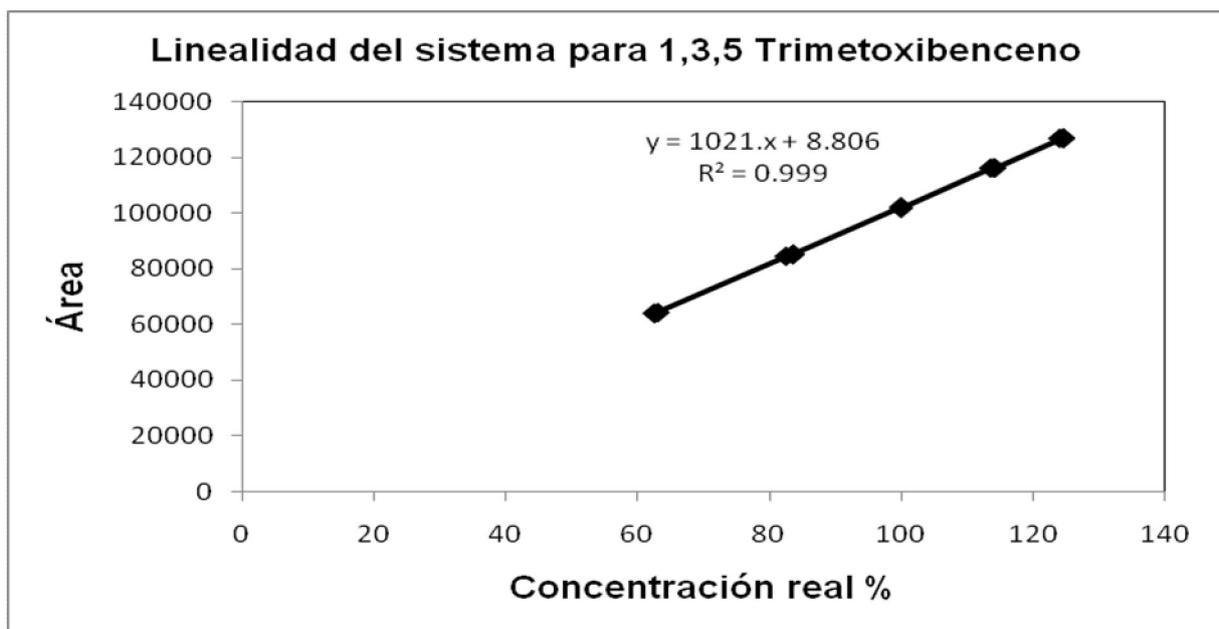


Gráfico 3. Linealidad del sistema de Clonixinato de lisina.

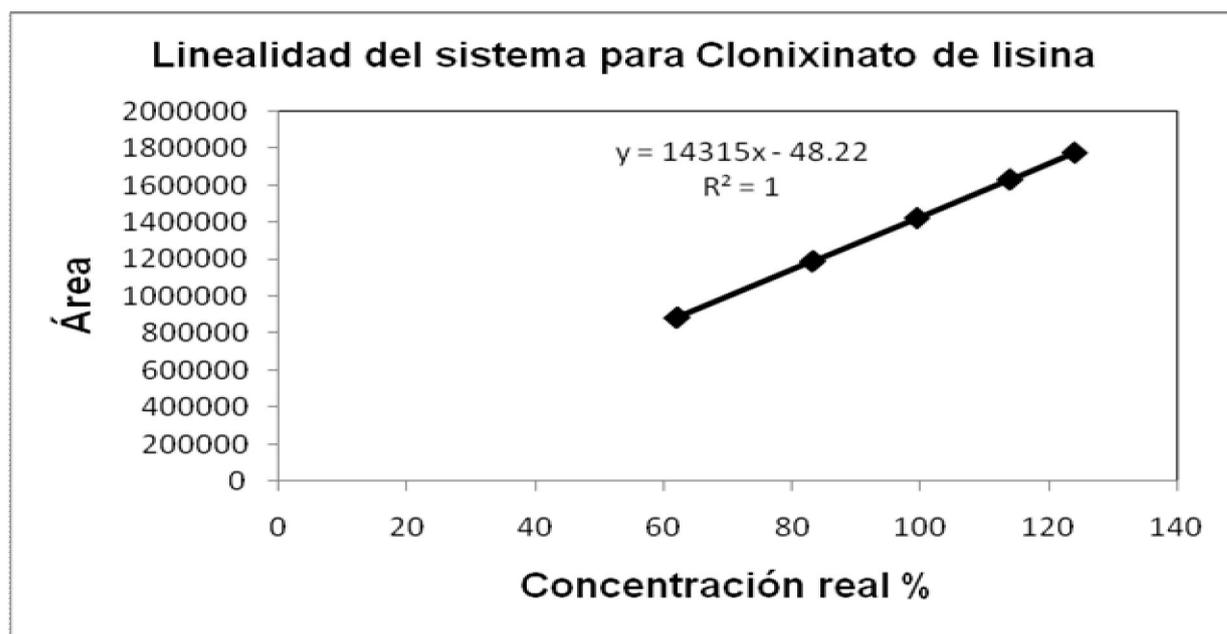


Tabla 8. Análisis de resultados. Linealidad del sistema

RESULTADOS				
Criterio de aceptación	1,3,5 Trihidroxibenceno	1,3,5 Trimetoxibenceno	Clonixinato de lisina	Cumplen
$r^2 \geq 0.98$	$r^2 = 0.99992$	$r^2 = 0.99988$	$r^2 = 0.99997$	SI
IC(β_1) no incluye el 0	IC(β_1) = 1257.9315_1244.7003	IC(β_1) = 1027.8982_1244.7003	IC(β_1) = 14362.4899_14266.2804	SI

Se observa que los resultados cumplen con los criterios de aceptación estipulados para la linealidad del sistema, tanto para r^2 (coeficiente de determinación) de 1,3,5-Trihidroxibenceno; 1,3,5-Trimetoxibenceno y Clonixinato de lisina así como para el IC (β_1) de los mismos, lo que indica que el sistema es lineal.

10.2 PRECISIÓN DEL SISTEMA

Tabla 9. Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente tabla:

No	Cantidad pesada STD (mg)		Área Y		
	1,3,5 Trihidroxibenceno y 1,3,5 Trimetoxibenceno	Clonixinato de lisina	1,3,5 Trihidroxibenceno	1,3,5 Trimetoxibenceno	Clonixinato de lisina
1	32.0	50.0	1691.6	1483.8	21343.7
2	32.0	50.0	1700.2	1487.9	21263.7
3	32.0	50.0	1692.3	1489.0	21215.5
4	32.0	50.0	1689.5	1485.4	21239.5
5	32.0	50.0	1690.1	1480.8	21169.3
6	32.0	50.0	1681.1	1458.4	20572.6

Resultados estadísticos de la precisión del sistema.

Media aritmética (\bar{Y})

$$\bar{Y}_{1,3,5\text{-Trijidroxibenceno}} = 1690.80$$

$$\bar{Y}_{1,3,5\text{-Trimetoxibenceno}} = 1480.88$$

$$\bar{Y}_{\text{Clonixinato de lisina}} = 21134.05$$

Desviación estándar (S)

$$S_{1,3,5\text{-Trijidroxibenceno}} = 6.12$$

$$S_{1,3,5\text{-Trimetoxibenceno}} = 11.40$$

$$S_{\text{Clonixinato de lisina}} = 281.06$$

Coefficiente de variación (CV)

$$CV_{1,3,5\text{-Trijidroxibenceno}} = 0.36\%$$

$$CV_{1,3,5\text{-Trimetoxibenceno}} = 0.77\%$$

$$CV_{\text{Clonixinato de lisina}} = 1.33\%$$

El CV para los 3 activos no excede el 1.5%.

Tabla 10. Análisis de resultados Precisión del sistema

Criterio de aceptación	Resultados			Cumplen
	1,3,5 Trihidroxibenceno	1,3,5 Trimetoxibenceno	Clonixinato de lisina	
CV≤1.5%	CV= 0.36%	CV= 0.77%	CV= 1.33%	SI

Los resultados obtenidos del coeficiente de variación (CV) para Clonixinato de lisina, 1,3,5-Trihidroxibenceno y 1,3,5-Trimetoxibenceno cumplen con el criterio de aceptación, lo que indica que el sistema es preciso.

10.3 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

Tabla 11. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

No	Cantidad pesada STD (mg)		Área Y		
	1,3,5 Trihidroxibenceno y 1,3,5 Trimetoxibenceno	Clonixinato de lisina	1,3,5 Trihidroxibenceno	1,3,5 Trimetoxibenceno	Clonixinato de lisina
1	32.0	50.0	122699	109951	1452297
2	32.0	50.0	120903	109640	1441096
3	32.0	50.0	121585	109115	1434835
4	32.0	50.0	120259	108742	1434007
5	32.0	50.0	122795	109797	1454558
6	32.0	50.0	121860	109777	1453405

Resultados estadísticos de la adecuabilidad del sistema.

Media aritmética (\bar{Y})

$$\bar{Y}_{1,3,5\text{-Trijidroxibenceno}} = 121683.50$$

$$\bar{Y}_{1,3,5\text{-Trimetoxibenceno}} = 109503.67$$

$$\bar{Y}_{\text{Clonixinato de lisina}} = 1445033$$

Desviación estándar (S)

S_{1,3,5-Trihidroxibenceno} = 994.5760

S_{1,3,5-Trimetoxibenceno} = 471.3061

S_{Clonixinato de lisina} = 9535.7596

Coefficiente de variación (CV)

CV_{1,3,5-Trihidroxibenceno} = 0.82%

CV_{1,3,5-Trimetoxibenceno} = 0.43%

CV_{Clonixinato de lisina} = 0.66%

El CV para los 3 activos no excede el 2.0%.

Tabla 12. Análisis de resultados de Adecuabilidad del sistema

Criterio de aceptación	Resultados			Cumplen
	1,3,5 Trihidroxibenceno	1,3,5 Trimetoxibenceno	Clonixinato de lisina	
CV ≤ 2.0%	CV = 0.82%	CV = 0.43%	CV = 0.66%	SI

Los resultados obtenidos del coeficiente de variación (CV) para Clonixinato de lisina, 1,3,5-Trihidroxibenceno y 1,3,5-Trimetoxibenceno cumplen con el criterio de aceptación, lo que indica que el sistema es adecuado.

10.4 ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO

Los espectros de CLAR(Cromatografía de líquidos de alta resolución) correspondientes tanto al estándar como a los placebos analizados, se observa que las inyecciones correspondientes a los placebos no presentan respuesta analítica, mientras que para el estándar se obtienen tres señales perfectamente separadas correspondientes a los tres analitos en cuestión, ver Figuras 3, 4, 5, 6 y 7.

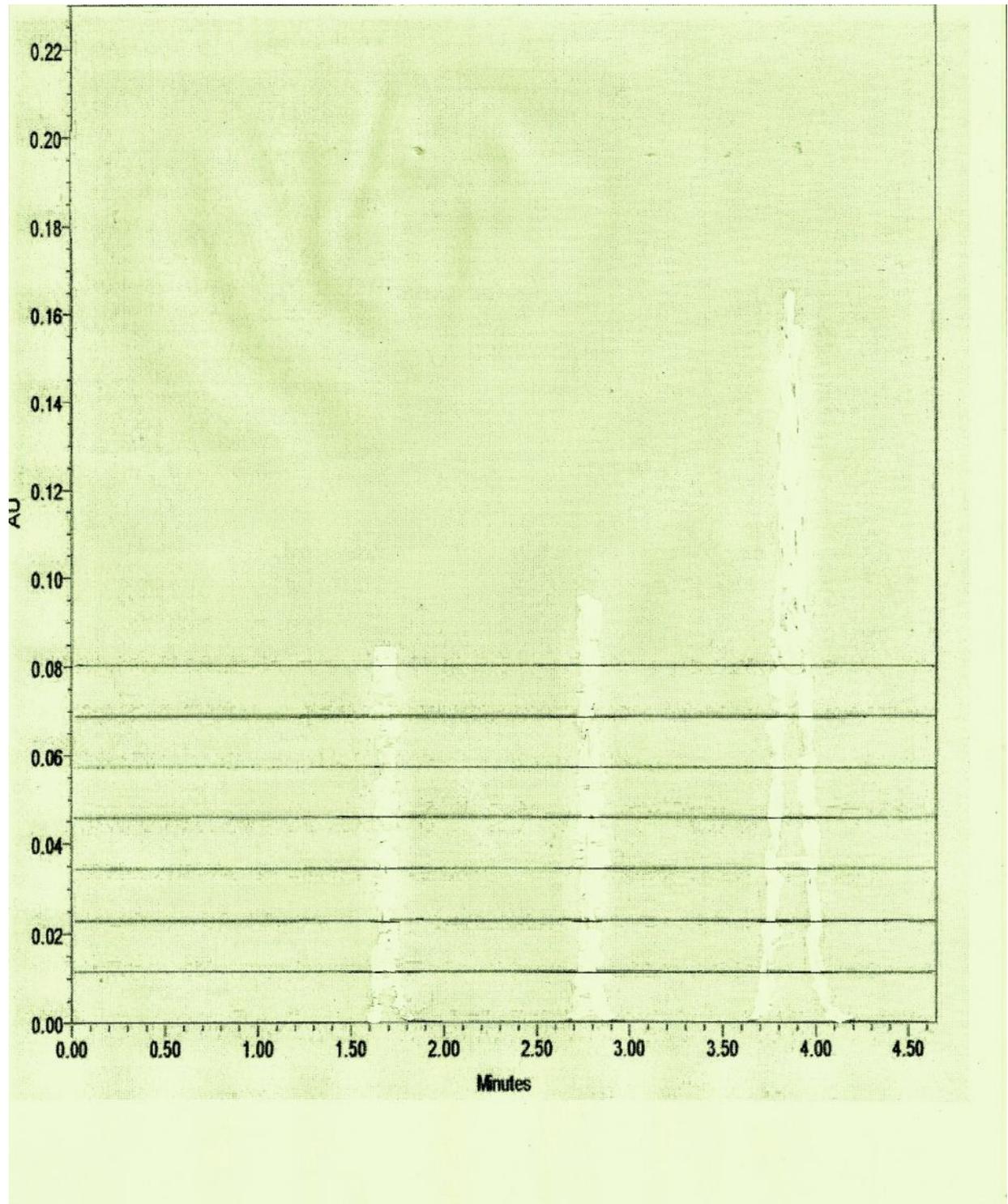


Figura 3. Cromatograma del placebo analítico y fase móvil sin respuesta

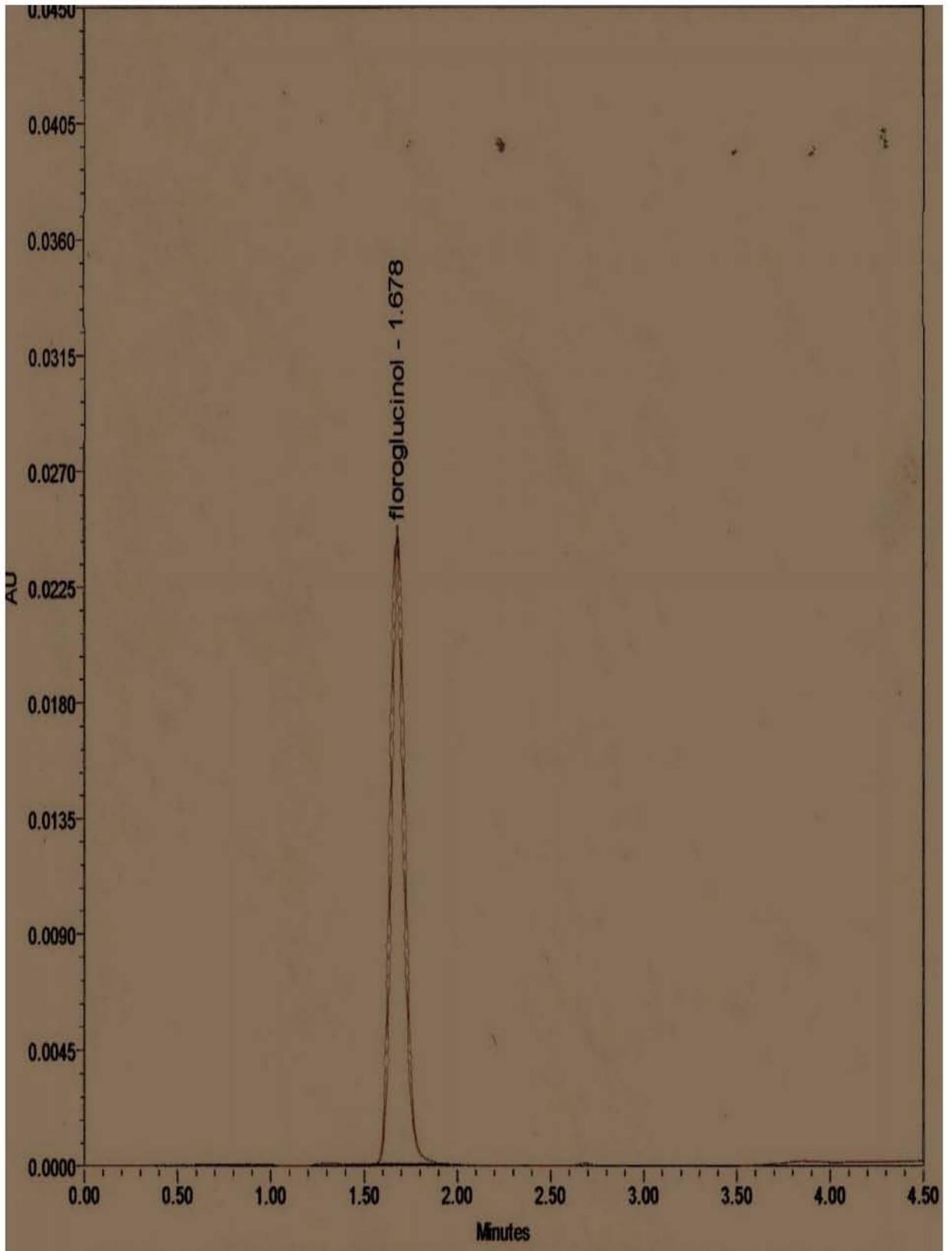


Figura 4 .Cromatograma de 1,3,5-Trihidroxibenceno ó Floroglucinol

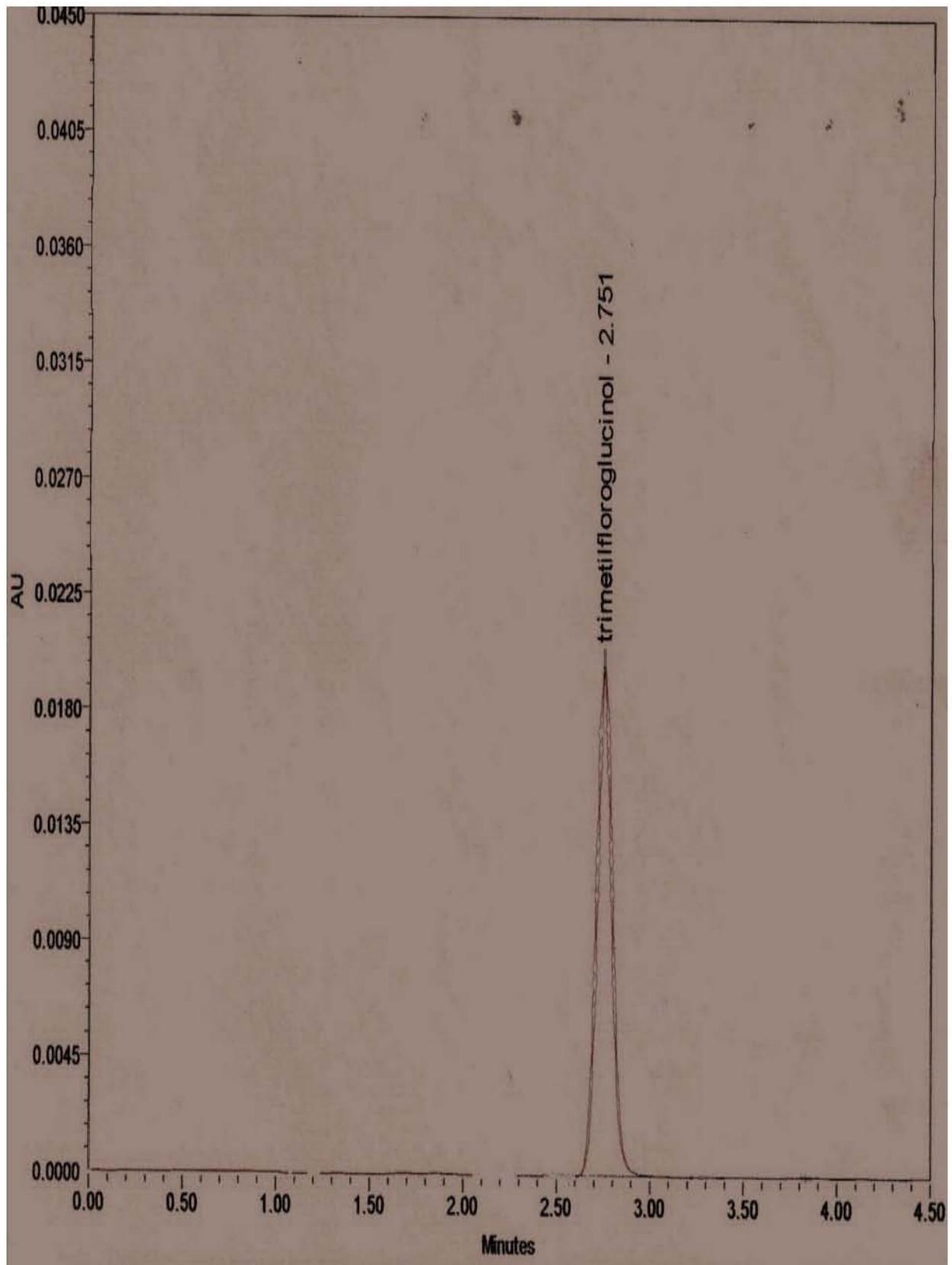


Figura 5. Cromatograma de 1,3,5-Trimetoxibenceno ó Trimetilfloroglucinol

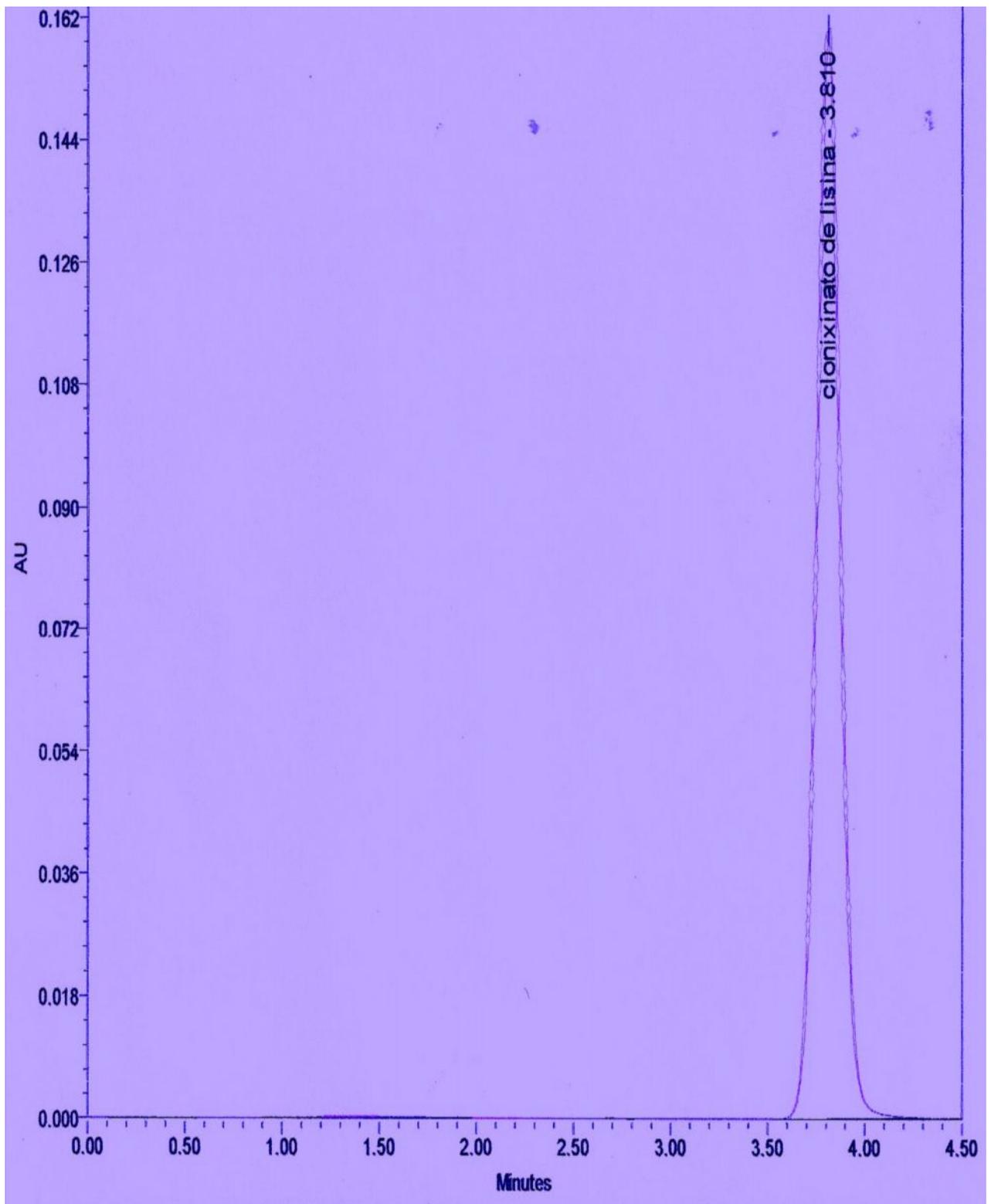


Figura 6. Cromatograma de Clonixinato de lisina

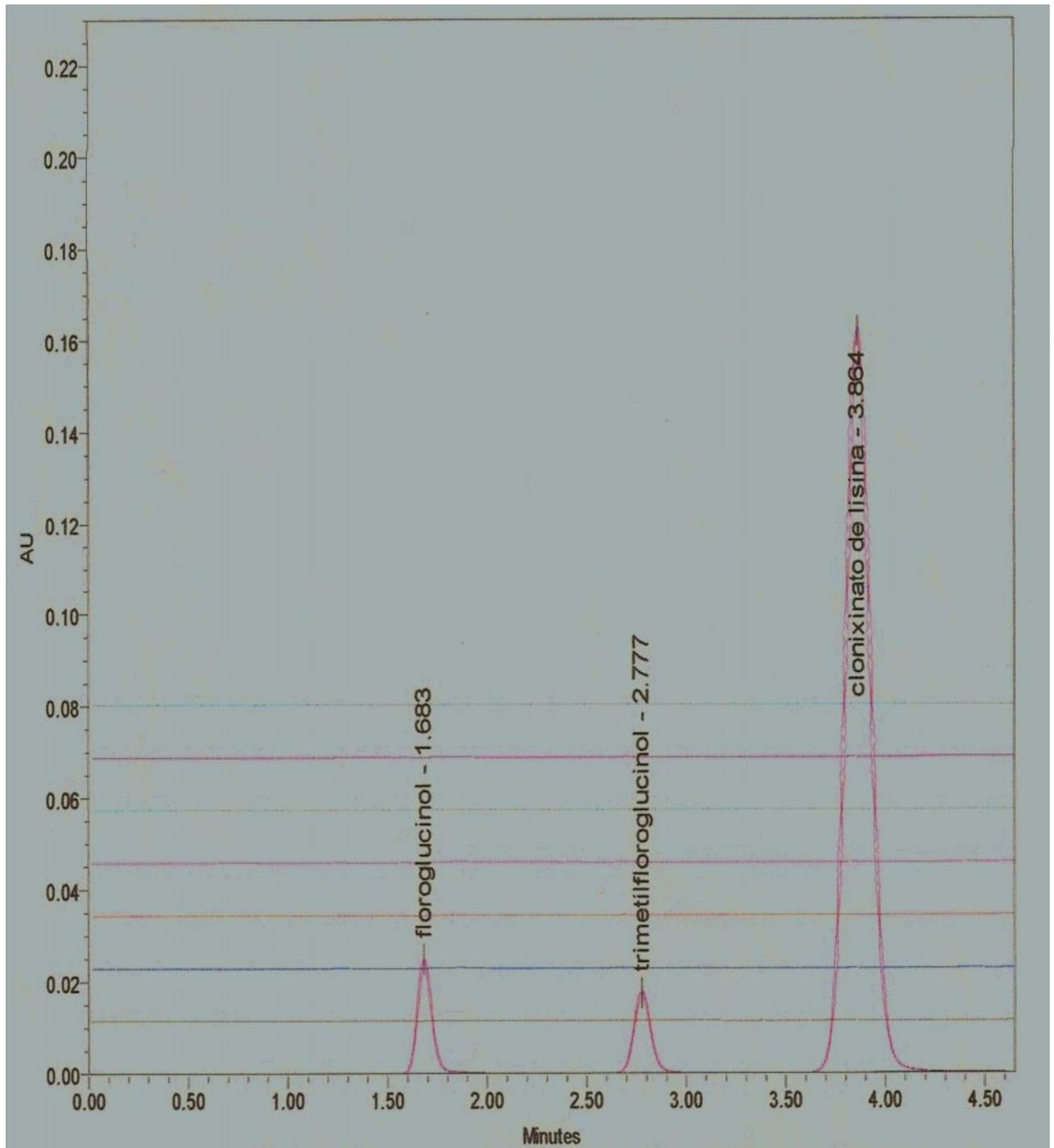


Figura 7. Cromatograma que presenta los tres analitos y placebo analítico sin interferencia.

De acuerdo a los resultados podemos decir que se cumple con el criterio de aceptación estipulado para la especificidad del método, ya que los placebos no presentan respuesta analítica, y tampoco interferencia alguna.

10.5 EXACTITUD Y REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO

Los resultados se presentan en las Tablas 13, 14 y 15.

1,3,5-Trihidroxibenceno

Peso promedio del placebo cargado: 480.0 mg

Cantidad pesada del estándar de referencia: 32.0 mg

Pureza del estándar de referencia: 100.0%

Área obtenida del estándar de referencia: 116266.8333

Tabla 13: Resultados de 1,3,5-Trihidroxibenceno

No	Cantidad pesada muestra (mg)	Área de la muestra	% Recobro
1	480.0	114927	98.85
2	480.0	115016	98.92
3	480.0	114906	98.83
4	480.0	114986	98.90
5	480.0	114719	98.70
6	480.0	114702	98.65

1,3,5-Trimetoxibenceno

Peso promedio del placebo cargado: 480.0 mg

Cantidad pesada del estándar de referencia: 32.4 mg

Pureza del estándar de referencia: 99.99%

Área obtenida del estándar de referencia: 104686.5

Tabla 14: Resultados de 1,3,5-Trimetoxibenceno

No	Cantidad pesada muestra (mg)	Área de la muestra	% Recobro
1	480.0	102720.0	99.34
2	480.0	102491.5	99.12
3	480.0	102347.5	98.98
4	480.0	102584.0	99.21
5	480.0	102471	99.10
6	480.0	102298	98.93

Clonixinato de lisina

Peso promedio del placebo cargado: 480.0 mg

Cantidad pesada del estándar de referencia: 50.0 mg

Pureza del estándar de referencia: 99.39 %

Área obtenida del estándar de referencia: 1393665.167

Tabla 15: Resultados de Clonixinato de lisina

No	Cantidad pesada muestra (mg)	Área de la muestra	% Recobro
1	480.0	1390049.0	99.13
2	480.0	1388967.5	99.05
3	480.0	1388826.5	99.04
4	480.0	1390980.0	99.20
5	480.0	1386086.0	98.85
6	480.0	1385983.0	98.84

Resultados estadísticos de la exactitud y reproducibilidad del método.

Media aritmética (\bar{Y})

$\bar{Y}_{1, 3,5\text{-Trihidroxibenceno}} = 98.81\%$

$\bar{Y}_{1, 3,5\text{-Trimetoxibenceno}} = 99.11\%$

$\bar{Y}_{\text{Clonixinato de lisina}} = 99.02\%$

Desviación estándar (S)

$S_{1, 3,5\text{-Trihidroxibenceno}} = 0.110$

$S_{1, 3,5\text{-Trimetoxibenceno}} = 0.150$

$S_{\text{Clonixinato de lisina}} = 0.146$

Coficiente de variación (CV)

$CV_{1, 3,5\text{-Trihidroxibenceno}} = 0.111\%$

$CV_{1, 3,5\text{-Trimetoxibenceno}} = 0.150\%$

$CV_{\text{Clonixinato de lisina}} = 0.148\%$

El CV para los 3 activos no excede el 2.0%.

Intervalo de confianza para la media poblacional: $IC(\mu) = \bar{Y} \pm (t_{n-1, 0.975}) \frac{S}{\sqrt{n}}$

$S_{1, 3,5 - \text{Trihidroxibenceno}} = 0.110$

$S_{1, 3,5 - \text{Trimetoxibenceno}} = 0.150$

$S_{\text{Clonixinato de lisina}} = 0.146$

$t_{5, 0.975} = 2.571$

$IC(\mu)_{1, 3,5 - \text{Trihidroxibenceno}} = 98.6945\%, 98.9254\%$

$IC(\mu)_{1, 3,5 - \text{Trimetoxibenceno}} = 98.9525\%, 99.2674\%$

$IC(\mu)_{\text{Clonixinato de lisina}} = 98.8667\%, 99.1732\%$

Los intervalos de confianza para la media poblacional no incluyen el 100%. Sin embargo los promedios de los porciento de recobro si se encuentran dentro del intervalo de 98.0-102.0%.

Tabla 16: Análisis de resultados de exactitud y reproducibilidad del método.

Criterio de aceptación		$CV \leq 2.0\%$	IC (μ) incluir 100% ó \bar{Y} entre 98%-102%	
Resultados	1,3,5 Trihidroxibenceno	CV= 0.111%	IC (μ)= 98.6945%_98.9254%	\bar{Y} = 98.81%
	1,3,5 Trimetoxibenceno	CV= 0.150%	IC (μ)= 98.9525%_99.2674%	\bar{Y} = 99.11%
	Clonixinato de lisina	CV= 0.148%	IC (μ)= 98.8667%_99.1732%	\bar{Y} = 99.02%
Cumplen		SI	NO	SI

Los resultados cumplen con el criterio de aceptación para el CV y aunque los intervalos de confianza para μ no incluyen el 100%, el promedio del porciento de recobro si se encuentran dentro del intervalo de 98.0-102.0% para los tres activos. Lo que indica que el método es exacto.

10.6 LINEALIDAD DEL MÉTODO

Se obtuvieron los resultados que se muestran en las tablas siguientes:

Tabla 17. Resultados linealidad del método 1,3,5-Trihidroxibenceno.

Peso promedio del placebo cargado: 480.0 mg

Cantidad pesada del estándar de referencia: 32.0 mg

Pureza del estándar de referencia: 99.80%

Área obtenida del estándar de referencia: 122254.3333

Nivel	% Adicionado X	% Recuperado Y	Área muestra	XY	X ²	Y ²	% Recobro
60%	60	60.23706319	73790	3614.22379	3600	3628.50378	100.395105
	60	59.98726591	73484	3599.23595	3600	3598.47207	99.9787765
	60	59.32440515	72672	3559.46431	3600	3519.38505	98.8740086
80%	80	81.63309824	100000	6530.64786	6400	6663.96273	102.041373
	80	81.46330139	99792	6517.06411	6400	6636.26947	101.829127
	80	78.97838988	96748	6318.27119	6400	6237.58607	98.7229874
100%	100	102.197292	125191	10219.7292	10000	10444.2865	102.197292
	100	98.34502611	120472	9834.50261	10000	9671.74416	98.3450261
	100	98.85768196	121100	9885.7682	10000	9772.84128	98.857682
110%	110	111.9818352	137177	12318.0019	12100	12539.9314	101.801668
	110	111.0691771	136059	12217.6095	12100	12336.3621	100.971979
	110	109.8201907	134529	12080.221	12100	12060.4743	99.836537
120%	120	123.0545486	150741	14766.5458	14400	15142.4219	102.545457
	120	121.9655631	149407	14635.8676	14400	14875.5986	101.637969
	120	122.8880171	150537	14746.5621	14400	15101.4647	102.406681
Σ 1410		1421.802856		140843.715	139500	142229.304	1510.44167
n =15	Σ ² 1988100	2021523.36					2281434.04

Resultados estadísticos de la linealidad del método.

Pendiente (b_1).

$$b_1 = 1.033656118$$

Ordenada al origen (b_0).

$$b_0 = -2.376818213$$

Coefficiente de determinación (r^2).

$$r^2 = 0.99668906.$$

El valor de r^2 es mayor de 0.98.

Intervalo de confianza: $IC(\beta_1) = b_1 \pm (t_{n-2, 0.975}) S_{b_1}$.

$$S_{b_1} = 0.01652335$$

$$t_{13, 0.975} = 2.16$$

$$IC(\beta_1) = 1.033656118 + 2.16 \times 0.01652335 = 1.069346552$$

$$IC(\beta_1) = 1.033656118 - 2.16 \times 0.01652335 = 0.99796568$$

El intervalo de confianza para la pendiente incluye la unidad.

Intervalo de confianza para la ordenada al origen: $IC(\beta_0) = b_0 \pm (t_{n-2, 0.975}) S_{b_0}$.

$$t_{13, 0.975} = 2.16$$

$$S_{b_0} = 1.593454104.$$

$$IC(\beta_0) = -2.376818213 + 2.16 \times 1.593454104 = 1.06504265$$

$$IC(\beta_0) = -2.376818213 - 2.16 \times 1.593454104 = -5.81867908$$

El intervalo de confianza de la ordenada al origen incluye el 0.

Coefficiente de variación de regresión ($CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{Y}} \times 100$)

$$\bar{Y}$$

$$\bar{Y} = 1421.802856 / 15 = 94.7868571$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\Sigma Y^2 - b_1 (\Sigma XY) - b_0 (\Sigma Y) / n - 2}$$

$$S_{y/x} = 1.37848709$$

$$(CV_{y/x} = 1.37848709/94.7868571 \times 100 = 1.4543\%)$$

El $CV_{y/x}$ es menor al 2.0%.

Porcentaje de recobro.

$$\bar{Y} = 1510.44167/15 = 100.69\%$$

$$S = 1.49$$

$$CV = 1.49/100.69 \times 100 = 1.48\%.$$

El CV para el porcentaje de recobro es menor 2.0%.

Intervalo de confianza para la media poblacional: $IC(\mu) = \bar{Y} \pm (t_{n-1, 0.975}) \frac{S}{\sqrt{n}}$

$$t_{14, 0.975} = 2.145$$

$$IC(\mu) = 100.69 + 2.145 \times 1.49/\sqrt{15} = 101.51$$

$$IC(\mu) = 100.69 - 2.145 \times 1.49/\sqrt{15} = 99.86$$

El intervalo de confianza para la media poblacional incluye el 100%.

Tabla 18. Resultados linealidad del método 1,3,5-Trimetoxibenceno.

Peso promedio del placebo cargado: 480.0 mg

Cantidad pesada del estándar de referencia: 32.0 mg

Pureza del estándar de referencia: 99.89%

Área obtenida del estándar de referencia: 110375

Nivel	% Adicionado X	% Recuperado Y	Área muestra	XY	X ²	Y ²	% Recobro
60%	60	59.83716439	66118	3590.22986	3600	3580.486243	99.7286073
	60	59.83173436	66112	3589.90406	3600	3579.836437	99.7195573
	60	59.82358931	66103	3589.41536	3600	3578.861838	99.7059822
80%	80	78.97079411	87260	6317.66353	6400	6236.386323	98.7134926
	80	79.26854097	87589	6341.48328	6400	6283.501588	99.0856762
	80	79.30564621	87630	6344.4517	6400	6289.38552	99.1320578
100%	100	99.79859443	110274	9979.85944	10000	9959.75945	99.7985944
	100	99.89633504	110382	9989.6335	10000	9979.277754	99.896335
	100	99.97507053	110469	9997.50705	10000	9995.014728	99.9750705
110%	110	110.3699656	121955	12140.6962	12100	12181.5293	100.336332
	110	110.3364804	121918	12137.0128	12100	12174.1389	100.305891
	110	110.3871607	121974	12142.5877	12100	12185.32524	100.351964
120%	120	119.6136934	132169	14353.6432	14400	14307.43565	99.6780778
	120	119.7847395	132358	14374.1687	14400	14348.38381	99.8206162
	120	119.8897201	132474	14386.7664	14400	14373.54499	99.9081001
Σ 1410		1407.089229		139275.023	139500	139052.8678	1496.15636
n =15	Σ ² 1988100	1979900.098					2238483.84

Resultados estadísticos de la linealidad del método.

Pendiente (b_1).

$$b_1 = 1.006987838$$

Ordenada al origen (b_0).

$$b_0 = -0.85091$$

Coefficiente de determinación (r^2).

$$r^2 = 0.9997$$

El valor de r^2 es mayor de 0.98.

Intervalo de confianza: $IC(\beta_1) = b_1 \pm (t_{n-2,0.975}) S_{b_1}$.

$$S_{b_1} = 0.004523$$

$$t_{13, 0.975} = 2.16$$

$$IC(\beta_1) = 1.006987838 + 2.16 \times 0.004523 = 1.0168$$

$$IC(\beta_1) = 1.006987838 - 2.16 \times 0.004523 = 0.9972$$

El intervalo de confianza para la pendiente incluye la unidad.

Intervalo de confianza para la ordenada al origen: $IC(\beta_0) = b_0 \pm (t_{n-2,0.975}) S_{b_0}$.

$$t_{13, 0.975} = 2.16$$

$$S_{b_0} = 0.436152$$

$$IC(\beta_0) = -0.85091 + 2.16 \times 0.436152 = 0.0912$$

$$IC(\beta_0) = -0.85091 - 2.16 \times 0.436152 = -1.7930$$

El intervalo de confianza de la ordenada al origen incluye el 0.

Coefficiente de variación de regresión ($CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{Y}} \times 100$)

\bar{Y}

$$\bar{Y} = 1407.09/15 = 93.80595$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\Sigma Y^2 - b_1 (\Sigma XY) - b_0 (\Sigma Y)/n - 2}$$

$$S_{y/x} = 0.377313$$

$$(CV_{y/x} = 0.377313/93.80595 \times 100 = 0.4022\%)$$

El $CV_{y/x}$ es menor al 2.0%.

Porcentaje de recobro.

$$\bar{Y} = 1496.16/15 = 99.74\%$$

$$S = 0.46$$

$$CV = 0.46/99.74 \times 100 = 0.46\%.$$

El CV para el porcentaje de recobro es menor 2.0%.

Intervalo de confianza para la media poblacional: $IC(\mu) = \bar{Y} \pm (t_{n-1, 0.975}) \frac{S}{\sqrt{n}}$

$$t_{14, 0.975} = 2.145$$

$$IC(\mu) = 99.74 + 2.145 \times 0.46/\sqrt{15} = 99.9833$$

$$IC(\mu) = 99.74 - 2.145 \times 0.46/\sqrt{15} = 99.4892$$

El intervalo de confianza para la media poblacional no incluye el 100%, sin embargo el promedio aritmético del porcentaje de recobro se encuentra dentro del intervalo 98.0%-102.0%.

Tabla 19. Resultados linealidad del método Clonixinato de lisina.

Peso promedio del placebo cargado: 480.0 mg

Cantidad pesada del estándar de referencia: 50.0 mg

Pureza del estándar de referencia: 99.39%

Área obtenida del estándar de referencia: 1440887

Nivel	% Adicionado X	% Recuperado Y	Área muestra	XY	X ²	Y ²	% Recobro
60%	60	60.27	873810	3616.43	3600	3632.9511	100.456612
	60	60.10	871422	3606.55	3600	3613.1215	100.182078
	60	60.06	870823	3604.07	3600	3608.1560	100.113215
80%	80	80.19	1162652	6415.82	6400	6431.6887	100.247263
	80	80.10	1161317	6408.45	6400	6416.9270	100.132155
	80	80.14	1161904	6411.69	6400	6423.4156	100.182768
100%	100	99.55	1443348	9955.97	10000	9912.1449	99.5597557
	100	99.27	1439243	9927.65	10000	9855.8432	99.2765996
	100	99.33	1440070	9933.36	10000	9867.1729	99.3336447
110%	110	111.12	1611058	12224.09	12100	12349.4576	101.025558
	110	111.08	1610413	12219.19	12100	12339.5712	100.985112
	110	111.15	1611406	12226.73	12100	12354.7934	101.04738
120%	120	120.49	1746790	14458.88	14400	14518.0045	100.408902
	120	120.31	1744299	14438.26	14400	14476.6274	100.265715
	120	120.31	1744219	14437.60	14400	14475.2995	100.261116
Σ 1410		1413.55		139884.81	139500	140275.1755	1503.47
n =15	Σ ² 1988100	1998145.164					2260445.72

Resultados estadísticos de la linealidad del método.

Pendiente (b_1).

$$b_1 = 1.00724$$

Ordenada al origen (b_0).

$$b_0 = -0.44363$$

Coefficiente de determinación (r^2).

$$r^2 = 0.9994$$

El valor de r^2 es mayor de 0.98.

Intervalo de confianza: $IC(\beta_1) = b_1 \pm (t_{n-2, 0.975}) S_{b_1}$.

$$S_{b_1} = 0.0069065$$

$$t_{13, 0.975} = 2.16$$

$$IC(\beta_1) = 1.00724 + 2.16 \times 0.0069065 = 1.0222$$

$$IC(\beta_1) = 1.00724 - 2.16 \times 0.0069065 = 0.9923$$

El intervalo de confianza para la pendiente incluye la unidad.

Intervalo de confianza para la ordenada al origen: $IC(\beta_0) = b_0 \pm (t_{n-2, 0.975}) S_{b_0}$.

$$t_{13, 0.975} = 2.16$$

$$S_{b_0} = 0.6660389$$

$$IC(\beta_0) = -0.44363 + 2.16 \times 0.6660389 = 0.9950$$

$$IC(\beta_0) = -0.44363 - 2.16 \times 0.6660389 = -1.8823$$

El intervalo de confianza de la ordenada al origen incluye el 0.

Coefficiente de variación de regresión ($CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{Y}} \times 100$)

$$\bar{Y}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\Sigma Y^2 - b_1 (\Sigma XY) - b_0 (\Sigma Y) / n - 2}$$

$$S_{y/x} = 0.576186$$

$$\bar{Y} = 1413.55 / 15 = 94.237236\%$$

$$(CV_{y/x} = 0.576186 / 94.237236 \times 100 = 0.6114\%)$$

El $CV_{y/x}$ es menor al 2.0%.

Porcentaje de recobro.

$$\bar{Y} = 1503.47/15 = 100.23\%$$

$$S = 0.54$$

$$CV = 0.54/100.23 \times 100 = 0.54\%$$

El CV para el porcentaje de recobro es menor 2.0%.

$$\text{Intervalo de confianza para la media poblacional: } IC(\mu) = \bar{Y} \pm (t_{n-1,0.975}) \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$$t_{14, 0.975} = 2.145$$

$$IC(\mu) = 100.23 + 2.145 \times 0.54/\sqrt{15} = 100.5314$$

$$IC(\mu) = 100.23 - 2.145 \times 0.54/\sqrt{15} = 99.9324$$

El intervalo de confianza para la media poblacional incluye el 100%.

Tabla 20: Análisis de resultados de la Linealidad del método.

	r^2	$IC(\beta_1)$	$IC(\beta_0)$	$CV_{y/x}$	$IC(\mu)$ ó $\bar{Y}\%$	$CV_{\%recobro}$
Criterio de aceptación	≥ 0.98	Incluir la unidad	Incluir el 0	$\leq 2.0\%$	Incluir el 100%	$\leq 2.0\%$
1, 3,5 Trihidroxibenceno	0.9966	1.069-0.997	-5.818-1.065	1.454%	101.51%-99.86%	100.69%
1, 3,5 Trimetoxibenceno	0.9997	1.016-0.997	-1.793-0.091	0.402%	99.98%-99.48%	99.74%
Clonixinato de lisina	0.9994	1.022-0.992	-1.882-0.995	0.611%	100.53%-99.93%	100.23%
Cumplen	SI	SI	SI	SI	SI	SI

Para los tres compuestos 1,3,5-Trihidroxibenceno; 1,3,5 Trimetoxibenceno y Clonixinato de lisina, se cumple con los parámetros para r^2 , $IC(\beta_0)$, $CV_{y/x}$, $IC(\beta_1)$ y $CV_{\%recobro}$, el $IC(\mu)$ para 1,3,5 Trihidroxibenceno y Clonixinato de lisina también cumple y aunque el $IC(\mu)$ no incluye el 100% para 1,3,5-Trimetoxibenceno, el promedio aritmético del porcentaje de recobro si se encuentra dentro del intervalo establecido en el criterio de aceptación, lo que indica que el método es lineal.

Grafico 4. Linealidad del método de 1,3,5-Trihidroxibenceno.

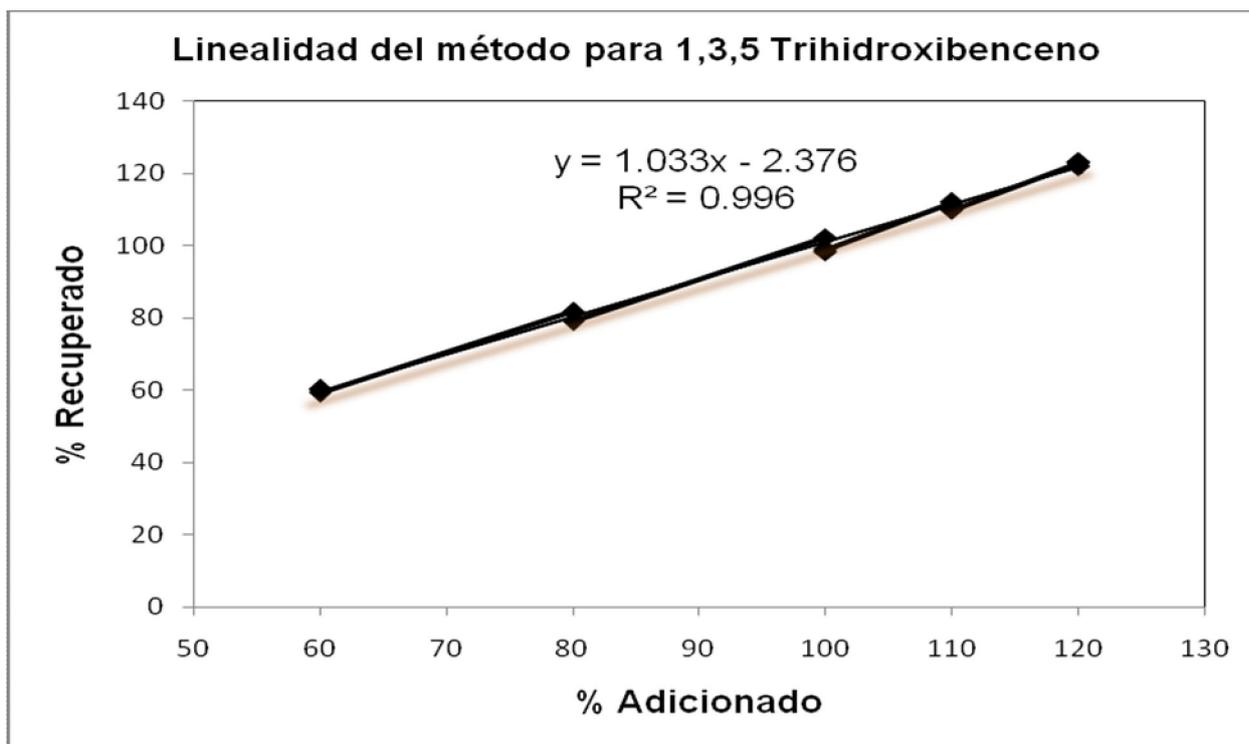


Grafico 5. Linealidad del método de 1,3,5-Trimetoxibenceno

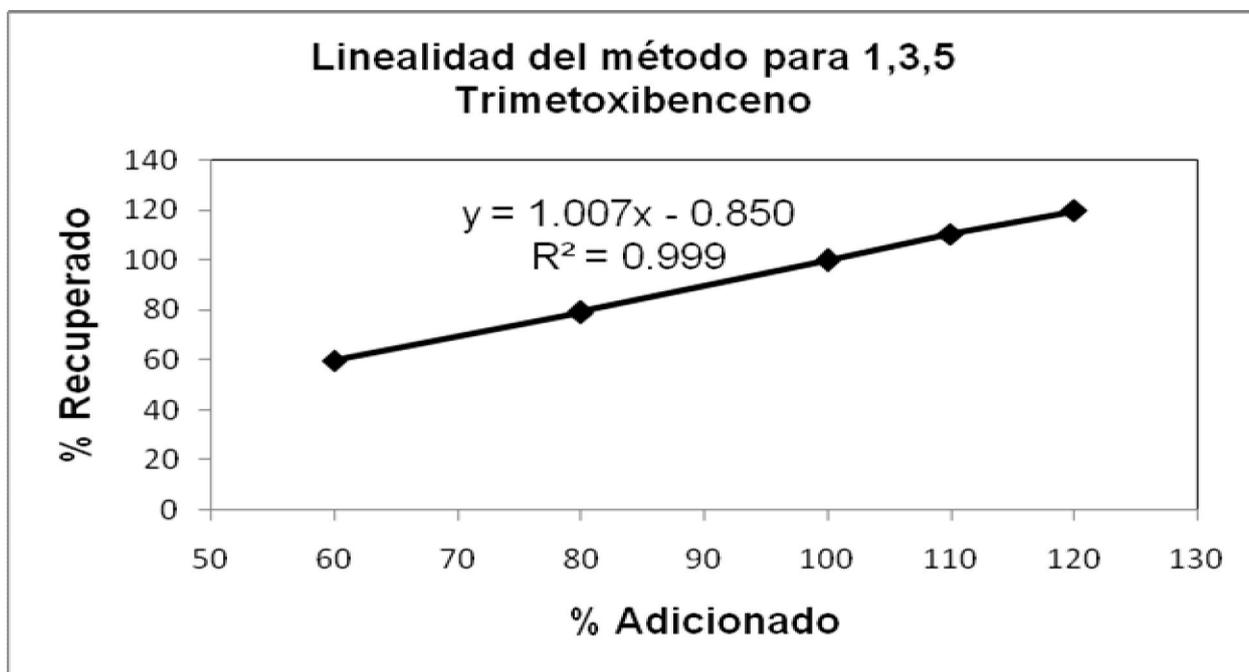
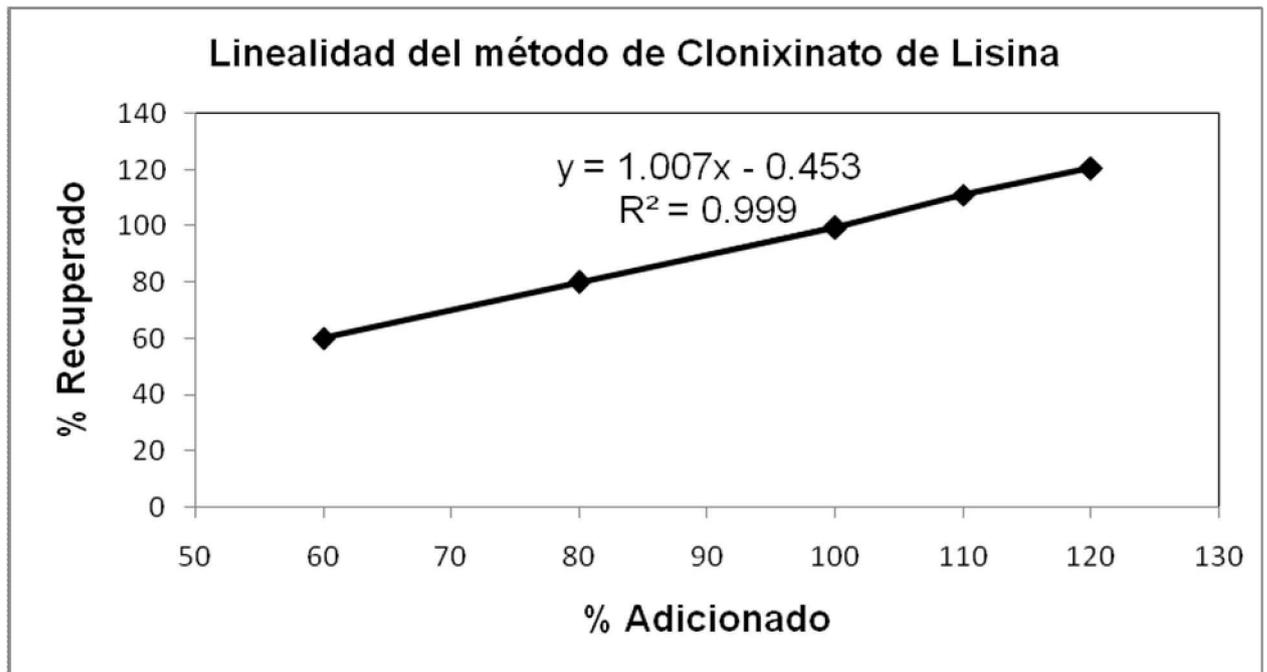


Grafico 6. Linealidad del método de Clonixinato de lisina.



10.7 PRECISIÓN DEL MÉTODO (Reproducibilidad día/analista)

En las siguientes tablas se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 21. Resultados para precisión del método para 1,3,5-Trihidroxibenceno.

	A1D1	A1D2	A2D1	A2D2
Peso promedio del placebo cargado:	480.0 mg	480.0 mg	480.0 mg	480.0 mg
Cantidad pesada del estándar:	32.0 mg	32.0 mg	32.0 mg	32.0 mg
Pureza del estándar:	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
Área obtenida del estándar :	115988.17	116764.00	1535.10	1529.85

A1D1: Analista 1: día 1, A2D1: Analista 2: día 1

A1D2: Analista 1: día 2, A2D2: Analista 2: día 2

Analista 1					Analista 2			
	No.	Cantidad pesada mg	Áreas	Cantidad recuperada (%)	No.	Cantidad pesada mg	Áreas	Cantidad recuperada (%)
Día 1	1	480.0	114705.0	98.89	1	480.0	1550.4	100.99
	2	480.0	114461.5	98.68	2	480.0	1529.1	99.60
	3	480.0	114681.5	98.87	3	480.0	1505.7	98.08
Día 2	No.	Cantidad pesada mg	Áreas	Cantidad recuperada (%)	No.	Cantidad pesada mg	Áreas	Cantidad recuperada (%)
	1	480.0	115102	98.58	1	480.0	1547.5	101.15
	2	480.0	114978	98.47	2	480.0	1526.0	99.75
	3	480.0	114226	97.83	3	480.0	1502.6	98.22

Tabla 22. Resultados de precisión del método para 1,3,5-Trimetoxibenceno.

	A1D1	A1D2	A2D1	A2D2
Peso promedio del placebo cargado:	480.0 mg	480.0 mg	480.0 mg	480.0 mg
Cantidad pesada del estándar:	32.4mg	32.5 mg	32.0 mg	32.0 mg
Pureza del estándar:	99.99%	99.99%	99.99%	99.99%
Área obtenida del estándar :	104704.67	104932.50	1386.5	1381.15

A1D1: Analista 1: día 1, A2D1: Analista 2: día 1

A1D2: Analista 1: día 2, A2D2: Analista 2: día 2

Analista 1					Analista 2			
	No.	Cantidad pesada mg	Áreas	Cantidad recuperada (%)	No.	Cantidad pesada mg	Áreas	Cantidad recuperada (%)
Día 1	1	480.0	103715.5	100.28	1	480.0	1379.9	99.51
	2	480.0	102994.0	99.59	2	480.0	1378.3	99.39
	3	480.0	102371.0	98.98	3	480.0	1354.3	97.66
Día 2	No.	Cantidad pesada mg	Áreas	Cantidad recuperada (%)	No.	Cantidad pesada mg	Áreas	Cantidad recuperada (%)
	1	480.0	102229.5	98.94	1	480.0	1374.7	99.52
	2	480.0	102070.0	98.78	2	480.0	1373.1	99.41
	3	480.0	101297.5	98.03	3	480.0	1351.2	97.82

Tabla 23. Resultados para precisión del método para Clonixinato de lisina.

	A1D1	A1D2	A2D1	A2D2
Peso promedio del placebo cargado:	480.0 mg	480.0 mg	480.0 mg	480.0 mg
Cantidad pesada del estándar:	50.0 mg	50.9 mg	50.0 mg	50.0 mg
Pureza del estándar:	99.39%	99.39%	99.39%	99.39%
Área obtenida del estándar :	1389277.67	1398853.17	19850.50	19863.47

A1D1: Analista 1: día 1, A2D1: Analista 2: día 1

A1D2: Analista 1: día 2, A2D2: Analista 2: día 2

Analista 1					Analista 2			
	No.	Cantidad pesada mg	Áreas	Cantidad recuperada (%)	No.	Cantidad pesada mg	Áreas	Cantidad recuperada (%)
Día 1	1	480.0	1389442.0	99.40	1	480.0	19950.5	99.89
	2	480.0	1386768.5	99.21	2	480.0	19900.5	99.64
	3	480.0	1384950.5	99.08	3	480.0	19601.5	98.14
Día 2	No.	Cantidad pesada mg	Áreas	Cantidad recuperada (%)	No.	Cantidad pesada mg	Áreas	Cantidad recuperada (%)
	1	480.0	1391343.5	100.64	1	480.0	19913.5	99.64
	2	480.0	1389295.5	100.49	2	480.0	19819.3	99.17
	3	480.0	1375247.5	99.47	3	480.0	19556.6	97.85

Resultados estadísticos de la precisión del método.

Media aritmética de todos los datos obtenidos por día y analista: $\bar{Y} = \sum Y/n$

$$\bar{Y}_{1,3,5\text{-Trihidroxibenceno}} = 99.09\%$$

$$\bar{Y}_{1,3,5\text{-Trimetoxibenceno}} = 98.99\%$$

$$\bar{Y}_{\text{Clonixinato de lisina}} = 99.38\%$$

Desviación estándar: $S = \sqrt{n(\sum Y^2) - (\sum Y)^2 / n(n-1)}$

$$S_{1,3,5\text{-Trihidroxibenceno}} = 1.0793$$

$$S_{1,3,5\text{-Trimetoxibenceno}} = 0.7987$$

$$S_{\text{Clonixinato de lisina}} = 0.8126$$

Coefficiente de variación ($CV = S/\bar{Y} \times 100$)

$$CV_{1,3,5\text{-Trihidroxibenceno}} = 1.089\%$$

$$CV_{1,3,5\text{-Trimetoxibenceno}} = 0.806\%$$

$$CV_{\text{Clonixinato de lisina}} = 0.817\%$$

El CV para los tres compuestos es menor a 2.0%.

Tabla 24: Análisis de resultados de precisión del método.

Criterio de aceptación	Resultado			Cumplen
	1,3,5 Trihidroxibenceno	1,3,5 Trimetoxibenceno	Clonixinato de lisina	
$CV \leq 2.0\%$	1.089%	0.806%	0.817%	SI

Los resultados obtenidos cumplen con el criterio de aceptación establecido para la precisión del método.

10.8 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 25: Condición inicial. Temperatura 25°C tiempo= 0 para 1,3,5-Trihidroxibenceno.

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	32.0	480.0	134152.8	134024.5	99.70
2	32.0	480.0	134152.8	131551.5	97.86
3	32.0	480.0	134152.8	131643.0	97.93

Tabla 26: Condición 1. Temperatura 25°C y sin protección a la luz por 3 horas para 1,3,5-Trihidroxibenceno.

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	32.0	480.0	138226	135910	98.12
2	32.0	480.0	138226	134036	96.77
3	32.0	480.0	138226	133434	96.34

Tabla 27: Condición 2. Temperatura 25°C y sin protección a la luz por 24 horas para 1,3,5-Trihidroxibenceno.

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	32.0	480.0	138226	124006	89.53
2	32.0	480.0	138226	123289	89.02
3	32.0	480.0	138226	122990	88.80

Tabla 28: Condición 3. En refrigeración 8°C y con protección a la luz por 24 horas para 1,3,5-Trihidroxibenceno.

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	32.0	480.0	138226	123573	89.22
2	32.0	480.0	138226	123104	88.88
3	32.0	480.0	138226	122901	88.74

Tabla 29: Condición inicial. Temperatura 25°C tiempo= 0 para 1,3,5-Trimetoxibenceno.

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	32.0	480.0	117030	111686.0	95.33
2	32.0	480.0	117030	112222.5	95.79
3	32.0	480.0	117030	112526.0	96.05

Tabla 30: Condición 1. Temperatura 25°C y sin protección a la luz por 3 horas para 1,3,5-Trimetoxibenceno.

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	32.0	480.0	117690.7	112775	95.72
2	32.0	480.0	117690.7	110636	93.90
3	32.0	480.0	117690.7	112700	95.65

Tabla 31: Condición 2. Temperatura 25°C y sin protección a la luz por 24 horas para 1,3,5-Trimetoxibenceno.

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	32.0	480.0	117690.7	111462	94.60
2	32.0	480.0	117690.7	111252	94.43
3	32.0	480.0	117690.7	111228	94.40

Tabla 32: Condición 3. En refrigeración 8°C y con protección a la luz por 24 horas para 1,3,5-Trimetoxibenceno.

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	32.0	480.0	117690.7	111872	94.95
2	32.0	480.0	117690.7	110525	93.81
3	32.0	480.0	117690.7	111127	94.32

Tabla 33: Condición inicial. Temperatura 25°C tiempo= 0 para Clonixinato de lisina

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	50.0	480.0	1516891.2	1475284.5	96.66
2	50.0	480.0	1516891.2	1480749.5	97.02
3	50.0	480.0	1516891.2	1484893.5	97.29

Tabla 34: Condición 1. Temperatura 25°C y sin protección a la luz por 3 horas para Clonixinato de lisina

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	50.0	480.0	1532854.3	1481277	96.05
2	50.0	480.0	1532854.3	1470938	95.38
3	50.0	480.0	1532854.3	1471000	95.38

Tabla 35: Condición 2. Temperatura 25°C y sin protección a la luz por 24 horas para Clonixinato de lisina

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	50.0	480.0	1532854.3	1464802	94.98
2	50.0	480.0	1532854.3	1461718	94.78
3	50.0	480.0	1532854.3	1462021	94.80

Tabla 36: Condición 3. En refrigeración 8°C y con protección a la luz por 24 horas para Clonixinato de lisina

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	50.0	480.0	1532854.3	1465802	95.04
2	50.0	480.0	1532854.3	1462718	94.84
3	50.0	480.0	1532854.3	1463021	94.86

Resultados estadísticos de la estabilidad analítica de la muestra.

Media aritmética de 1,3,5-Trihidroxibenceno a las condiciones:

$$\bar{Y}_{\text{Condición inicial}} = 98.50\%$$

$$\bar{Y}_{\text{Condición 1}} = 97.07\%$$

$$\bar{Y}_{\text{Condición 2}} = 89.12\%$$

$$\bar{Y}_{\text{Condición 3}} = 88.95\%$$

Diferencias absolutas de las medias aritméticas con respecto a la condición inicial:

$$|d_i|_{\text{Condición 1}} = |98.50\% - 97.07\%| = 1.43 \%$$

$$|d_i|_{\text{Condición 2}} = |98.50\% - 89.12\%| = 9.38 \%$$

$$|d_i|_{\text{Condición 3}} = |98.50\% - 88.95\%| = 9.55 \%$$

Solo en la condición 1 la diferencia absoluta es menor a 2.0%.

Media aritmética de 1,3,5-Trimetoxibenceno a las condiciones:

$$\bar{Y}_{\text{Condición inicial}} = 95.72\%$$

$$\bar{Y}_{\text{Condición 1}} = 95.09\%$$

$$\bar{Y}_{\text{Condición 2}} = 94.48\%$$

$$\bar{Y}_{\text{Condición 3}} = 94.36\%$$

Diferencias absolutas de las medias aritméticas con respecto a la condición inicial:

$$|d_i|_{\text{Condición 1}} = |95.72\% - 95.09\%| = 0.63 \%$$

$$|d_i|_{\text{Condición 2}} = |95.72\% - 94.48\%| = 1.24 \%$$

$$|d_i|_{\text{Condición 3}} = |95.72\% - 94.36\%| = 1.36 \%$$

Las diferencias absolutas son menor a 2.0% en las tres condiciones.

Media aritmética de Clonixinato de lisina, a las condiciones:

$$\bar{Y}_{\text{Condición inicial}} = 96.99\%$$

$$\bar{Y}_{\text{Condición 1}} = 95.60\%$$

$$\bar{Y}_{\text{Condición 2}} = 94.85\%$$

$$\bar{Y}_{\text{Condición 3}} = 94.91\%$$

Diferencias absolutas de las medias aritméticas con respecto a la condición inicial:

$$|d_i|_{\text{Condición 1}} = |96.99\% - 95.60\%| = 1.39\%$$

$$|d_i|_{\text{Condición 2}} = |96.99\% - 94.85\%| = 2.14\%$$

$$|d_i|_{\text{Condición 3}} = |96.99\% - 94.91\%| = 2.08\%$$

Solo en la condición 1 la diferencia absoluta es menor a 2.0%.

Tabla 37: Análisis de resultados de la estabilidad analítica de la muestra.

Criterio de aceptación	Condición	1,3,5 Trihidroxibenceno	1,3,5 Trimetoxibenceno	Clonixinato de lisina
$ d_i \leq 2.0\%$	1	1.43%	0.63%	1.39%
$ d_i \leq 2.0\%$	2	9.38%	1.24%	2.14%
$ d_i \leq 2.0\%$	3	9.55%	1.36%	2.08%
Cumple		Solo Condición 1	SI	Solo Condición 1

Como se puede observar que solo los resultados para el 1,3,5-Trimetoxibenceno cumple con todas las condiciones, ya que la diferencia absoluta para estas condiciones de almacenaje son menores al 2.0%. Con respecto al 1,3,5-Trihidroxibenceno y Clonixinato de lisina, solo se cumple la condición 1, por lo tanto, podemos decir que el análisis de las muestras es estable hasta un límite de 3 horas después de su preparación.

10.9 MÉTODO DE ESTABILIDAD DE LA MUESTRA A DIFERENTES pH.

Las muestras se prepararon de acuerdo con lo establecido y fueron expuestas a soluciones reactivas de ácido fosfórico e Hidróxido de sodio 1.0 N, posteriormente se neutralizaron y se inyectaron al cromatografo de líquidos y se observa que las muestras son sensibles a los cambios de pH.

Análisis de resultados del método de estabilidad de la muestra a diferentes pH.

El resultado cumple con el criterio de aceptación ya que se observa una clara disminución en los resultados obtenidos para el 1, 3,5-Trihidroxibenceno se observa una deformación del pico y a pH de 10 no se observan picos bien definidos para ninguno de los tres compuestos. Lo cual es sensible a diferentes pH.

MÉTODO DE ESTABILIDAD DE LA MUESTRA pH ACIDO, H₃PO₄ 1.0 N

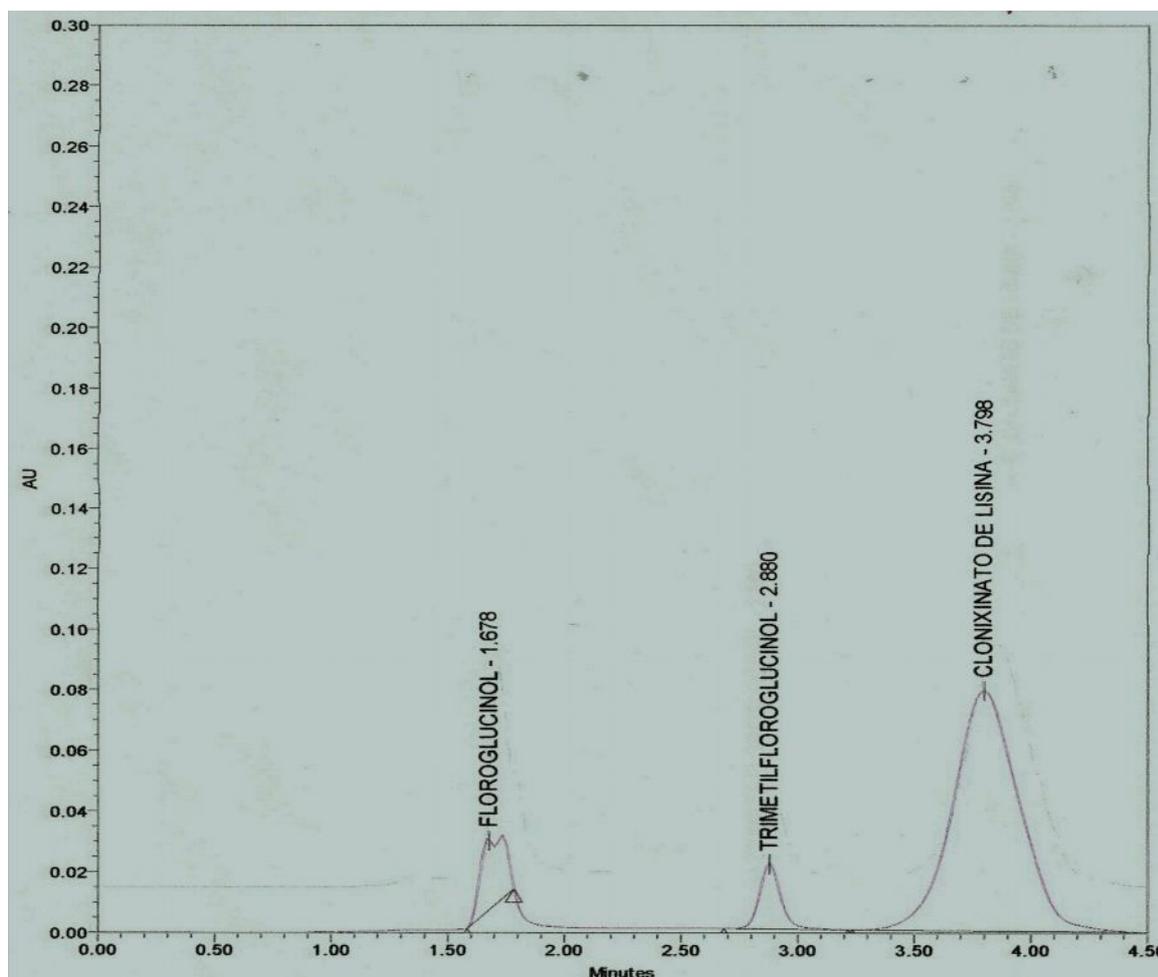


Figura 8. Cromatograma pH ácido

MÉTODO DE ESTABILIDAD DE LA MUESTRA pH BASICO, NaOH 1.0 N

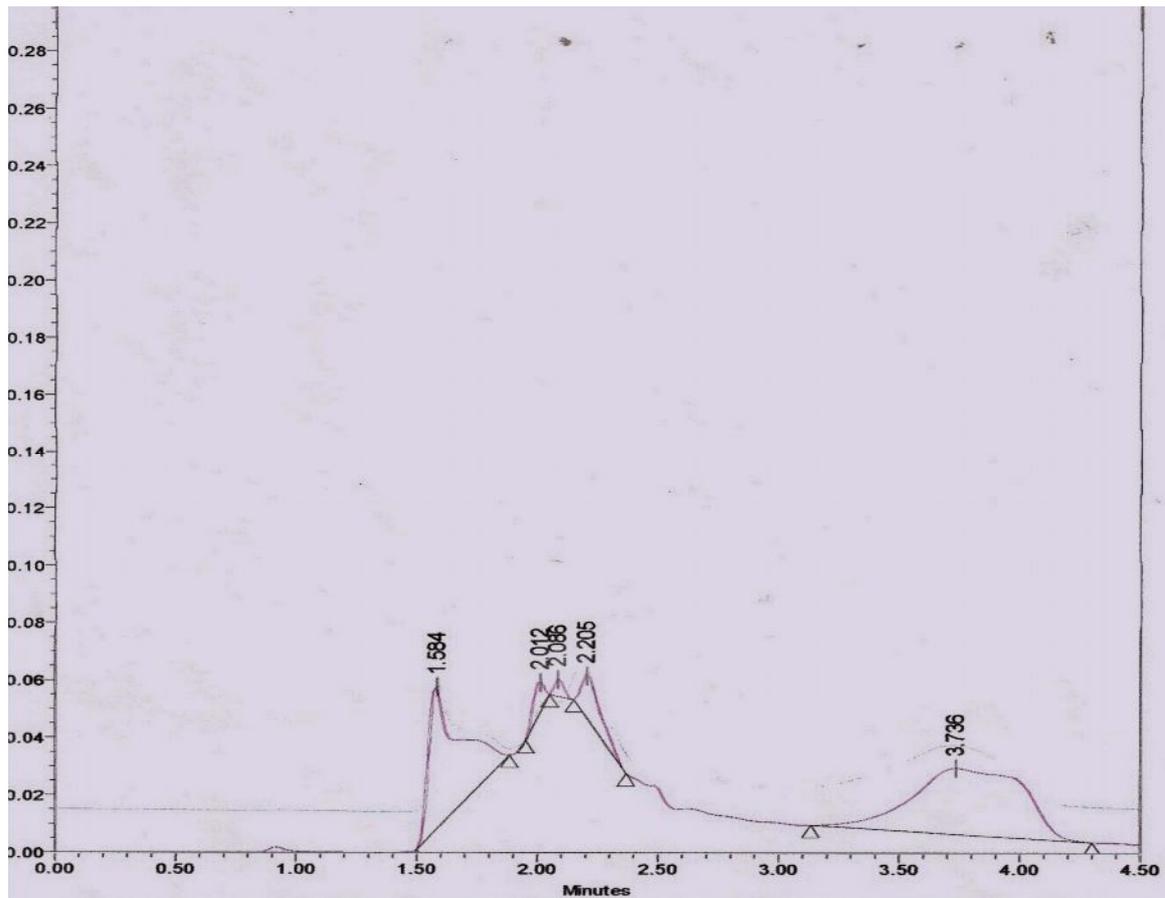


Figura 9. Cromatograma pH básico

10.10 ROBUSTEZ DEL MÉTODO

Los resultados obtenidos se presentan en las siguientes tablas:

Resultados de Robustez para 1,3,5-Trihidroxibenceno.

Tabla 38: Condición normal.

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	32.0	480.0	128099.8	126408.0	98.48
2	32.0	480.0	128099.8	127032.5	98.97
3	32.0	480.0	128099.8	126972.5	98.92

Tabla 39: Condición 1: Flujo de 0.7 mL/min.

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	32.0	480.0	184225.7	181463.5	98.30
2	32.0	480.0	184225.7	185010.0	100.22
3	32.0	480.0	184225.7	183444.0	99.38

Tabla 40: Condición 2: Flujo de 1.4 mL/min.

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	32.0	480.0	92626.2	93547.5	100.79
2	32.0	480.0	92626.2	94408.0	101.72
3	32.0	480.0	92626.2	94165.0	101.46

Resultados estadísticos de la robustez.

Media aritmética condición normal: $\bar{Y}_{\text{Condición normal}} = 98.79\%$

Media aritmética condición 1: $\bar{Y}_{\text{Condición1}} = 99.30\%$

Media aritmética condición 2: $\bar{Y}_{\text{Condición2}} = 101.32\%$

Diferencias absolutas de las medias aritméticas con respecto a la condición normal:

$$|d_i|_{\text{Condición 1}} = |98.79\% - 99.30\%| = 0.51 \%$$

$$|d_i|_{\text{Condición 2}} = |98.79\% - 101.32\%| = 2.53 \%$$

Solo en la condición 1 la diferencia absoluta es menor a 2.0%.

Resultados de Robustez para 1,3,5-Trimetoxibenceno.

Tabla 41: Condición normal.

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	32.0	480.0	115185.2	108356	93.97
2	32.0	480.0	115185.2	108813	94.36
3	32.0	480.0	115185.2	109226	94.72

Tabla 42: Condición 1: Flujo de 0.7 mL/min.

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	32.0	480.0	163171.2	155455.0	95.17
2	32.0	480.0	163171.2	155038.5	94.91
3	32.0	480.0	163171.2	156731.5	95.95

Tabla 43: Condición 2: Flujo de 1.4 mL/min.

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	32.0	480.0	82071.8	78985.5	96.13
2	32.0	480.0	82071.8	79964.0	97.32
3	32.0	480.0	82071.8	79749.0	97.06

Resultados estadísticos de la robustez.

Media aritmética condición normal: Condición normal = 94.35%

Media aritmética condición 1: $\bar{Y}_{\text{Condicion1}} = 95.34\%$

Media aritmética condición 2: $\bar{Y}_{\text{Condicion2}} = 96.84\%$

Diferencias absolutas de las medias aritméticas con respecto a la condición normal:

$$|d_i|_{\text{Condición 1}} = |94.35\% - 95.34\%| = 0.99\%$$

$$|d_i|_{\text{Condición 2}} = |94.35\% - 96.84\%| = 2.49\%$$

Solo en la condición 1 la diferencia absoluta es menor a 2.0%.

Resultados de Robustez para Clonixinato de lisina

Tabla 44: Condición normal.

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	50.0	480.0	1356803.8	1387067.5	101.61
2	50.0	480.0	1356803.8	1386443.0	101.56
3	50.0	480.0	1356803.8	1383051.5	101.31

Tabla 45: Condición 1: Flujo de 0.7 mL/min.

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	50.0	480.0	1928780.5	1958697.0	100.93
2	50.0	480.0	1928780.5	2028128.5	104.51
3	50.0	480.0	1928780.5	2023958.5	104.29

Tabla 46: Condición 2: Flujo de 1.4 mL/min.

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	32.0	480.0	979735.5	1028395.0	104.33
2	32.0	480.0	979735.5	1026766.0	104.16
3	32.0	480.0	979735.5	1026816.5	104.17

Resultados estadísticos de la robustez.

Media aritmética condición normal: $\bar{Y}_{\text{Condición normal}} = 101.49\%$

Media aritmética condición 1: $\bar{Y}_{\text{Condición1}} = 103.25\%$

Media aritmética condición 2: $\bar{Y}_{\text{Condición2}} = 104.22\%$

Diferencias absolutas de las medias aritméticas con respecto a la condición normal:

$$|d_i|_{\text{Condición 1}} = |101.49\% - 103.25\%| = 1.75\%$$

$$|d_i|_{\text{Condición 2}} = |101.49\% - 104.22\%| = 2.72\%$$

Solo en la condición 1 la diferencia absoluta es menor a 2.0%

Tabla 47: Análisis de resultados de Robustez.

Criterio de aceptación	Condición	1,3,5 Trihidroxibenceno	1,3,5 Trimetoxibenceno	Clonixinato de lisina
$ d_i \leq 2.0\%$	1	0.51%	0.99%	1.75%
$ d_i \leq 2.0\%$	2	2.53%	2.49%	2.72%
Cumple		Solo condición 1	Solo condición 1	Solo condición 1

Observando las tablas de resultados se puede indicar que el método para los tres analitos es robusto cuando se varia el flujo a 0.7 mL/min, pero no al variar el flujo a 1.4% mL/min, lo cual es nos indica que es robusto para variaciones de flujo menores al normal.

10.11 TOLERANCIA DEL MÉTODO

Los resultados obtenidos se presentan en las siguientes tablas:

Tolerancia del método para 1,3,5-Trihidroxibenceno.

Tabla 48: Condición normal. HPLC WATERS MODELO 1515 AUTOMATIZADO

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	32.0	480.0	128099.8	126408.0	98.48
2	32.0	480.0	128099.8	127032.5	98.96
3	32.0	480.0	128099.8	126972.5	98.92

Tabla 49: Condición 1. HPLC WATERS MODELO 510 MANUAL

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	32.0	480.0	129904.3	124597.5	95.72
2	32.0	480.0	129904.3	125485.0	96.40
3	32.0	480.0	129904.3	125471.5	96.39

Resultados estadísticos de tolerancia del método.

Media aritmética: $\bar{Y} = 97.48\%$

Desviación estándar: $S = 1.44$

Coefficiente de variación: $CV = 1.48\%$.

El CV no excede el 2.0%

Tolerancia del método para 1,3,5-Trimetoxibenceno.

Tabla 50: Condición normal. HPLC WATERS MODELO 1515 AUTOMATIZADO

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	32.0	480.0	117146	112050.5	95.54
2	32.0	480.0	117146	111079	94.71
3	32.0	480.0	117146	111702	95.24

Tabla 51: Condición 1. HPLC WATERS MODELO 510 MANUAL

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	32.0	480.0	115185.2	108356	93.96
2	32.0	480.0	115185.2	108813	94.36
3	32.0	480.0	115185.2	109226	94.72

Resultados estadísticos de tolerancia del método.

Media aritmética: $\bar{Y} = 94.76\%$

Desviación estándar: $S = 0.73$

Coefficiente de variación: $CV = 0.77\%$.

El CV no excede el 2.0%

Tolerancia del método para Clonixinato de lisina.

Tabla 52: Condición normal. HPLC WATERS MODELO 1515 AUTOMATIZADO

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	50.0	480.0	1356803.8	1387067.5	101.60
2	50.0	480.0	1356803.8	1386443.0	101.56
3	50.0	480.0	1356803.8	1383051.5	101.31

Tabla 53: Condición 1. HPLC WATERS MODELO 510 MANUAL

No	Cantidad pesada estándar (mg)	Cantidad pesada muestra (mg)	Área estándar	Área muestra	% Recobro
1	50.0	480.0	1339906	1381698	102.48
2	50.0	480.0	1339906	1381900	102.50
3	50.0	480.0	1339906	1380552	102.40

Resultados estadísticos de tolerancia del método.

Media aritmética: $\bar{Y} = 101.98\%$

Desviación estándar: $S = 0.53$

Coefficiente de variación: $CV = 0.52\%$.

El CV no excede el 2.0%

Tabla 54: Análisis de resultados de la Tolerancia del método.

Criterio de aceptación	Resultados			Cumplen
	CV ≤ 2.0%	1,3,5 Trihidroxibenceno	1,3,5 Trimetoxibenceno	
CV= 1.48%		CV=0.77%	CV=0.52	SI

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede indicar que estos cumplen con el criterio de aceptación, por lo que el método analítico se puede llevar a cabo en cualquiera de las condiciones y con ello generando resultados reproducibles, es decir el método analítico es tolerante a estos cambios.

11. CONCLUSIONES

De acuerdo a los análisis de resultados se puede concluir que: El sistema es lineal en un intervalo de concentración de 19.2 $\mu\text{g/mL}$ -38.4 $\mu\text{g/mL}$ tanto para 1,3,5-Trihidroxibenceno como para el 1,3,5-Trimetoxibenceno y de 30 $\mu\text{g/mL}$ -60 $\mu\text{g/mL}$ para Clonixinato de lisina, ya que los resultados obtenidos son directamente proporcionales a la concentración de los analitos y existe concordancia entre los resultados analíticos individuales, el sistema es preciso, adecuado, por lo que permite asegurar la confiabilidad de los resultados del método analítico. El método de análisis también es lineal en el intervalo de concentración estudiado (19.2 $\mu\text{g/mL}$ -38.4 $\mu\text{g/mL}$ tanto para 1,3,5-Trihidroxibenceno como para el 1,3,5-Trimetoxibenceno y de 30 $\mu\text{g/mL}$ -60 $\mu\text{g/mL}$ para Clonixinato de lisina), es preciso ya que no se observaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos entre los analistas y días, los resultados obtenidos del método concuerdan con el valor de referencia por lo que es exacto, es específico ya que no existe interferencia ni de los excipientes y ni de la fase móvil de acuerdo a los cromatogramas de las figuras 3-7, solo responde a los analitos de interés, también se puede decir que es capaz de detectar las posibles degradaciones de los analitos a diferentes pH(figuras 8-9), es robusto para la condición 1(Flujo de 0.7 mL/min en lugar de 1.0 mL/min) y además tolerante a la variación analizada (Cambio de HPLC de inyección automatizada a HPLC inyección manual). Con respecto a la estabilidad de las muestras, los tres analitos son estables a la condición 1(temperatura 25 °C y sin protección de la luz por 3 horas) por ello, se recomienda una vez preparadas las muestras no dejar pasar más de tres horas para su análisis para así evitar errores en la respuesta analítica del equipo. Por lo tanto se puede concluir que, si se llevan a cabo las condiciones cromatográficas y analíticas propuestas en este método analítico y de acuerdo a los resultados obtenidos el método se considera validado.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. United States Pharmacopeial 34. 2011. U.S. Pharmacopeia National Formulary NF 29. Convention 12601, MD 20852.
2. Farmacopea de los Estados Unidos de América. 2008. Edición en español. USA: USP-NF.
3. Secretaria de Salud. 2011. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. México. 10^a ed.: SSA.
4. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A.C. 2002. Guía de Validación de Métodos Analíticos. México: CNQFB.
5. Harris, D. 2001. Análisis Químico Cuantitativo. México. 6^a ed.: Interamericana, 230-298.
6. Yost R, Etre L, Colon R. 1980. Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica. Estados Unidos de América: Perkin-Elmer.
7. Index Merck. 2001. 13th. New Jersey, USA. Merck & Co, 2196, 4571, 8180.
8. Peña, H. 1996. Ensayo clínico terapéutico con el analgésico clonixinato de lisina. IMI; 75: 200-203.
9. Revista Médica del Hospital General de México. 2003. Un nuevo esquema terapéutico en el manejo del dolor abdominal de tipo cólico. Vol: 66, Núm.: 3, Julio-Septiembre, 143-146.
10. Goodman y Gilman. 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica. México. 9^a ed.: Interamericana, 677-679.
11. Cohen, Yves. 2001. Análisis y Control de Calidad en los Medicamentos, Principios activos, Excipientes, Dosis, Envasado y Etiquetado. México.: Limusa, 112-141,1040-1043.
12. Sweetman, Sean. 2003. Guía Completa de Consulta Farmacoterapeutica. Barcelona. 19^a ed: Pharma, 75-77, 80-83.
13. Santos J, Aparicio A, Callejon M. 2005. Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors, Analytical Chemical Act, 116-122.
14. Noa Pérez, Mario. 2005. Cromatografía de gases y de líquidos de alta resolución, aplicaciones en el análisis de alimentos. México.: UAM, 123-207.

15. Aguirre Ortega, Leticia. 2001. Validación de métodos analíticos. España: A.E.F.I, 37-113.
16. Waters Corporation. 1997. Millennium 32 System Suitability Quick Reference Guide. Milford: Waters Corporation.
17. Kromidas, Stavros. 2006. HPLC Made to Measure. USA.: WILEY-VCH, 3-57.
18. Centro Nacional de Metrología. 2000. Manual de buenas prácticas de laboratorio. México. 2ª ed, 78-80.
19. Engineering Pharmaceutical Innovation. 2003. Technology Transfer. USA.: ISPE, 81-84.
20. Bliesner M, David. 2006. Validating Chromatographic methods, a practical Guide. USA.: WILEY-INTERSCIENCE, 1-283.
21. Valiente Barderas, Antonio. 2000. Problemas de balances de materia y energía. México.: Alhambra Mexicana, 3-26.
22. Waters Corporation. 2005. Guía de funcionamiento HPLC Waters modelo 1515, 7.1-7.51.
23. Creus Solé, Antonio. 2001. Instrumentos industriales, su ajuste y calibración. México. 2ª ed.: Alfaomega, 213:238.

13. ANEXO

MANTENIMIENTO DEL EQUIPO DE HPLC

El mantenimiento de equipos de HPLC en la validación de métodos analíticos es de suma importancia ya que de ello depende el que se tengan resultados precisos y confiables, es por ello que se describe en forma general en el presente anexo el mantenimiento que se realiza a un cromatografo de líquidos de alta resolución (HPLC) marca Waters modelo 1515 automatizado, mismo que se utilizo para llevar a cabo la validación analítica desarrollada en la presente tesina.

Definición de mantenimiento:

Se puede definir al mantenimiento como la conservación o protección de componentes o equipos para una condición determinada, especialmente en lo que se refiere a su eficiencia y bajo costo de operación.

Objetivos del mantenimiento.

- Garantizar disponibilidad.
- Satisfacer requisitos de Calidad.
- Cumplir Normas de Seguridad.
- Maximizar los beneficios.
- Evitar riesgos laborales.
- Prolonga la vida útil de los equipos.
- Prepararse a situaciones de emergencia.
- Evitar resultados erróneos por descalibración.
- Seguir las recomendaciones del fabricante.

Que se debe de observar.

- Que los equipos, sustancias, productos o herramienta de trabajo no constituyan una fuente de peligro ni pongan en riesgo la seguridad y salud de los trabajadores.
- Que los proveedores entreguen información y capacitación sobre la instalación, mantenimiento preventivo y el uso apropiado de los equipos.
- Solicitar una traducción al idioma oficial y en lenguaje sencillo y preciso.
- Elaborar y facilitar folletos informativos a los usuarios relativos a los equipos.

Entre las principales ventajas del mantenimiento, podemos mencionar las siguientes:

- Mejor conservación de los equipos.
- Aumento de la calidad y de la productividad.
- Disminución de paralizaciones imprevistas.
- Disminución de reparaciones.
- Reducción de horas extra de trabajo y reducción de costos.

Existen dos tipos de mantenimiento uno de ellos llamado preventivo y el otro correctivo.

Mantenimiento preventivo.

La finalidad del mantenimiento preventivo es encontrar y corregir los problemas menores antes de que estos provoquen fallas. El mantenimiento preventivo puede ser definido como una lista completa de actividades, todas ellas realizadas por usuarios, operadores, y personal de mantenimiento. Para asegurar el correcto funcionamiento de los equipos.

VENTAJAS:

- Confiabilidad, los equipos operan en mejores condiciones de seguridad, ya que se conoce su estado, y sus condiciones de funcionamiento.
- Disminución del tiempo muerto, tiempo que se paran los equipos.
- Mayor duración de los equipos e instalaciones.
- Disminución de existencias en Almacén y por lo tanto sus costos, puesto que se ajustan los repuestos de mayor y menor consumo.
- Uniformidad en la carga de trabajo para el personal de mantenimiento debido a una programación de actividades.
- Menor costo de las reparaciones

Mantenimiento correctivo.

Es reparar, cambiar o modificar cualquier herramienta, maquinaria o equipo cuando se ha detectado alguna falla o posible falla que pudiera poner en riesgo el funcionamiento seguro de la herramienta o equipo y de la persona que lo utiliza.

Básicamente, el mantenimiento correctivo puede ser definido como la reparación de fallos que se han presentado sin previo aviso.

Dichos fallos pueden ser originados por explotación inadecuada del equipo, malfuncionamiento del equipo, negligencia por parte del personal que maneja el equipo o fallas en la calidad y el diseño de la máquina o equipo.

DESVENTAJAS

- Desconfianza en la utilización del equipo.
- Tiempo indefinido de equipo fuera de servicio.
- Menor duración de la vida útil del equipo y sus instalaciones.
- Riesgo de no contar con existencias en almacén.
- Aumento en la carga de trabajo para el personal de mantenimiento.
- Mayor costo de las reparaciones.
- Complica el análisis de las averías.

El mantenimiento preventivo y correctivo que se realiza a un HPLC durante una validación de un método analítico se desglosara en forma general en las siguientes páginas, considerando que pueden presentarse o no todos los casos. Por considerar de suma importancia las partes que forman un cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Waters Modelo 1515 automatizado y para ser más entendible el mantenimiento que se lleva acabo se muestra la figura 1:



Figura1. Partes que forman un HPLC WATERS MODELO 1515

MANTENIMIENTO A SEGUIR PARA GARANTIZAR EL FUNCIONAMIENTO ININTERRUMPIDO DE UN HPLC.

Reiniciar el sistema.

Los instrumentos del sistema se deben reiniciar al menos una vez por semana. Para esto, se debe apagar el Cromatografo de líquidos de alta resolución (HPLC), el modulo de transferencia, el detector, la bomba durante un mínimo de 1 minuto y, a continuación, volver a encender cada instrumento. Este procedimiento sirve para garantizar que los componentes mecánicos y electrónicos, se sincronizan para un correcto funcionamiento.

Tabla 1. Listado de los sistemas de mantenimiento más frecuente en un HPLC.

SISTEMA DE ADMINISTRACIÓN DE ELUYENTES
a).- Sustituir el filtro de eluyentes
b).- Reemplazar la junta del émbolo
c).- Sustituir el émbolo
d).- Sustituir el cartucho de la válvula de retención de entrada
e).- Sustituir el filtro de la línea de entrada
SISTEMA DE ADMINISTRACIÓN DE MUESTRAS
a).-Sustituir la jeringa
b).-Sustituir el asiento del puerto de inyección
c).- Reconstruir el inyector

MANTENIMIENTO EN EL SISTEMA DE ADMINISTRACIÓN DE ELUYENTES

Descripción general:

Entre las tareas de mantenimiento del sistema de administración de eluyentes se encuentran:

- Sustituir las juntas del émbolo.
- Sustituir las juntas de lavado de juntas.
- Limpiar y sustituir un émbolo.
- Sustituir una válvula de retención de entrada.
- Sustituir el filtro de la línea de entrada.

Para garantizar una protección contra derrames adecuada, se debe comprobar que las bandejas de suministro y acondicionamiento de eluyentes están bien sujetas con tornillos antes de poner en marcha el sistema.

Componentes del sistema de administración de eluyentes.

La figura 2 ilustra los componentes del sistema de administración de eluyentes (con la bandeja de distribución de eluyentes extraída).

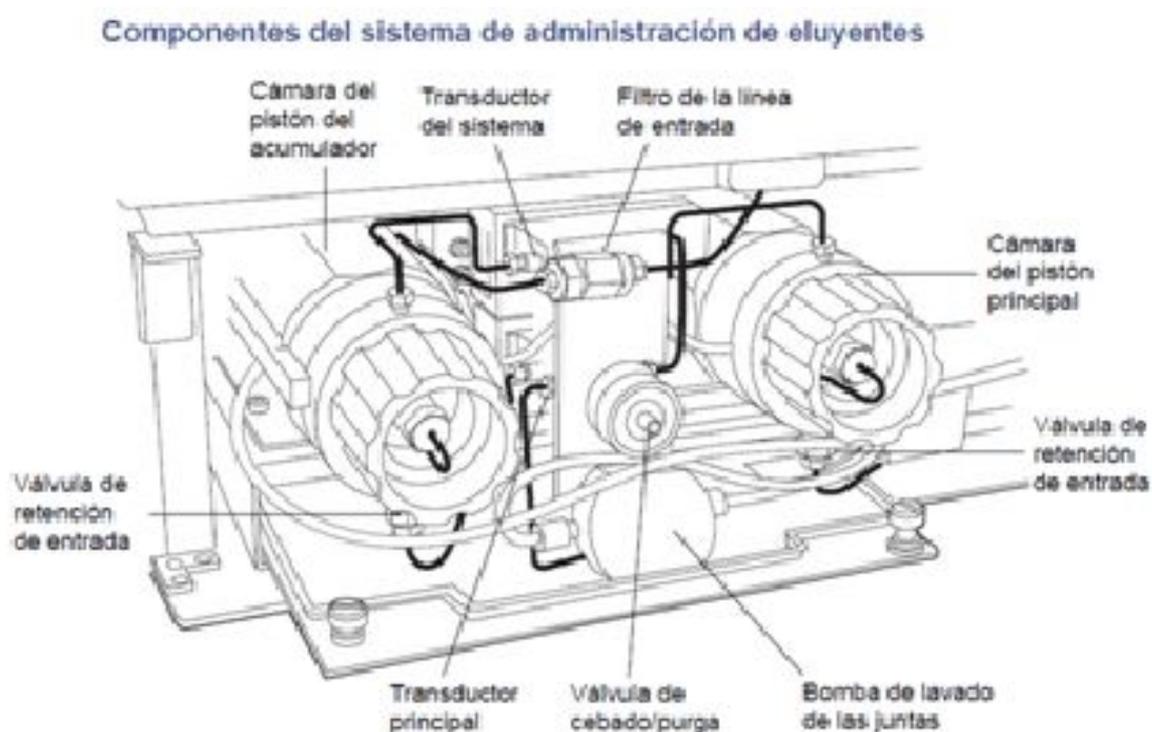


Figura 2. Componentes del sistema de administración de eluyentes.

Tabla 2. Componentes del sistema de administración de eluyentes.

Componente	Función
Cámara del pistón principal	Extrae y expelle eluyente como parte de un diseño de flujo en serie.
Cámara del pistón del acumulador	Extrae y expelle eluyente como parte de un diseño de flujo en serie.
Válvula de cebado/purga	Permite el cebado, la purga y la descarga de eluyentes.
Bomba de lavado de las juntas	Proporciona eluyente para lavar las juntas del émbolo principal y del acumulador.
Válvula principal de retención de entrada	Mantiene la dirección del flujo en la cámara principal del pistón, abriéndose en una sola dirección (se abre para cargar y se cierra para descargar).
Válvula de retención de entrada del acumulador	Mantiene la dirección del flujo en la cámara principal del pistón del acumulador, abriéndose en una sola dirección (se abre para cargar y se cierra para descargar).
Transductor principal	Percibe la contrapresión desarrollada por la resistencia al flujo de eluyente en la cámara del pistón principal.
Transductor del sistema	Percibe la contrapresión desarrollada por la resistencia al flujo de eluyente en el sistema de HPLC.
Filtro de la línea de entrada	Filtra el eluyente entre el sistema de administración de eluyentes y el sistema de administración de muestras.

Extraer el cabezal, el conjunto de lavado de juntas y el émbolo.

La figura 3 muestra el cabezal, la tuerca del cabezal, el émbolo, el conjunto de lavado de juntas y el conjunto de válvulas de retención de cada cámara del pistón de suministro de eluyentes.

Extraer el cabezal, el conjunto de lavado de juntas y el embolo siempre que se vayan a realizar las siguientes tareas:

- Reemplazar las juntas del émbolo
- Limpiar o sustituir un émbolo.
- Realizar tareas de mantenimiento en las juntas de lavado de juntas.

Componentes de la cámara del pistón

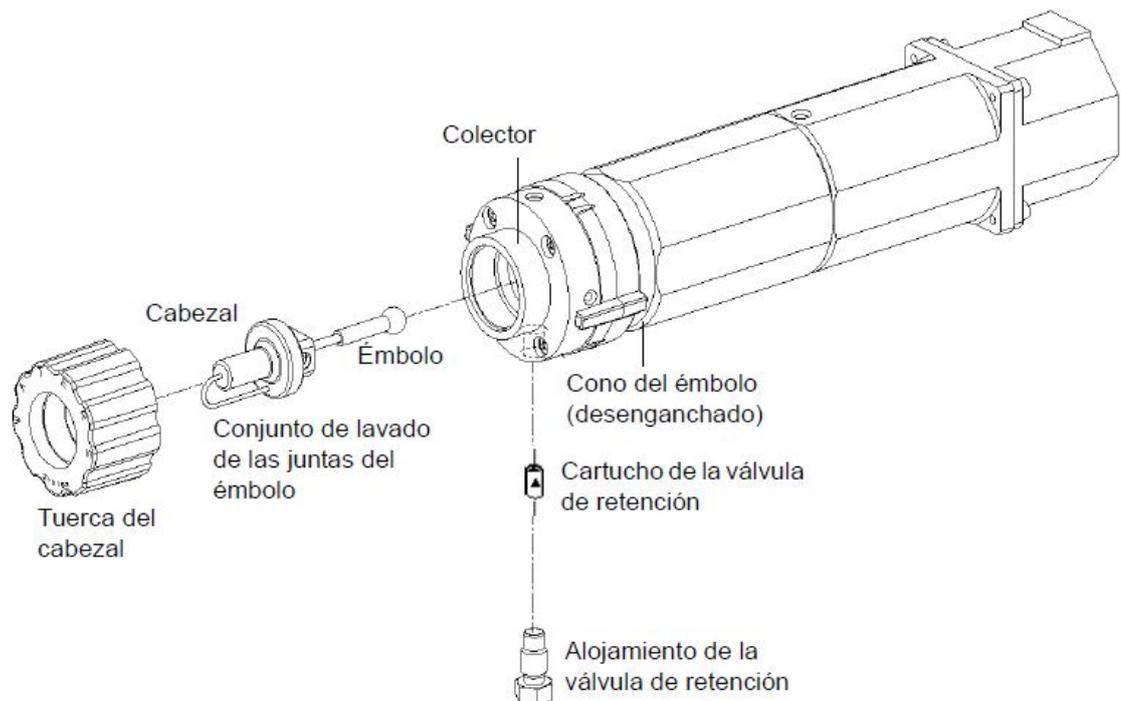


Figura 3. Componentes de la cámara del pistón

Sustituir las juntas del émbolo.

Este procedimiento incluye la sustitución de las siguientes juntas:

- Junta del émbolo
- Junta de cubierta de entrada
- Junta de cubierta de salida

Sustituir la junta del émbolo

- 1.- Extraer el cabezal.
2. Usar el extremo de plástico de la herramienta para extraer juntas para retirar del cabezal la junta del émbolo.
- 3.- Humedecer la herramienta de inserción, la abertura de la junta y la nueva junta del émbolo con metanol grado HPLC al 100% antes de instalar la junta.
- 4.- Colocar la junta de lavado nueva en la herramienta para colocar juntas, con el lado con resorte hacia la herramienta.
- 5.- Insertar la punta de la herramienta en la abertura de la junta del émbolo, en el cabezal y a continuación, apretar con firmeza para instalar la junta.

Sustituir las juntas de la cubierta

- 1.- Extraer el cabezal.
- 2.- Dirigir una corriente de aire comprimido hacia el centro de la junta de la cubierta o usar pinzas de plástico para extraer las juntas de las cubiertas de entrada y de salida de las aberturas de juntas en el cabezal. Auxiliarse de la figura 4.



Figura 4. Juntas del émbolo y de la cubierta.

- 3.- Humedecer las nuevas juntas y las aberturas de juntas con metanol grado HPLC al 100%.

4.- Colocar las nuevas juntas de cubierta en las aberturas correspondientes en el cabezal.

5.- Usar un objeto plano limpiado con metanol grado HPLC, como una ventana del detector, para presionar firmemente las juntas de cubierta en las aberturas del cabezal de la bomba.

6.- Una vez sustituidas las juntas volver a instalar el cabezal, el alojamiento del lavado de juntas, la arandela y los conjuntos del émbolo.

Sustituir las juntas del conjunto de lavado de juntas

Este procedimiento incluye la sustitución de las siguientes juntas:

- Juntas de la cubierta del lavado de juntas
- Dos juntas de tubos
- Junta de lavado del émbolo

Para sustituir las juntas del componente de lavado de juntas

1.- Extraer el conjunto de lavado de juntas.

2.- Usar el extremo de plástico de la herramienta para retirar juntas para extraer de su asiento la junta de lavado del émbolo. Repetir este procedimiento para cada una de las juntas de los tubos.

3.- Usar las pinzas de plástico para retirar la junta de la cubierta del lavado de juntas. Auxiliarse con la figura 5.

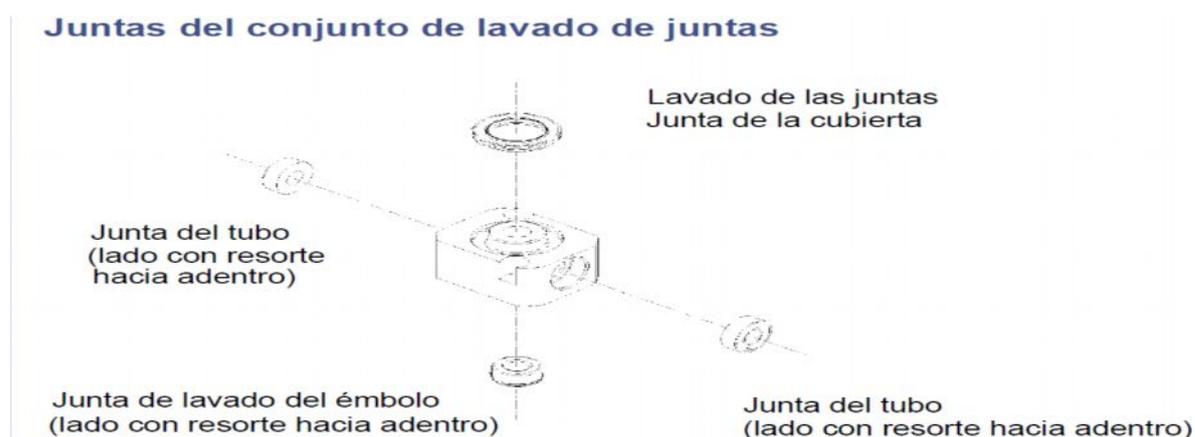


Figura 5. Juntas del conjunto de lavado de juntas.

4.- Usando metanol grado HPLC al 100%, humedecer la herramienta de inserción, cada junta nueva y la abertura en donde se colocará antes de instalar la junta.

5.- Colocar la junta de lavado del émbolo nueva en la herramienta para colocar juntas, con el lado con resorte hacia afuera de la herramienta.

6.- Insertar la punta de la herramienta en la abertura de la junta y, a continuación, apretar con firmeza para instalar la junta. Repetir esta operación para cada una de las juntas de los tubos.

7.- Instalar la nueva junta presionándola con el pulgar dentro de la cavidad.

8.- Volver a instalar la arandela del conjunto del alojamiento del lavado de juntas.

9.- Deslizar el alojamiento del lavado de las juntas con la arandela en el émbolo y después insertar el conjunto en el cabezal, volver a insertar el cabezal, el conjunto de lavado de juntas y el émbolo.

Limpiar y sustituir un émbolo

Limpiar el émbolo.

1.- Extraer el conjunto de lavado de juntas.

2.- Inspeccionar el émbolo para ver si está dañado, muy gastado o si tiene residuos de la fase móvil, sin llegar a separarlo del cabezal de la bomba y del conjunto de lavado de juntas. Si la junta del émbolo tiene residuos de fase móvil, se debe llevar a cabo lo siguiente: Auxiliarse de acuerdo a la figura 6.

a. Separar el émbolo del cabezal y del conjunto del alojamiento del lavado de juntas.

b. Limpiar el émbolo con una piedra pómez fina para eliminar la capa de residuos.

c. Aclarar bien el émbolo con agua para eliminar cualquier resto de material abrasivo y a continuación, limpiarlo.

3.- Volver a revisar el émbolo. Si muestra un desgaste excesivo, se debe sustituir y si fuera necesario, la junta del émbolo y las juntas de la cubierta.

Sustituir el émbolo.

Deslizar el alojamiento del lavado de las juntas con la arandela en el émbolo nuevo y después insertar el conjunto en el cabezal, el conjunto de lavado de juntas y el émbolo.

Émbolo, lavado de juntas y cabezal

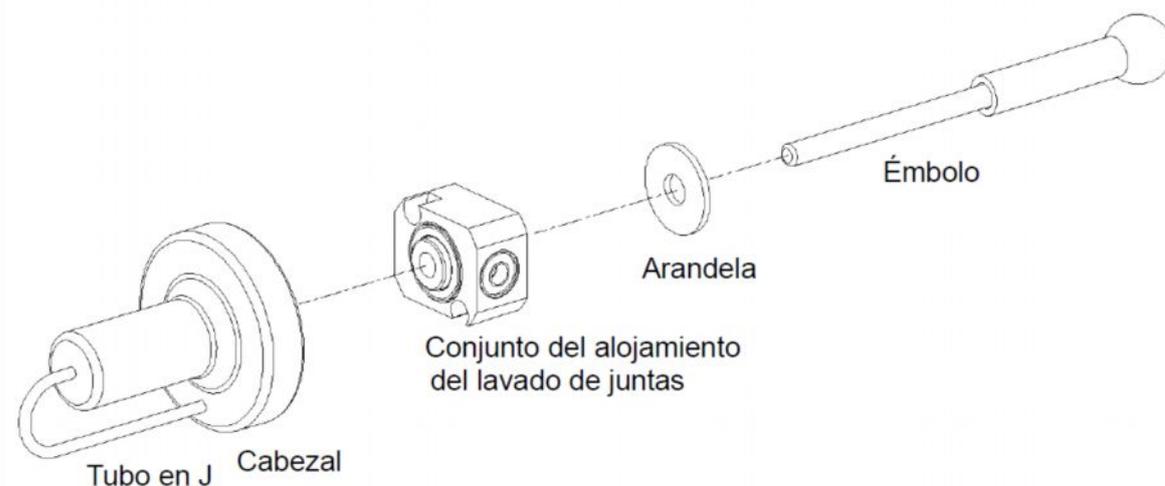


Figura 6. Émbolo, lavado de juntas y cabezal.

Sustituir un cartucho de válvula de retención de entrada

Para sustituir una válvula de retención de entrada en cualquiera de las cámaras del pistón.

- 1.- En la pantalla Otros diagnósticos, seleccionar Motores y válvulas.
- 2.- Aflojar los tornillos que aseguran las bandejas de distribución de eluyentes y de acondicionamiento de eluyentes, tirar de las bandejas hacia afuera unas cuantas pulgadas para tener acceso a las válvulas de retención.
- 3.- Usar la llave de 1/2 pulgada para sostener la cubierta de la válvula de retención de entrada mientras se desconecta el tornillo de compresión de la válvula de retención de entrada con la llave de 5/16 pulgadas. Ver la figura 7.
- 4.- Usar la llave de 1/2 pulgada para desconectar el alojamiento de la válvula de retención del colector.
- 5.- Girar la posición de la cubierta de la válvula de retención de entrada para retirar el cartucho viejo de la válvula de retención.
- 6.- Inspeccionar la cubierta de la válvula de retención y limpiarla si fuera necesario. Humedecer la cubierta con metanol grado HPLC al 100%.
- 7.- Humedecer el cartucho nuevo de la válvula de retención con metanol grado HPLC al 100%.
- 8.- Insertar el cartucho de repuesto de la válvula de retención dentro de la cubierta de ésta.

9.- Insertar el alojamiento de la válvula de retención de entrada en el alojamiento de la cámara del pistón y, a continuación, apretarlo con los dedos.

10.- Usar la llave de 1/2 pulgada para apretar el alojamiento de la válvula de retención de entrada 1/8 vuelta.

11.- Usar la llave de 1/2 pulgada para sostener la cubierta de la válvula de retención mientras se reinstala y se aprieta el tornillo de compresión en la cubierta de la válvula de retención con la llave de 5/16 pulgadas.

12.- Seleccionar Motores y válvulas en la pantalla otros diagnósticos y presionar ok para devolver la válvula a su estado normal.

13.- Si las líneas del HPLC están vacías, se debe cebar en seco el sistema de administración de eluyentes antes de cebarlo en húmedo o iniciar la distribución de eluyente con el fin de extraer el eluyente hacia la cavidad del émbolo.

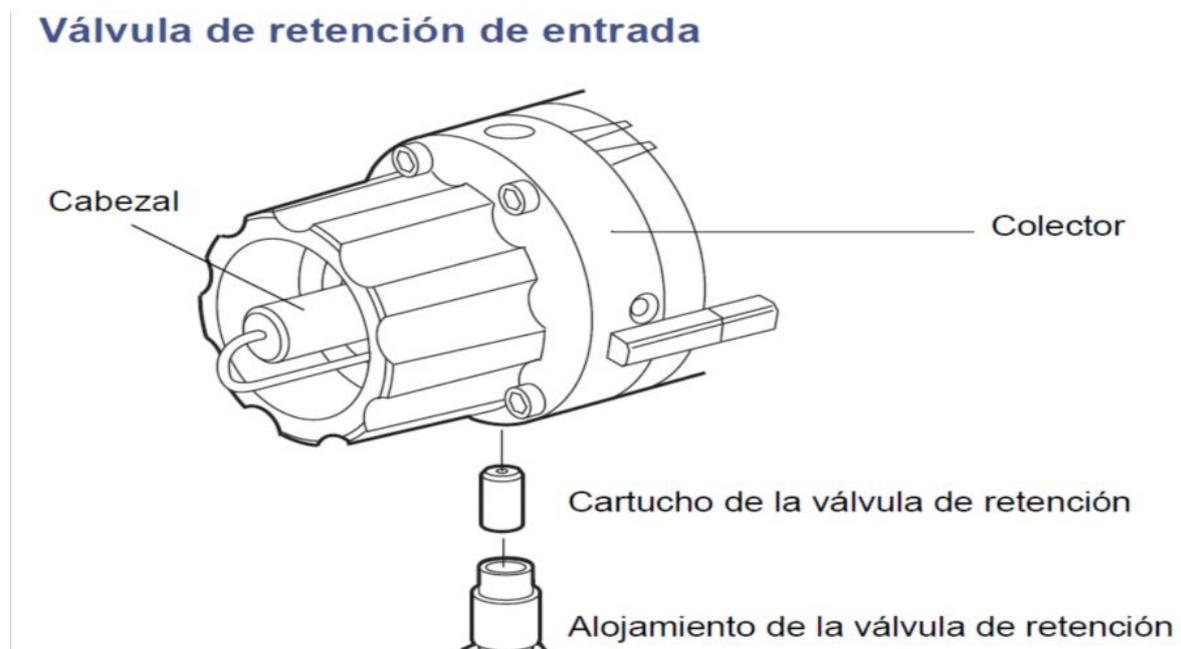


Figura 7. Válvula de retención de entrada y cartucho de la válvula de retención.

Sustituir el filtro de la línea de entrada

Los filtros de la línea de entrada filtran el eluyente entre el sistema de administración de eluyentes y el sistema de administración de muestras. Se debe limpiar y sustituir el elemento del filtro de la línea de entrada cuando sea el origen de una contrapresión elevada.

Para sustituir el filtro de la línea de entrada

- 1.- Utilizar una llave de 5/8 pulgada y otra de 5/16 pulgada para desconectar el tornillo de compresión del lateral izquierdo del filtro de la línea de entrada del alojamiento de entrada.
- 2.- Usar una llave de 5/8 pulgada para sostener el alojamiento de la salida del filtro mientras se afloja el alojamiento de entrada con otra llave de 5/8 pulgada.
- 3.- Invertir la posición del alojamiento de entrada para extraer el filtro de la línea de entrada.
- 4.- Humedecer el filtro de la línea de entrada de repuesto con metanol grado HPLC.
- 5.- Insertar el elemento de repuesto del filtro de la línea de entrada en el alojamiento del filtro de la línea de entrada.
- 6.- Volver a conectar los alojamientos de entrada y de salida del filtro de la línea de entrada.
- 7.- Volver a apretar el tornillo de compresión en el alojamiento de entrada.
- 8.- Enjuagar el sistema de administración de eluyentes con fase móvil a un flujo de 1.0 ml/min durante 10 minutos.
- 9.- Comprobar que no existan fugas en el filtro de la línea de entrada y apretar las conexiones según se requiera. Ver figura 8.

Sustituir el filtro de la línea de entrada

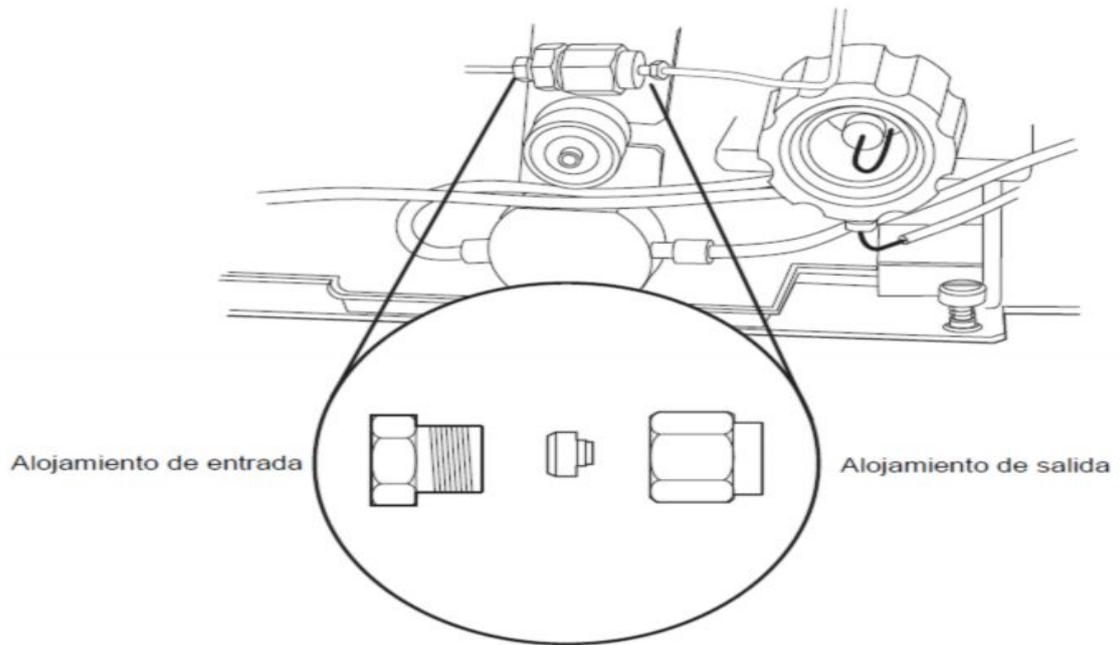


Figura 8. Filtro de la línea de entrada.

MANTENIMIENTO EN EL SISTEMA DE ADMINISTRACIÓN DE MUESTRAS

Si surge algún problema con alguno de los componentes del sistema de administración de muestras, se deben seguir los procedimientos desglosados en las páginas siguientes.

Cuando se extrae la cubierta superior o lateral derecha del HPLC para realizar tareas de mantenimiento, los motores del conjunto XYZ sólo funcionan a velocidades muy lentas. Esta restricción permite observar de forma segura la aguja y el bucle de retención. La velocidad de funcionamiento normal se recupera al reinstalar las cubiertas.

Descripción general

Entre las tareas de mantenimiento del sistema de administración de muestras se encuentran:

- Sustituir la jeringa
- Sustituir el conjunto de la aguja
- Sustituir el asiento del puerto de inyección
- Sustituir el bucle de retención
- Sustituir el bucle de muestras

La figura 9 muestra una vista lateral de los conjuntos y los componentes del sistema de administración de muestras.



Figura 9. Vista lateral de los conjuntos y componentes del sistema de administración de muestras.

La tabla 3 describe las funciones de cada conjunto y componentes del sistema de administración de muestras.

Tabla 3. Conjuntos/Componentes del Sistema de administración de muestras

Conjunto/Componente	Función
Jeringa	Extrae muestra del vial o pocillo de muestras hasta el bucle de muestras.
Transportador de placas	Acoge un máximo de cuatro placas de tipos que pueden contener hasta 96 muestras.
Válvula de inyección	Acepta muestra proveniente de la aguja del inyector y conecta o desconecta el bucle de muestras del flujo de alta presión. En la posición Prime (Cebarr), dirige el flujo de eluyente al desecho.
Bucle de muestras	Admite un volumen de bucle de muestras (estándar de 50 μ L) de muestra.
Bucle de retención	Retiene la muestra antes de la inyección en el bucle de muestras.
Bloque de montaje de la aguja	Contiene sensores que registran los movimientos ascendentes y descendentes de la aguja del inyector.
Aguja	Perfora la película de la placa de muestra o el septum preporforado, extrae muestra y la inyecta en la trayectoria del flujo a través del puerto de inyección.
Asiento del puerto de inyección	Sella la aguja al puerto de inyección.

Sustituir la jeringa

La jeringa se debe sustituir bajo las siguientes condiciones:

- La punta del émbolo de la jeringa se desgasta o se decolora.
- Se desea cambiar a un tamaño de jeringa diferente (100, 250, 500 μL).

Retirar la jeringa

Para extraer la jeringa

- 1.- Abrir la puerta del compartimiento de jeringas.
- 2.- Quitar la tuerca estriada que mantiene unido el cuerpo de la jeringa a la abrazadera de montaje.
- 3.- En la pantalla principal, presionar Diagnostico.
- 4.- Presionar la tecla Sensores, motores en la pantalla Diagnostico.
- 5.- En la pantalla sensores, presionar motores.
- 6.- En la pantalla de diagnostico motores y válvulas seleccionar la casilla posición de la jeringa y después presionar Enter para ver la lista desplegable.
- 7.- Seleccionar Full de la lista desplegable y después presionar Enter.
- 8.- Cuando la abrazadera de montaje se ha bajado por completo, sujetar el cilindro de la jeringa por la parte próxima a la abrazadera y desenroscar la jeringa, en el sentido contrario a las agujas del reloj, hasta que se suelte. Ver figura 10.

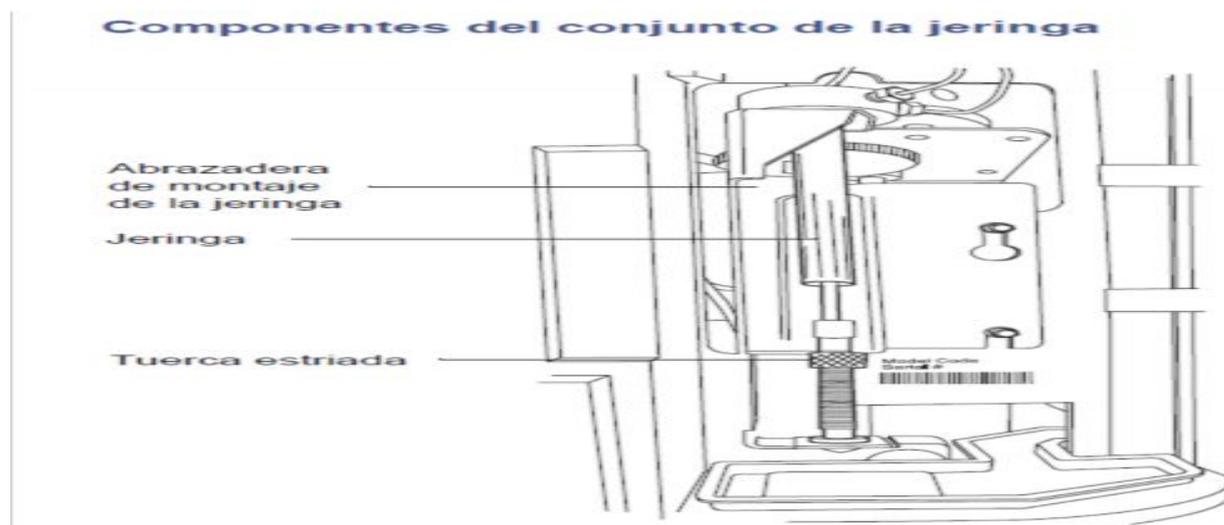


Figura 10. Componentes del conjunto de la jeringa

Para instalar una jeringa

- 1.- Llenar parcialmente la nueva jeringa (a mano) con eluyente de purga (para eliminar las burbujas de aire).
- 2.- Enroscar parcialmente la jeringa nueva en la abrazadera de montaje, no apretar.
- 3.- Empujar hacia abajo el cilindro de la jeringa para el extremo roscado se deslice a través de la guía de la jeringa en la abrazadera de montaje.
- 4.- Apretar la jeringa con los dedos.
- 5.- En la pantalla de diagnostico Motores y válvulas, seleccionar posición de la jeringa y después presionar Enter para ver la lista desplegable.
- 6.- Seleccionar posición inicial y luego presionar Enter.
- 7.- En la pantalla motores y válvulas, presionar salir.
- 8.- En la pantalla diagnostico, presionar salir dos veces.
- 9.- Instalar y apretar con los dedos la tuerca estriada.
- 10.- Ejecutar la función Purgar jeringa varias veces para purgar cualquier resto de aire de la jeringa. Ver figura 11.

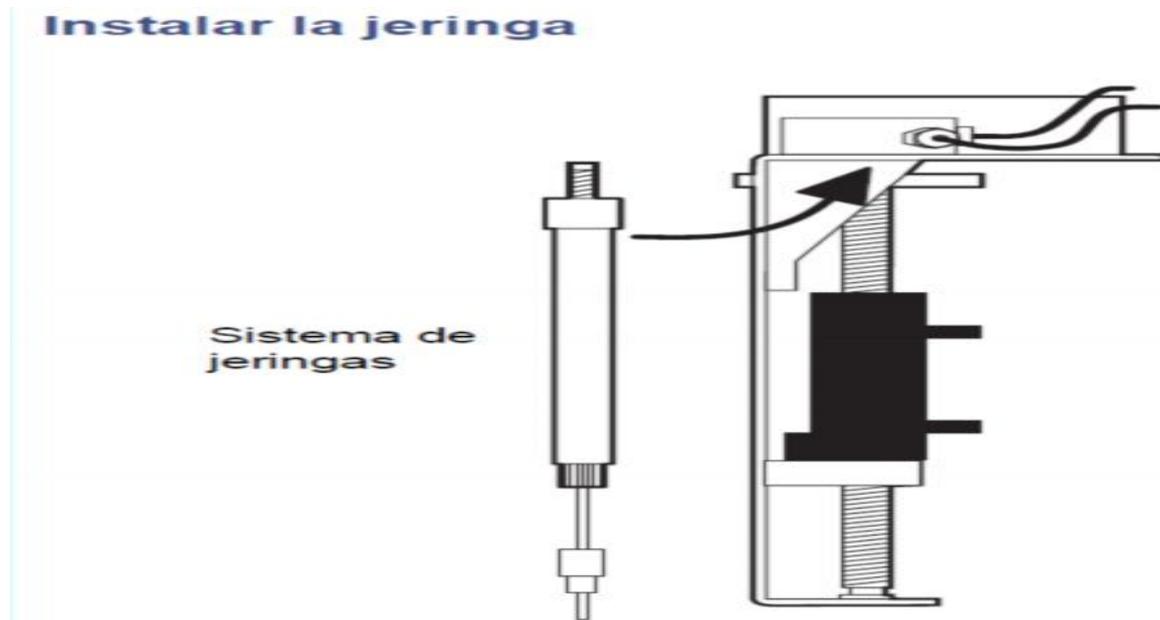


Figura 11. Instalar la jeringa.

Purgar la jeringa

Una vez instalada la jeringa, es necesario purgarla para extraer cualquier burbuja del sistema.

Para purgar la jeringa

- 1.- Presionar la tecla Menú/Estado para abrir la pantalla estado.
- 2.- Presionar Funciones directas.
- 3.- En el menú funciones directas, seleccionar purgar jeringa y, a continuación presionar Enter.
- 4.- En el cuadro de diálogo purgar jeringa, escribir el número de emboladas de la jeringa en la casilla emboladas de jeringa y el volumen de sustitución de eluyente desgasificado en las casillas volumen de sustitución. Se recomienda comenzar con 12 emboladas de jeringa y 600 ml de volumen de sustitución. Presionar OK, y se inicia el ciclo de purga de la jeringa.

Sustituir el conjunto de la aguja

Sustituir el conjunto de la aguja cuando se presente alguna de las siguientes condiciones:

- No se pueden corregir los picos de contaminación que aparecen en el cromatograma cambiando el eluyente de lavado del sistema de lavado de la aguja.
- Las alturas de los picos cromatográficos varían de forma inesperada, lo que se puede deber a:
 - Aguja doblada
 - Punta de aguja dañada
 - Aguja obstruida
 - Asiento del puerto de inyección desgastado

Retirar el conjunto de la aguja

Para retirar el conjunto de la aguja

- 1.- Apagar el HPLC.
- 2.- Extraer el termostatizador para columnas y después encender el HPLC.
- 3.- Extraer los paneles superior y lateral derecho del HPLC.

- 4.- En la pantalla principal, presionar la tecla diagnóstico y después otros diagnósticos.
- 5.- En la lista desplegable de otros diagnósticos seleccionar cambiar aguja.
- 6.- Retirar las placas del transportador, presionar OK.
- 7.- Cuando la pantalla muestre un mensaje indicando que la aguja está accesible, se debe desconectar la tuerca de compresión en la parte superior del conjunto de la aguja para liberar el bucle de retención. Ver la figura 12.

Liberar el bucle de retención del conjunto de la aguja

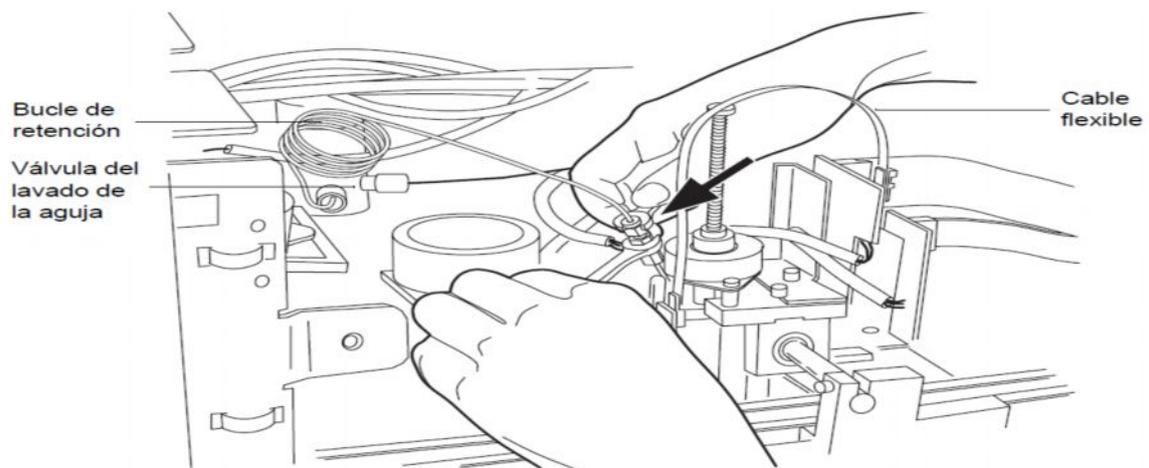


Figura 12. Forma de liberar el bucle de retención del conjunto de la aguja.

- 8.- Usar un desarmador adecuado para aflojar los dos tornillos de retención del bloque porta-agujas. Ver figura 13.

Aflojar los dos tornillos cautivos del bloque porta-agujas

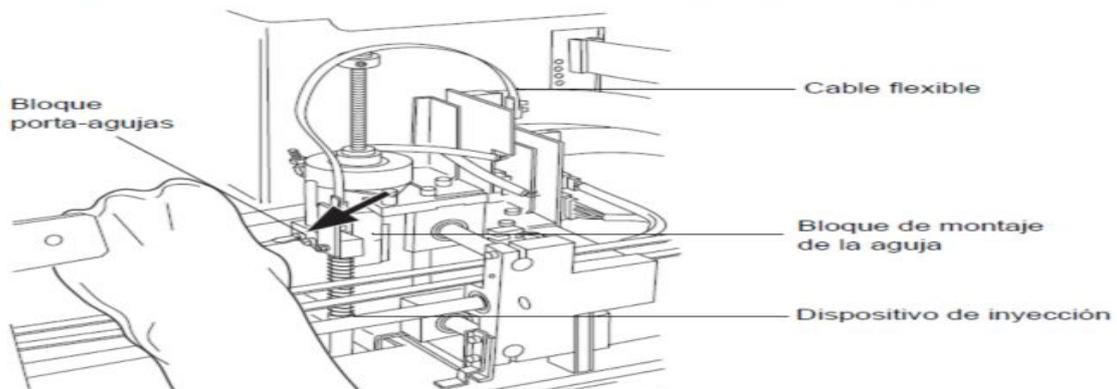


Figura 13. Aflojar los tornillos del bloque porta-agujas.

Instalar el conjunto de la aguja

Para instalar el conjunto de la aguja

1.- Sujetar el nuevo conjunto de la aguja por debajo de los cojinetes (pero por encima del tubo de PEEK). Ver figura 14.



Figura 14. Conjunto de la aguja.

2.- Deslizar la arandela accionada por resorte bajo los “dedos” en el bloque de montaje de agujas. Comprobar que el indicador en el conjunto de la aguja de recambio esté en el lado derecho de la aguja. Ver figura 15.

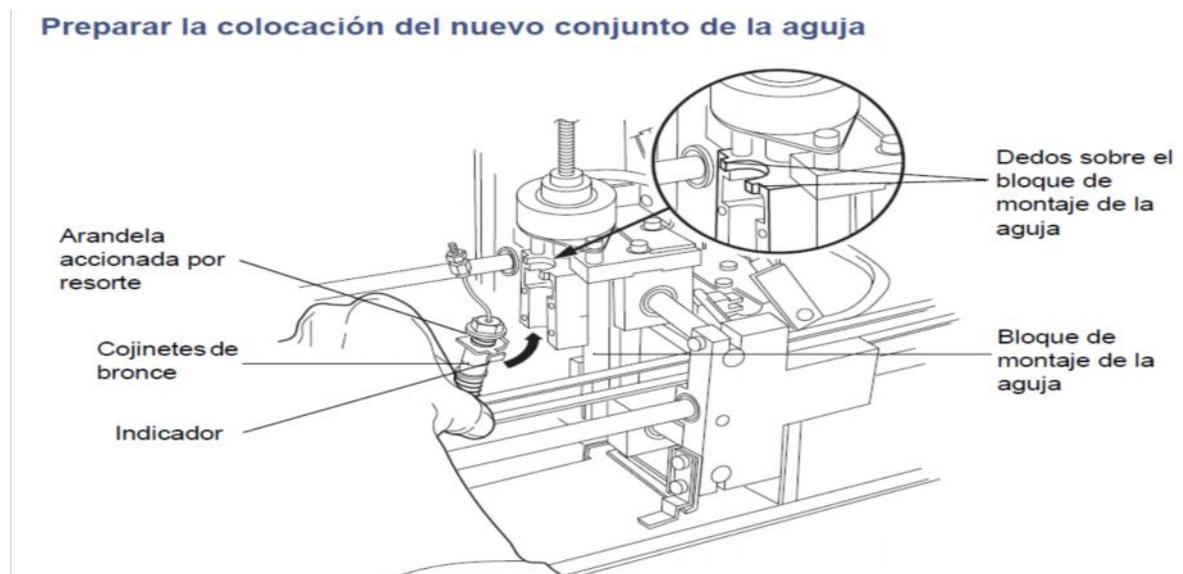


Figura 15. Colocación del nuevo conjunto de la aguja.

3.- Mover hacia arriba la aguja de recambio y luego hacia la cavidad del bloque de montaje de agujas.

- 4.- Reinstalar el bloque de montaje de la aguja y apretar los tornillos.
- 5.- Reconectar el bucle de retención existente o instalar uno nuevo.
- 6.- Al finalizar la sustitución del conjunto de la aguja, presionar OK, en donde el HPLC muestra un mensaje indicando que está redirigiendo la aguja a su posición inicial. Ver figura 16.

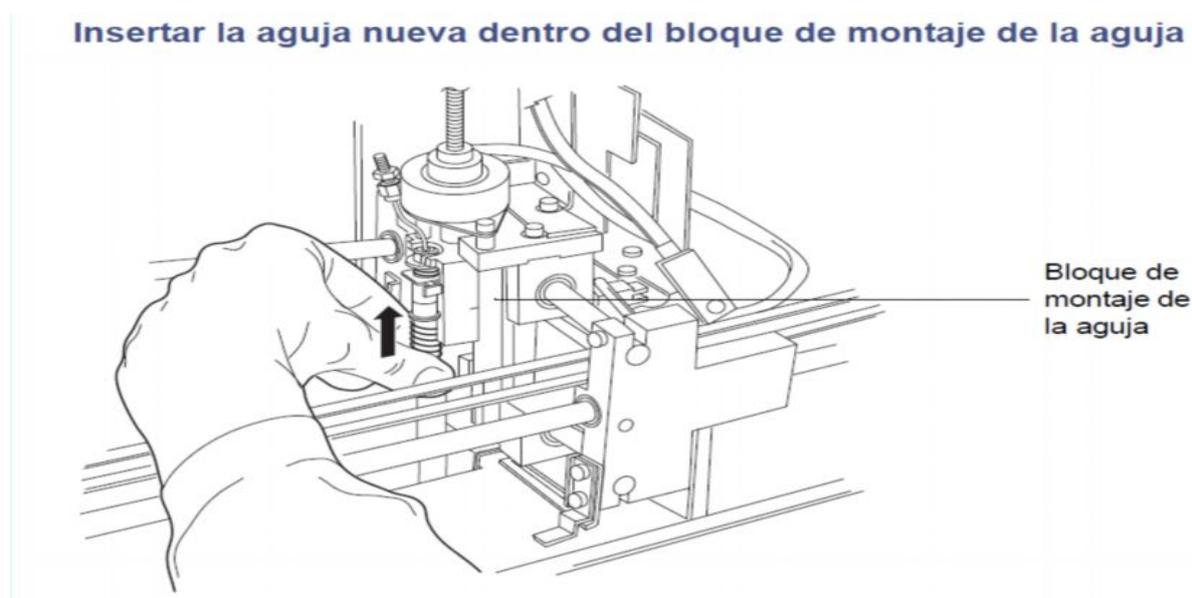


Figura 16. Colocación correcta de la aguja nueva en el bloque de montaje de la aguja.

Sustituir el asiento del puerto de inyección

Cuando se observan picos de contaminación que no se pueden corregir cambiando el fluyente de lavado del sistema de lavado de la aguja o bien alturas de picos cromatográficos que varían de forma inesperada, puede que la causa se encuentre en un asiento de inyección desgastado y precisamente en la validación que se realizó este problema fue uno de los más comunes y se procedió a cambiar el puerto de inyección según se describe en las siguientes páginas. También se cambió al mismo tiempo la arandela de la junta del puerto de inyección.

Extraer el asiento del puerto de inyección

Para extraer el asiento del puerto de inyección

- 1.- Apagar el HPLC y extraer el termostator para columnas y luego el panel lateral derecho.
- 2.- Extraer el bloque de aislamiento de espuma del compartimiento de muestras.

3.- Usar la llave Allen para aflojar los dos tornillos cautivos del panel frontal y a continuación, extraer el panel frontal. Ver figura 17.

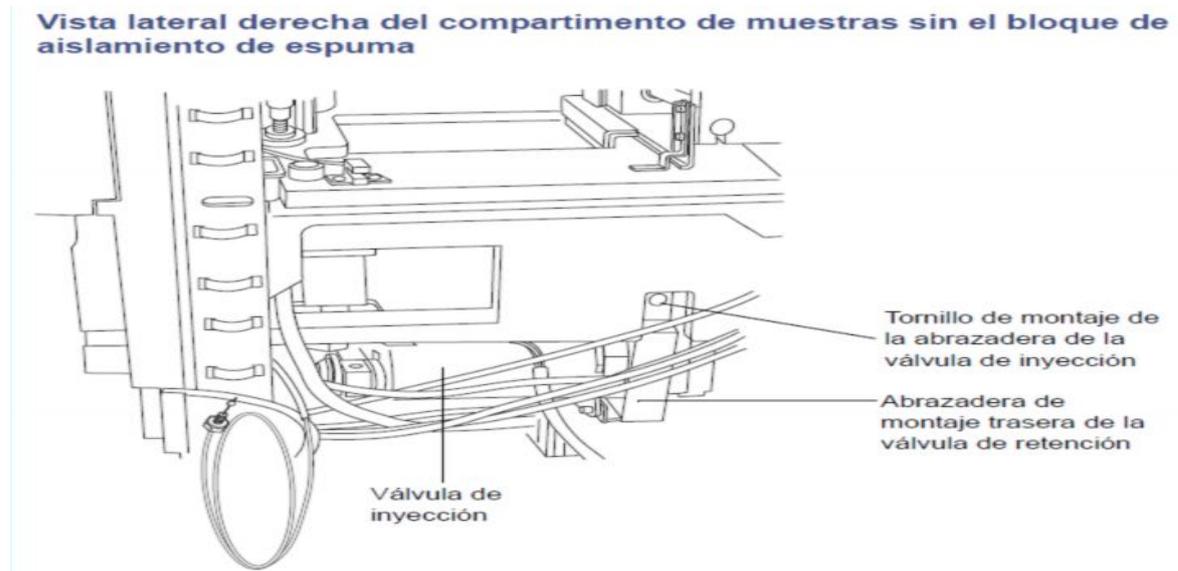


Figura 17. Compartimento de muestras sin el bloque de aislamiento de espuma.

4.- Usar un desarmador adecuado para aflojar el tornillo cautivo debajo del compartimento de muestras y después retirar la abrazadera de montaje del panel frontal derecho. Ver la figura 18.

Aflojar el tornillo de la abrazadera de montaje del panel frontal derecho

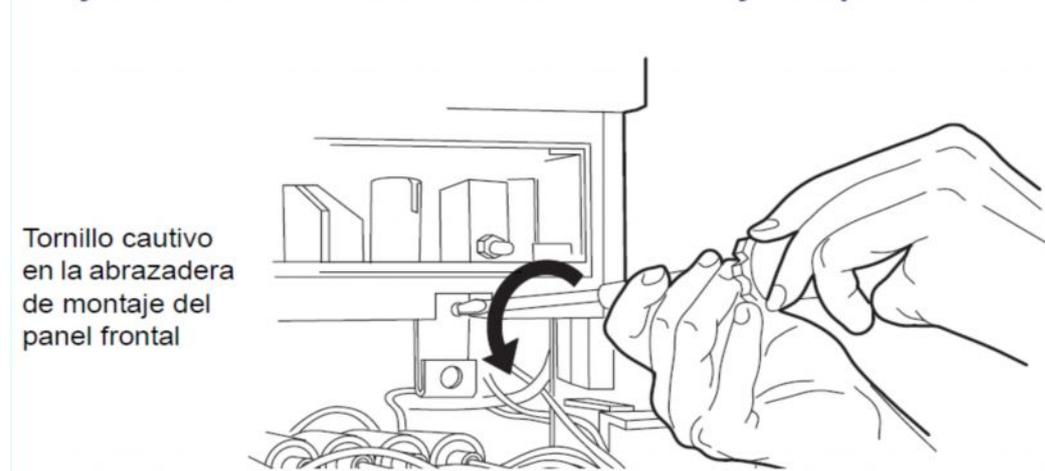


Figura 18. Forma de aflojar el tornillo de la abrazadera.

5.- Usar la llave de 1/4 pulgada para desconectar los tubos del puerto número 6 de la válvula de inyección.

6.- Usar la llave de 5/8 pulgada para aflojar la tuerca de roscado inverso debajo del alojamiento del lavado de la aguja.

7.- Sosteniendo la válvula de inyección, usar la llave T-20 para extraer el tornillo de montaje de la abrazadera de la válvula, en la parte trasera de la válvula, y después bajar la válvula del alojamiento.

8.- Extraer el asiento del puerto de inyección de éste. Ver las figuras 19 y 20.



Figura 19. Forma correcta de aflojar la tuerca de roscado inverso.

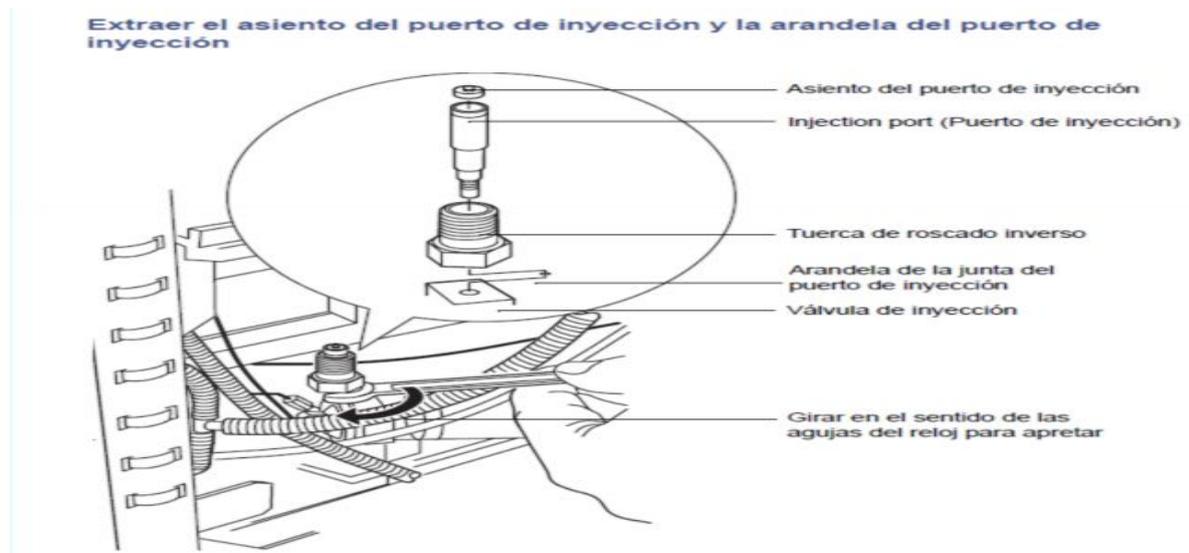


Figura 20. Forma correcta de extraer el asiento del puerto de inyección.

Instalar el asiento del puerto de inyección

Antes de instalar el asiento del puerto de inyección, se debe observar si hay que cambiar también la arandela del puerto de inyección. Sustituir la arandela de la junta del puerto de inyección cuando se piense que tiene fugas o que está obstruyendo la trayectoria del flujo del puerto de inyección.

Para instalar el asiento del puerto de inyección

- 1.- Colocar un nuevo asiento del puerto de inyección dentro del puerto de inyección.
- 2.- Sostener la válvula de inyección a nivel para colocarla nuevamente bajo el compartimento de muestras, y después levantar la válvula y el puerto de inyección hacia la cubierta del lavado de la aguja.
- 3.- Mientras se sostiene la válvula y el puerto de inyección con una mano, hacer girar la tuerca de roscado inverso dentro de la cubierta del lavado hasta ajustarla manualmente.
- 4.- Usar la llave de 5/8 pulgada para apretar la tuerca girándola en sentido contrario a las agujas del reloj. No apretar demasiado.
- 5.- Mientras se continúa sosteniendo la válvula de inyección, reinstalar el tornillo de montaje de la abrazadera de la válvula.
- 6.- Usar la llave de 1/4 pulgada para volver a conectar el tubo al puerto número 6 de la válvula de inyección.
- 7.- Volver a instalar el bloque de aislamiento de espuma.
- 8.- Reinstalar la abrazadera de montaje del panel frontal y el panel frontal.
- 9.- Volver a instalar el panel lateral y el horno para columnas, y encender el HPLC.

Sustituir la arandela de la junta del puerto de inyección

Para extraer y sustituir la arandela de la junta del puerto de inyección

- 1.- Seguir las instrucciones anteriores para extraer el asiento del puerto de inyección.
- 2.- Realizar los siguientes pasos al extraer la válvula de inyección del HPLC.
 - a. Usar la llave de 3/16 pulgada para aflojar el puerto de inyección y después extraerlo de la válvula de inyección.
 - b. Usar un palillo dental o pinzas para extraer la arandela vieja de la junta del puerto de inyección del fondo del cuerpo de la válvula de inyección.

- c. Usar los dedos para insertar cuidadosamente la nueva arandela de la junta dentro del cuerpo de la válvula de inyección.
- d. Volver a instalar el puerto de inyección y el asiento del puerto de inyección como se menciona anteriormente.

Sustituir el bucle de retención

Para extraer y sustituir el bucle de retención

- 1.- Apagar el HPLC.
- 2.- Extraer el termostizador para columnas, así como los paneles superior y lateral derecho del HPLC.
- 3.- Utilizar dos llaves de 5/16 pulgada para aflojar la tuerca de compresión de acero inoxidable de la parte superior del conjunto de la aguja.
- 4.- Desatornillar el tornillo de compresión de plástico de la válvula de lavado de agujas y luego extraer el bucle de retención. Ver figura 21.

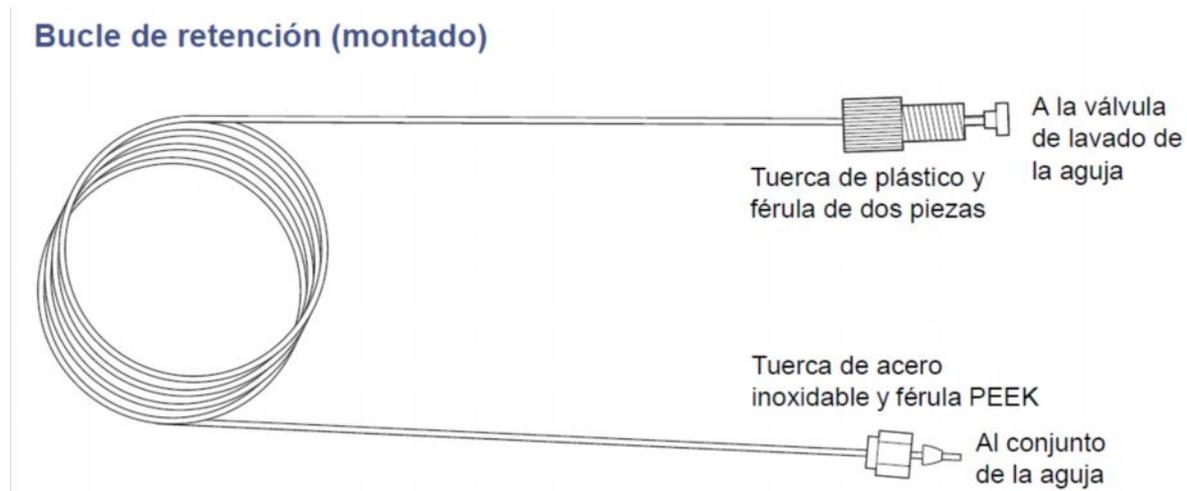


Figura 21. Bucle de retención.

- 5.- Insertar el bucle de retención nuevo en la válvula de lavado de la aguja y luego apretar con los dedos el tornillo de compresión.
- 6.- Extraer la tapa de plástico del otro extremo del bucle de retención nuevo y a continuación, utilizar la tuerca de acero inoxidable para conectar el extremo del bucle a la unión de acero inoxidable de la parte superior del conjunto de la aguja.
- 7.- Utilizar las dos llaves de 5/16 pulgada para apretar la unión hasta que quede ajustada, no apretar demasiado.

Sustituir el bucle de muestras

Para extraer y sustituir el bucle de muestras

- 1.- Abrir las puertas de acceso de la bandeja de distribución de eluyentes y la bandeja de acondicionamiento de eluyentes.
- 2.- Usar la llave Allen para aflojar los dos tornillos cautivos del panel frontal y extraer el panel frontal. Ver figura 22.

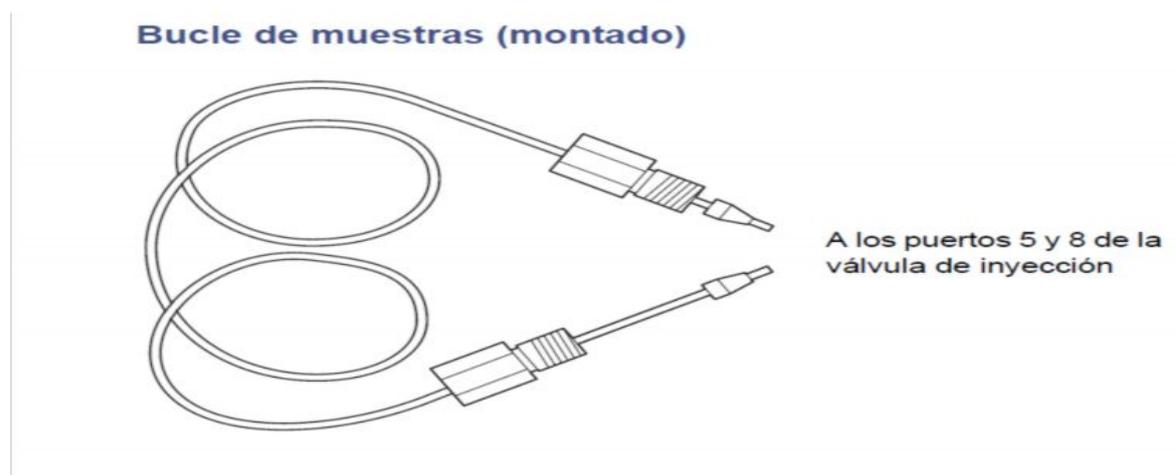


Figura 22. Bucle de muestras.

- 3.- Utilizar la llave T-20 para aflojar el tornillo cautivo que sujeta la abrazadera de sujeción del lateral derecho del compartimento de muestras y luego retirar la abrazadera.
- 4.- Usar la llave fija para quitar los conectores de los puertos número 5 y número 8 de la válvula de inyección.
- 5.- Extraer el bucle de muestras y los conectores.
- 6.- Sacar con cuidado el bucle de muestras de recambio y los conectores del embalaje original.
- 7.- Deslizar una férula y un tornillo de compresión hacia un extremo del bucle de muestras y después fijar el extremo dentro del puerto número 5 de la válvula de inyección.
- 8.- Apretar el conector con la llave hasta que quede encajado.
- 9.- Repetir los pasos 7 y 8 para el otro extremo del bucle de muestras y para el puerto número 8 de la válvula de inyección.
10. Volver a instalar la abrazadera de sujeción y apretar el tornillo cautivo hasta que quede encajado.

11.- Volver a instalar el panel frontal. Se debe comprobar que la cubierta superior y el panel lateral se han acoplado antes de suministrarle energía al HPLC.

De todo lo anterior, como se menciona al inicio del presente anexo, el mantenimiento de un HPLC es esencial y de primordial importancia para obtener resultados precisos y exactos y con ello garantizar validaciones de métodos analíticos exitosas y con un alto grado de repetibilidad.