



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

REPORTE DE SERVICIO SOCIAL

REALIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA LA OPERACIÓN, LIMPIEZA Y MANTENIMIENTO DEL CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

Prestador del Servicio Social:

Sánchez Machuca Armando

Asesores:
Interno:
Dr. Karina Sánchez Herrera
Número económico:
29037

Lugar de realización: UAM-Xochimilco

Introducción

Es bien sabido que la cromatografía de líquidos de alta resolución es la técnica de separación más ampliamente utilizada, las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles, y sobre todo su gran aplicación a sustancias que son de gran interés para la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Estas sustancias incluyen aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos esteroides, especies organometálicas y una cierta variedad de sustancias inorgánicas. La sensibilidad y el amplio espectro son dos ventajas que hacen que esta técnica sea muy utilizada en la industria, la sensibilidad debido a que la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución es capaz de separar moléculas complejas cuando se elige la columna y la fase móvil adecuados y el amplio espectro debido a que en la actualidad hay columnas cromatográficas para separar casi cualquier material.

Por esta razón y por ser la técnica más ampliamente utilizada en la industria farmacéutica se decide la realización de un procedimiento normalizado de operación para el cromatógrafo de líquidos que se encuentra en el laboratorio G-103 de la UAM-X, para que los alumnos pongan en práctica los conocimientos teóricos aprendidos durante el módulo.

El procedimiento normalizado de operación se basa en integrar los procesos y técnicas necesarias para el ejercicio de las funciones asignadas en el manejo y mantenimiento del equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución, constituyéndose este documento como la herramienta de apoyo y consulta para el personal que interviene en sus procesos.

Justificación

Que un recién egresado conozca el fundamento y pueda utilizar un equipo de cromatografía de alta resolución es cada vez más necesario para los reclutadores en donde se puede desempeñar un químico farmacéutico biólogo, ya que esta técnica es de las más socorridas en la actualidad por su alto grado de certeza y fiabilidad, así como el amplio espectro en el que trabaja.

Es por esto que se debe enseñar a los estudiantes cómo operar un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución y no solo el fundamento, para que así, al concluir sus estudios y buscar empleo tengan mayores posibilidades sobre los demás candidatos y no solo tener los conocimientos teóricos.

También es necesario contar con un procedimiento normalizado de operación del equipo para que cualquier docente o estudiante pueda manipular el equipo con una serie de instrucciones claras y no correr el riesgo de dañarlo.

Marco Teórico

Principios cromatográficos

El término cromatografía procede de la palabra griega chroma- que significa color y -graphein que significa escribir. El primer uso registrado de la cromatografía en columna se le otorga al científico ruso Mikhail Tsvet que trituró carbonato de calcio en un tubo y posteriormente agregó hojas de una planta verde homogeneizadas, seguido de un solvente orgánico. Tsvet observó bandas de colores separadas a medida que el solvente pasaba a través del tubo. Así es como la cromatografía práctica comenzó al principio, separando con éxito varios pigmentos de las hojas. En el mundo de hoy, hay muchos analitos que son incoloros y están separados por técnicas cromatográficas, todavía se le conoce con el mismo nombre. ⁽³⁾

La cromatografía es una técnica utilizada en el campo de la salud que consiste en separar dos o más componentes de una mezcla compleja, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios.

El principio básico en todas las separaciones cromatográficas consiste en disolver la muestra en uno o más disolventes conocidos como "fase móvil", en el caso concreto del método CLAR es un líquido, y cuya función es transportar el analito a través de una columna generalmente de acero inoxidable (puede ser de otro material dependiendo la naturaleza de la muestra). Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible, que es una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte, que se mantiene fija sobre una columna. Las

dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la estacionaria. ⁽¹⁾

Aquellos componentes que son retenidos con fuerza por la fase estacionaria se mueven lentamente a través de la columna, debido al flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez, esto depende de la naturaleza de la fase estacionaria, la cual puede ser un compuesto cargado iónicamente para adsorber los componentes más afines mientras los menos selectivos salen primero de la columna.

Las principales características de esta técnica son sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y su gran aplicabilidad debido a que actualmente se pueden desarrollar técnicas para cuantificar la pureza de un analito o el porcentaje de impurezas que puede contener, ya que actualmente se cuenta con 52 fases estacionarias registradas ⁽⁹⁾ y se sigue innovando para cumplir con las demandas.

Existen diferentes tipos de cromatografía de líquidos:

* Cromatografía de Reparto.

Ha llegado a ser el tipo de cromatografía de líquidos más ampliamente utilizada. Se puede subdividir en cromatografía líquido-líquido y cromatografía con fases unidas químicamente (enlazadas) sólido-líquido. La diferencia entre estas técnicas radica en la forma como se retiene la fase estacionaria sobre las partículas soporte del relleno. En líquido-líquido, la fase estacionaria líquida se retiene sobre la superficie del soporte de adsorción física. En fase unida químicamente, la fase estacionaria se une químicamente a la superficie del soporte. Este tipo de cromatografía, al principio era del tipo líquido-líquido; sin embargo, actualmente el más utilizado es la fase sólido líquido debido a las desventajas que posee la fase líquido-líquido como es la pérdida de fase estacionaria debido a que si no se utiliza una fase móvil adecuada esta puede disolver la fase estacionaria lo cual terminaría con la vida útil de la columna, pudiendo recubrirla de nuevo, pero en cualquier caso se acortaría la vida y generaría gastos innecesarios.

Dentro de este tipo de cromatografía se utilizan 2 tipos principalmente: Fase normal y fase reversa, en la fase normal la fase estacionaria posee una alta polaridad (agua o trietilenglicol sobre partículas de sílice o alúmina), en esta fase el componente menos polar del analito eluye primero debido a que es relativamente más soluble en la fase móvil y no es retenido por la fase estacionaria.

En la fase reversa la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es relativamente polar (Agua, MeOH, ACN) y los componentes más polares aparecen primero en el cromatograma.

Generalmente se utilizan columnas con fase estacionaria a base de sílice debido a que posee tres características principales: resistencia, porosidad y uniformidad, su superficie está constituida por grupos SiOH.

Esta variante de la cromatografía es la más utilizada debido a la gran cantidad de aplicaciones que puede tener como son en productos farmacéuticos, industria bioquímica, productos alimenticios, industria química, contaminantes, química forense y medicina clínica. ⁽¹¹⁾

* Cromatografía de Adsorción.

También conocida como cromatografía líquido-sólido. Las únicas fases que se utilizan en esta cromatografía son la sílice y la alúmina, siendo la primera la que se prefiere para casi todas las aplicaciones debido a su mayor capacidad de carga y a su mayor diversidad de presentaciones. Con pocas excepciones, las características de adsorción de los dos adsorbentes son similares. Con ambos, el orden de tiempos de retención es: olefinas < hidrocarburos aromáticos < haluros = sulfuros < éteres < nitrocompuestos < ésteres = aldehídos = cetonas < alcoholes = aminas < sulfonas < sulfóxidos < amidas < ácidos carboxílicos.

Aplicaciones de la cromatografía de adsorción

Es más adecuada para compuestos no polares probablemente con masas moleculares inferiores a 5000. En general, es más adecuada para muestras que son solubles en disolventes no polares, y que por tanto tiene una solubilidad limitada en los disolventes acuosos que son los que utilizan en los procedimientos de reparto en fase inversa. Una característica particular, que no es compartida con otros métodos, es su capacidad para diferenciar compuestos isómeros.

* Cromatografía Iónica.

Está relacionada con los métodos modernos y eficaces para la separación y determinación de iones que se basan en el uso de las resinas de intercambio iónico. Empezó a desarrollarse a mediados de los años setenta, cuando se demostró que mediante las columnas de HPLC rellenas con resinas de intercambio catiónico o aniónico, se podían resolver fácilmente mezclas de cationes o aniones.

Aplicaciones de la cromatografía iónica

Se ha aplicado a una variedad de sistemas orgánicos y bioquímicos incluyendo drogas y sus metabolitos, sueros, conservantes de alimentos, mezclas de vitaminas, azúcares y preparaciones farmacéuticas.

* Cromatografía de Exclusión por Tamaños o en Geles.

Es una técnica muy valiosa que se aplica particularmente a especies de alto peso molecular. Los rellenos están constituidos por pequeñas partículas (de unas 10 μm) poliméricas o de sílice que contienen una red uniforme de poros en los que pueden difundir las moléculas del soluto y del disolvente. En los poros, las moléculas son atrapadas efectivamente y eliminadas del flujo de la fase móvil. El tiempo de residencia medio de los poros depende del tamaño efectivo de las moléculas de los analitos. Las moléculas que tienen diámetros que son significativamente menores que los poros, pueden penetrar a través del laberinto de poros y así resultan atrapadas durante más tiempo; éstas son las últimas en eluir. Entre estos dos extremos, están las moléculas de tamaño intermedio cuya penetración media en los poros depende de su diámetro. Dentro de este grupo, tiene lugar el fraccionamiento, que está directamente relacionado con el tamaño molecular y en cierto modo con la forma molecular.

Aplicaciones de la cromatografía de exclusión por tamaños

Los métodos de exclusión por tamaños se subdividen en la cromatografía de filtración en gel y la de gel permeable. En el primer tipo se utilizan disolventes acuosos y rellenos hidrofílicos. En el último, los métodos se basan en disolventes no polares y en rellenos hidrofóbicos. Los métodos son complementarios en el sentido que en un caso se aplican a muestras solubles en agua, y en el otro a sustancias solubles en disolventes orgánicos poco polares. Una de las aplicaciones más útiles del procedimiento de filtración en gel consiste en separar las moléculas de alto peso molecular de productos naturales de las especies de bajo peso molecular y de las sales. Por ejemplo, un gel con un límite de exclusión de varios miles puede separar bien las proteínas de los aminoácidos y de los péptidos de bajo peso molecular.

Se elige cada tipo a utilizar en función de las características químicas del analito a determinar.

Instrumentación para cromatografía de líquidos

Con objeto de alcanzar un caudal de eluyente razonable con rellenos de tamaño de partícula entre 3 y 10 μm , que, por otra parte, son comunes en la moderna cromatografía de líquidos, se requieren presiones de algunos cientos de kilos por centímetro cuadrado. Como consecuencia de estas elevadas presiones, el equipo necesario para la HPLC tiende a ser más sofisticado y caro que el que se utiliza en otros tipos de cromatografía. La figura muestra un esquema de los componentes fundamentales de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución típico.

Los principales componentes de un cromatógrafo de líquidos son:

* Recipientes para la fase móvil y sistemas para el tratamiento de los disolventes

Un aparato moderno de HPLC se equipa con uno o más recipientes de vidrio o de acero inoxidable, cada uno de los cuales contiene unos 500 mL de un disolvente. Los recipientes a menudo se equipan con un sistema para eliminar los gases disueltos –en general oxígeno y nitrógeno– que interfieren formando burbujas en los sistemas de detección. Un desgasificador puede consistir en un sistema de bombeo por vacío, un sistema de destilación, dispositivos para calentar y agitar los disolventes o, sistemas de difusión que permiten arrastrar los gases disueltos fuera de la solución mediante finas burbujas de un gas inerte de baja solubilidad. Con frecuencia estos sistemas también contienen un dispositivo para la filtración del polvo y de las partículas sólidas en suspensión de los disolventes.

* Sistemas de bombeos.

Los requisitos para un sistema de bombeo en HPLC son rigurosos e incluyen: la generación de presiones por encima de 400 kg/cm², un flujo libre de pulsaciones, un intervalo de caudales de 0.1 a 10 mL/min, el control y reproducibilidad del caudal mejor del 0,5% relativo y componentes resistentes a la corrosión (juntas de acero inoxidable o teflón). Debe subrayarse que las altas presiones que generan las bombas de HPLC no constituyen un riesgo de explosión, debido a que los líquidos no son muy compresibles. De este modo, la rotura de un componente del sistema sólo supone una pérdida de disolvente. Es evidente que esta pérdida puede suponer un riesgo de incendio.

* Sistemas de Inyección de la Muestra.

El método más ampliamente utilizado para la introducción de la muestra utiliza bucles de muestra. Estos dispositivos están normalmente integrados en el equipo cromatográfico y hay bucles intercambiables que permiten la elección de tamaños de muestra desde 5 a 500 μL . Con bucles de este tipo se puede introducir la muestra

a presiones de hasta 500 kg/cm² con una precisión relativa de unas décimas por ciento. También existen válvulas de inyección de micromuestras, con bucles con volúmenes de 0,5 a 5 µL.

* Columnas.

Las columnas para cromatografía de líquidos se construyen de ordinario con tubo de acero inoxidable de diámetro interno uniforme. Cientos de columnas empaquetadas que difieren en tamaño y relleno se comercializan por distintos fabricantes. La mayoría de las columnas para cromatografía de líquidos tienen una longitud entre 5 y 30 cm. Por lo común, las columnas son rectas y se pueden alargar, si es necesario, acoplando dos o más columnas. El diámetro interno de las columnas es a menudo de 4 a 10 mm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son 3, 5 y 10 µm. Tal vez la columna más frecuentemente utilizada es la de 25 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, y empaquetada con partículas de 5 µm. Estas columnas tienen de 40, 000 a 60, 000 platos/metro.

* Detectores.

Un detector ideal para cromatografía de líquidos debería poseer todas las propiedades listadas en relación con la cromatografía de gases, con la excepción de que un detector para cromatografía de líquidos no es necesario que sea sensible en un intervalo tan grande de temperaturas.

Además, un detector de HPLC debe tener un volumen interno mínimo a fin de reducir el ensanchamiento de banda. Los detectores en cromatografía de líquidos son de dos tipos básicos. Los detectores basados en una propiedad de la disolución responden a una propiedad de la fase móvil, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica, o la densidad, que se modifica por la presencia de los analitos. Por contraste, los detectores basados en una propiedad del soluto responden a alguna de las propiedades del soluto, como la absorbancia UV, fluorescencia, o intensidad de difusión, que no son propias de la fase móvil.

* Sistema de procesamiento de señal y tratamiento de datos.

Los sistemas de computadora para el procesamiento de datos son los más complejos y caros. Se dividen en dos grupos. Los dispositivos del primer grupo son solamente para el procesamiento de datos y son los ordenadores de pequeño tamaño con grandes cantidades de memoria, que realizan una variedad de cálculos complejos y presentan los resultados en forma numérica y gráfica. Y los dispositivos que pertenecen al segundo grupo, se encargan de gestionar los diversos elementos del sistema cromatográfico.

La cromatografía se puede emplear para la identificación cualitativa (que no es objeto de este procedimiento) y para la determinación cuantitativa de los analitos separados. La cromatografía en columna cuantitativa se basa en la comparación de la altura, o del área, del pico del analito con la producida por una o más disoluciones del analito de concentración producida.

Objetivos

General:

- Elaborar un procedimiento normalizado de operación del cromatógrafo de líquidos Knauer modelo Chanc€, ubicado en el laboratorio G-103 de la UAM-X donde se incluya la correcta operación, limpieza y mantenimiento del equipo para obtener resultados confiables y evitando la mayor cantidad de variables en los procesos.

Específicos:

1. Apoyar al personal docente con la programación de prácticas demostrativas sobre el uso del cromatógrafo de líquidos.
2. Que los alumnos conozcan el fundamento de la cromatografía de líquidos de alta resolución
3. Enseñar a los alumnos a utilizar los cromatógrafos de líquidos.

Metas

Identificar principios activos mediante la técnica de separación por cromatografía líquida de alta resolución, aplicando los conocimientos teóricos en un cromatógrafo de inyección manual y conociendo el funcionamiento de todos los módulos que lo componen.

Métodos

El trabajo se llevó a cabo en dos etapas; por una parte, la programación de prácticas para que los alumnos aprendan a utilizar el equipo, como se lleva a cabo la preparación de muestras y como interpretar los resultados; al mismo tiempo se realizó la elaboración del PNO para que en la segunda etapa se someta a revisión para su posterior aprobación y entrega.

La programación de prácticas se revisó y planeó con el docente en curso para asignar grupos de personas para que todos tengan la oportunidad de trabajar con el equipo, durante la práctica se revisó la preparación de la muestra, el fundamento de la cromatografía de líquidos de alta resolución, así como los componentes del equipo.

En el procedimiento se especifica cómo operar el equipo y llevar a cabo la limpieza exterior del mismo para mantenerlo en condiciones óptimas de trabajo, también se trató el mantenimiento de columnas, líneas y jeringas para asegurar un aumento en la vida útil de los accesorios.

La práctica que se realizó tenía como objetivo identificar y cuantificar Acetaminofén por el método de CLAR descrito en la USP 40 edición en tres etapas principales.

1. Preparación de muestras y fase móvil

1.1 **Solución A:** Se pesaron 0.85 g de fosfato monobásico de potasio y 0.9 de fosfato dibásico de sodio anhidro y se disolvieron en 500 mL de agua purificada.

1.2 **Solución B:** Se utiliza el equipo de filtración con membranas de 0.42 µm para filtrar metanol.

1.3 Fase móvil:

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)
0.0	99	1
3.0	99	1
7.0	19	81
7.1	99	1
10.0	99	1

1.4 **Solución estándar y solución de la muestra:** Se pesaron 50 mg de Acetaminofén grado reactivo y se disolvieron en 100 mL de metanol, se tomó una alícuota de 1 mL y se llevó a un matraz de 50 mL, de esta solución se tomó una alícuota de 1 mL y se diluyó a 10 mL con metanol.

Concentración aproximada: 0.1 mg/mL.

2. Condiciones cromatográficas

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos Knauer modelo Chanc€ con un detector UV a 230 nm, con una columna acoplada de 4.6 mm x 25 cm, empacada con fase L1 de 5 micras (octadecilsilano enlazado químicamente a partículas de cerámica), con una velocidad de flujo de 1.0 mL/min y un volumen de inyección de 5 µL, para ello se utilizó una jeringa de 10 µL.

3. Procedimiento

Se verificó la preparación de las soluciones, se acondicionó el equipo con fase móvil hasta observar una línea base estable, se realizó el registro en la bitácora de uso y se purgó el inyector y la jeringa hasta que no se observaran burbujas.

Se realizó una inyección de prueba para observar la adecuabilidad del sistema y se procedió a generar la secuencia de análisis iniciando con un blanco (metanol) y posteriormente 5 inyecciones de estándar y 2 inyecciones de la muestra.

Se realiza este tipo de secuencia para demostrar la aptitud del sistema inyectando 5 réplicas de la solución estándar para obtener un promedio del área, así como un coeficiente de variación menor a 2.0% para considerarse un sistema reproducible y robusto.

Al finalizar las inyecciones de la muestra se inyecta nuevamente la solución estándar, para garantizar que el sistema fue apto durante todo el tiempo de análisis, esta inyección de estándar de cierre se debe considerar para calcular el coeficiente de variación de las áreas.

Una vez concluida la corrida se procedió a lavar la columna con una mezcla de agua y metanol (80:20) para eliminar los restos de muestra que pudieran quedar almacenados en la columna. Una vez concluido el lavado de la columna se procedió a desmontar la columna para lavar el equipo con agua a flujo de trabajo para eliminar los restos de sales que pudieran quedar almacenados en el detector a causa de la fase móvil.

Se revisaron los resultados con los alumnos para identificar el tiempo de corrida del pico correspondiente a acetaminofén y se reportó el resultado como informativo. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios de acuerdo con lo planteado al inicio de la práctica la cual se trató de identificación del principio activo al no poder cuantificar por no contar con un estándar de pureza conocida.

En paralelo a la ejecución de la práctica se elaboró un procedimiento para la correcta operación del equipo, basado en diferentes referencias como capítulos generales de farmacopeas, normas y regulaciones internacionales, se consultó el método general de la FEUM y USP para definir los parámetros que aseguran resultados confiables.

Resultados

Se emitió el procedimiento para la operación, limpieza y mantenimiento del cromatógrafo de líquidos Knauer. Y se llevó a cabo una capacitación en forma de práctica interactiva con los alumnos de 9º trimestre de los trimestres 16-O y 17-I a cargo del profesor IQ. Celerino Muñoz Estrada, por medio de la cual a los alumnos se les explicaron los principios de la cromatografía de líquidos de alta resolución, se explicó la función de cada uno de los componentes del cromatógrafo, así como la obtención y procesamiento de los resultados, posteriormente los alumnos realizaron la preparación de muestras, fase móvil y operación del equipo. Los equipos investigaron en la bibliografía (FEUM) sobre el analito de su interés, de acuerdo al activo utilizado en su forma farmacéutica, utilizando principio activo de grado reactivo como estándar utilizando la misma concentración que la muestra, realizando diluciones hasta llegar a la misma concentración, también se realizó la preparación de la fase móvil utilizando solventes de grado HPLC para proteger los componentes del equipo, la fase móvil se preparó haciendo una mezcla de agua y acetonitrilo (80:20), se filtró y degasificó con el equipo correspondiente, se preparó también la solución de lavado de sellos para lavar el equipo, con una mezcla de acetonitrilo-agua (50:50), se realizó la purga del inyector y de las líneas de solventes para evitar resultados erróneos y para eliminar cualquier burbuja dentro de las mismas, la colocación de la columna en el equipo, indicando cómo se debe atornillar de acuerdo al flujo natural del equipo, del puerto de inyección hacia el detector conforme a la identificación de la columna para evitar dañarla. Una vez montado todo el sistema cromatográfico se procedió a cargar la secuencia para la inyección de las muestras, verificando el correcto llenado de la jeringa, para asegurar que no se inyecte aire al equipo y pueda ocasionar un resultado erróneo, el paso de la palanca de la posición de carga a la posición de inyección, posteriormente se procedió a revisar los cromatogramas y a procesar los datos obtenidos para cuantificar el contenido del activo en la muestra contra una preparación de referencia a la cual se le aplicó el mismo tratamiento que a la muestra. Una vez terminado el análisis se lavó el equipo con un método previamente cargado por los alumnos en el cual se les explicó la importancia de lavar las líneas y el detector para evitar la acumulación de sales, así como el flujo adecuado que se debe colocar para que vaya disminuyendo y así asegurar que el equipo queda limpio para su próximo uso. La documentación generada por los análisis se incluyó en el reporte final del grupo solo como informativo debido a que no se cuantificó la cantidad de principio activo al no tener la pureza del estándar.

Como evidencia se anexa el procedimiento y el diagrama de flujo del proceso al presente reporte, este procedimiento servirá para alargar la vida útil del equipo y de sus componentes y consumibles. También se describe la administración del equipo, proceso de limpieza y mantenimiento con el fin de que cualquier usuario este capacitado para realizar prácticas de identificación y cuantificación de fármacos.

Conclusiones

Durante el proceso de ejecución de la práctica se observan oportunidades de mejora debido a la ausencia de un procedimiento para la correcta operación del equipo, entre ellos el lavado antes y después de la utilización, adicional el cambio de solventes de acuerdo al tipo de fase utilizada para los diversos análisis. Por lo que es importante considerar una capacitación del procedimiento a todos los usuarios que consideren prácticas con este equipo durante los trimestres, para así, alargar la vida útil del equipo como de los consumibles (columna, jeringas, etc.). Es importante también contar con una bitácora donde se registren los mantenimientos programados que aseguren el correcto funcionamiento de todos los componentes del cromatógrafo.

Respecto al análisis realizado, se observa que los alumnos poseen el conocimiento adecuado en el apartado teórico sobre el funcionamiento de la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución, una vez capacitados en el correcto uso del equipo se pueden integrar prácticas de mayor complejidad para la identificación y cuantificación de activos para robustecer los trabajos de investigación.

Bibliografía

- 1.- Procedimiento QU-004 para la calibración de equipos de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Centro Español de Metrología. Edición Digital 1. Pag 17 y 18.
- 2.- Técnicas cromatográficas, Facultad de química, UNAM, diciembre 2007.
- 3.- Dr. Ramkumar Dhandapani, Phenomenex / ¿Qué es la hplc y cómo funciona?, 2017.

- 4.-HPLC instrumental, García de Marina Bayo Adrián, Yusá Marco Dolores Julia, Universitat Politècnica de València.
- 5.-Nomenclatura para cromatografía, L. S. Ettre, IUPAC, 1995
- 6.-Serie Académicos CBS. Cromatografía de gases y de líquidos de alta resolución México 2000. pag. 215-231 255-305
- 7.- Ohmacht R., Halasz /Chromatographia, 1981, v. 14, p. 155-161, p. 216- 226.
- 8.- Engelhardt H., J. Muller/J. Chromatogr, 1981, v. 218, p. 395-407.
- 9.- FEUM 11ª Edición, MGA 0241, Cromatografía, CLAR. 2014
- 10.- Cromatografía de gases y de líquidos de alta resolución: aplicación en el análisis de alimentos / Mario Noa Pérez... [et al.]. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco, 2005
- 11.- Gomis, V (2008). Cromatografía de líquidos de alta resolución. Alicante: Universidad de Alicante. Departamento de Ingeniería Química, Capítulo 4.

Esta página se deja en blanco de manera intencional

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA EL MANEJO DEL CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS KNAUER CHANCE					
Clave: QFB-H-1	Versión: 01	Emisión: 24/ABR/2022	Vigente a partir de: 24/ABR/2022	Próxima revisión: ABR/2025	Sustituye a: Nuevo	Página 16 de 22

1. Objetivo:

Contar con un procedimiento que permita la correcta operación, limpieza, mantenimiento y calificación de los Cromatógrafos de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) Knauer Chance.

2. Alcance

Aplica al Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) Knauer Chance ubicado en el laboratorio G-102 de la universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

3. Política

Cumplir con las buenas prácticas de laboratorio y con la NOM-059-SSA1-2015 en lo que respecta a contar con procedimientos actualizados para el manejo de equipos e instrumentos de laboratorio.

4. Responsabilidades

4.1 Alumnos:

4.1.1 Dar aviso al profesor o coordinador del laboratorio cualquier desperfecto o mal funcionamiento del equipo.

4.1.2 Mantener limpio el equipo, para evitar precipitación de sales que afecten la operación de este.

4.2 Profesor/Laboratorista

4.1.3 Cumplir con lo establecido en este procedimiento
4.2.1 Verificar el cumplimiento de este procedimiento y mantenerlo vigente.

4.2.2 Verificar que los equipos se encuentren en los programas de mantenimiento y calificación correspondientes.

4.3 Coordinación de QFB

4.3.1 Coordinar con el proveedor de servicio los mantenimientos preventivos y/o correctivos, así como las calificaciones.

Elaboró: Armando Sánchez Machuca	Autorizó: QFB. Karina Sánchez Herrera
Fecha:	Fecha:

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA EL MANEJO DEL CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS KNAUER CHANCE					
Clave: QFB-H-1	Versión: 01	Emisión: 24/ABR/2022	Vigente a partir de: 24/ABR/2022	Próxima revisión: ABR/2025	Sustituye a: Nuevo	Página 17 de 22

4.3.2 Asignar un Químico Administrador para los equipos.

5. Definiciones:

5.1 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución: Técnica de separación basada en la interacción de una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. La separación se alcanza por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, dependiendo del tipo de fase estacionaria usada.

5.2 Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución: Es un aparato que consiste en un reservorio que contiene la fase móvil, una bomba que impulsa la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector para introducir la muestra a la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un dispositivo de colecta de datos como computadora o integrador.

5.3 Calificación: Evaluación de las características de los elementos del proceso.

5.4 Mantenimiento Preventivo: Conjunto de acciones que se realizan en los equipos para mantenerlos en óptimas condiciones de uso y así incrementar el tiempo de vida de los mismos.

5.5 Mantenimiento Correctivo: Conjunto de acciones que se realizan en los equipos para corregir algún problema que se haya presentado durante su uso. Este tipo de mantenimiento lo llevará a cabo personal externo.

5.6 HPLC: Cromatógrafo de líquidos de alta resolución, por sus siglas en inglés.

5.7 PDA: Detector de fotodiodos, por sus siglas en inglés.

5.8 CPU: Unidad de procesamiento central, por sus siglas en inglés.

5.9 TUV: Doble ultravioleta, por sus siglas en inglés.

6. Material y equipo

6.1. Material de vidrio perfectamente limpio y seco.

6.2. Microjeringa

6.3. Jeringa para purga

6.4. Filtros de Nylon de 0.45 μm

Elaboró: Armando Sánchez Machuca	Autorizó: QFB. Karina Sánchez Herrera
Fecha:	Fecha:

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA EL MANEJO DEL CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS KNAUER CHANCE					
Clave: QFB-H-1	Versión: 01	Emisión: 24/ABR/2022	Vigente a partir de: 24/ABR/2022	Próxima revisión: ABR/2025	Sustituye a: Nuevo	Página 18 de 22

7. Procedimiento

7.1 Operación del equipo

7.1.1 Descripción del equipo:

- Módulo de Separaciones con inyección manual modelo Azura.
- Detector Ultravioleta/Visible de longitud de onda fija a 296 nm.

7.1.2 Revise que el equipo se encuentre perfectamente conectado antes de prender cada módulo.

7.1.3 Revise que el equipo asignado para el análisis se encuentre limpio, sin escurrimientos de fases, sin desechos en el contenedor, sin residuos en el loop de muestra y con las líneas de uso y lavado en un solvente orgánico vigente.

7.1.4 Preparar las soluciones conforme a la monografía, y verificar que se encuentren libres de partículas extrañas. Lavar la jeringa y enjuagar el loop de inyección.

7.1.5 Prepare una mezcla de agua: (metanol ó acetonitrilo) en la proporción que ha especificado el proveedor Knauer, y/o de acuerdo con lo que señale la metodología analítica, con la finalidad de evitar precipitación de sales y lograr un buen lavado del equipo. Transfírela a un reservorio limpio e introduzca las líneas correspondientes a los reservorios para realizar el lavado de sellos.

7.1.6 Encender el equipo de cromatografía, el CPU y el monitor del equipo y realizar la purga de las líneas para evitar burbujas.

7.1.7 Realizar el lavado del inyector y de la jeringa con soluciones afines y que no interfieran con la fase móvil y el analito como se indica a continuación:

- Abrir el programa Clarity Chrom y dar clic izquierdo en el botón login.
- Abrir la válvula del equipo para liberar la presión y colocar una jeringa sin aguja en la salida de la purga del equipo.
- Desde el software dirigirse al botón de presión y dar clic en el botón purga, y colocar como velocidad de flujo 5 mL/min. El equipo comienza la purga.
- Terminada la purga, cerrar la válvula y retirar la jeringa.

7.1.8 Colocar la fase móvil en la línea adecuada e iniciar con flujo de 0.2 y aumentar lentamente hasta flujo de trabajo (aumentos de flujo de 0.1), dejar acondicionar durante 30 a 45 min o hasta obtener una línea base estable.

Elaboró: Armando Sánchez Machuca	Autorizó: QFB. Karina Sánchez Herrera
Fecha:	Fecha:

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA EL MANEJO DEL CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS KNAUER CHANCE					
Clave: QFB-H-1	Versión: 01	Emisión: 24/ABR/2022	Vigente a partir de: 24/ABR/2022	Próxima revisión: ABR/2025	Sustituye a: Nuevo	Página 19 de 22

7.1.9 En caso de detectar que el equipo presenta una falla o no cumple con lo indicado en los numerales anteriores, repórtelo con el profesor o responsable del laboratorio y registre la falla detectada en la bitácora correspondiente.

7.1.10 **NO** se debe pasar 100% de solvente orgánico al detector, sino almacenar en una proporción de 90:10 de Agua: Acetonitrilo.

7.1.11 Cargar o crear el método a utilizar e inyectar las soluciones de referencia y de la muestra y registrar los cromatogramas después de cada inyección.

7.1.12 Al terminar la secuencia de inyección, utilizar un método de lavado adecuado conforme a la fase móvil utilizada durante el análisis.

7.1.13 Un método de lavado adecuado debe eliminar cualquier traza de analito en la columna y detector, desmontar la columna y almacenar.

7.1.14 Lavar y purgar nuevamente el equipo como se indica en el punto 7.5 en adelante para asegurar que no hay restos de muestra o algún contaminante que pudiera tapar algún componente (loop, tubería, celda de detector, inyector.)

7.1.15 en caso de presión elevada o que se detecte que el equipo se encuentra tapado se puede lavar con una solución de ácido clorhídrico al 10% en agua grado HPLC, sin columna conectada.

7.2 Procesamiento de muestras

7.2.1 Abrir los resultados dentro del software y procesar los picos de valle a valle, calcular el recobro de los dos estándares y la cantidad de analito en la muestra de acuerdo con la formula indicada en la monografía.

7.2.3 Indicar la concentración de los estándares considerando la pureza indicada en la etiqueta.

7.3 Lavado mensual

7.3.1 Realice el lavado mensual del equipo y registrar la actividad en la bitácora de uso.

7.3.2 Conectar la tubería que va a la columna cromatográfica con la tubería de entrada del detector con un volumen muerto verificando que no fugue al momento de pasarle flujo.

7.3.3 Purgar las líneas con agua grado HPLC y lavar el sistema con agua grado HPLC para remover la fase móvil y los restos de solventes, durante 10 minutos a un flujo de 1 mL/min.

Elaboró: Armando Sánchez Machuca	Autorizó: QFB. Karina Sánchez Herrera
Fecha:	Fecha:

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA EL MANEJO DEL CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS KNAUER CHANCE					
Clave: QFB-H-1	Versión: 01	Emisión: 24/ABR/2022	Vigente a partir de: 24/ABR/2022	Próxima revisión: ABR/2025	Sustituye a: Nuevo	Página 20 de 22

7.3.4 A las líneas pasar ácido acético al 10 %a flujo de 1.0 mL/min durante 15 minutos a través del sistema y neutralizar pasando en el sistema agua HPLC el tiempo que sea necesario o con Acetonitrilo: Etanol: Isopropanol y Ácido Fosfórico al 10% con una proporción (25:25:25:25) a un flujo de 1.0 mL/min durante 15 minutos a través del sistema, una vez terminado el tiempo pase en el sistema Agua HPLC a un flujo de 1 mL/min durante 10 minutos.

7.4 Mantenimiento preventivo

7.4.1 El mantenimiento preventivo que se realiza al Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), se lleva a cabo por parte de personal externo calificado dentro de un programa calendarizado cada 12 meses de acuerdo a la recomendación del fabricante.

7.4.2 El proveedor emite un reporte por escrito donde registra el mantenimiento que se dio al equipo y pega etiquetas correspondientes.

7.4.3 Cuando se detecte una falla en cualquiera de los equipos, se debe levantar un reporte de servicio con el proveedor para que se realice un servicio de mantenimiento correctivo.

7.4.4 Estas actividades de mantenimientos preventivos y correctivos deben ser registrados en las bitácoras correspondientes y en las hojas de vida del equipo en servicio.

7.5 Calificación del equipo

7.5.1 La calificación que se realiza a los HPLC, se lleva a cabo por parte del personal externo calificado dentro de un programa calendarizado cada año.

7.5.2 El proveedor emite un reporte por escrito donde registra la calificación realizada al equipo y pega etiquetas correspondientes a cada equipo, además, de registrarse en las bitácoras correspondientes y en las hojas de vida del equipo en servicio.

7.6 Limpiar el exterior del equipo con un trapo humedecido con agua después de cada uso.

7.7 Almacenar la línea de la fase móvil en un envase con agua grado CLAR para evitar que ingrese aire.

7.8 Cerrar el programa y apagar los equipos y el monitor. Registrar el uso en la bitácora correspondiente.

Elaboró: Armando Sánchez Machuca	Autorizó: QFB. Karina Sánchez Herrera
Fecha:	Fecha:

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA EL MANEJO DEL CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS KNAUER CHANCE					
Clave: QFB-H-1	Versión: 01	Emisión: 24/ABR/2022	Vigente a partir de: 24/ABR/2022	Próxima revisión: ABR/2025	Sustituye a: Nuevo	Página 21 de 22

8. Referencias

8.1 NOM-059-SSA1-2015. Buenas Prácticas de Fabricación de Medicamentos.

8.2 Secretaria de salud. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 13ª Edición, "Cromatografía" Pág. 312, 2021.

8.3 USP 43 the United States Pharmacopeia NF 38 the National Formulary USP Convention INC. 2021. Capítulo <621> Chromatography. Pág. 6853.

8.4 Guidance for Industry CFR21, Part 11, Electronic records; Electronic Signatures – Scope and Application, 2003.

8.5 EudraLex. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, Volumen 4, EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Part 1 Chapter 3: Premises and Equipment.

9. Historial de cambios

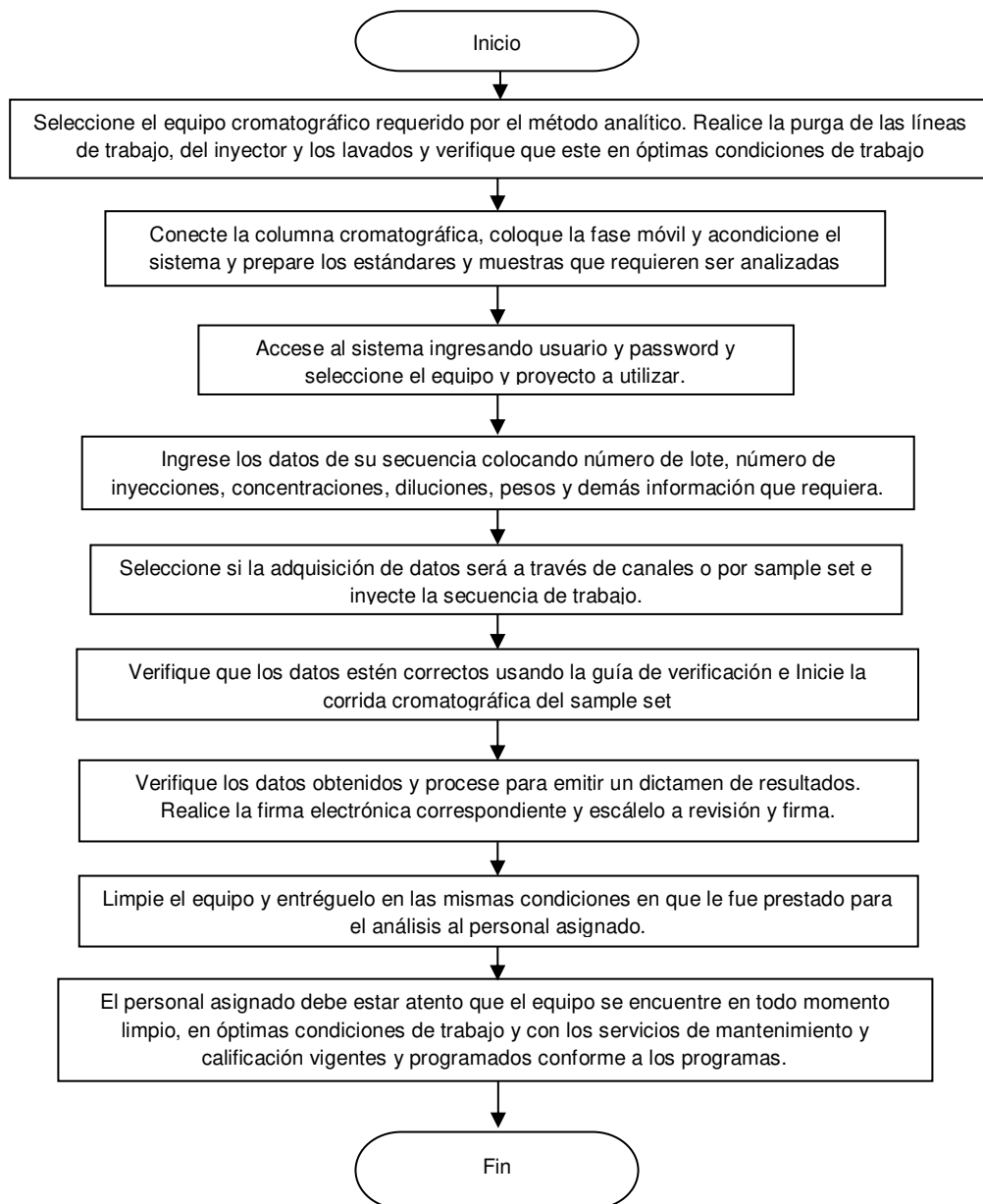
Cambio	Fecha
NUEVO	24/04/22

TERMINA DOCUMENTO

Elaboró: Armando Sánchez Machuca	Autorizó: QFB. Karina Sánchez Herrera
Fecha:	Fecha:

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA EL MANEJO DEL CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS KNAUER CHANCE					
Clave: QFB-H-1	Versión: 01	Emisión: 24/ABR/2022	Vigente a partir de: 24/ABR/2022	Próxima revisión: ABR/2025	Sustituye a: Nuevo	Página 22 de 22

DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO.



Elaboró: Armando Sánchez Machuca	Autorizó: QFB. Karina Sánchez Herrera
Fecha:	Fecha:

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA EL MANEJO DEL CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS KNAUER CHANCE					
Clave: QFB-H-1	Versión: 01	Emisión: 24/ABR/2022	Vigente a partir de: 24/ABR/2022	Próxima revisión: ABR/2025	Sustituye a: Nuevo	Página 16 de 22

1. Objetivo:

Contar con un procedimiento que permita la correcta operación, limpieza, mantenimiento y calificación de los Cromatógrafos de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) Knauer Chance.

2. Alcance

Aplica al Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) Knauer Chance ubicado en el laboratorio G-102 de la universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

3. Política

Cumplir con las buenas prácticas de laboratorio y con la NOM-059-SSA1-2015 en lo que respecta a contar con procedimientos actualizados para el manejo de equipos e instrumentos de laboratorio.

4. Responsabilidades

4.1 Alumnos:

4.1.1 Dar aviso al profesor o coordinador del laboratorio cualquier desperfecto o mal funcionamiento del equipo.

4.1.2 Mantener limpio el equipo, para evitar precipitación de sales que afecten la operación de este.

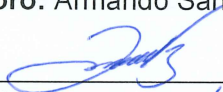
4.2 Profesor/Laboratorista

4.1.3 Cumplir con lo establecido en este procedimiento
4.2.1 Verificar el cumplimiento de este procedimiento y mantenerlo vigente.

4.2.2 Verificar que los equipos se encuentren en los programas de mantenimiento y calificación correspondientes.

4.3 Coordinación de QFB

4.3.1 Coordinar con el proveedor de servicio los mantenimientos preventivos y/o correctivos, así como las calificaciones.

Elaboró: Armando Sánchez Machuca 	Autorizó: QFB. Karina Sánchez Herrera 
Fecha: 16/11/2022	Fecha: 16- Agosto-22

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA EL MANEJO DEL CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS KNAUER CHANCE					
Clave: QFB-H-1	Versión: 01	Emisión: 24/ABR/2022	Vigente a partir de: 24/ABR/2022	Próxima revisión: ABR/2025	Sustituye a: Nuevo	Página 17 de 22

4.3.2 Asignar un Químico Administrador para los equipos.

5. Definiciones:

5.1 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución: Técnica de separación basada en la interacción de una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. La separación se alcanza por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, dependiendo del tipo de fase estacionaria usada.

5.2 Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución: Es un aparato que consiste en un reservorio que contiene la fase móvil, una bomba que impulsa la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector para introducir la muestra a la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un dispositivo de colecta de datos como computadora o integrador.

5.3 Calificación: Evaluación de las características de los elementos del proceso.

5.4 Mantenimiento Preventivo: Conjunto de acciones que se realizan en los equipos para mantenerlos en óptimas condiciones de uso y así incrementar el tiempo de vida de los mismos.

5.5 Mantenimiento Correctivo: Conjunto de acciones que se realizan en los equipos para corregir algún problema que se haya presentado durante su uso. Este tipo de mantenimiento lo llevará a cabo personal externo.

5.6 HPLC: Cromatógrafo de líquidos de alta resolución, por sus siglas en inglés.

5.7 PDA: Detector de fotodiodos, por sus siglas en inglés.

5.8 CPU: Unidad de procesamiento central, por sus siglas en inglés.

5.9 TUV: Doble ultravioleta, por sus siglas en inglés.

6. Material y equipo

- 6.1. Material de vidrio perfectamente limpio y seco.
- 6.2. Microjeringa
- 6.3. Jeringa para purga
- 6.4. Filtros de Nylon de 0.45 μ m

Elaboró: Armando Sánchez Machuca	Autorizó: QFB. Karina Sánchez Herrera
Fecha: 16/AGO/22	Fecha: 16-Agosto-22

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA EL MANEJO DEL CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS KNAUER CHANCE					
Clave: QFB-H-1	Versión: 01	Emisión: 24/ABR/2022	Vigente a partir de: 24/ABR/2022	Próxima revisión: ABR/2025	Sustituye a: Nuevo	Página 18 de 22

7. Procedimiento

7.1 Operación del equipo

7.1.1 Descripción del equipo:

- Módulo de Separaciones con inyección manual modelo Azura.
- Detector Ultravioleta/Visible de longitud de onda fija a 296 nm.

7.1.2 Revise que el equipo se encuentre perfectamente conectado antes de prender cada módulo.

7.1.3 Revise que el equipo asignado para el análisis se encuentre limpio, sin escurrimientos de fases, sin desechos en el contenedor, sin residuos en el loop de muestra y con las líneas de uso y lavado en un solvente orgánico vigente.

7.1.4 Preparar las soluciones conforme a la monografía, y verificar que se encuentren libres de partículas extrañas. Lavar la jeringa y enjuagar el loop de inyección.

7.1.5 Prepare una mezcla de agua: (metanol ó acetonitrilo) en la proporción que ha especificado el proveedor Knauer, y/o de acuerdo con lo que señale la metodología analítica, con la finalidad de evitar precipitación de sales y lograr un buen lavado del equipo. Transfírela a un reservorio limpio e introduzca las líneas correspondientes a los reservorios para realizar el lavado de sellos.

7.1.6 Encender el equipo de cromatografía, el CPU y el monitor del equipo y realizar la purga de las líneas para evitar burbujas.

7.1.7 Realizar el lavado del inyector y de la jeringa con soluciones afines y que no interfieran con la fase móvil y el analito como se indica a continuación:

- Abrir el programa Clarity Chrom y dar clic izquierdo en el botón login.
- Abrir la válvula del equipo para liberar la presión y colocar una jeringa sin aguja en la salida de la purga del equipo.
- Desde el software dirigirse al botón de presión y dar clic en el botón purga, y colocar como velocidad de flujo 5 mL/min. El equipo comienza la purga.
- Terminada la purga, cerrar la válvula y retirar la jeringa.

7.1.8 Colocar la fase móvil en la línea adecuada e iniciar con flujo de 0.2 y aumentar lentamente hasta flujo de trabajo (aumentos de flujo de 0.1), dejar acondicionar durante 30 a 45 min o hasta obtener una línea base estable.

Elaboró: Armando Sánchez Machuca 	Autorizó: QFB. Karina Sánchez Herrera 
Fecha: 16/11/01/22	Fecha: 16-Agosto-22

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA EL MANEJO DEL CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS KNAUER CHANCE					
Clave: QFB-H-1	Versión: 01	Emisión: 24/ABR/2022	Vigente a partir de: 24/ABR/2022	Próxima revisión: ABR/2025	Sustituye a: Nuevo	Página 19 de 22

7.1.9 En caso de detectar que el equipo presenta una falla o no cumple con lo indicado en los numerales anteriores, repórtelo con el profesor o responsable del laboratorio y registre la falla detectada en la bitácora correspondiente.

7.1.10 **NO** se debe pasar 100% de solvente orgánico al detector, sino almacenar en una proporción de 90:10 de Agua: Acetonitrilo.

7.1.11 Cargar o crear el método a utilizar e inyectar las soluciones de referencia y de la muestra y registrar los cromatogramas después de cada inyección.

7.1.12 Al terminar la secuencia de inyección, utilizar un método de lavado adecuado conforme a la fase móvil utilizada durante el análisis.

7.1.13 Un método de lavado adecuado debe eliminar cualquier traza de analito en la columna y detector, desmontar la columna y almacenar.

7.1.14 Lavar y purgar nuevamente el equipo como se indica en el punto 7.5 en adelante para asegurar que no hay restos de muestra o algún contaminante que pudiera tapar algún componente (loop, tubería, celda de detector, inyector.)

7.1.15 en caso de presión elevada o que se detecte que el equipo se encuentra tapado se puede lavar con una solución de ácido clorhídrico al 10% en agua grado HPLC, sin columna conectada.

7.2 Procesamiento de muestras

7.2.1 Abrir los resultados dentro del software y procesar los picos de valle a valle, calcular el recobro de los dos estándares y la cantidad de analito en la muestra de acuerdo con la formula indicada en la monografía.

7.2.3 Indicar la concentración de los estándares considerando la pureza indicada en la etiqueta.

7.3 Lavado mensual

7.3.1 Realice el lavado mensual del equipo y registrar la actividad en la bitácora de uso.

7.3.2 Conectar la tubería que va a la columna cromatográfica con la tubería de entrada del detector con un volumen muerto verificando que no fugue al momento de pasarle flujo.

7.3.3 Purgar las líneas con agua grado HPLC y lavar el sistema con agua grado HPLC para remover la fase móvil y los restos de solventes, durante 10 minutos a un flujo de 1 mL/min.

Elaboró: Armando Sánchez Machuca 	Autorizó: QFB. Karina Sánchez Herrera 
Fecha: 16/Agosto/22	Fecha: 16-Agosto-22

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA EL MANEJO DEL CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS KNAUER CHANCE					
Clave: QFB-H-1	Versión: 01	Emisión: 24/ABR/2022	Vigente a partir de: 24/ABR/2022	Próxima revisión: ABR/2025	Sustituye a: Nuevo	Página 20 de 22

7.3.4 A las líneas pasar ácido acético al 10 %a flujo de 1.0 mL/min durante 15 minutos a través del sistema y neutralizar pasando en el sistema agua HPLC el tiempo que sea necesario o con Acetonitrilo: Etanol: Isopropanol y Ácido Fosfórico al 10% con una proporción (25:25:25:25) a un flujo de 1.0 mL/min durante 15 minutos a través del sistema, una vez terminado el tiempo pase en el sistema Agua HPLC a un flujo de 1 mL/min durante 10 minutos.

7.4 Mantenimiento preventivo

7.4.1 El mantenimiento preventivo que se realiza al Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), se lleva a cabo por parte de personal externo calificado dentro de un programa calendarizado cada 12 meses de acuerdo a la recomendación del fabricante.

7.4.2 El proveedor emite un reporte por escrito donde registra el mantenimiento que se dio al equipo y pega etiquetas correspondientes.

7.4.3 Cuando se detecte una falla en cualquiera de los equipos, se debe levantar un reporte de servicio con el proveedor para que se realice un servicio de mantenimiento correctivo.

7.4.4 Estas actividades de mantenimientos preventivos y correctivos deben ser registrados en las bitácoras correspondientes y en las hojas de vida del equipo en servicio.

7.5 Calificación del equipo

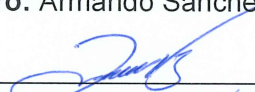
7.5.1 La calificación que se realiza a los HPLC, se lleva a cabo por parte del personal externo calificado dentro de un programa calendarizado cada año.

7.5.2 El proveedor emite un reporte por escrito donde registra la calificación realizada al equipo y pega etiquetas correspondientes a cada equipo, además, de registrarse en las bitácoras correspondientes y en las hojas de vida del equipo en servicio.

7.6 Limpiar el exterior del equipo con un trapo humedecido con agua después de cada uso.

7.7 Almacenar la línea de la fase móvil en un envase con agua grado CLAR para evitar que ingrese aire.

7.8 Cerrar el programa y apagar los equipos y el monitor. Registrar el uso en la bitácora correspondiente.

Elaboró: Armando Sánchez Machuca 	Autorizó: QFB. Karina Sánchez Herrera 
Fecha: 16/AGO/22	Fecha: 16-Agosto-22

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA EL MANEJO DEL CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS KNAUER CHANCE					
Clave: QFB-H-1	Versión: 01	Emisión: 24/ABR/2022	Vigente a partir de: 24/ABR/2022	Próxima revisión: ABR/2025	Sustituye a: Nuevo	Página 21 de 22

8. Referencias

8.1 NOM-059-SSA1-2015. Buenas Prácticas de Fabricación de Medicamentos.

8.2 Secretaria de salud. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 13ª Edición, "Cromatografía" Pág. 312, 2021.

8.3 USP 43 the United States Pharmacopeia NF 38 the National Formulary USP Convention INC. 2021. Capítulo <621> Chromatography. Pág. 6853.

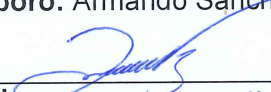
8.4 Guidance for Industry CFR21, Part 11, Electronic records; Electronic Signatures – Scope and Application, 2003.

8.5 EudraLex. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, Volumen 4, EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Part 1 Chapter 3: Premises and Equipment.

9. Historial de cambios

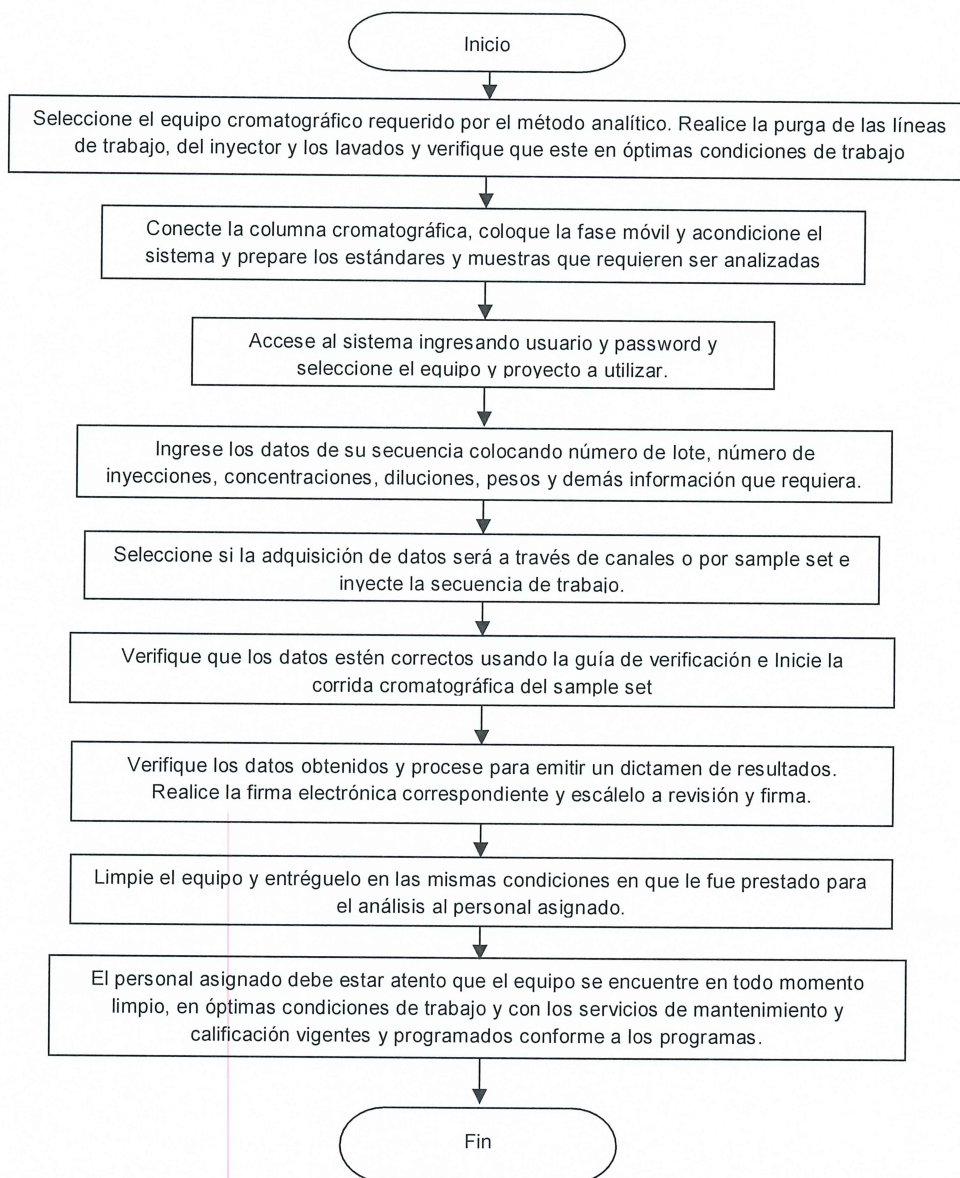
Cambio	Fecha
NUEVO	24/04/22

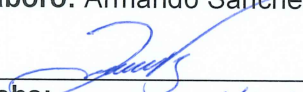
TERMINA DOCUMENTO

Elaboró: Armando Sánchez Machuca 	Autorizó: QFB. Karina Sánchez Herrera 
Fecha: 16/AGO/22	Fecha: 16-Agosto-22

	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA EL MANEJO DEL CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS KNAUER CHANCE					
Clave: QFB-H-1	Versión: 01	Emisión: 24/ABR/2022	Vigente a partir de: 24/ABR/2022	Próxima revisión: ABR/2025	Sustituye a: Nuevo	Página 22 de 22

DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO.



Elaboró: Armando Sánchez Machuca 	Autorizó: QFB. Karina Sánchez Herrera 
Fecha: 16/16/01/22	Fecha: 16-Agosto-22

