

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA

“ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”



**VERIFICACIÓN OPERACIONAL DE UN EQUIPO HPLC AGILENT
TECHNOLOGIES MODELO 1200 HACIENDO USO DE UN CAPILAR DE
RESTRICCIÓN POLIMÉRICO-POLIÉTER ÉTER CETONA (PEEK)**

**TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL PARA OPTAR EL TÍTULO
PROFESIONAL DE LICENCIADO EN QUÍMICA**

AUTOR:

ARMÍN GARCÍA CHOQUEHUANCA

ASESOR(A):

WILNER VALENZUELA BARRIENTOS

LIMA-PERÚ

2021

REVISORES:

Profa. Dra. Elisa Castañeda Santa Cruz

Prof. MSc. Edson Emilio Garambel Vilca

Este trabajo lo dedico a mis padres y hermanos
que son el apoyo y la fuerza para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

- A mi familia por el soporte en todo el desarrollo de este trabajo.
- A mi asesor: Dr. Wilner Valenzuela Barrientos por aceptar asesorarme durante todo el desarrollo de este trabajo.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Verificación Operacional	4
2.2. Pruebas del proceso de verificación operacional	5
2.3. Módulos básicos del equipo HPLC Agilent Technologies modelo 1200/1260 ..	7
2.3.2. Sistema de inyección	9
2.3.3. Sistema de compartimento de columnas	10
2.3.4. Sistema de detección	11
2.3.5. Sistema de registro	12
3. OBJETIVOS	
3.1. Generales	13
3.2. Específicos	13
4. METODOLOGÍA	14
4.1. Operación de variables	14
4.1.1. Variables independientes	14
4.1.2. Variables dependientes	15
4.2. Equipos, materiales, soluciones y muestra	16
4.2.1. Equipos	16
4.2.2. Materiales	17
4.2.3. Fase móvil y muestra	18
4.3. Condiciones del equipo HPLC para las pruebas de verificación operacional	19
4.3.1. Condiciones del HPLC Agilent Technologies para las pruebas de repetibilidad, carry over y linealidad	20
4.3.2. Condiciones del HPLC Agilent Technologies para prueba de gradiente A&B y gradiente C&D	21
4.3.3. Condiciones del HPLC Agilent Technologies para prueba de ruido y deriva	22
4.4. Procedimiento	23
4.4.1. Acondicionamiento del equipo HPLC	24
4.4.2. Prueba de repetibilidad	24

4.4.3.	Prueba del carry over	25
4.4.4.	Prueba de Linealidad.....	25
4.4.5.	Prueba de Gradiente A&B.....	26
4.4.6.	Prueba de gradiente C&D.....	28
4.4.7.	Prueba de Ruido y Deriva	28
4.5.	Cálculo y expresión de resultados y especificaciones a las diferentes pruebas de verificación operacional.....	29
4.5.1.	Cálculo de RSD para prueba repetibilidad	29
4.5.3.	Cálculo de R^2 para prueba Linealidad	31
4.5.4.	Cálculo de exactitud total, precisión y linealidad para prueba gradiente A&B y C&D	32
4.5.5.	Cálculo de Ruido y Deriva.	35
5.	RESULTADOS	37
5.1.	Prueba de repetibilidad	37
5.2.	Prueba de carry over	40
5.3.	Prueba de Linealidad.....	41
5.4.	Prueba de Gradiente.....	44
5.4.1.	Prueba de gradiente A&B.....	44
5.4.2.	Prueba de gradiente C&D.....	47
5.5.	Prueba de ruido y deriva.....	50
6.	DISCUSIONES	53
7.	CONCLUSIÓN	57
8.	RECOMENDACIONES	57
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	58

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

HPLC	Cromatógrafo líquida de alta resolución
MCGV	Válvula de gradiente multicanal
PEEK	Poliéter éter cetona.
SS	Acero inoxidable
VO	Verificación operacional

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Capilares de restricción – A: metálico. B: polimérico.....	5
Figura 2. Módulos básicos del sistema HPLC Agilent Technologies modelo 1200/1260. Agilent Technologies.....	7
Figura 3. Diagrama del flujo de la muestra y fase móvil en el sistema HPLC.....	7
Figura 4. Secuencia de las pruebas de verificación operacional.....	23
Figura 5. Cromatograma: absorbancia (mAU) vs tiempo (min), según ASTM para encontrar el valor del ruido y deriva.....	35
Figura 6. Cromatograma obtenido de las seis inyecciones en la prueba de repetibilidad.....	37
Figura 7. Precisiones en área y altura obtenidas en la prueba de repetibilidad haciendo uso de ambos capilares de restricción.....	39
Figura 8. Cromatograma obtenido en la prueba de carry over.....	40
Figura 9. Cromatogramas obtenidos de los cinco estándares de cafeína.....	41
Figura 10. Curva de linealidad obtenido en la prueba de linealidad. A: capilar metálico. B: capilar polimérico.....	43
Figura 11. Cromatograma obtenido en la prueba gradiente A&B. A: Capilar metálico. B: capilar polimérico.....	45
Figura 12. Linealidad obtenida en la prueba de gradiente A&B.....	47
Figura 13. Cromatograma obtenido en la prueba de gradiente C&D. A: capilar metálico. B: capilar polimérico.....	48
Figura 14. Linealidad obtenida en la prueba de gradiente C&D..	50
Figura 15. Cromatograma obtenido en la prueba de ruido y deriva.....	50

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Especificaciones del módulo bomba cuaternaria.....	8
Tabla 2. Especificaciones del módulo automuestrador.....	9
Tabla 3. Especificaciones del módulo del compartimento de columnas.....	10
Tabla 4. Especificaciones del detector VWD.....	11
Tabla 5. Características de las variables independientes.....	14
Tabla 6. Características de las variables dependientes.....	15
Tabla 7. Equipos usados en el proceso de verificación operacional (VO).....	16
Tabla 8. Materiales usados en el proceso la verificación operacional.....	17
Tabla 9. Fase móvil utilizada en las diferentes pruebas del proceso de verificación operacional.....	18
Tabla 10. Estándar de cafeína usado en el proceso de verificación operacional.....	19
Tabla 11. Parámetros configurados en la prueba de repetibilidad, carry over y linealidad.....	20
Tabla 12. Parámetros configurados en la prueba de gradiente A&B y C&D.....	21
Tabla 13. Parámetros configurados en la prueba de ruido y deriva.....	22
Tabla 14. Porcentajes en el canal A y B para el lavado de sistema HPLC, previo a la prueba de gradiente A&B. Canal A: Agua grado HPLC. Canal B Acetona 0.5% en agua grado HPLC.....	26
26	
Tabla 15. Porcentajes de las fases móviles en un tiempo determinado para la prueba de gradiente A&B. Canal A: agua grado HPLC. Canal B: Acetona 0.5% en agua grado HPLC.....	27
Tabla 16. Especificaciones en la prueba repetibilidad.....	30

Tabla 17. Especificaciones en la prueba de carry over.....	31
Tabla 18. Especificación en la prueba de linealidad.....	32
Tabla 19. Especificaciones en la prueba de gradiente A&B y C&D.....	34
Tabla 20. Especificaciones en la prueba de ruido y deriva.....	36
Tabla 21. Resultados obtenidos en la prueba de repetibilidad, expresado en desviación estándar relativa (RSD).....	38
Tabla 22. Resultados obtenidos en la prueba de carry over, expresado en desviación estándar relativa (RSD).....	40
Tabla 23. Resultados obtenidos en la prueba de linealidad.....	42
Tabla 24. Resultados obtenidos en la prueba de gradiente A&B.....	44
Tabla 25. Porcentajes de acetona 0.5% en agua grado HPLC (canal B) teóricos y encontrados usando ambos capilares de restricción en la prueba de gradiente A&B.....	46
Tabla 26. Resultados obtenidos en la prueba de gradiente C&D.....	47
Tabla 27. Porcentajes de acetona 0.5% en agua grado HPLC (canal D) teóricos y encontrados usando ambos capilares de restricción en la prueba de gradiente C&D.....	49
Tabla 28. Resultados obtenidos para a prueba de ruido y deriva.....	51
Tabla 29. Resumen de resultados obtenidos con el capilar de restricción metálico y polimérico a las diferentes pruebas del proceso de verificación operacional en un equipo HPLC Agilen Technologies modelo 1200.....	52

RESUMEN

Los cromatógrafos líquidos (HPLC) son equipos analíticos/eléctricos ampliamente utilizados en el sector industrial para la identificación y cuantificación de diferentes compuestos orgánicos. El desempeño y eficiencia del cromatógrafo está relacionado con el proceso de verificación operacional, el cual consiste en un conjunto de pruebas: prueba de repetibilidad, carry over, linealidad, gradiente A&B y C&D, y finalmente, prueba de ruido y deriva. En un proceso de verificación operacional se usa un capilar de restricción, el cual reemplaza a la columna cromatográfica, y que hasta finales del año 2020 la empresa Analíticos S.A.C usó un capilar a base de acero inoxidable. Sin embargo, este tipo de material es frágil, de alto costo y de poca versatilidad, lo que ha generado que el proceso de verificación operacional sea prolongado y costoso, motivo por el cual la empresa Analíticos S.A.C optó por la búsqueda de un nuevo material para el capilar de restricción. Una alternativa es el uso del capilar de restricción polimérico a base de Poliéter Éter Cetona-PEEK debido a que este material es menos frágil y económico. Este trabajo se enfocará en la descripción del proceso de verificación operacional en un equipo HPLC Agilent technologies modelo 1200 haciendo uso de un capilar de restricción metálico y uno polimérico, para mostrar los resultados obtenidos de las pruebas ejecutadas. De acuerdo con las pruebas ejecutadas se determinó que los valores obtenidos con ambos capilares de restricción cumplen con las especificaciones establecidas por el fabricante, por lo que el capilar polimérico puede reemplazar al capilar metálico para ejecutar el proceso de verificación operacional.

Palabras claves: Cromatógrafo líquido, capilar de restricción, PEEK, verificación operacional.

ABSTRACT

Liquid chromatographs (HPLC) are analytical / electrical equipment widely used in the industrial sector for the identification and quantification of different organic compounds. The performance and efficiency of the chromatograph is related to the operational verification process which consists of a set of tests: repeatability test, carry over, linearity, A&B and C&D gradient, and finally, noise and drift test. Operational verification process uses a restriction capillary, which replaces the chromatographic column, and that until the end of 2020 the company Analíticos S.A.C used a capillary based on stainless steel. However, this type of material is fragile, high cost and not very versatile, which has made the operational verification process long and expensive, which is why the company Analíticos S.A.C opted for the search for a new material for the restriction capillary. An alternative is the use of polymeric restriction capillary based on Polyether Ether Ketone-PEEK because this material is less brittle and inexpensive. This work will focus on the description of the operational verification process in an Agilent technologies model 1200 HPLC equipment making use of a metallic and a polymeric restriction capillary, to show the results obtained from the tests carried out. According to the tests carried out, it was determined that the values obtained with both restriction capillaries comply with the specifications established by the manufacturer, so that the polymeric capillary can replace the metallic capillary to execute the operational verification process.

Keywords: Liquid chromatograph, restriction capillary, PEEK, operational verification

1. INTRODUCCIÓN

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica física donde los componentes de una muestra eluyen, de acuerdo con el grado de afinidad a la fase estacionaria. Esta técnica permite separar, determinar y cuantificar los componentes de muestras de naturaleza química, biológica y otros [1, 2]; asimismo los equipos que operan bajo este principio son los cromatógrafos líquido de alto rendimiento conocidos por sus siglas en inglés como HPLC que básicamente se encuentran activos en la industria farmacéutica y laboratorio de investigación; por ello la alta eficiencia, operatividad y rendimiento del equipo está relacionado con una serie de procesos como son: calificación de instalación, mantenimiento preventivo, verificación operacional, calificación de rendimiento y otros. El proceso que determina a un equipo como operativo es la verificación operacional, el cual cuenta y ejecuta un conjunto de pruebas para establecer que el equipo está trabajando dentro de las especificaciones establecidas por el fabricante [3, 4, 5, 6, 7]. En este proceso se usa un capilar de restricción (2 metros de longitud y 0.12 mm de diámetro interno- el cual reemplaza a la columna cromatográfica en los análisis), una muestra estándar de cafeína de concentraciones conocidas, fase móvil de dos composiciones diferentes: agua grado HPLC y acetona 0.5% en agua grado HPLC) [8, 9].

Hasta fines del año 2020 la empresa Analíticos S.A.C ejecutaba el proceso de verificación operacional en los equipos HPLC Agilent Technologies modelo 1200 haciendo uso de un capilar de restricción metálico a base de acero inoxidable por su alta precisión y eficiencia en este proceso, sin embargo, su poca versatilidad (dificultad para ser usado en conexiones reducidas de un módulo o entre módulos del equipo HPLC), mala flexibilidad (se rompe al no adaptarse con facilidad a diversas necesidades) y elevado costo (\$ 150.00 dólares americanos. aproximadamente) generó que la empresa opte por la búsqueda de capilares de restricción de un material diferente. Un material alternativo que tomó relevancia e importancia en los procesos de verificación operacional es el poliéter éter cetona (PEEK), siendo un capilar de restricción de menor costo (aproximadamente \$ 70.00 dólares americanos), mayor flexibilidad (al estar hecho de un material polimérico presenta una mayor flexibilidad y por tanto un mayor tiempo de vida) y versatilidad [10].

Este trabajo tiene como fin describir el proceso de verificación operacional haciendo uso de capilares de restricción metálico y polimérico, luego comparar con las especificaciones establecidas por el fabricante a las diferentes pruebas del proceso de verificación operacional para un equipo HPLC Agilent Technologies modelo 1200. Este proceso de calificación implica: Acondicionar el equipo (basándose en la estabilidad de la línea base), determinar la desviación estándar relativa (RSD) en área y altura en la prueba de repetibilidad usando el estándar de cafeína de 25 µg/mL y en la prueba de carry over usando el blanco (fase móvil); también se va determinar el coeficiente de correlación lineal (R^2) en la prueba de linealidad usando los cinco estándares de cafeína (0.5 µg/mL, 1.0 µg/mL, 5.0 µg/mL, 25.0 µg/mL, 50.0 µg/mL), así como también determinar la

precisión, exactitud total y linealidad para prueba de gradiente A&B y C&D usando la fase móvil de dos composiciones diferentes: agua grado HPLC y acetona 0.5% en agua grado HPLC y finalmente determinar el ruido y deriva usando únicamente fase móvil (agua grado HPLC) para finalmente comparar los resultados obtenidos de ambos capilares de restricción (metálico y polimérico) con las especificaciones establecidas por el fabricante.

La implementación de este proceso generará reducir costos, optimizar el tiempo en el proceso de verificación operacional y lograr contrarrestar la alta demanda de servicios en laboratorios farmacéuticos y de investigación.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Verificación Operacional

La verificación operacional (VO) en los equipos HPLC Agilent Technologies involucra una serie de pruebas, en la cual cada prueba tiene un propósito a evaluar y comparar con las especificaciones del fabricante. La verificación operacional de acuerdo al fabricante hace uso de un capilar de restricción (0.12 mm de diámetro interno y 2 metros de longitud), estándares de cafeína, fase móvil de dos composiciones diferentes: Agua grado HPLC y acetona 0.5% en agua grado HPLC (extraída del software Chemstation versión A.10.02). Este proceso se lleva a cabo después de un mantenimiento preventivo (MP) si el equipo se encuentra operando (MP son aquellas actividades previamente programadas con el fin de evitar y corregir fallas en el equipo) [11, 12], lo cual ocasiona reducción de costos y de tiempos muertos) y después de una calificación de instalación (IQ) si el equipo es nuevo en el área de operación (IQ es proceso por el cual se comprueba que el equipo ha sido instalado correctamente junto a los servicios de apoyo: área, temperatura, corriente eléctrica y otros) [13].

A continuación, en la figura 1 se ilustra los capilares de restricción usados en este proceso de verificación operacional. A: capilar metálico. B: capilar polimérico

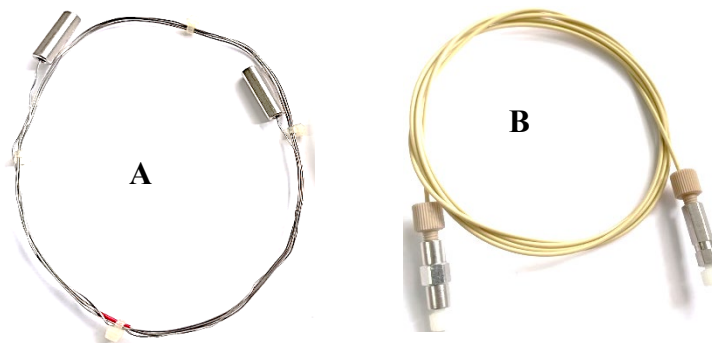


Figura 1. Capilares de restricción – A: capilar metálico. B: capilar polimérico.

Fuente: Autoría propia.

2.2.Pruebas del proceso de verificación operacional.

-Prueba de repetibilidad: Se ejecuta con la finalidad de verificar la eficiencia del sistema de inyección, realizando seis inyecciones del estándar de cafeína de 25 $\mu\text{g/mL}$ (extraído del software Chemstation versión A.10.02).

-Prueba de Carry Over: Se ejecuta con el fin de evaluar si el módulo del sistema de inyección ha retenido muestra de cafeína en la prueba de repetibilidad y para ello se realiza una sola inyección del blanco-agua grado HPLC (Extraído del software Chemstation versión A.10.02).

-Prueba de Linealidad: Con esta prueba se evalúa la vigencia del lote de la cafeína de cinco estándares (0.5 µg/mL, 1.0 µg/mL, 5.0 µg/mL, 25.0 µg/mL, 50.0 µg/mL) para asegurar y validar que el proceso de verificación operacional ha sido realizado con éxito y con el estándar adecuado (extraído del software Chemstation versión A.10.02).

-Prueba de gradiente A&B y C&D: La prueba de gradientes se realiza con el fin de evaluar la eficiencia de la válvula de gradiente multicanal (MCGV), de tal forma que los canales A & C contengan agua grado HPLC y los canales B&D contengan acetona 0.5% en agua grado HPLC. Se analiza a 265 nm (absorbancia máxima de la acetona) a flujo de 2 mL/min en modo gradiente de acuerdo con los porcentajes de cada fase móvil en el tiempo de análisis y sin inyección (extraído del software Chemstation versión A.10.02).

-Prueba ruido y Deriva: Esta prueba se realiza para verificar la estabilidad del sistema HPLC, para determinar que durante todo el proceso de verificación operacional el sistema HPLC no sufre cambios que distorsionen la señal y para verificar la energía de la lámpara de deuterio. Se analiza a 254 nm en modo isocrático y un flujo de 1 mL/ min (extraído del software Chemstation versión A.10.02).

2.3. Módulos básicos del equipo HPLC Agilent Technologies modelo 1200/1260

A continuación, en la figura 2 se muestran los módulos básicos del sistema HPLC Agilent Technologies modelo 1200: Bomba cuaternaria, automuestrador, compartimento de columnas y detector. Luego en la figura 3 se muestra el recorrido de la fase móvil y de la muestra en el sistema HPLC



Figura 2. Módulos básicos del sistema HPLC Agilent Technologies modelo 1200/1260. Agilent Technologies.

Fuente: Agilent Technologies. System Manual and Quick Reference [14].

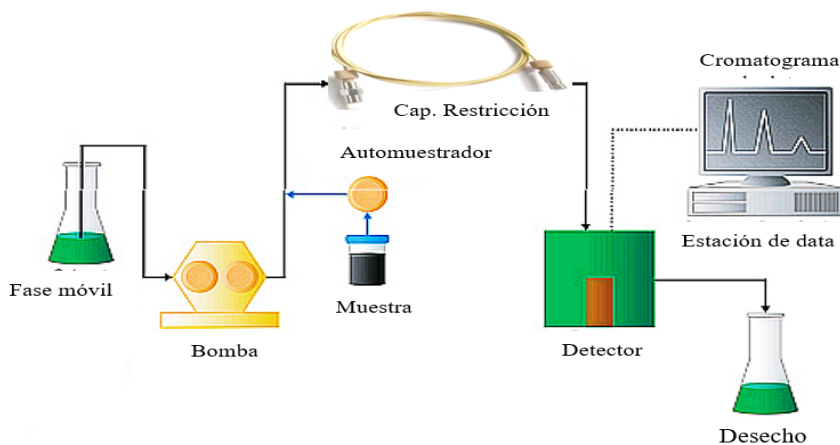


Figura 3. Diagrama del flujo de la muestra y fase móvil en el sistema HPLC. Fuente: Tom Sirard. Fundamentals of HPLC. [15]

2.3.1. Sistema de bombeo

El sistema de bombeo hace referencia al módulo bomba cuaternaria, el cual comprende partes fundamentales: desgasificador, válvula multicanal de gradiente (MGCV), un sistema de control electrónico. El desgasificador que sirve para disolver y eliminar gases CO₂ generados en las tuberías que recorre el eluyente desde las botellas del reservorio; la MGCV posee cuatro canales dosificadoras de fase líquida al sistema HPLC y la fuente de control electrónico es el encargado de emitir los errores generados en todo el cuerpo del módulo o sistema [16, 17]. A continuación, en la tabla 1 indica las especificaciones de fábrica del sistema de bombeo.

Tabla 1. Especificaciones del módulo bomba cuaternaria.

Parámetros	Especificaciones
Sistema Hidráulico	Doble pistón en serie con un servocontrolador
Flujo	0.2 mL/min – 10 mL/min
Presión	≤ 600 bares
pH*	1.0 – 12.5
Sistema de control	Software Chemstation

* Los solventes que contengan pH inferior a 2.3 no deben contener ácidos fuertes.

Fuente: Agilent Technologies. User manual-Bomba cuaternaria Agilent Serie 1200. [17]

2.3.2. Sistema de inyección

El sistema de inyección caracterizado por el módulo del automuestrador comprende partes esenciales como: transportador de muestras, gradilla de muestras, válvula de inyección, dispositivo de medición de muestra, un sistema de control electrónico; para sistemas que requieran control de temperatura de muestras se puede combinar con un módulo de termostato. El sistema de control electrónico trabaja similar al sistema del módulo bomba cuaternaria [18, 19]. Las especificaciones de fábrica del sistema de inyección se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Especificaciones del módulo automuestrador.

Parámetros	Especificaciones
Presión	≤ 600 bares
Inyección	0.1uL – 100uL
Viscosidad de la muestra	0.2cp – 50cp
Alcance de gradilla	100 viales de 1.5mL o 15 viales de 6mL
Sistema de control	Software Chemstation

Fuente: Agilent Technologies. User manual-Agilent 1200 Series Standard and Preparative Autosamplers [18]

2.3.3. Sistema de compartimento de columnas

Este sistema es conocido como compartimento termostático de columnas comprende elementos indispensables como: intercambiadores de calor, válvula de intercambio de columnas, sistema de control electrónico. Los intercambiadores de calor ayudan que la muestra de análisis y la columna de análisis se mantengan en la temperatura programada. El sistema de control electrónico opera bajo el mismo principio que el sistema de los módulos previamente mencionados [20]. En la tabla 3 se muestran las especificaciones de fábrica para el módulo sistema de compartimento de columnas.

Tabla 3. Especificaciones del módulo del compartimento de columnas

Parámetros	Especificaciones
Temperatura	15°C – 80°C
Capacidad de columnas	Tres de 30 cm
Precisión de Temperatura	±0.8°C con calibración a 25°C
Sistema de control	Software Chemstation

Fuente: Agilent Technologies. User manual-Agilent 1200 Series Thermostatted Column Compartment G1316A/G1316B/G1316C [20]

2.3.4. Sistema de detección.

El sistema de detección caracterizado por el detector de onda variable (VWD) posee elementos indispensables como: sistema óptico, celda de cuarzo con una capacidad de 1 μ L, lámpara de deuterio y un sistema de control electrónico [21, 22]. A continuación, en la tabla 4 se indican las especificaciones de fábrica para el módulo del detector VWD.

Tabla 4. Especificaciones del detector VWD.

Parámetro	Especificación
Fuente de Luz	Lámpara de deuterio
Tipo de detección	Fotómetro de doble haz.
Longitud de onda	190 nm – 600 nm
Celda de flujo	1 μ L – 40 bar
Velocidad máxima de datos	80Hz
Sistema de control	Software chemstation

Fuente: Agilent Technologies. User manual-Agilent 1200 Infinity Series Variable Wavelength Detectors [21]

2.3.5. Sistema de registro

Es el software que toma control del equipo HPLC Agilent Technologies y uno de los más conocidos es el software Chemstation, siendo el detector el que adquiere información eléctrica y lo traduce a una señal física como absorbancia o voltaje, el cual se manifiesta en la señal de respuesta [23].

3. OBJETIVOS

3.1. Generales

- Describir el proceso de verificación operacional en un equipo HPLC Agilent Technologies modelo 12000 haciendo uso de un capilar de restricción metálico (acero inoxidable-SS) y polimérico (poliéter éter cetona-PEEK).

3.2. Específicos

- Determinar la desviación estándar relativa (RSD) en área y altura para la prueba de repetibilidad usando el estándar de cafeína de 25 µg/mL, así como también determinar RSD en área y altura para la prueba de carry over usando el blanco (agua grado HPLC); haciendo uso de capilares de restricción polimérico y metálico.
- Determinar el coeficiente de correlación lineal (R^2) en área para la prueba de linealidad usando los cinco estándares de cafeína, así como también determinar la precisión, exactitud total y linealidad en altura en la prueba de gradiente A&B y gradiente C&D en base a la mezcla entre las fases móviles: agua grado HPLC y acetona 0.5% en agua grado HPLC, haciendo uso de capilares de restricción polimérico y metálico.
- Determinar el ruido y deriva usando únicamente fase móvil y haciendo uso de capilares de restricción polimérico y metálico.
- Comparar los resultados obtenidos con ambos capilares de restricción respecto a las especificaciones establecidas por el fabricante.

4. METODOLOGÍA

4.1. Operación de variables

A continuación, en la tabla 5 se indican las variables independientes y en la tabla 6 las variables dependientes, que se usaran en el proceso de verificación operacional

4.1.1. Variables independientes

Las variables independientes que se trabajaran en el proceso de verificación operacional son la concentración del estándar de cafeína en la prueba de linealidad y el tiempo de análisis de cada prueba ejecutada como muestra la tabla 5.

Tabla 5. Características de las variables independientes

Variable	Naturaleza	Descripción/unidades
Concentración	Cuantitativa discreta	Concentración de cada estándar cafeína para prueba de linealidad. Expresado en $\mu\text{g/mL}$
Tiempo	Cuantitativa continua	Tiempo transcurrido cada prueba ejecutada. Expresado en Minutos

Fuente: Autoría propia

4.1.2. Variables dependientes

Las variables dependientes que se trabajaran en el proceso de verificación operacional se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Características de las variables dependientes

Variable	Naturaleza	Descripción/ unidades
R ²	Cuantitativa continua	Coefficiente de correlación lineal entre el área del pico y la concentración de los estándares de cafeína en prueba de linealidad
RSD	Cuantitativa continua	Desviación estándar relativa de áreas y alturas en prueba de repetibilidad y carry over. Expresado en porcentaje (%).
Precisión	Cuantitativa continua	Precisión de alturas en cada intervalo de tiempo por cada porcentaje de acetona 0.5% en agua en prueba de gradiente A&B y C&D.
Exactitud total	Cuantitativa continua	Exactitud total de alturas en cada intervalo de tiempo por cada porcentaje de acetona 0.5% en agua en prueba de gradiente A&B y C&D.
Ruido		Ruido del sistema HPLC, expresado en mAU*s
Deriva		Deriva del sistema HPLC, expresado en mAU/h

Fuente: autoría propia.

4.2. Equipos, materiales, soluciones y muestra

A continuación, se indican los equipos, materiales, soluciones y estándar usados en el proceso de verificación operacional

4.2.1. Equipos

A continuación, en la tabla 7 se indica los equipos usados y la función que desempeñan en el proceso de verificación operacional

Tabla 7. Equipos usados en el proceso de verificación operacional (VO)

Equipo	Función
HPLC Agilent Technologies	Analizar las pruebas del proceso VO
Sonicador Branson	Retirar partículas de los filtros de acero inoxidable

Fuente: Autoría propia.

4.2.2. Materiales

A continuación, en la tabla 8 se muestra los materiales que serán usados en la verificación operacional

Tabla 8. Materiales usados en el proceso de verificación operacional

Material	Descripción
Viales de vidrio	Viales de 1.5 mL
Jeringas de plástico y aguja	Jeringas de 5 mL
Capilar metálico	0.12 mm diámetro interno x 2 m de longitud
Capilar polimérico	

Fuente: Autoría propia

4.2.3. Fase móvil y muestra

A continuación, en la tabla 9 se muestran las fases móviles utilizadas de acuerdo a la prueba ejecutada y en la tabla 10 se muestra la solución estándar de cafeína usado en el proceso de verificación operacional.

Tabla 9. Fases móviles utilizada en las diferentes pruebas del proceso de verificación operacional.

Fases móviles	Prueba de verificación operacional
Agua grado HPLC	Todas las pruebas
Acetona 0.5% en agua grado HPLC	Gradiente A&B y C&D

Fuente: Autoría propia

Tabla 10. Estándar de cafeína usado en el proceso de verificación operacional

Estándares de cafeína	Concentraciones (µg/mL)	Proveedor
STD 1	0.5	
STD 2	1.0	
STD 3	5.0	Agilent Technologies
STD 4	25.0	
STD 5	50.0	

Fuente: Autoría propia.

4.3. Condiciones del equipo HPLC para las pruebas de verificación operacional.

A continuación, se indicaran las condiciones del equipo HPLC de acuerdo a los parámetros configurados para cada prueba a ejecutar del proceso de verificación operacional

4.3.1. Condiciones del HPLC Agilent Technologies para las pruebas de repetibilidad, carry over y linealidad.

En la tabla 11 se muestra los parámetros de configuración en las pruebas de repetibilidad, linealidad y carry over indicadas previamente.

Tabla 11. Parámetros configurados en la prueba de repetibilidad, carry over y linealidad.

Parámetro	Configuración
Bomba	Canal A: Agua grado HPLC
Volumen de inyección	20 µL
Fase móvil	Agua grado HPLC
Modo de elución	isocrático
Flujo	1.0 mL/min
Temperatura de TCC	40°C
Tiempo total de corrida	1.0 minutos
Longitud de onda	273 nm

Fuente: extraído del software chemstation versión B.04.03.SP2

4.3.2. Condiciones del HPLC Agilent Technologies para prueba de gradiente A&B y gradiente C&D

A continuación, en la tabla 12 se detallan los parámetros configurados en la prueba de gradiente A&B o C&D

Tabla 12. Parámetros configurados en la prueba de gradiente A&B y C&D

Parámetro	Configuración
Bomba	Canal A o C: Agua grado HPLC, según la prueba. Canal B o D: acetona 0.5% en agua grado HPLC, según la prueba.
Volumen de inyección	Sin inyección
Fase móvil	Agua grado HPLC y Acetona 0.5% en agua grado HPLC
Modo de elución	gradiente
Flujo	2.0 mL/min
Tiempo de análisis	55.0 minutos
Longitud de onda	265 nm

Fuente: Extraído del software chemstation versión B.04.03.SP2

4.3.3. Condiciones del HPLC Agilent Technologies para prueba de ruido y deriva.

A continuación, en la tabla 13 se muestra los parámetros de configuración en la prueba de ruido y deriva del proceso de verificación operacional

Tabla 13. Parámetros configurados en la prueba de ruido y deriva.

Parámetro	Configuración
Bomba	Canal A: Agua grado HPLC
Volumen de inyección	Sin inyección
Fase móvil	Agua grado HPLC
Modo de elución	isocrático
Flujo	1.0 mL/min
Temperatura del TCC	40.0°C
Tiempo de corrida	2.0 minutos
Longitud de onda	254.0nm

Parámetros extraído del software chemstation versión B.04.03.SP2

4.4.Procedimiento

La secuencia de etapas o pasos del proceso de verificación se indican a continuación y finalmente se representa en la figura 4.

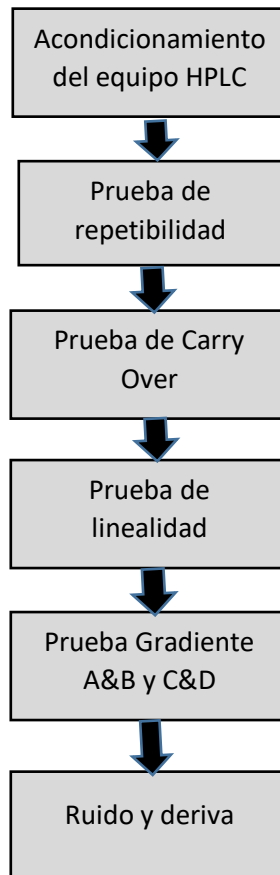


Figura 4. Secuencia de las pruebas de verificación operacional

Fuente: Autoría propia

4.4.1. Acondicionamiento del equipo HPLC

Antes de haber empezado a realizar las pruebas de verificación operacional del HPLC Agilent Technologies modelo 1200 se sonicó los filtros de acero inoxidable de las botellas del reservorio con isopropanol por diez minutos y luego en agua grado HPLC por diez minutos más, asimismo se purgó los cuatro canales de la válvula de gradiente multicanal (MCGV) del módulo de la bomba cuaternaria y por último se observó que la señal del sistema HPLC sea estable, con una máxima relación señal/ruido de 10:1.

4.4.2. Prueba de repetibilidad

La prueba de verificación operacional se realizó haciendo uso del estándar de cafeína de 25.0 µg/mL contenido en una ampolla. Se retiró el estándar con una jeringa descartable de 5 mL o 10 mL y se transfirió a un vial ámbar de 1.5 mL; en otro vial se añadió agua grado HPLC, el cual fue usado como blanco. Se configuró el flujo en modo isocrático (por ser tiempo corto), luego se inyectó de tres a cinco inyecciones del blanco y finalmente se realizó seis inyecciones del estándar de cafeína de 25 µg/mL, de estas últimas inyecciones se determinará la desviación estándar relativa en área y altura. Las condiciones en la prueba de repetibilidad se indican en la tabla 10 (Software Chemstation versión A.10.02).

4.4.3. Prueba del carry over

La prueba del carry over se ejecutó bajo las mismas condiciones que la prueba de repetibilidad mostrado en la tabla 10. Se aprovechó que el sistema de inyección ha usado previamente el estándar de 25 µg/mL de la solución de cafeína para evaluar la cantidad de muestra retenida en el sistema de inyección; por ello se realizó una inyección del blanco, el cual es llamado carry over (Software Chemstation versión A.10.02).

4.4.4. Prueba de Linealidad

Se transfirió cada estándar de cafeína (0.5 µg/mL. 1.0 µg/mL. 5.0 µg/mL. 25.0 µg/mL y 50.0 µg/mL) a un vial de 1.5mL, respectivamente. En otro vial de 1.5mL se añadió agua grado HPLC como blanco para posteriormente se realizó dos inyecciones sucesivas. Finalmente se inyectó cada solución estándar de cafeína.

Esta prueba analítica se realiza a 273nm de longitud de onda y flujo constante de 1mL/min de fase móvil, agua grado HPLC. (Software Chemstation versión A.10.02).

4.4.5. Prueba de Gradiente A&B.

Verificar que el canal A contenga agua grado HPLC y el canal B Acetona 0.5% en agua grado HPLC, luego ejecutar una prueba de lavado del sistema como se indica en la tabla 14 y finalmente ejecutar la prueba de gradiente A&B con los porcentajes configurados de las fases móviles utilizados en un tiempo determinado como se muestra en la tabla 15 (Software Chemstation versión A.10.02).

Tabla 14. Porcentajes de la fases móviles usados para el lavado del HPLC, previo a la prueba de gradiente A&B. Canal A: Agua grado HPLC. Canal B: Acetona 0.5% en agua grado HPLC.

Tiempo (min)	Canal A (%)	Canal B (%)
00.00 - 00.01	100.00	00.00
00.01 - 08.01	00.00	100.00
08.01 – 10.00	100.00	00.00

Fuente: Extraído del software chemstation versión B.04.03.SP2

Tabla 15. Porcentajes de la fase móvil en un tiempo determinado para la prueba de gradiente A&B. Canal A: agua grado HPLC. Canal B: Acetona 0.5% en agua grado HPLC.

Tiempo (min)	Canal A (%)	Canal B (%)
00.00 - 01.01	100.00	00.00
01.01 - 06.01	00.00	100.00
06.01 - 09.01	10.00	90.00
09.01 - 12.01	11.00	89.00
12.01 - 16.01	49.00	51.00
16.01 - 19.01	50.00	50.00
19.01 - 23.01	94.00	06.00
23.01 - 26.01	95.00	05.00
26.01 - 29.01	100.00	00.00
29.01 - 32.01	95.00	05.00
32.01 - 35.01	94.00	06.00
35.01 - 39.01	50.00	50.00
39.01 - 42.01	49.00	51.00
42.01 - 45.01	50.00	50.00
45.01 - 49.01	94.00	06.00
49.01 - 52.01	95.00	05.00
52.01 - 55.00	100.00	00.00

Valores extraídos del software chemstation versión B.04.03.SP2

4.4.6. Prueba de gradiente C&D

La prueba de gradiente C&D se realizó bajo las mismas condiciones y tolerancias que el inciso 4.5.5 (Prueba de gradiente A&B). Excepto que para esta prueba el agua grado HPLC se colocó en el canal C y la acetona 0.5% en agua grado HPLC en el canal D

4.4.7. Prueba de Ruido y Deriva

Se verificó que el detector se encuentre a 254 nm y luego se ejecutó la prueba correspondiente, el cual dejó circular únicamente el agua grado HPLC por todo el sistema del cromatógrafo líquido con un tiempo de corrida de 20 minutos y flujo contante de 1 mL/min (Software Chemstation versión A.10.02).

4.5. Cálculo y expresión de resultados y especificaciones a las diferentes pruebas de verificación operacional

A continuación, se muestra la determinación de las ecuaciones para cada prueba, así como también se muestra las especificaciones establecidas por el fabricante para las diferentes pruebas del proceso de verificación operacional

4.5.1. Cálculo de RSD para prueba repetibilidad

El cálculo para determinar el RSD en áreas y alturas de cada pico obtenido del estándar de cafeína de concentración 25 µg/mL en la prueba de repetibilidad se muestra en la ecuación 1 y ecuación 2.

$$RSD_{rep.A} = \frac{S_A}{\bar{X}_A} * 100 = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(X_{i.A} - \bar{X}_A)^2}{n-1}}}{\sum_{i=1}^n \frac{X_{i.A}}{n}} * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

$$RSD_{rep.H} = \frac{S_H}{\bar{X}_H} * 100 = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(X_{i.H} - \bar{X}_H)^2}{n-1}}}{\sum_{i=1}^n \frac{X_{i.H}}{n}} * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

$RSD_{rep.A}$	Desviación estándar relativa en área.
$RSD_{rep.H}$	Desviación estándar relativa en altura.
S_A	Desviación estándar muestral en área
S_H	Desviación estándar muestral en altura
\bar{X}_A	Área promedio de las seis inyecciones
\bar{X}_H	Altura promedio de las seis inyecciones
$X_{i.A}$	Área obtenido de un análisis determinado
$X_{i.H}$	Altura obtenida de un análisis determinado
n	Tamaño del análisis

Tabla 16. Especificaciones en la prueba repetibilidad.

Criterio	Especificación
RSD _{rep.A}	≤1.0%
RSD _{rep.H}	≤2.0%

Fuente: Extraído del Software Chemstation versión A.10.02

4.5.2. Prueba del carry over

A continuación, se indica la ecuación 3 y ecuación 4 para determinar el RSD en área y altura en prueba del carry over.

$$RSD_{Cover.A} = \frac{X_{cover.A}}{X_{ur.A}} * 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

$$RSD_{Cover.H} = \frac{X_{cover.H}}{X_{ur.H}} * 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

RSD_{Cover.A} Desviación estándar relativa en área del carry over

RSD_{Cover.H} Desviación estándar relativa en altura del carry over.

X_{cover.A} área del pico del carry over

X_{u.c.A} área del pico de la última corrida de la prueba repetibilidad

X_{cover.H} altura del pico del carry over

X_{u.c.H} altura del pico de la última corrida de la prueba repetibilidad

Tabla 17. Especificaciones en la prueba de carry over.

Criterio	Especificación
RSD _{Cover.A}	≤0.2%
RSD _{Cover.H}	≤0.4%

Fuente: Extraído del Software Chemstation versión A.10.02

4.5.3. Cálculo de R² para prueba Linealidad

El cálculo se ejecuta en base a las áreas obtenidas de cada pico y la concentración del estándar de cafeína tal como se indica en la ecuación 5.

$$R^2 = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n [(X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})]}}{[\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2][\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2]} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

R² Coeficiente de correlación lineal.

X_i Concentración del estándar de cafeína.

Y_i Área encontrada para un estándar determinado de cafeína.

\bar{X} Concentración promedio de los cinco estándares de cafeína.

\bar{Y} Área promedio de los cinco estándares de cafeína analizados.

N Número de análisis

Tabla 18. Especificación en la prueba de linealidad.

Criterio	Especificación
R ²	≥0.999

Fuente: Extraído del Software Chemstation versión A.10.02

4.5.4. Cálculo de exactitud total, precisión y linealidad para prueba gradiente A&B y C&D

El cálculo de precisión, exactitud y linealidad para esta prueba se realiza en base a las alturas (mAU) de cada porcentaje de acetona 0.5% en agua grado HPLC configurado-canal B o D, dependiendo de la prueba. Los porcentajes involucrados en los cálculos son: 100%, 90%, 89%, 51%, 50.0%, 6.0%, y 5.0% (B o D)

A continuación, se indica la obtención de la ecuación 9 para determinar la exactitud de la prueba de gradiente A&B.

$$\bar{X}_{\%} = \sum_{i=1}^n \frac{X_{i\%}}{n} \quad \text{Ecuación 6}$$

$$\%_{\text{o.e}} = \frac{\bar{X}_{\%}}{\%_{\text{t}}} * (100) \quad \text{Ecuación 7}$$

$$EX_e = \%_{\text{o.e}} - \%_{\text{t}} \quad \text{Ecuación 8}$$

$$EX_t = \sum_{i=1}^n \bar{X}_{iEX_e} \quad \text{Ecuación 9}$$

A continuación, se indica la obtención de la ecuación 12 para determinar la precisión de la prueba de gradiente A&B.

$$S_{\%} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(X_{\%.i} - \bar{X}_{\%})^2}{n-1}} \quad \text{Ecuación 10}$$

$$RSD_m = \frac{S_{\%}}{\bar{X}_{\%}} \quad \text{Ecuación 11}$$

$$Prec = \sum_{i=1}^n \bar{X}_{iRSD_m} \quad \text{Ecuación 12}$$

r: se calcula de manera similar que el inciso 4.6.3 (ecuación 5)

Donde:

- $X_{i.\%}$ Altura encontrada (mAU) para un porcentaje configurado de acetona 0.5% en agua grado HPLC (canal B o canal D).
- $\bar{X}_{\%}$ Altura promedio (mAU) para un porcentaje configurado de acetona 0.5% en agua grado HPLC (canal B o canal D).
- N Número de alturas para un porcentaje configurado de acetona 0.5% en agua grado HPLC (canal B o canal D).
- $\%.e$ Porcentaje encontrado para un porcentaje configurado de acetona 0.5% en agua grado HPLC (canal B o canal D).
- $\%.t$ Porcentaje teórico de acetona 0.5% en agua grado HPLC (canal B o canal D).
- Ex_e Exactitud encontrada para un porcentaje configurado de acetona 0.5% en agua grado HPLC (canal B o canal D).

$\bar{X}i_{Ex_e}$	Promedio de exactitudes de todos los porcentajes involucrados para este cálculo (100%, 90%, 89%, 51%, 50%, 6% y 5% - canal B o canal D)
Ex _t	Exactitud total o final de la prueba (canal B o D)
S%	Desviación estándar para un porcentaje configurado de acetona 0.5% en agua grado HPLC
RSD _m	Desviación estándar relativa medida para un porcentaje configurado de acetona 0.5% en agua grado HPLC (canal B o canal D).
$\bar{X}i_{RSD_m}$	Promedio de desviaciones estándares relativa de todos los porcentajes involucrados para este cálculo (100%, 90%, 89%, 51%, 50%, 6% y 5%) (Canal B o canal D).
Prec	Precisión total para de la prueba (canal B o D)
R ²	Coefficiente de correlación linealidad

Tabla 19. Especificaciones en la prueba de gradiente A&B y C&D

Criterio	Especificación
Ex	≤ 1.5% B o D
Prec	≤ 0.5% B o D
R ²	≥ 0.999 B o D

Fuente: Extraído del software chemstation versión A.10.02

4.5.5. Cálculo de Ruido y Deriva.

Para esta prueba, la obtención numérica del ruido y deriva a partir de cromatograma obtenido se puede determinar mediante el método de ASTM. Se muestra la ecuación 12 y ecuación 13 para determinar el ruido y deriva.

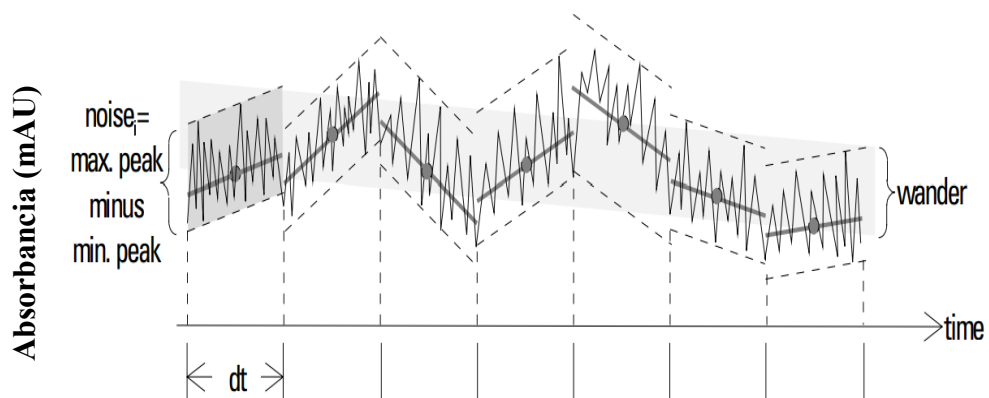


Figura 5. Cromatograma: absorción (mAU) vs tiempo (min), según ASTM (ASTM E 685-93) para encontrar el valor del ruido y deriva.

Fuente: Agilent Technologies. Familiarización con el chemstation-Agilent chemstation [23]

$$R = P_{\text{máx.60c}} - P_{\text{mín.60c}} \text{ cada 60 ciclos} \quad \text{Ecuación 12}$$

$$D = m_{rL} \quad \text{Ecuación 13}$$

Donde:

R	Ruido
D	Deriva
m_{rL}	Pendiente en la regresión lineal durante el tiempo de la prueba
$P_{\text{máx.60c}}$	Valor máximo del pico por cada 60 ciclos durante el tiempo de la prueba
$P_{\text{mín.60c}}$	Valor mínimo del pico por cada 60 ciclos durante el tiempo de la prueba

Tabla 20. Especificaciones en la prueba de ruido y deriva.

Criterio	Especificación
Ruido	$\leq 0.04 \text{ mAU}$
Deriva	$\leq 0.05 \text{ mAU/h}$

Fuente: Extraído del Software Chemstation versión A.10.02

5. RESULTADOS

5.1. Prueba de repetibilidad

A continuación, se muestra en la figura 06 los cromatogramas obtenidos de las inyecciones realizadas en la prueba de repetibilidad haciendo uso el estándar cafeína de 25.0 µg/mL

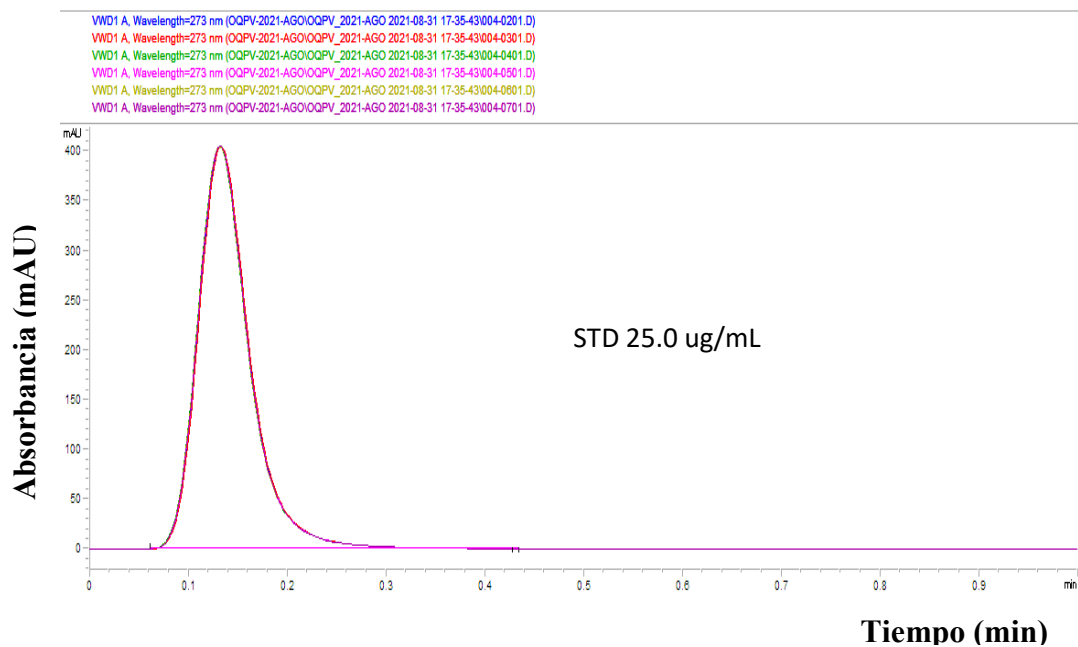


Figura 6. Cromatograma obtenido de las seis inyecciones en la prueba de repetibilidad.

Fuente: Extraído del Software Chemstation version B.04.03.SP2

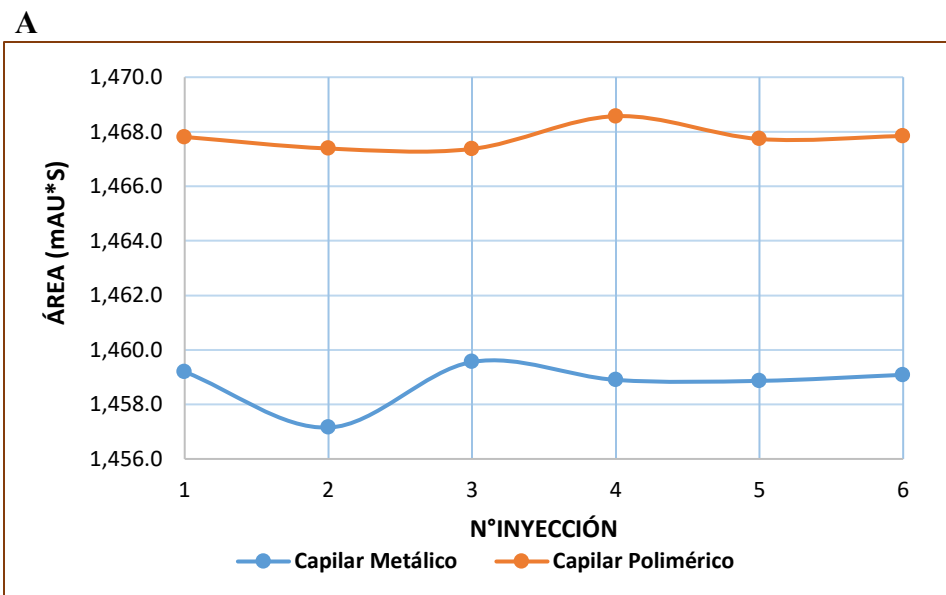
En la tabla 21 se muestran los resultados obtenidos en la prueba de repetibilidad haciendo uso del capilar de restricción metálico y polimérico.

Tabla 21. Resultados obtenidos en la prueba de repetibilidad, expresado en desviación estándar relativa (RSD).

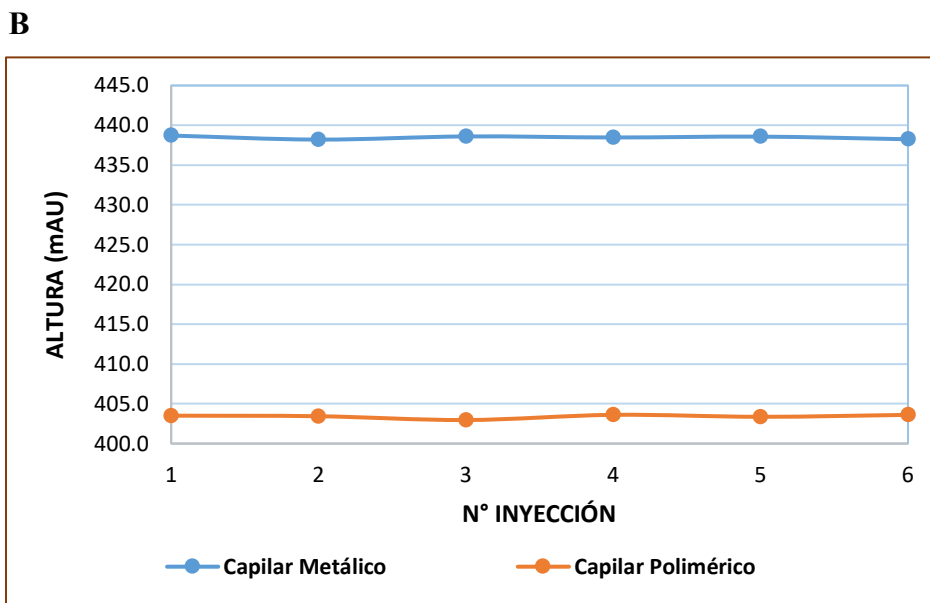
Nº de inyección STD 25.0ug/mL	Capilar metálico		Capilar polimérico	
	Área ($X_{i,A}$) mAU*s	Altura ($X_{i,H}$) mAU	Área ($X_{i,A}$) mAU*s	Altura ($X_{i,H}$) mAU
1	1459.195	438.710	1467.809	403.508
2	1457.151	438.204	1467.386	403.439
3	1459.557	438.600	1467.371	402.961
4	1458.899	438.470	1468.572	403.611
5	1458.863	438.574	1467.734	403.366
6	1459.086	438.245	1467.844	403.607
RSD _{rep}	0.058%	0.046%	0.030%	0.060%
Especificación del fabricante	RSD en área: < 1.0%		RSD en altura: < 2.0%	

Fuente: Extraído del Software Chemstation versión B.04.03.SP2

Figura 7. Variación de áreas y alturas obtenidas en la prueba de repetibilidad haciendo uso de ambos capilares de restricción. A: variación en área. B: variación altura



Fuente: Autoría propia



Fuente: Autoría propia

5.2. Prueba de carry over

A continuación, se muestra el cromatograma obtenido en la prueba de carry over.

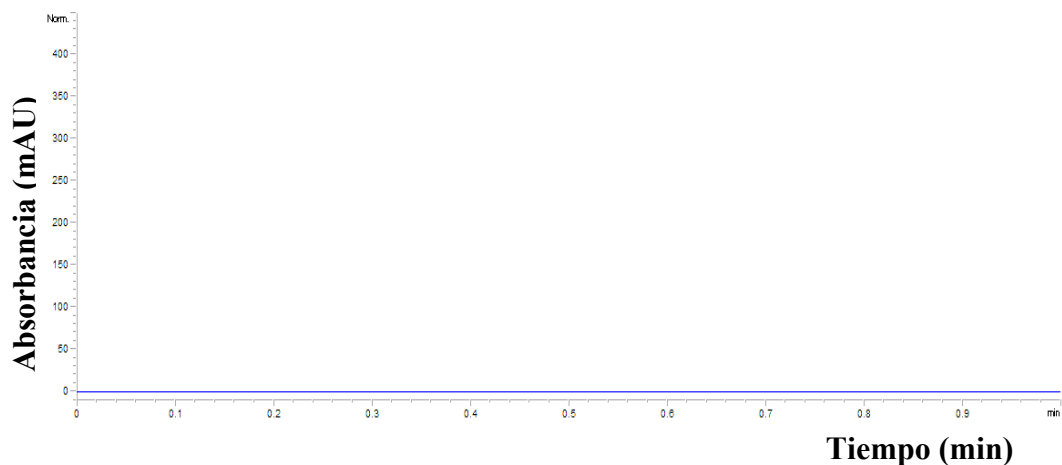


Figura 8. Cromatograma obtenido en la prueba de carry over.

Fuente: Extraído del Software Chemstation versión B.04.03.SP2

Tabla 22. Resultados obtenidos en la prueba de carry over, expresado en desviación estándar relativa (RSD).

Prueba	Capilar metálico		Capilar Polimérico	
	Área (mAU*s)	Altura (mAU)	Área (mAU*s)	Altura (mAU)
Carry over	0.00	0.00	0.00	0.00
Repetibilidad	1459.089	438.245	1467.844	403.607
RSD _{cover}	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
Especificación del fabricante	RSD área $\geq 0.20\%$ RSD altura $\geq 0.40\%$			

Extraído del software chemstation versión B.04.03.SP2

5.3. Prueba de Linealidad

A continuación, en la figura 9 se muestra los cromatogramas obtenidos de los cinco estándares de cafeína en la prueba de linealidad

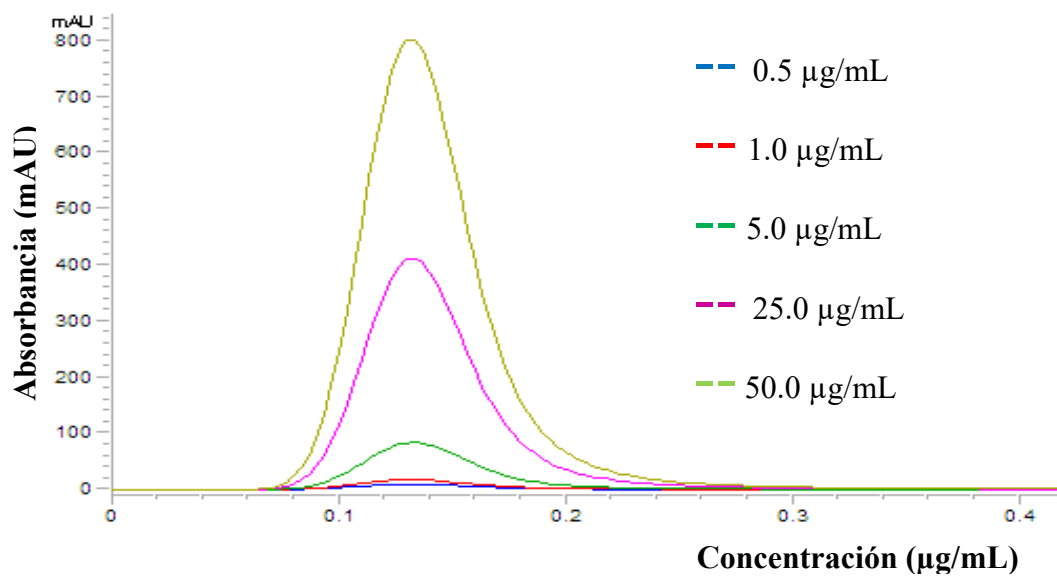


Figura 9. Cromatogramas obtenidos de los cinco estándares de cafeína.

Fuente: Extraído del Software Chemstation versión B.04.03.SP2

Los resultados obtenidos en la prueba de linealidad se muestran en la tabla 23 haciendo uso del capilar metálico y polimérico

Tabla 23. Resultados obtenidos en la prueba de linealidad

[STD Cafeína] ($\mu\text{g/mL}$)	Área (Y_i) mAU*s	
	Capilar metálico	Capilar Polimérico
0.5	33.246	35.499
1.0	86.950	67.905
5.0	295.755	303.698
25.0	1469.761	1485.909
50.0	2901.506	2905.866
R^2	0.99992	0.99990
Especificación del fabricante	$R^2 \geq 0.999$	

Fuente: Extraídos del Software Chemstation versión B.04.03.SP2

A continuación, en la figura 10 se muestra las curvas de linealidad obtenidas con el capilar de restricción metálico y polimérico.

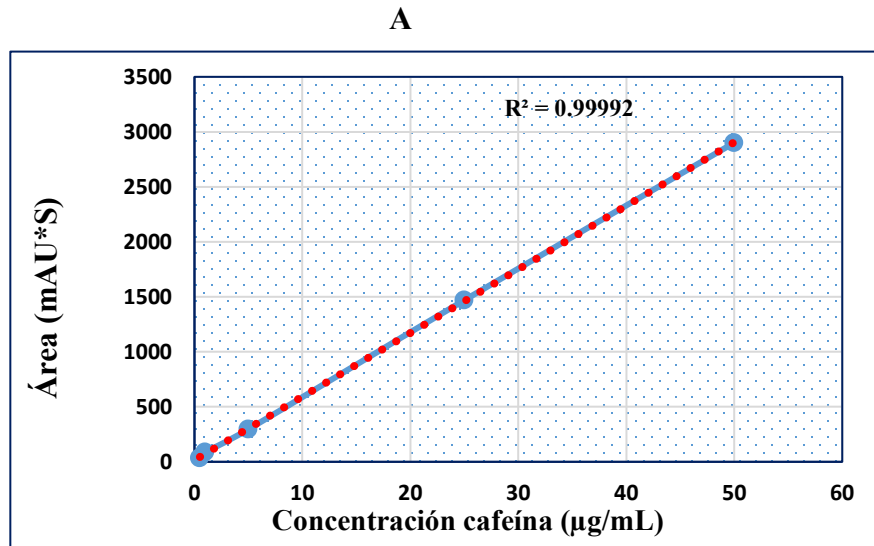
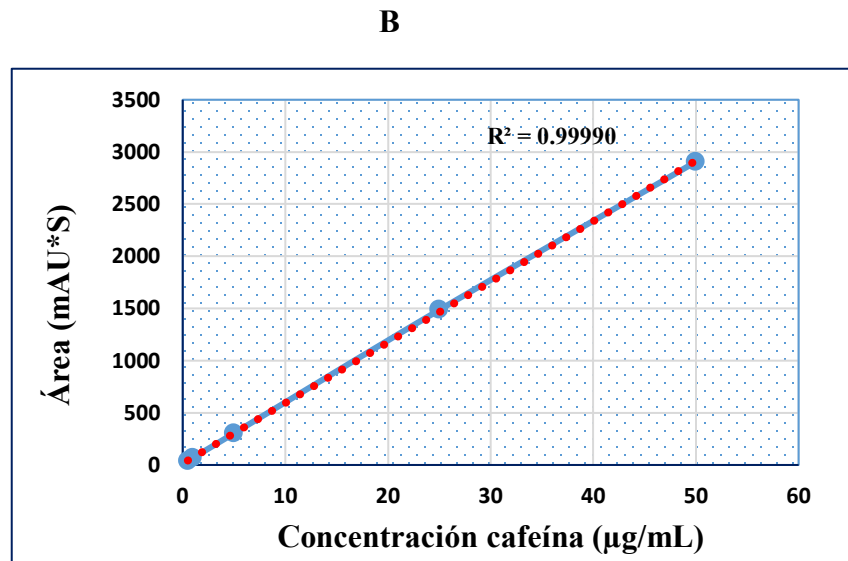


Figura 10. Curva de linealidad obtenido en la prueba de linealidad. A: capilar metálico. B: capilar polimérico

Fuente Autoría propia



Fuente: Autoría propia

5.4. Prueba de Gradiente

5.4.1. Prueba de gradiente A&B

A continuación, en la tabla 24 se muestran los resultados obtenidos en la prueba de gradiente A&B expresado en porcentajes de B.

Tabla 24. Resultados obtenidos en la prueba de gradiente A&B

Gradiente	Capilar de restricción	Exactitud total (Ext)	Precisión	Linealidad (R²)
A&B	Capilar metálico	0.492%B	0.010%B	0.999932
	Capilar polimérico	0.095%B	0.072%B	0.999992
Especificación del fabricante		≤ 1.5%D	≤ 0.5%D	≥ 0.999

Fuente: Extraído del Software Chemstation versión B.04.03.SP2

Los cromatogramas obtenidos en la prueba de gradiente A&B con el capilar metálico y polimérico se muestran en la figura 11.

A

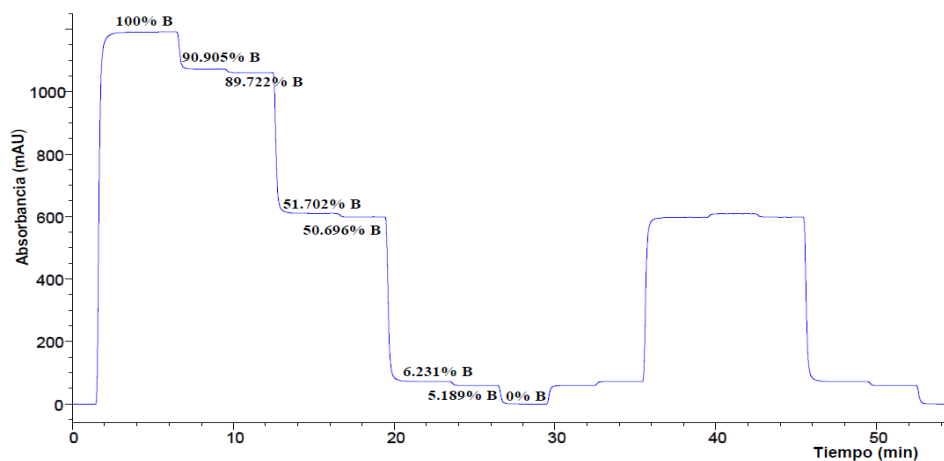
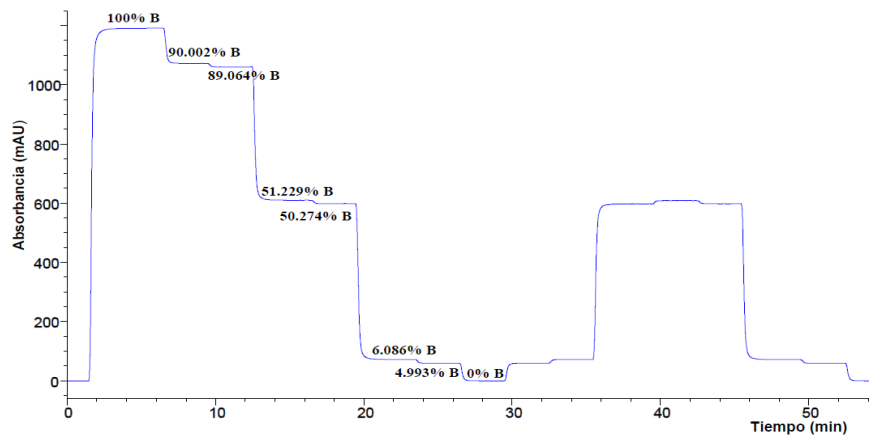


Figura 11. Cromatograma obtenido en la prueba gradiente A&B. A: Capilar metálico. B: capilar polimérico

Extraído del Software Chemstation versión B.04.03.SP2

B



Extraído del software chemstation versión B.04.03.SP2

Los valores obtenidos en porcentajes de B en la prueba de gradiente A&B se muestran a continuación en la tabla 25 y de las cuales se realizan la curva de linealidad para esta prueba como muestra la figura 12.

Tabla 25. Porcentajes de acetona 0.5% en agua grado HPLC (canal B) teóricos y encontrados usando ambos capilares de restricción en la prueba de gradiente A&B.

% B Teóricos (%.t)	% B encontrado (%.e)	
	Cap. Metálico	Cap. Polimérico
100	100.000	100.000
90	90.905	90.002
89	89.722	89.064
51	51.702	51.229
50	50.696	50.274
6	6.231	6.086
5	5.189	4.993

Fuente: Extraídos del Software Chemstation versión B.04.03.SP2

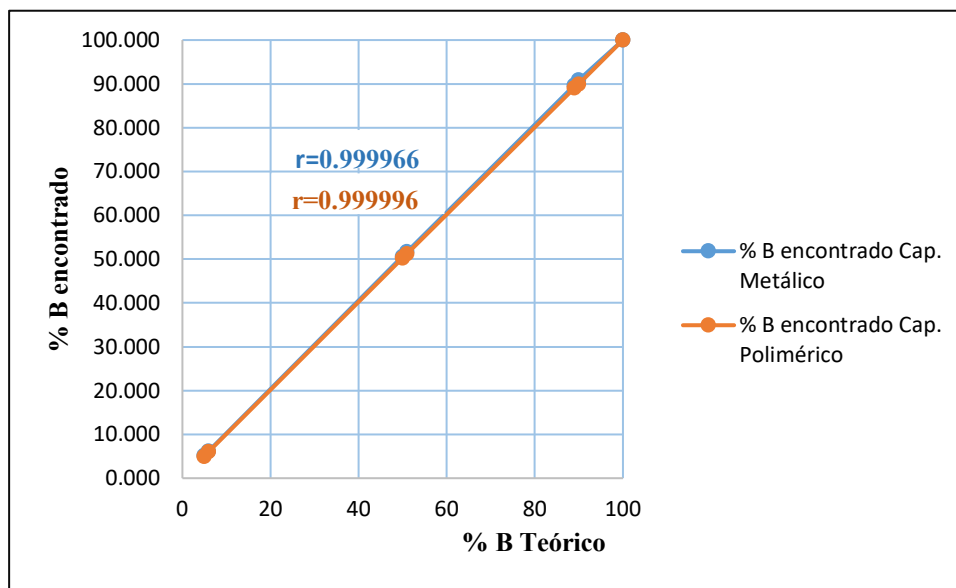


Figura 12. Linealidad obtenida en la prueba de gradiente A&B.

Fuente: Autoría propia

5.4.2. Prueba de gradiente C&D

A continuación, en la Tabla 26 se muestran los resultados obtenidos en la prueba de gradiente C&D expresado en porcentajes de D.

Tabla 26. Resultados obtenidos en la prueba de gradiente C&D

Gradiente	Capilar	Exactitud total o (Ex _t)	Precisión	Linealidad
C&D	Metálico	0.748%D	0.019%D	0.999882
	Polimérico	0.430%D	0.023%D	0.999968
Especificación del fabricante		≤ 1.5%D	≤ 0.5%D	≥ 0.999

Fuente: Extraído del Software Chemstation versión B.04.03.PS2

Los cromatogramas obtenidos en la prueba de gradiente A&B con el capilar metálico y polimérico se muestran en la figura 13.

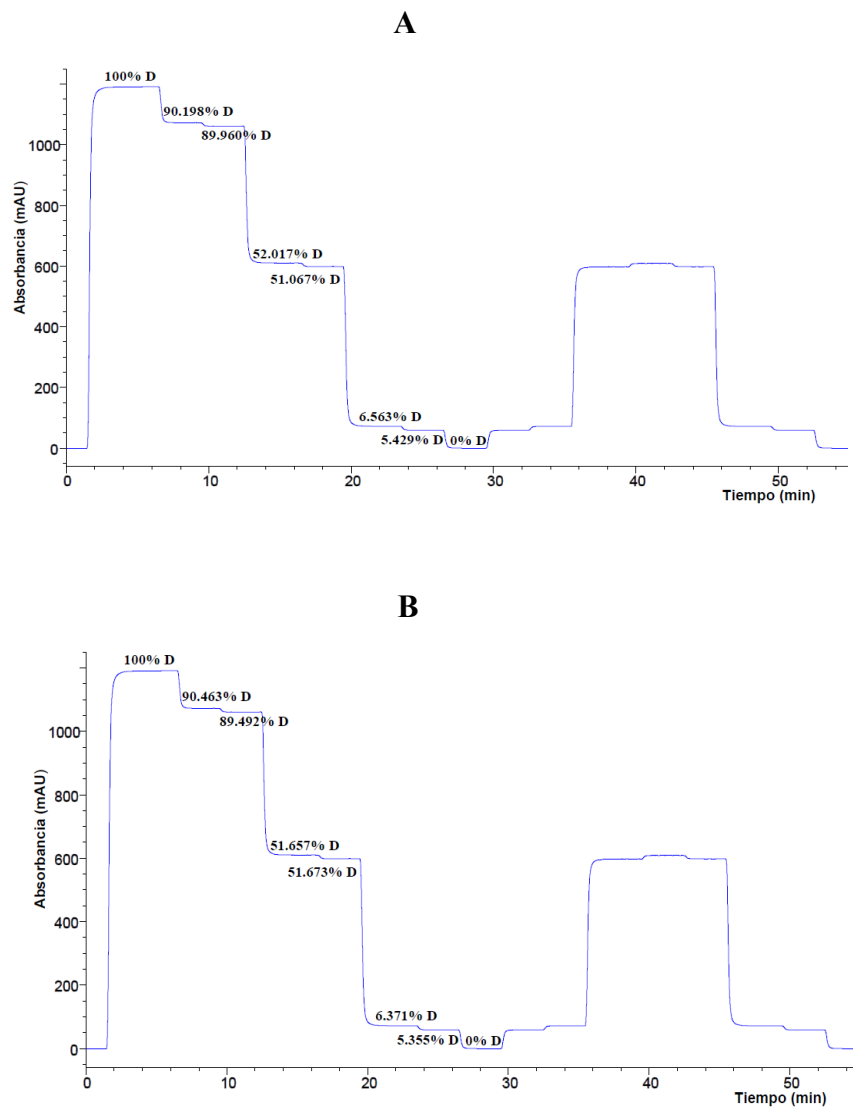


Figura 13. Cromatogramas obtenidos en la prueba de gradiente C&D. A: capilar metálico. B: capilar polimérico

Extraído del software chemstation version B.04.03.SP2

Los valores obtenidos en porcentajes en B para la prueba de gradiente A&B se muestran a continuación en la tabla 27 y de los cuales se realizan la curva de linealidad para esta prueba como muestra la figura 14.

Tabla 27. Porcentajes de acetona 0.5% en agua grado HPLC (canal D) teóricos y encontrados usando ambos capilares de restricción en la prueba de gradiente C&D.

% D Teóricos (%.t)	% D encontrado (%.e) Cap. Metálico	% D encontrado (%.e) Cap. Polimérico
100	100.000	100.000
90	91.198	90.463
89	89.960	89.492
51	52.017	51.657
50	51.067	50.673
6	6.563	6.371
5	5.429	5.355

Fuente: Extraído del Software Chemstation versión B.04.03.SP2

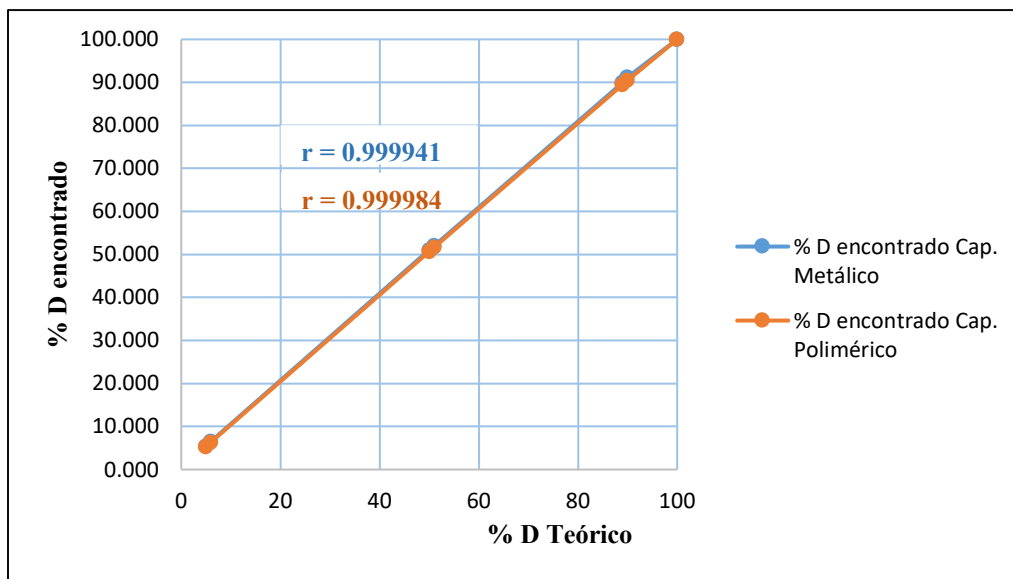


Figura 14. Linealidad obtenida en la prueba de gradiente C&D.

Fuente: Autoría propia

5.5. Prueba de ruido y deriva.

A continuación, en la figura 15 se muestra el cromatograma obtenido en la prueba de ruido y deriva usando agua grado HPLC.

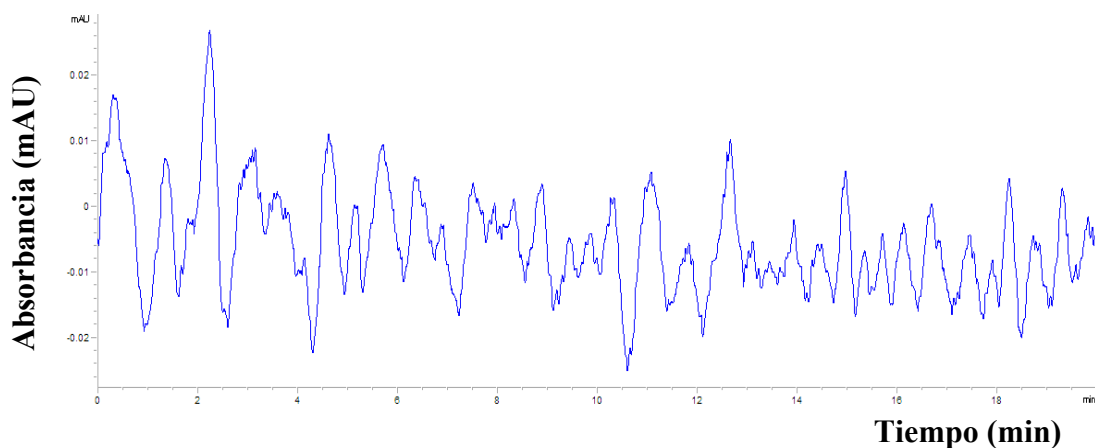


Figura 15. Cromatograma obtenido en la prueba de ruido y deriva.

Fuente: Extraído del Software Chemstation versión B.04.03.SP2.

Los resultados obtenidos en la prueba de ruido y deriva se indican a continuación en la tabla 28 con su respectiva especificación del fabricante.

Tabla 28. Resultados obtenidos para a prueba de ruido y deriva

Capilar	Ruido	Deriva
Metálico	0.005	-1.078
Polimérico	0.020	-0.032
Especificaciones del fabricante	Ruido ≤ 0.04 mAU*S Deriva ≤ 0.5 mAU/h	

Fuente: Extraído del Software Chemstation versión B.04.03.SP2

A continuación, en la tabla 29 se muestran todos los resultados obtenidos con el capilar metálico y polimérico respecto a las distintas pruebas de verificación operacional

Tabla 29. Resumen de resultados obtenidos con el capilar de restricción metálico y polimérico a las diferentes pruebas del proceso de verificación operacional en un equipo HPLC Agilen Technologies modelo 1200

Prueba	Resultado Capilar SS	Resultado capilar PEEK	Especificación
Repetibilidad	Área:0.058% RSD Altura: 0.046% RSD	Área: 0.030% RSD Altura: 0.060% RSD	Área: ≤ 1.00 % RSD Altura: ≤ 2.00 % RSD
Carry over	Área: 0.00% RSD Altura: 0.00% RSD	Área:0.00% RSD Altura:0.00% RSD	Área: ≤ 0.20% RSD Altura: ≤ 0.40% RSD
Linealidad	R^2 : 0.99992	R^2 : 0.99990	R^2 : ≥ 0.999
Gradiente A&B	Exactitud total: 0.492%B Precisión: 0.010%B Linealidad: 0.999966	Exactitud total: 0.095%B Precisión: 0.072%B Linealidad: 0.999996	Exactitud: ≤ 1.5%B o %D Precisión: ≤ 0.5 %B o %D Linealidad: ≥ 0.999
Gradiente C&D	Exactitud total: 0.748%D Precisión: 0.019%D Linealidad: 0.999941	Exactitud total: 0.023%D Precisión: 0.430%D Linealidad: 0.999984	
Ruido y deriva	Ruido: 0.005mAU Deriva: -1.078 mAU/h	Ruido:0.020 mAU Deriva:-0.032 mAU/h	Ruido: ≤0.04 mAU Deriva: ≤0.5 mAU/h

6. DISCUSIONES

El proceso de verificación operacional se empezó con la ejecución de tres inyecciones del blanco (agua grado HPLC) para evaluar la estabilidad de la línea base y lavar todo el sistema de inyección, posteriormente se dio inicio a las pruebas de rutina del proceso de verificación operacional. Se empezó por la prueba de inyección o repetibilidad, en la cual se evalúa si los componentes del módulo automuestrador del sistema HPLC se encuentra en óptimas condiciones para que el analista realice sus respectivos análisis. Se realizó seis inyecciones del estándar de cafeína de 25µg/mL mostradas en la figura 6 como cromatogramas superpuestos, asimismo en la tabla 21 nos muestra que con el capilar de restricción metálico se obtuvo un RSD en área 0.058% y en altura 0.044%, y con el capilar de restricción polimérico se obtuvo un RSD en área 0.030% y en altura 0.060%. Estos resultados obtenidos cumplen con las especificaciones establecidas por el fabricante mostradas en la tabla n° 016 ($RSD_{\text{área}} \leq 1.0\%$ y $RSD_{\text{altura}} \leq 2.0\%$), por tanto, los resultados de esta prueba de verificación operacional indican el buen funcionamiento del sistema de inyección y la homogeneidad del estándar usado para esta prueba.

La prueba de carry over fue realizada con la función de verificar la cantidad de muestra retenida por el sistema de inyección, ejecutándose una sola inyección del blanco (agua grado HPLC) y del cual se obtuvo un RSD en área y altura de 0.00% con ambos capilares de restricción mostrado en la tabla 22, asimismo en la figura 8 se puede ver que el cromatograma es prácticamente una línea recta, puesto en cero absoluto; este resultado corrobora la información de la prueba de repetibilidad que indica que el estado del sistema de inyección

es bueno, ya que los resultados obtenidos cumplen las especificaciones establecidas por el fabricante mostradas en la tabla 17 ($RSD_{\text{área}} \leq 0.2\%$ y $RSD_{\text{altura}} \leq 0.4\%$).

La prueba de linealidad hace uso de los cinco estándares de la muestra de cafeína de concentraciones conocidas mostradas en la tabla 10 y se ejecuta para evaluar de manera específica la vigencia de la muestra estándar de cafeína. Esta prueba se realiza inyectando la solución estándar de menor a mayor concentración y de acuerdo a la tabla 23 muestra que los resultados obtenidos con el capilar de restricción metálico fue en R^2 de 0.99992 y con el capilar de restricción polimérico se obtuvo un R^2 de 0.99990; ambos resultados cumplen la especificación establecida por el fabricante mostradas en la tabla 18 ($R^2 \geq 0.999$). Tanto la prueba de repetibilidad, carry over y linealidad se analizan a una longitud de onda de 273nm como se muestra en la tabla 11 porque a esa la longitud de onda la molécula de cafeína presenta su máxima absorbancia.

La prueba de gradiente A&B y C&D se realiza para verificar la eficiencia de la válvula de gradiente multicanal (MCGV) del módulo bomba cuaternaria y para ello las pruebas se corren con ciertos porcentajes de las fases móviles, mostrados en la tabla 12. La eficiencia de MCGV para las pruebas de gradiente A&B o gradiente C&D se mide en porcentajes del canal que contiene la acetona 0.5% en agua grado HPLC como se muestra en la tabla 15 y los parámetros a evaluar son precisión, exactitud total y en coeficiente de correlación lineal. Los resultados obtenidos mostrados en la tabla 24 en la prueba de gradiente A&B con el capilar de restricción metálico fueron una exactitud total de 0.492%B, una precisión de 0.010%B y linealidad de 0.999966, y con el capilar de restricción polimérico se obtuvo una exactitud total de 0.095%B, una precisión 0.072%B y una linealidad de 0.999996; asimismo los

resultados en prueba de gradiente C&D de acuerdo a la tabla 26 con el capilar de restricción metálico fueron una exactitud total de 0.748%D, una precisión: 0.019%D y una linealidad de 0.999941, y con el capilar de restricción polimérico se obtuvo una exactitud total de 0.43%D, una precisión de 0.023%D y una linealidad de 0.999984. Los resultados obtenidos cumplen con las especificaciones del fabricante mostrados en la tabla 19 (Exactitud total $\leq 1.5\%B$ o D , Precisión $\leq 0.5\%B$ o D y linealidad ≥ 0.999). Por tanto, la MCGV se encuentra en buenas condiciones para operar.

La prueba de ruido y deriva en la verificación operacional se realiza para ver la estabilidad del sistema HPLC y la eficiencia de la lámpara de deuterio. Los resultados obtenidos que se muestran en la tabla 28 con el capilar metálico fueron de 0.005 mAU en ruido y -1.078 mAU/h en deriva, asimismo con capilar polimérico se obtuvo 0.020 mAU en ruido y -0.032 mAU/h en deriva. Estos valores cumplen con las especificaciones del fabricante mostrados en la tabla 20 (Ruido $\leq 0.04\text{mAU}$. Deriva $\leq 0.04\text{mAU/h}$), por tanto, el equipo no presenta partículas o impurezas en el sistema y/o factores ambientales que afecten los análisis. El ruido se analiza a 254nm porque a esa longitud de onda la señal es más estable en el rango ultravioleta, debido a la alta energía que emite la lámpara de deuterio, este parámetro está estandarizado por el fabricante.

Los resultados obtenidos para las pruebas ejecutadas del proceso de verificación operacional en el equipo HPLC Agilent technologies modelo 1200 cumplen con las especificaciones del fabricante, tanto con el capilar polimérico y metálico como se muestra en la tabla n° 028; Sin embargo, el tiempo y resultados obtenidos pueden verse alterados por factores internos y externos al equipo. Factores internos como el tiempo de uso de cada consumible usado (sellos

bomba, sello válvula de inyección, aguja, asiento de aguja, sello del compartimento de columnas, lámpara de deuterio, frits, válvulas de entrada y salida del cabezal de la bomba y otros) como lo indican los manuales de usuarios del equipo HPLC Agilent Technologies y factores externos como la muestra estándar de cafeína, fase móvil preparado por los analistas de laboratorio y personal poco capacitado para este servicio de verificación operacional del equipo HPLC Agilent Technologies modelo 1200.

7. CONCLUSIÓN

En vista que los resultados obtenidos para todas las pruebas ejecutadas cumplen las especificaciones del fabricante; el capilar polimérico puede reemplazar al capilar metálico para realizar todo el proceso de verificación operacional de un equipo HPLC agilent technologies modelo 1200.

8. RECOMENDACIONES

1. Traspasar la muestra del estándar de cafeína a los viales de 1.5 mL con mucha cautela y evitar generar burbuja en el interior del vial; esto generará resultados que superaran las especificaciones del fabricante en la prueba de repetibilidad y linealidad.
2. Si los resultados obtenidos en la prueba de gradiente A&B y gradiente C&D exceden las especificaciones del fabricante cambiar la MCGV o bloquear el canal defectuoso.
3. En la prueba de ruido y deriva evitar realizar ruidos fuertes cerca al equipo, debido que la señal del detector se distorsionará y no cumplirán las especificaciones del fabricante para estas pruebas.
4. En la química analítica instrumental adquirir conocimientos teóricos y prácticos en el manejo del equipo HPLC y software para realizar operaciones rápidas en el ámbito laboral.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Gismera García M.J. y María del Carmen Quintana Mani. Introducción a la cromatografía líquida de alta resolución [En Línea]. Madrid: Editorial Universidad Autónoma de Madrid. 2014 [consultado 16 Sep 2021]. Disponible en: <https://bibvirtual.upch.edu.pe:2893/es/ereader/cayetano/53955?page=1>
2. Polo Díez L.M. Fundamentos de cromatografía [En Línea]. Madrid: Dextra Editorial. 2015 [consultado 16 Sep 2021]. Disponible en: <https://bibvirtual.upch.edu.pe:2893/es/lc/cayetano/titulos/131492>
3. McDowall RD. USP on Analytical Instrument Qualification and the Laboratory Impact. Spectroscopy 2009 04; 24(4):20-27.
4. Huber L. In search of standardized definitions for validation. qualification. verification. and calibration. BioPharm 1999 04; 12(4):56-58.
5. Krull I. Swartz M. Operational and performance qualification. LC GC North America 2002 04; 20(4):356.
6. El Fallah MZ. Performance verification--a regulatory burden or an analytical tool? LC GC 1999 05; 17(5):434.
7. Agilent Technologies. Operational Qualification and Performance Verification of UV-visible Spectrophotometers [En Línea]. 1997 [Consultado 16 Sep 2021]. Disponible en: <https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/Public/59657438.pdf>.

8. Agilent Technologies. ANALYTICAL SCALE HPLC AGILENT SYSTEMS [En Línea] 2018. [Consultado 16 Sep 2021]. Disponible en https://www.agilent.com/cs/library/service/public/HPLC%20Hardware_Operational%20Qual-Col2.pdf.
9. Agilent Technologies. EQUIPMENT QUALIFICATION PLAN [En Línea]. 2013 [Consultado 16 Sep 2021]. Disponible en: https://www.agilent.com/cs/library/service/Public/Review%20Document_Standard_EQP_UHPLC.pdf.
10. Martínez Gómez L. Acero (3a. ed.) [En Línea]. México D. F: FCE - Fondo de Cultura Económica. 2002 [consultado 16 Sep 2021]. Disponible en: <https://bibvirtual.upch.edu.pe:2893/es/ereader/cayetano/71931?page=33>
11. FEDEMETAL-SENA. Manual de mantenimiento. Disponible en: https://repositorio.sena.edu.co/sitios/fedemetal_manual_mantenimiento/.
12. Pérez Orozco AF. Guía para el cumplimiento de los requisitos técnicos de validación del sistema cromatográfico para el análisis de progesterona. 2010; Disponible en: <https://www.uv.mx/gestion/files/2013/01/arith-fabiana-perez-orozco.pdf>.
13. Cervantes M, e. a. (2009). Protocolo para la calificación de área y equipo de encapsulado como material de educativo para la enseñanza de la validación de procesos en la Fez Zaragoza, UNAM (versión electrónica). revista d'educació superior en Farmàcia , 4, 1-13.
14. Agilent Technologies. System Manual and Quick Reference. 2010. Disponible en: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G1311-90300_QuaternarySystem_ebook.pdf.

15. Sirard T. Fundamentals of HPLC. Disponible en:
https://www.waters.com/webassets/cms/events/docs/FundamentalsofHPLCWebinar_TRS_102012.pdf
16. Agilent Technologies. Manual de usuario-Bomba cuaternaria Agilent Serie 1200. 2008. Disponible en: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G1311-95011_QuaternaryPump-ebook.pdf
17. Agilent Technologies. User manual. Agilent 1260 Infinity Isocratic Pump and Quaternary Pump. 2013. Disponible en:
https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G1310-90016_Iso-QuatPump-B_USR_EN.pdf
18. Agilent Technologies. User manual-Agilent 1200 Series Standard and Preparative Autosamplers.2008. Disponible en:
https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G1329-90012_StandPrepSamplers_ebook.pdf.
19. Agilent Technologies. User manual- Agilent 1260 Infinity Standard Autosampler. 2013. Disponible en: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G1329-90015_ALS-B_USR_EN.pdf
20. Agilent Technologies. User manual-Agilent 1200 Series Thermostatted Column Compartment G1316A/G1316B/G1316C. 2008. Disponible en:
https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G1316-90011_TCC-A-B-C_ebook.pdf

21. Agilent Technologies. User manual- Agilent 1200 Infinity Series Variable Wavelength Detectors. 2013. Disponible en: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G1314-90034_VWD_DEF_USR_EN.pdf
22. Agilent Technologies. User manual- Agilent 1260 Infinity Variable Wavelength Detector. 2010. Disponible en: <http://www.hz-rush.com/UploadFile/file/1260/G1314BCUser.pdf>
23. Agilent Technologies. Familiarización con Chemstation-Agilent ChemStation. 2008. Disponible en: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2070-95125_understanding_e-book.pdf