

Curso de cromatografía de  
líquidos empleando software  
interactivo

**PARTE B**

Dr. Juan Carlos Vázquez Lira

Julio 2023

# Bases del desarrollo de métodos cromatográficos

# Modalidades en CL

## Cromatografía de interacción hidrofóbica

- **Principio:** técnicas adsortivas que se basan en interacción de tipo hidrofóbica entre la matriz y las proteínas
- **Grupos hidrofóbicos unidos a la matriz de sílica:**
  - Butilo (Butil Sepharose 4 FF)
  - Octilo (Octil Sepharose CL-4B)
  - Fenilo (Phenyl Superose)

# Modalidades en CL

## Cromatografía de interacción hidrofóbica

- **Ventajas:**

- Alta capacidad
- Alta resolución
- Al ser de naturaleza adsorptiva se logra concentrar la muestra.

- **Desventajas:**

- La alta fuerza iónica necesaria para el pegado puede desnaturalizar el Ac , enzimas entre otras.
- No recomendada cuando se quiere conservar actividad biológica

# Modalidades en CL

## Cromatografía de interacción hidrofóbica

Elución:

- Decrece con la fuerza iónica. (sulfato de amonio)
- Decrece con la polaridad de la fase móvil (glicoles)
- Utilización de agentes caotrópicos (sales , uea)
- Utilización de detergentes.
- Separación de pequeños péptidos

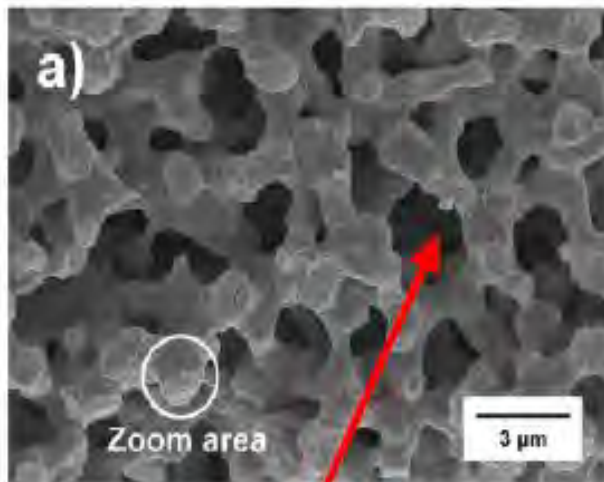
<b>Condición</b>	<b>CIH</b>	<b>CFR</b>
<b>Fase móvil</b>	<b>Polar</b>	<b>No polar</b>
<b>Condiciones</b>	<b>Suaves</b>	<b>Desnaturalizantes</b>
<b>Discriminación de solutos</b>	<b>Residuos superficiales</b>	<b>Residuos totales</b>

# Modalidades en CL

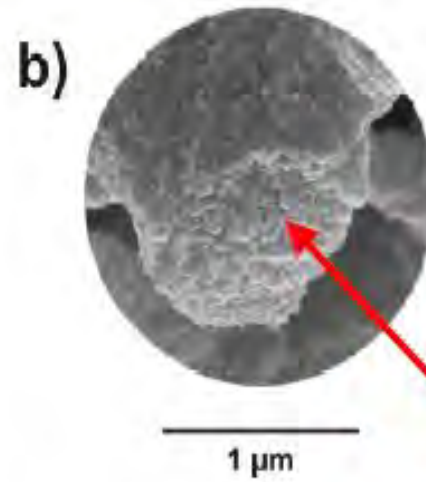
## Cromatografía de exclusión

### GEL :

entramado polimérico insoluble  
con porosidad de tamaño uniforme  
sin interacción fisicoquímica con los  
componentes de la muestra.



Macroporos



Mesoporos

# Modalidades en CL

## Cromatografía de exclusión

### RELLENOS :

#### TRADICIONALES:

Polidextrano (glucosa)

Celulosas

Agarosa

Acrilamida

Son sólo semirígidos y compactables, no útiles a alta presión.

Hasta 3000 psi se puede usar PS/DVB

#### RÍGIDOS :

Mejor empacado

Compatibles con más fases móviles acuosas y orgánicas

Más rápido equilibrio al cambiar de fase móvil

Termoestables

Presurizables

#### TIPOS:

Sílica enlazada con éteres o glicoles

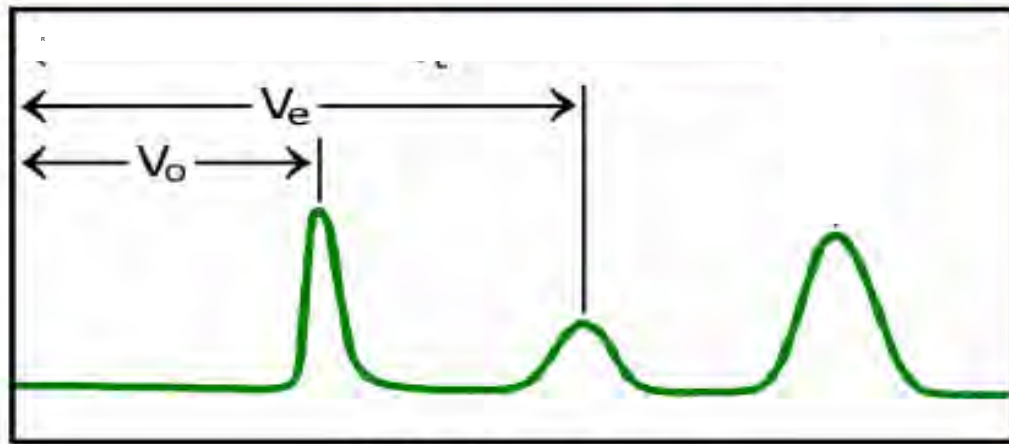
Sílica sin enlazar hidrofílica, porosa y desactivada con agua

<b>Sephadex</b>	
<b>Code</b>	<b>Range (kDa)</b>
<b>G-25</b>	<b>1-5</b>
<b>G-50</b>	<b>2-30</b>
<b>G-100</b>	<b>4-150</b>
<b>G-150</b>	<b>5-300</b>
<b>G-200</b>	<b>5-600</b>

# Modalidades en CL

## Cromatografía de exclusión

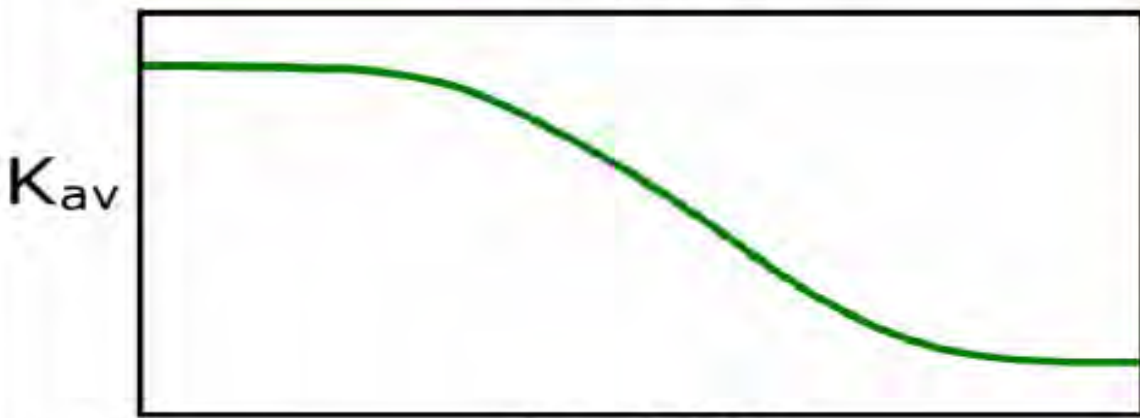
$V_0$  se determina con azul de dextrano  $V_t = \pi r^2 L$



Volume

$V_0$  = void volume  
 $V_t$  = total volume  
 $V_e$  = elution volume

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$



$\log MW$

- use size standards
- (relative MW)
- migration also affected by shape



# Modalidades en CL

## Cromatografía de exclusión

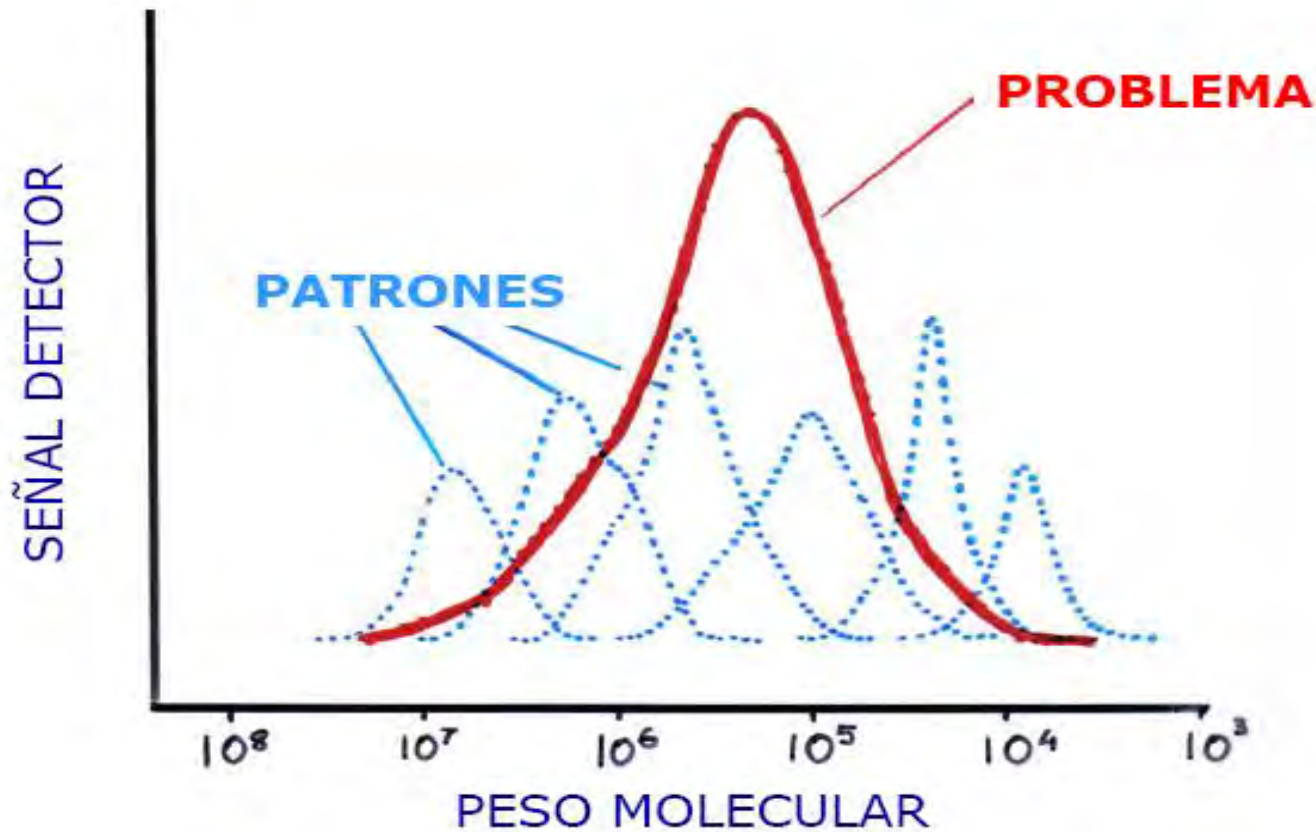
### **FASES MÓVILES :**

- Sin contribución a la separación
- Buen disolvente de la muestra completa
- Compatibilidad con el relleno
- Baja viscosidad
- Acuósas (pH: 2.5-7.5 con sílica)
- Orgánicas y mezclas
- Ejemplos: THF, cloruro de metileno, tetracloruro de carbono, DMF, agua, tolueno, cloroformo...

# Modalidades en CL

## Cromatografía de exclusión

CALIBRADO DE UNA COLUMNA EN PERMEABILIDAD SOBRE GEL



Detector de Índice de Refracción.

# Modalidades en CL

## Cromatografía de exclusión

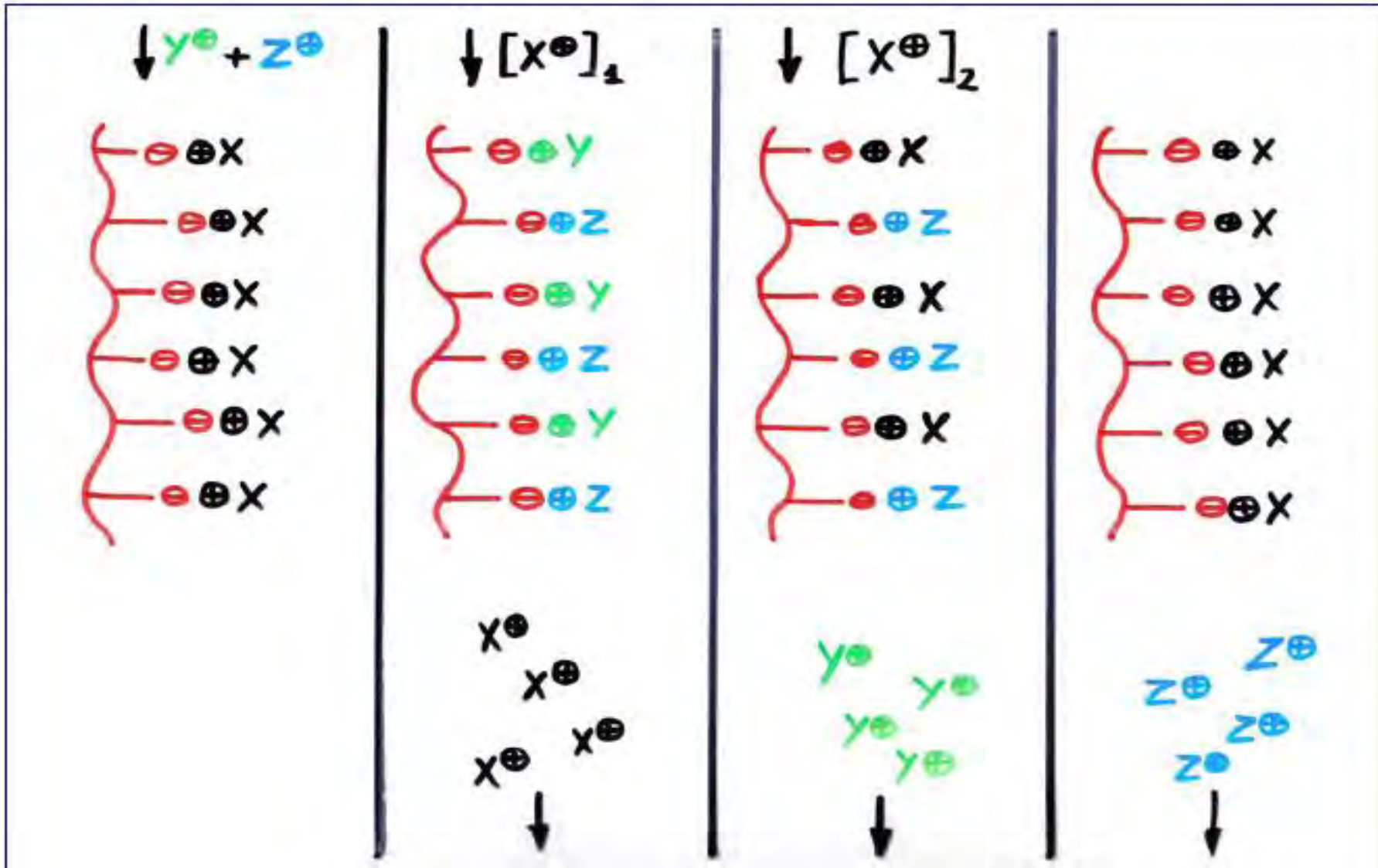
- La enzima pepsina y grupo de marcadores fueron eluidos de una columna de sephadex. Los volúmenes de elución junto con los marcadores moleculares son los siguientes. Determina el peso molecular de la pepsina  $V_0 = 20$  mL, columna 10x 450 mm

Proteína	VOLUMEN ELUCIÓN ml	PESO MOLECULAR
Albúmina	107	66000
Ovoalbumina	121	45000
Chimiotripsinogeno	139	23000
Mioglobina	150	17000
Citocromo C	158	13000
Pepsina	127	?

# Modalidades en CL

## Cromatografía de Intercambio iónico

### FUNDAMENTO QUÍMICO DEL INTERCAMBIO IÓNICO

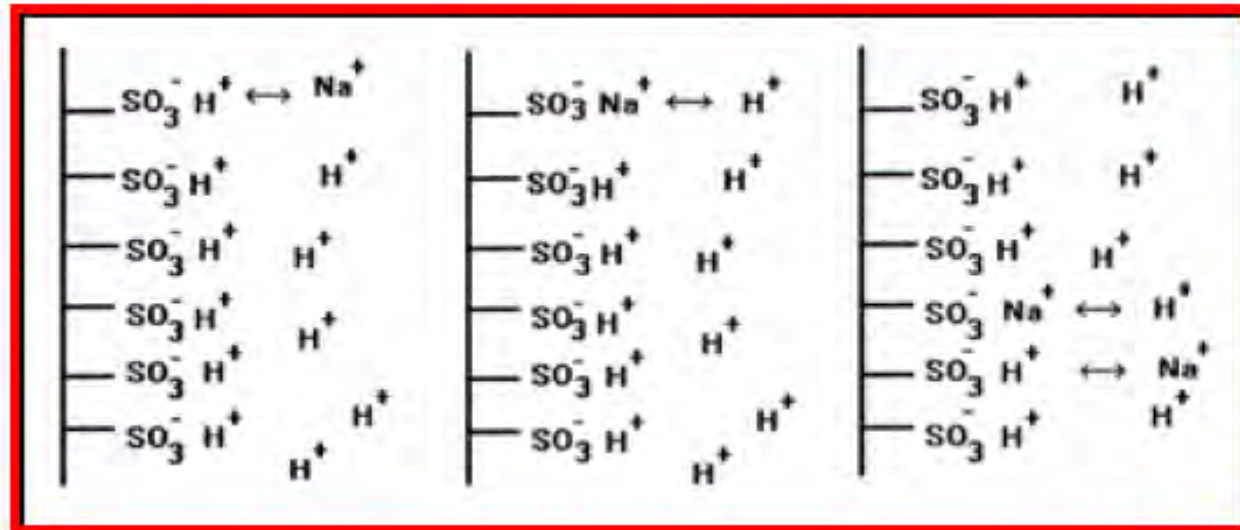


# Modalidades en CL

## Cromatografía de Intercambio iónico

### Mecanismo

Los iones de las sustancias de la mezcla desplazan a los contraiones de la columna. A su vez, ellos compiten con los iones de la FM por los sitios activos



$$k = \frac{[\text{H}^+]^n [\text{B}^{n+}]_{re}}{[\text{H}^+]_{re}^n [\text{B}^{n+}]}$$

$$k = \frac{[\text{H}^+]^n}{[\text{H}^+]_{re}^n} K$$

Donde: K es la cte de distribución y k la de equilibrio

# Modalidades en CL

## Cromatografía de Intercambio iónico

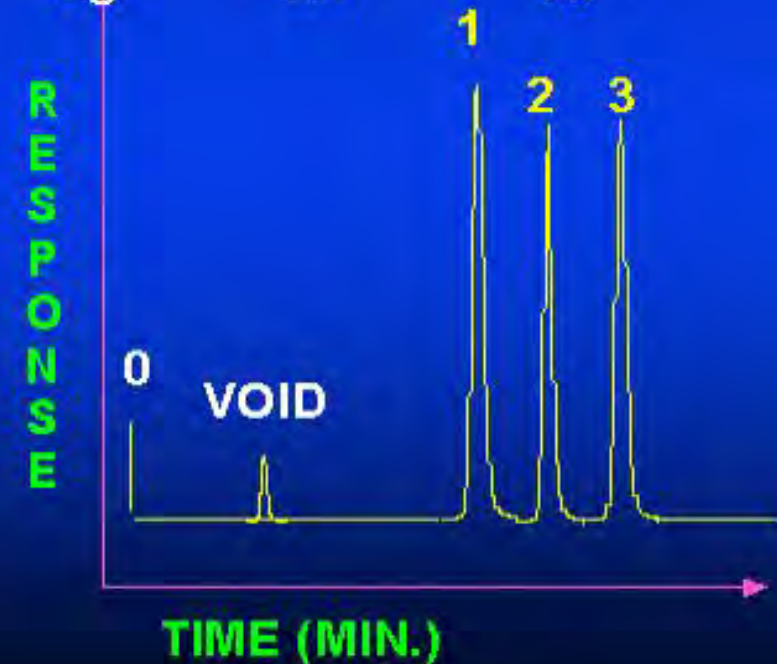
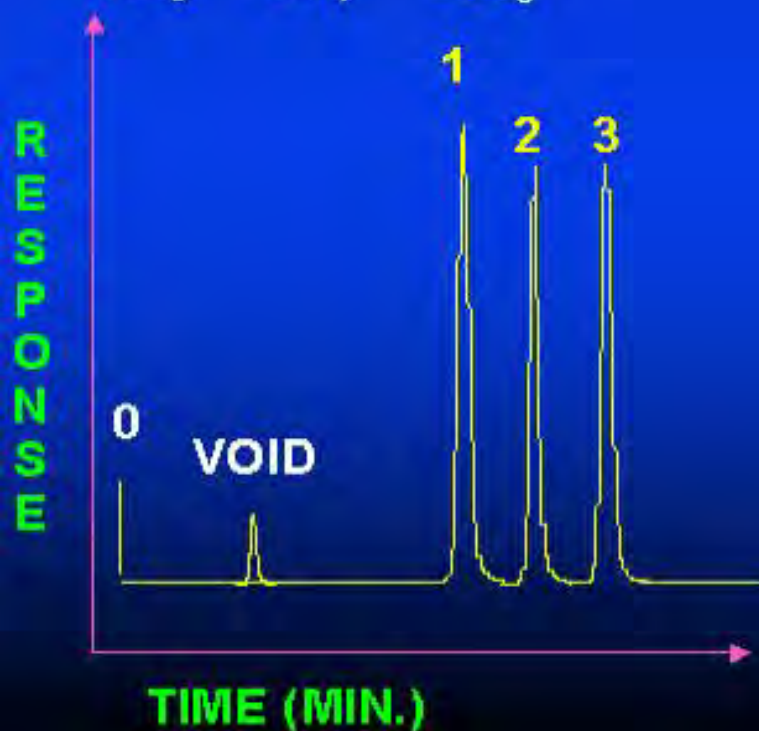
Intercambio aniónico

Intercambio catiónico

1	2	3
OAc <sup>-</sup>	OH <sup>-</sup>	F <sup>-</sup>
1	2	3
Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
1	2	3
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>

DENSITY OF CHARGE

1	2	3
K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Li <sup>+</sup>
1	2	3
Ag <sup>+</sup>	Zn <sup>++</sup>	Al <sup>+++</sup>



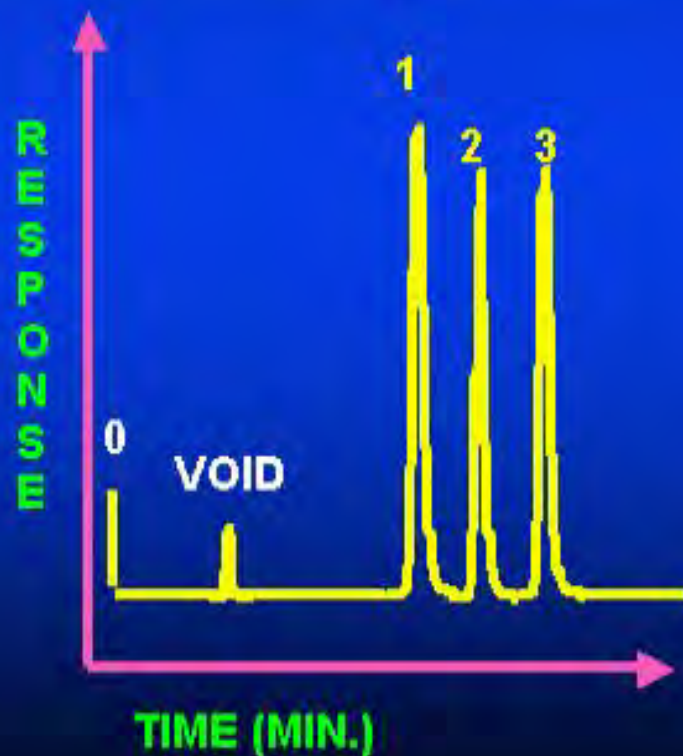
# Modalidades en CL

## Cromatografía de Intercambio iónico

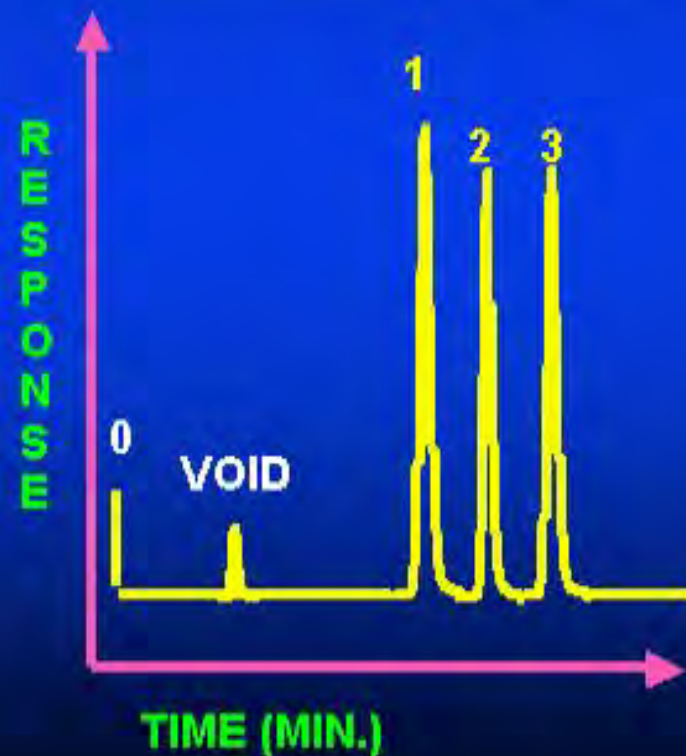
Intercambio aniónico

Intercambio catiónico

STRONGER ACID



STRONGER BASE

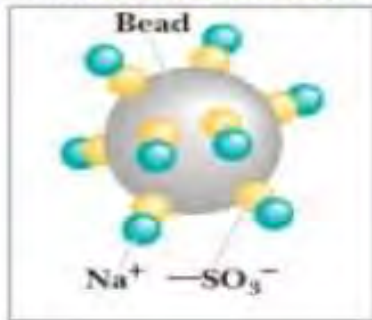


# Modalidades en CL

## Cromatografía de Intercambio iónico

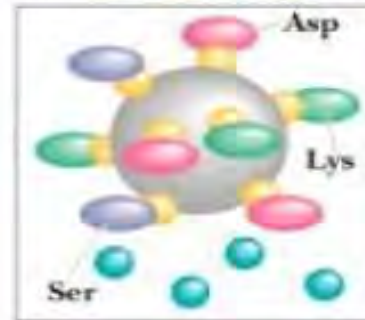
Una vez terminada la separación es necesario regenerar la resina para volverla a su estado original y poder utilizarla en una nueva separación

Resina de Intercambio Catiónico antes de añadir la muestra



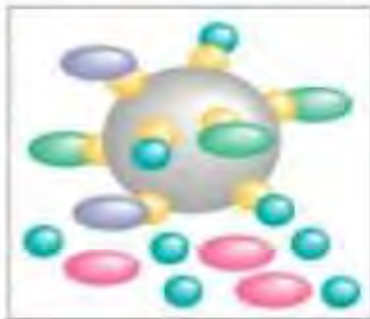
(a)

Se añade la muestra, una mezcla de Asp, Ser y Lys



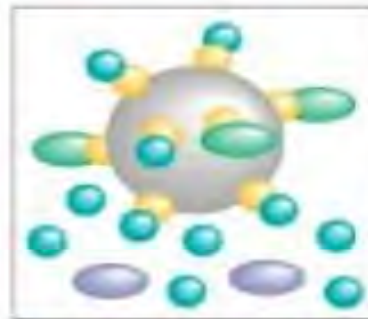
(b)

Se añade  $\text{Na}^+$  ( $\text{NaCl}$ )



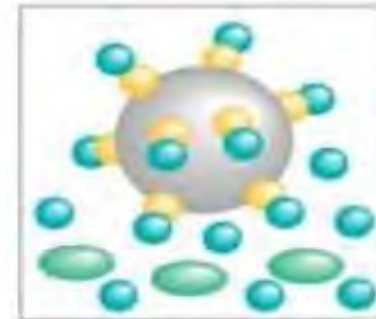
(c) La Asp, el aminoácido con menos carga positiva, eluye el primero

Se aumenta el  $[\text{Na}^+]$



(d) A continuación eluye la Ser

Se aumenta el  $[\text{Na}^+]$



(e) La Lys, el que posee mas carga positiva eluye el último



# Modalidades en CL

## Cromatografía de Intercambio iónico

### **FASES ESTACIONARIAS :**

- 1.** Fases iónicas enlazadas químicamente sobre sílice:  
Silice—conexión—grupo iónico activo (variable).
- 2.** Poliestireno/divinilbenceno con funcionalización posterior.
- 3.** PS/DVB sulfonada con micropartículas de resina intercambiadora de aniones fijadas en la superficie por diferencia eléctrica.
- 4.** Resinas fenólicas ya con el reactivo funcionalizado.
- 5.** Fases ligadas complejantes para iones metálicos.

# Modalidades en CL

## Cromatografía de Intercambio iónico

### **FASES MÓVILES :**

#### CARACTERÍSTICAS DE SU MISIÓN :

- Solubilizar sales, reguladores de pH y muestra
- Controlar la retención de la muestra
- Proporcionar selectividad a la separación

#### COMPOSICIÓN :

- Acuosa
- Salina para ajustar la fuerza iónica
- Regulación del pH
- Disolvente orgánico miscible para facilitar la solubilización

#### EFFECTO DEL pH:

- Aquí es variable cromatográfica
- Prever corrosión del equipo (piezas de teflón)
- Deterioro de rellenos silíceos
- Resistencia superior de matrices orgánicas.

Detectores: Conductividad y electroquímicos (Amperométrico, coulombimétrico, potenciométrico).

# Modalidades en CL

- **Pares de iones:** Especialidad de CFR. Fase móvil Agua:Metanol o Agua:Acetonitrilo en la que se disuelven sales y un ión de carga contraria a la de los solutos (orgánico o inorgánico)
- **Intercambio iónico:** Separación de solutos por carga empleando fases intercambiadoras de iones.
- **Cromatografía de iones:** Es un método para separar iones disueltos por intercambio iónico con el empleo de fases poliméricas neutras. Estas resinas de 10  $\mu\text{m}$  se sulfonan o aminan, luego se introduce en un lecho de esferas poliméricas cargadas de 100-300  $\mu\text{m}$  que se unen electrostáticamente sobre la superficie del núcleo polimérico inicial.
  - Generalmente se emplea una columna separadora y otra supresora.
  - **Eluyentes aniónicos** (salicilato, borato cianofenato, bicarbonato glicina tirosina), arriba de pH 8 aniones pH entre 5-8 neutros
  - **Eluyentes catiónicos** ( HCl histidina-HCl, hidroxilamina-HC, lisina-HCl, Trietanolamina-HCl,  $\text{HNO}_3$  Debajo de pH 5: cationes y entre pH 5-9 neutros

# Intercambio iónico

- El uso de detectores de conductividad tienen el inconveniente de que requieren una elevada concentración de electrolito en la FM para eluir el analito.

La conductividad de la FM enmascara a la de los analitos

-Solución: COLUMNAS SUPRESORAS

Inmediatamente después de la columna analítica.

-Relleno de resina de intercambio iónico que convierte los iones del disolvente (FM) en especies moleculares poco ionizadas

# VARIABLES Y EFECTOS EN CII

<b>Variable</b>	<b>Efecto</b>
pH	La retención depende del pKa del soluto. Permite variar tanto la fuerza como la selectividad
Fuerza iónica	A mayor fuerza iónica, mayor fuerza de elución (menor tiempo de retención). Escasa participación sobre la selectividad.
Contraión	A mayor valencia, mayor influencia (en proporción directa) sobre la fuerza iónica. El tipo de contraión (incluso a igual valencia) determina la fuerza de elución
Modificador Orgánico	A mayor proporción de modificador (MeOH, AcN), menor retención. Efecto sobre fuerza y selectividad.
Temperatura	A mayor temperatura, mayor eficiencia y menor retención.
Capacidad de Intercambio de la partícula	A mayor capacidad, mayor retención. Mayor capacidad requiere mayor fuerza iónica de la fase móvil

# Cromatografía de intercambio iónico de columna única

Empleo de fase móvil a baja fuerza iónica 0.1-100 mM

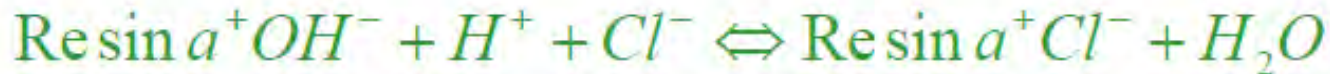
Columna intercambiadora débil 0.005-0.1 mEq/g

<b>Fase móvil</b>	<b>Concentración</b>	<b>pH</b>	<b>Detección</b>
<b>Biftalato de Potasio</b>	<b>0.5-10 mM</b>	<b>1-6.2</b>	<b>Conductividad UV indirecto, 280 nm</b>
<b>Benzoato de Sodio</b>	<b>0.1-5 mM</b>	<b>3.2-5.2</b>	<b>Conductividad UV indirecto, 280 nm</b>
<b>Ac. p-hidro-xibenzoico</b>	<b>3-10 mM</b>	<b>3.5-5.5 8.3-10.3</b>	<b>Conductividad UV indirecto, 370 nm</b>
<b>Fenolato de Sodio</b>	<b>1-100 mM</b>	<b>9-11</b>	<b>Conductividad</b>
<b>Hidróxido de potasio</b>	<b>3-100 mM</b>	<b>11-13</b>	<b>Conductividad</b>

Aditivos empleados en CII de columna simple

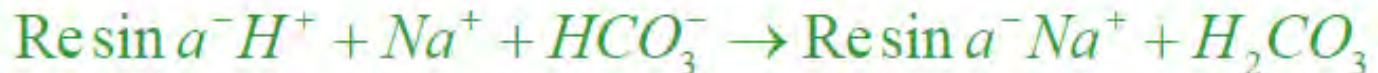
## Supresión de iones

Ej.:a) En una separación de cationes, si se ha utilizado HCl como eluyente, a continuación se pone una columna supresora aniónica en forma hidroxido:



Se eliminan los aniones del medio pero no afecta a los cationes de la muestra a analizar

b) En las separaciones de aniones suele utilizarse el bicarbonato sódico como eluyente, y en este caso se utiliza como columna supresora una columna en forma catiónica, donde se da:

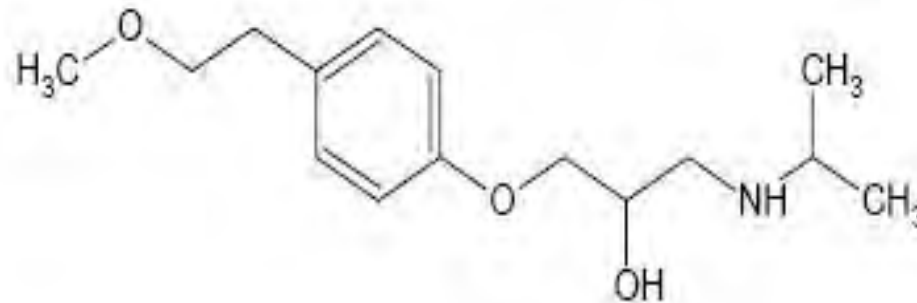


El ácido carbónico se disocia poco y apenas contribuye al transporte de carga

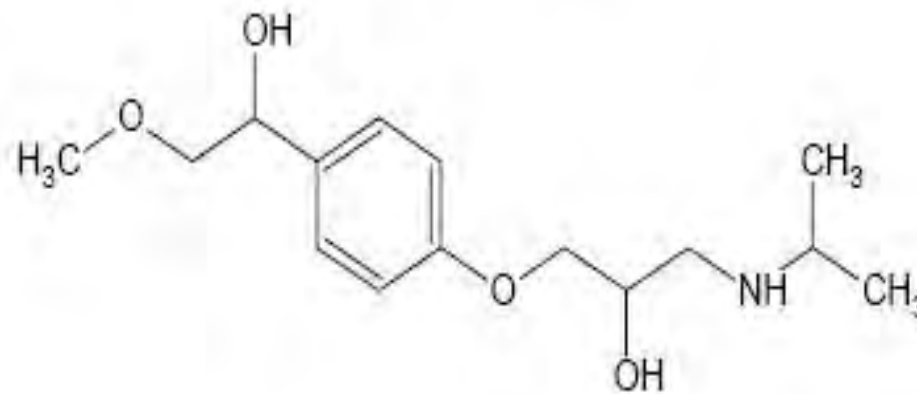
Esto permite utilizar un detector conductimétrico.

# CLAR FORMACIÓN DE PARES IÓNICOS

## Comparación de una separación



Metoprolol (MP)



Hydroxymetoprolol (HM)



# CLAR FORMACIÓN DE PARES IÓNICOS

## Par iónico

- Columna Discovery C-18 4.6 x 250 mm 5  $\mu$ m
- Velocidad de flujo 1 mL/min
- Temperatura 35°C
- Volumen de inyección 10  $\mu$ L
- Muestra 200  $\mu$ g/mL
- Detección UV 254 nm
- Fase móvil (USP): Disolver 961 mg de la sal sódica del ácido 1-pentanosulfónico (monohidratado) y agregar 82 mg de acetato de sodio anhidro a una mezcla de 550 mL de metanol y 470 mL de agua que contiene 0.57 mL de ácido acético glacial

# CLAR FORMACIÓN DE PARES IÓNICOS

## Alto pH

- Columna Discovery Zr- PBD 4.6 x 150 mm 5  $\mu$ m
- Fase móvil 80:20 agua:amortiguador de fosfatos pH 12:AcN
- Velocidad de flujo 1 mL/min
- Temperatura 35°C
- Volumen de inyección 10  $\mu$ L
- Muestra 200  $\mu$ g/ml
- Detección UV 254 nm

## Fase reversa polar

- Columna: Discovery HS-F5 4.6 x 150 mm 5  $\mu$ m
- Fase móvil: Acetato de amonio 5 mM en agua:AcN 10:90
- Velocidad de flujo: 1 mL/min
- Temperatura 35 °C
- Volumen de inyección 10  $\mu$ L
- Muestra 200  $\mu$ g/ml
- Detección UV 254 nm

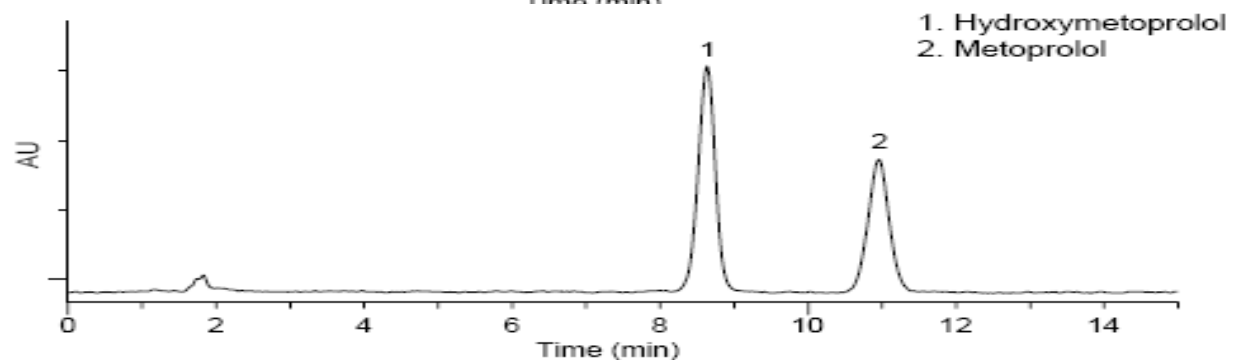
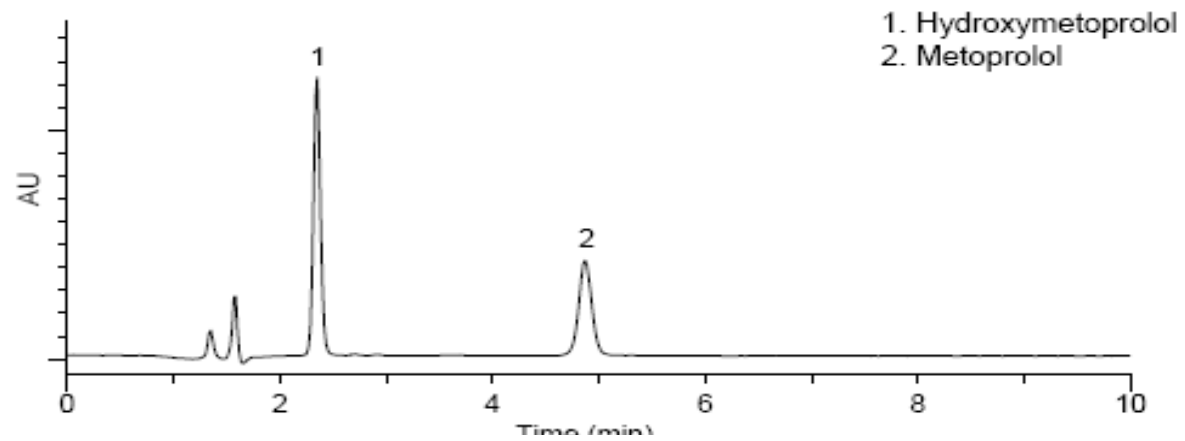
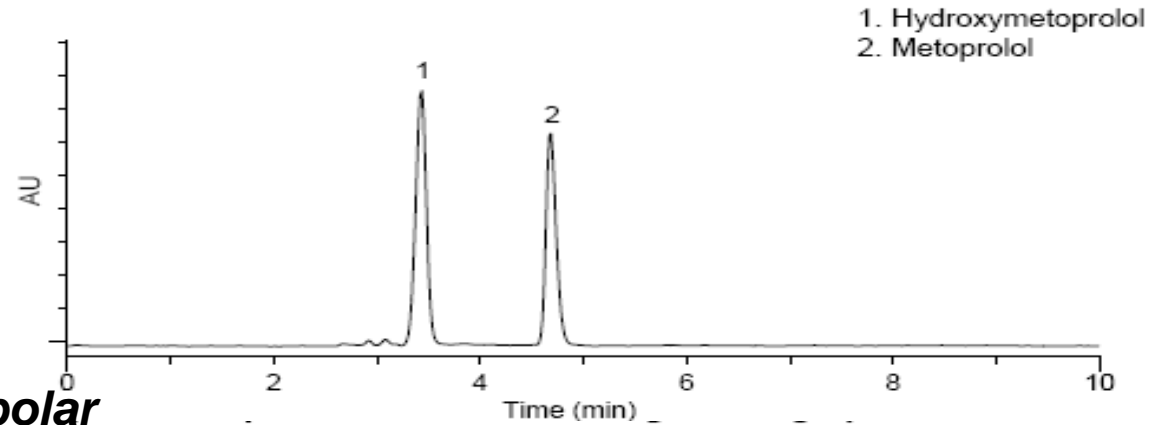
# CLAR FORMACIÓN DE PARES IÓNICOS

	%CV of Metoprolol (MP) k'		
	Intra-Column	Inter-Column	Inter-Laboratory
<b>Par iónico</b> <b>Alto pH</b> <b>Fase reversa polar</b>	0.133	1.938	0.936
	0.210	1.784	1.234
	0.878	4.090	4.211
	%CV of Metoprolol (MP) Area		
	Intra-Column	Inter-Column	Inter-Laboratory
<b>Par iónico</b> <b>Alto pH</b> <b>Fase reversa polar</b>	0.292	0.546	-
	1.171	0.355	-
	3.009	0.927	-

# CLAR FORMACIÓN DE PARES IÓNICOS

Métodos

1. *Par iónico*
2. *Alto pH*
3. *Fase reversa polar*



# CLAR FORMACIÓN DE PARES IÓNICOS

## Ventajas

- Utilización de columnas de fase reversa
- Detección UV

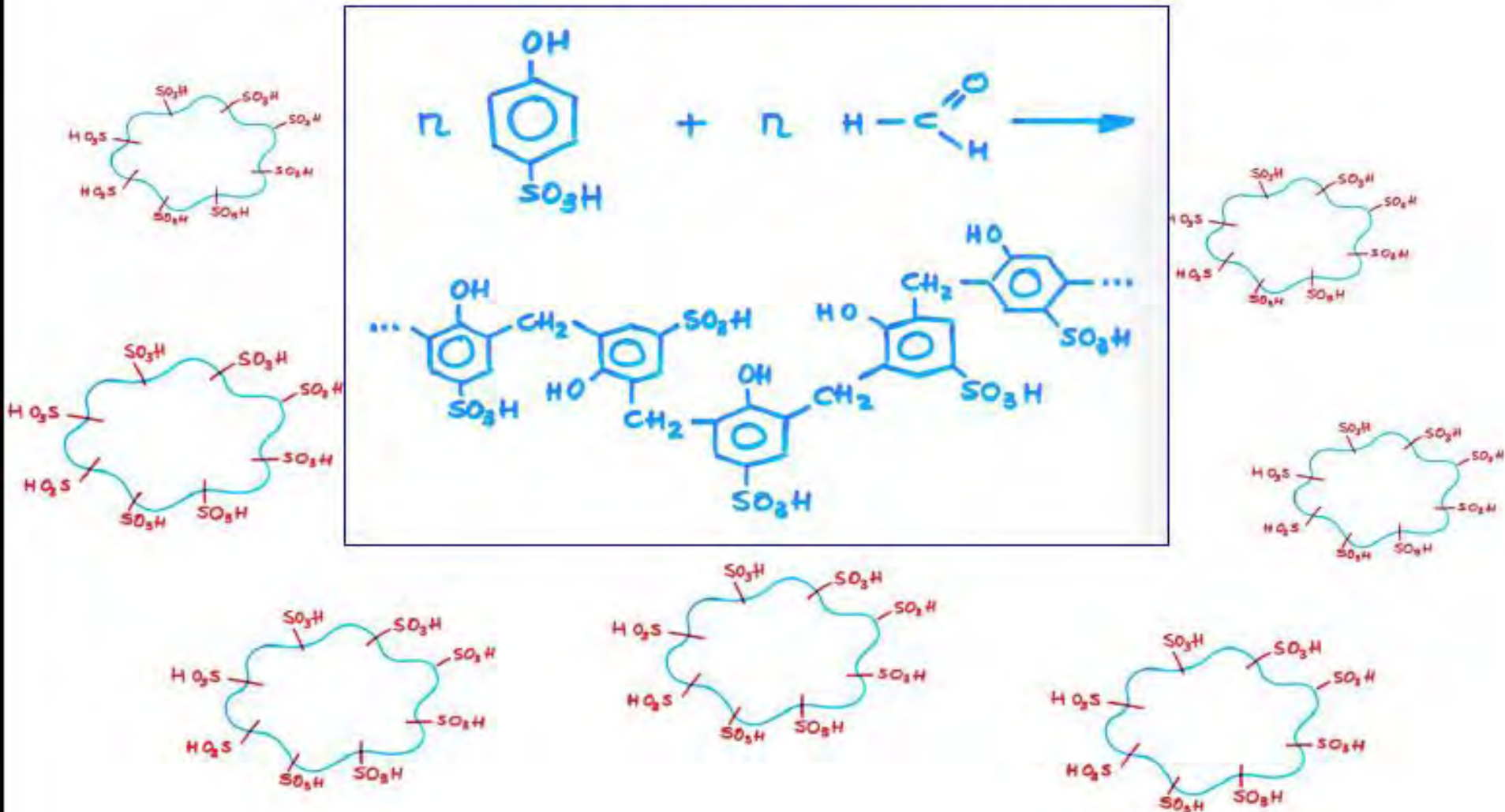
## Desventajas

- Gradiente no recomendado
- Incompatible con CL/EM
- Largos tiempos de equilibrio

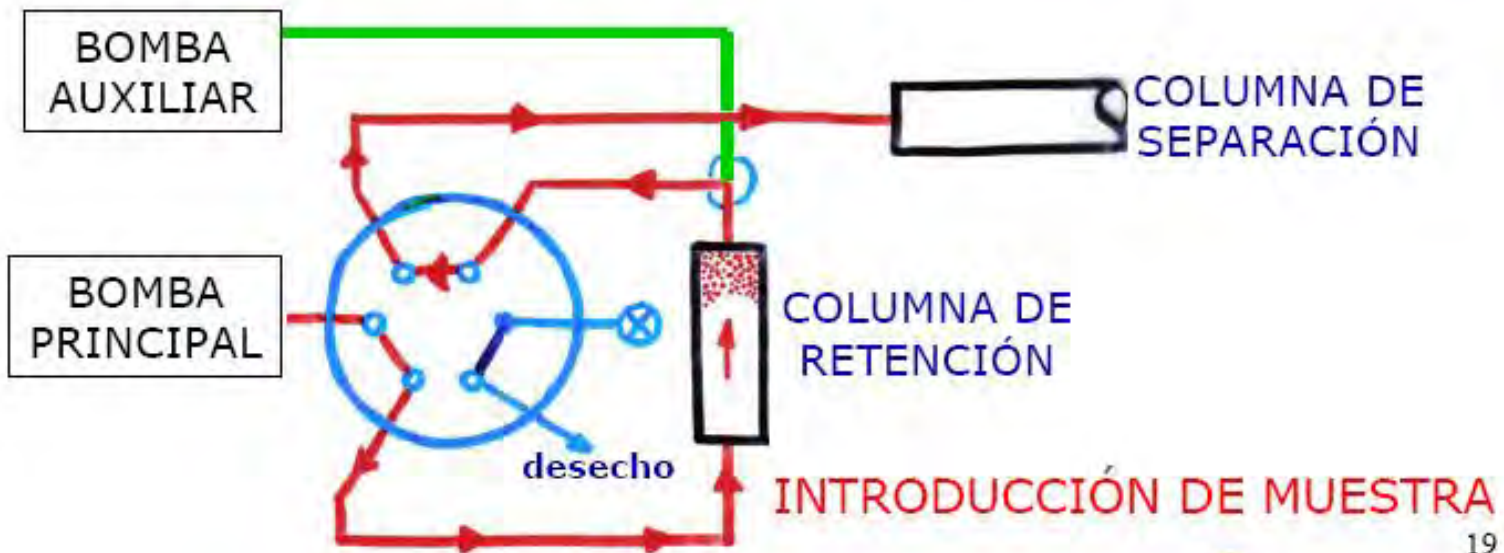
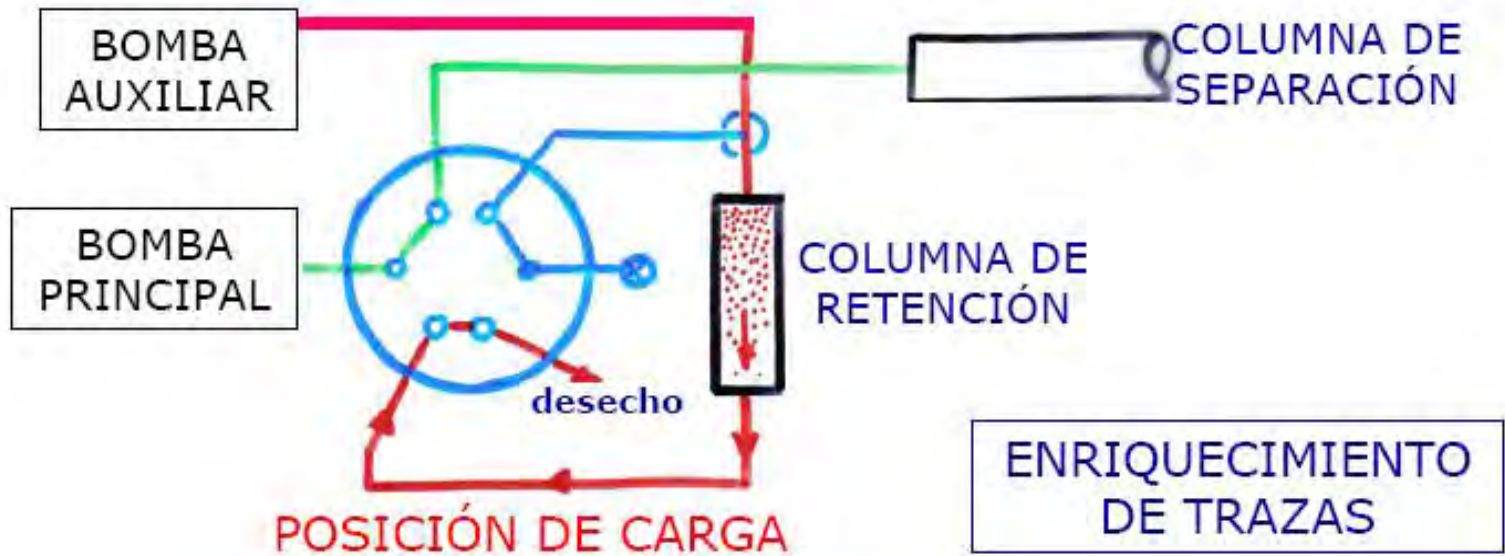
# Modalidades en CL

## Cromatografía de Intercambio iónico

POLIMERIZACIÓN DE RESINAS FENÓLICAS Y ESQUEMA DE SUS ESTRUCTURA FÍSICO-QUÍMICA



# Acoplamiento de columnas



# CLAR

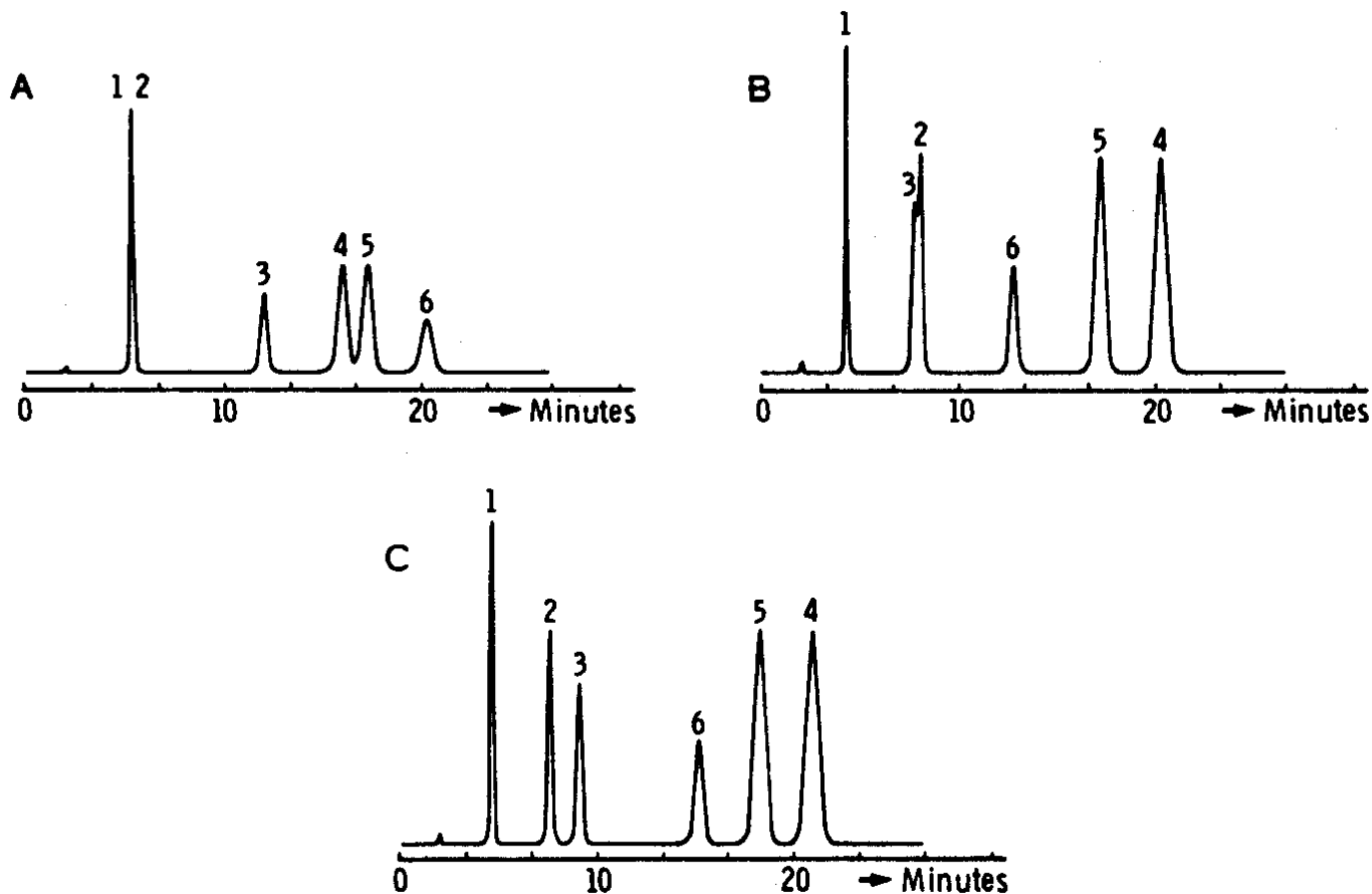
## Cambio de Resolución

### ACCIONES A CONSIDERAR PARA INCREMENTAR LA RESOLUCIÓN

1. Aumentar la longitud de la columna.
2. Disminuir el diámetro interior de la columna.
3. Comprobar si la velocidad de flujo es correcta.
4. Revisar el estado del empacamiento de la columna.
5. Elegir un empacado uniforme y esférico.
6. Disminuir el tamaño de muestra introducido.
7. Seleccionar la fase estacionaria adecuada.
8. Seleccionar la fase móvil apropiada.
9. Asegurarse de que la presión es adecuada.
10. Usar un gradiente de elución.



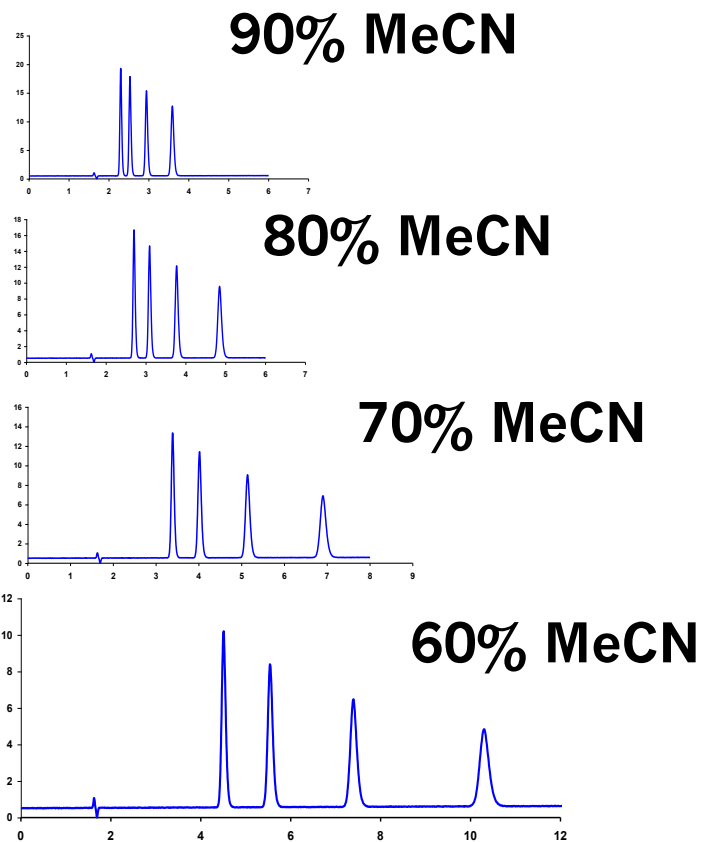
# Optimización de la fase móvil. Fase reversa



A: metanol/agua 50:50; B: tetrahidrofurano/agua 32:68  
C: metanol/tetrahidrofrano/agua 35:10:55

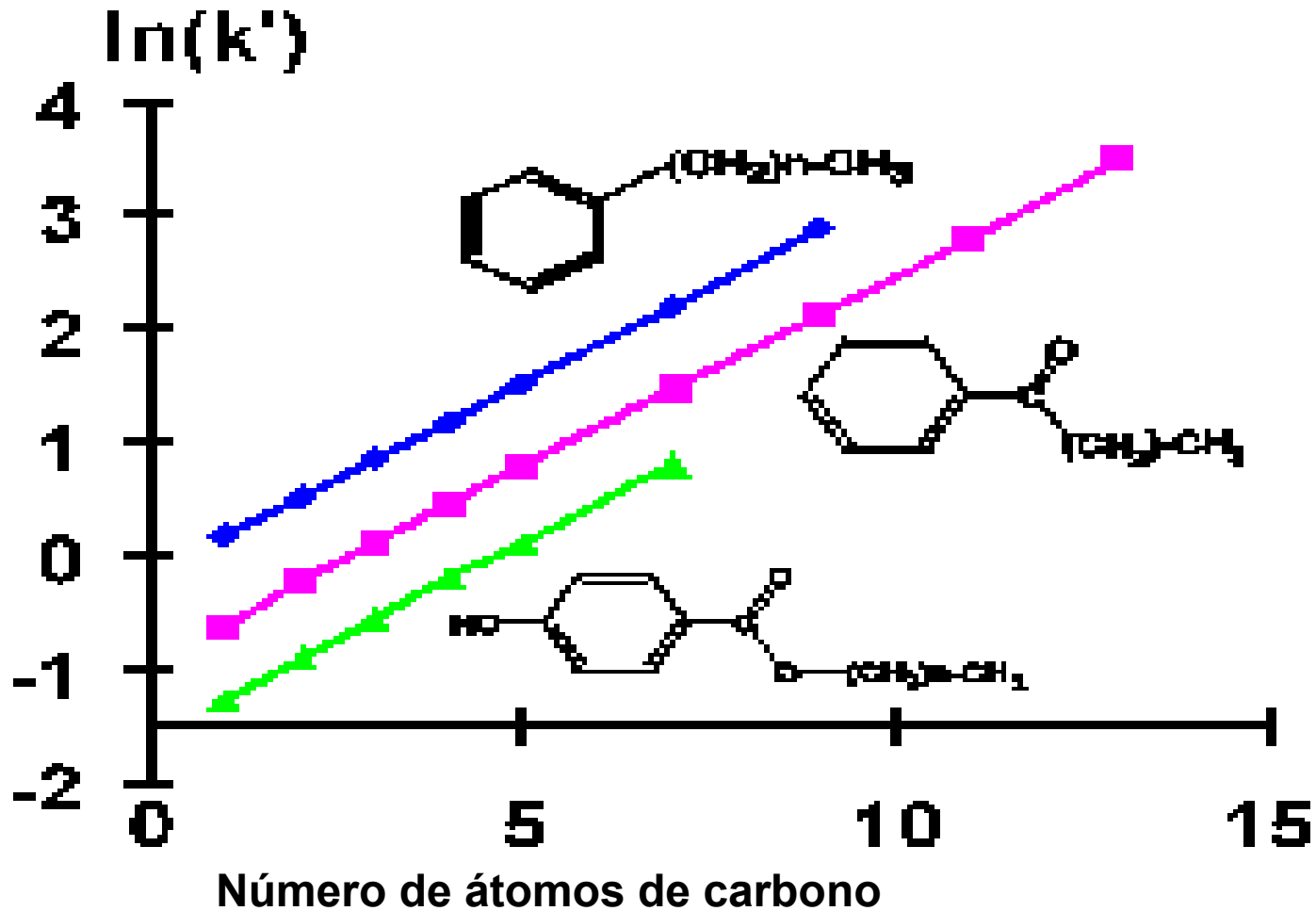
# Efecto de la composición de la fase móvil.

## Fase reversa



# CLAR FASE REVERSA

## Analitos neutros



$$\ln(k') = m (\text{\#carbonos cadena alifática}) + b$$

# Fase normal vs fase reversa

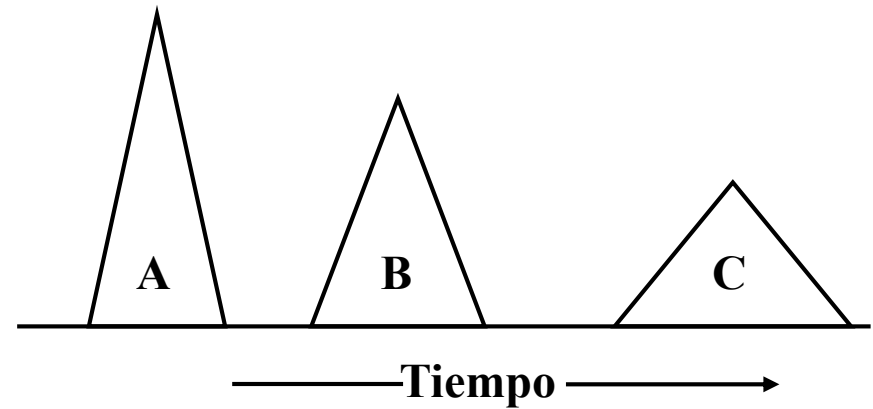
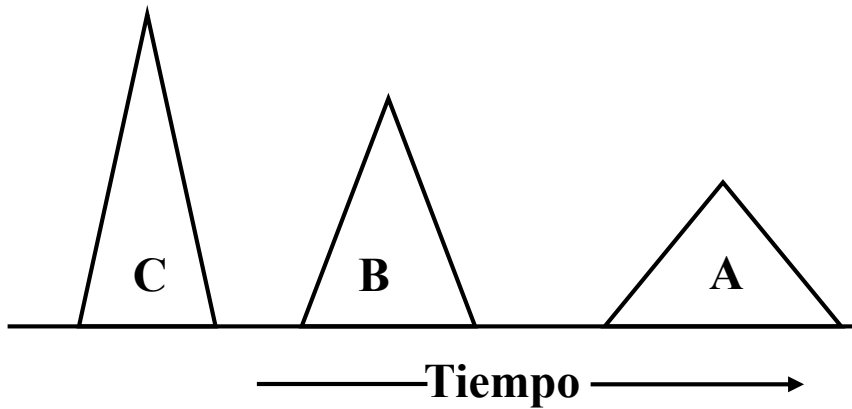
**Fase normal**

**Fase móvil no polar**

**Fase reversa**

**Fase móvil polar**

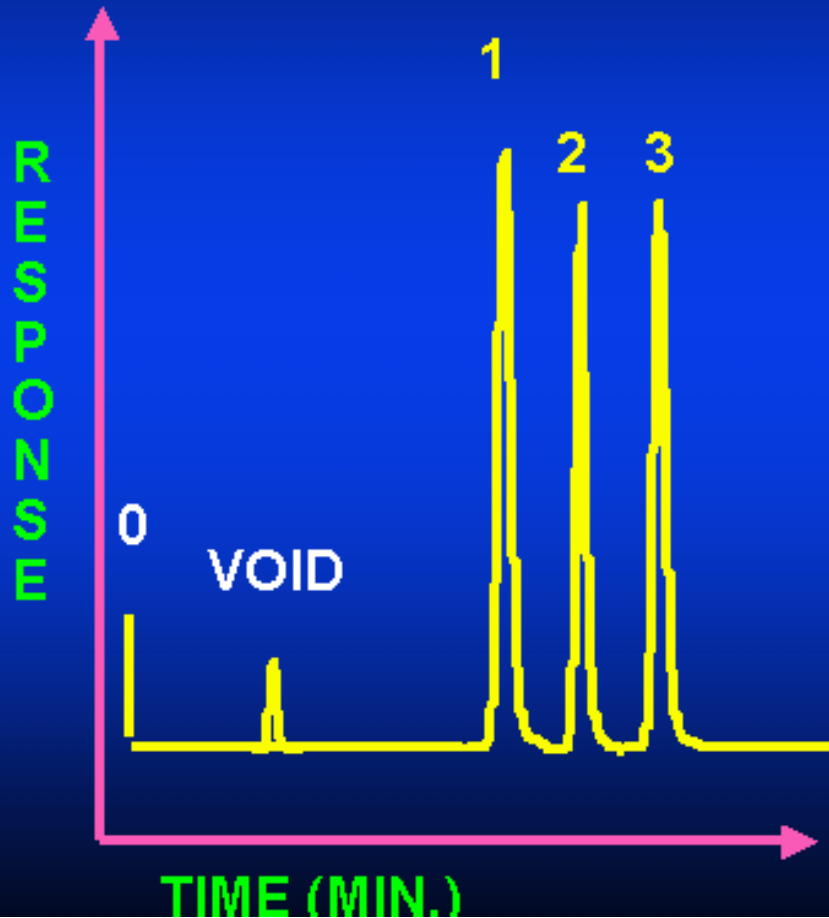
**Polaridad de los analitos:  $A > B > C$**



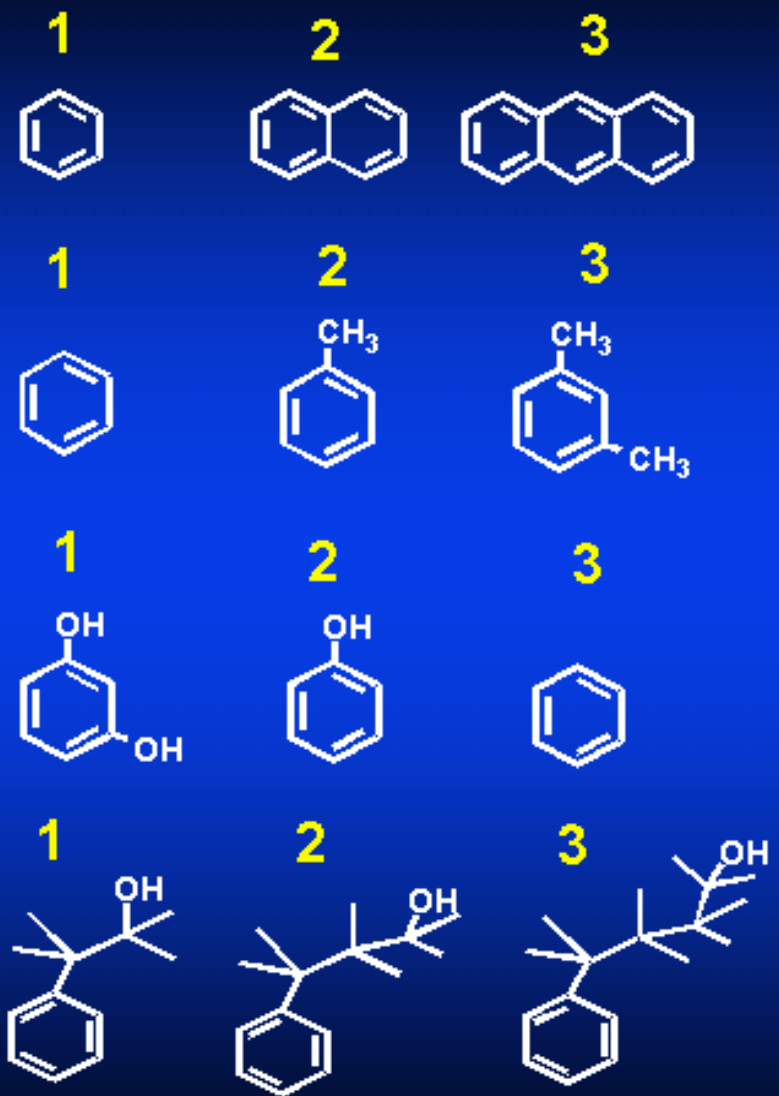
**Diferentes perfiles de elución.**

# Fase reversa

ORDEN DE ELUCIÓN

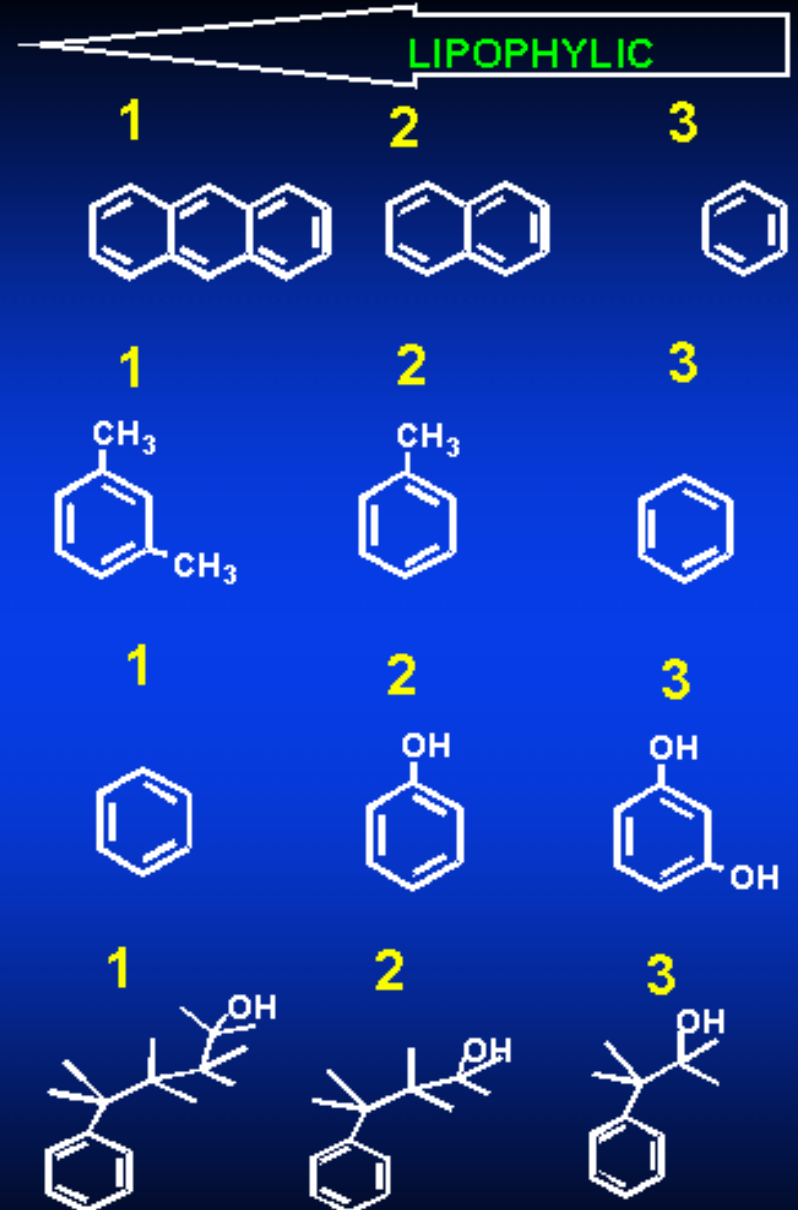
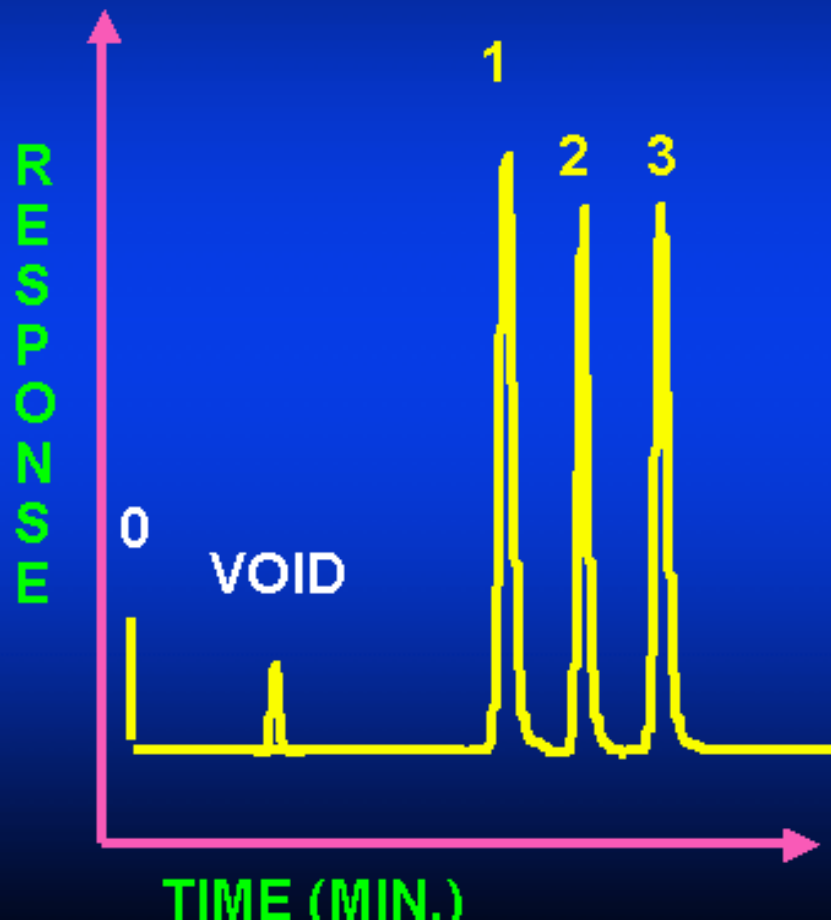


LIPOPHYLIC



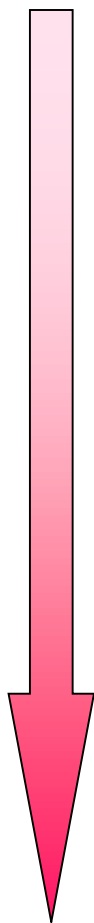
# Fase normal

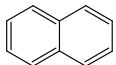
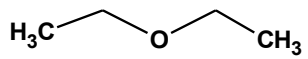
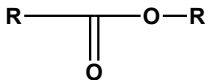
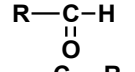
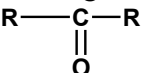
ORDEN DE ELUCIÓN



# Polaridades de algunos grupos funcionales en moléculas de interés farmacéutico

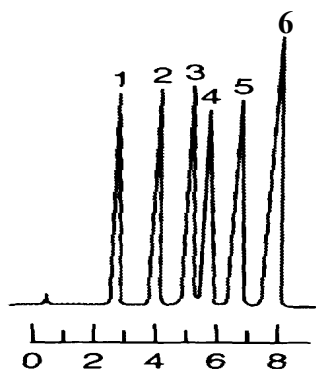
Incremento de polaridad



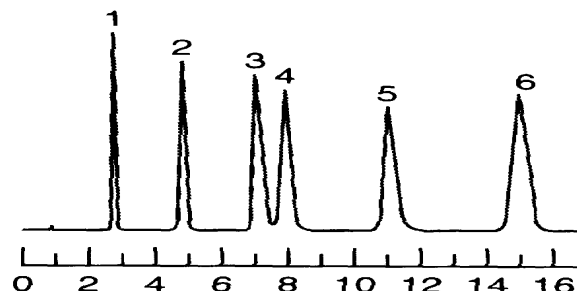
- Cadena alifática  $R-CH_2-R$
- Dobles enlaces  $R-CH=CH_2$
- Aromáticos 
- Haluros  $R-Cl$
- Sulfuros  $R-S$
- Éteres 
- Nitro compuestos  $R-NO_2$
- Esteres 
- Aldehídos 
- Cetonas 
- Alcoholes  $R-OH$
- Aminas  $R-NH_2$
- Sulfonas  $R-SO_2-OH$
- Sulfoxidos  $R-SO-R$
- Amidas  $R-CO-NH_2$
- Ácidos carboxílicos  $R-COOH$

# Fase Reversa

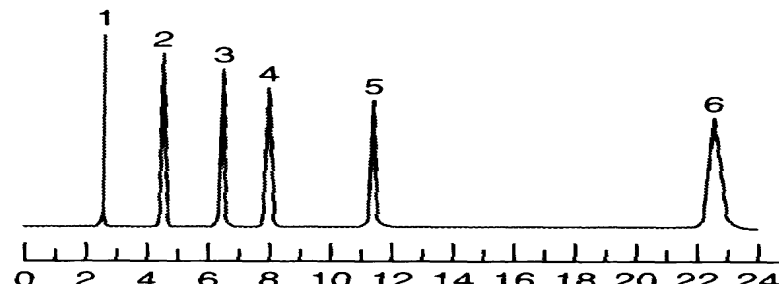
**Metilo-**



**Octilo**



**Octadecilo**



**Time (min)**

**Time (min)**

**Time (min)**

**5  $\mu\text{m}$  tamaño de partícula.**

**Fase móvil: 50/50 metanol/agua.**

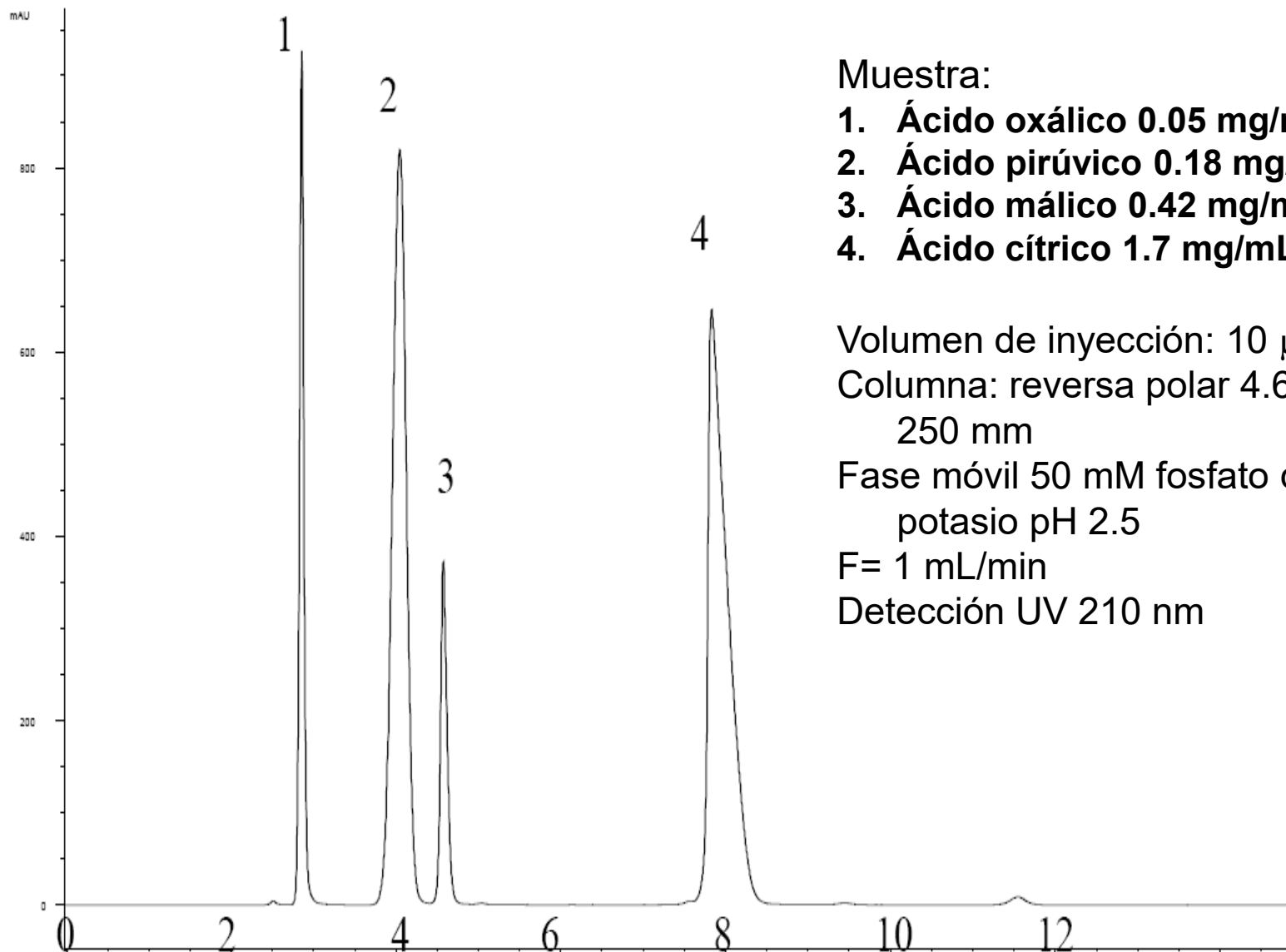
**Velocidad de flujo: 1 mL min<sup>-1</sup>**

**Peak identification:**

**1. Uracilo; 2. Fenol; 3. Acetofenona; 4. Nitrobenceno; 5. Benzoato de metilo; 6. Tolueno**



# Ejemplo de separación



Muestra:

1. **Ácido oxálico 0.05 mg/mL**
2. **Ácido pirúvico 0.18 mg/mL**
3. **Ácido málico 0.42 mg/mL**
4. **Ácido cítrico 1.7 mg/mL**

Volumen de inyección: 10  $\mu$ L

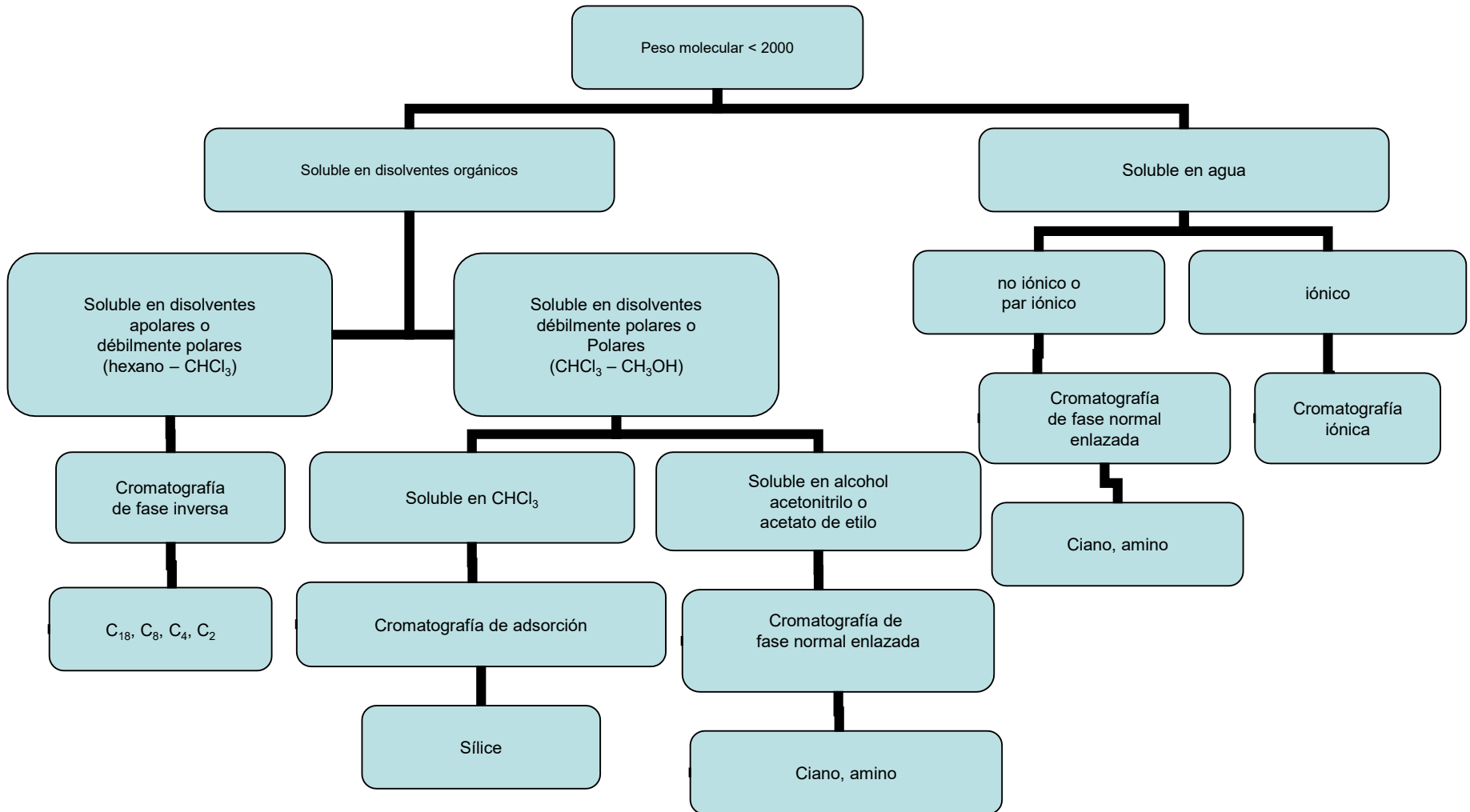
Columna: reversa polar 4.6 x 250 mm

Fase móvil 50 mM fosfato de potasio pH 2.5

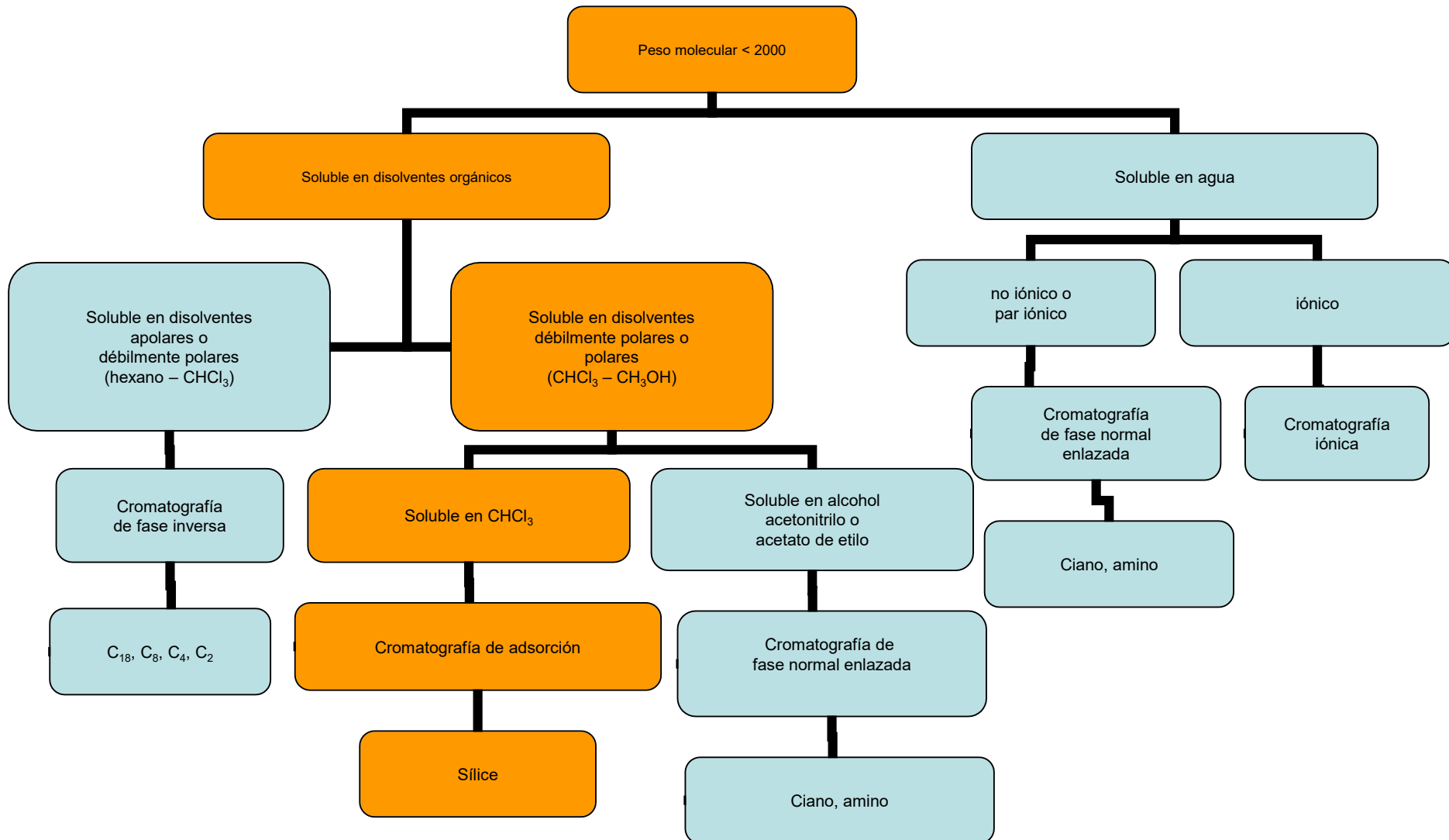
F= 1 mL/min

Detección UV 210 nm

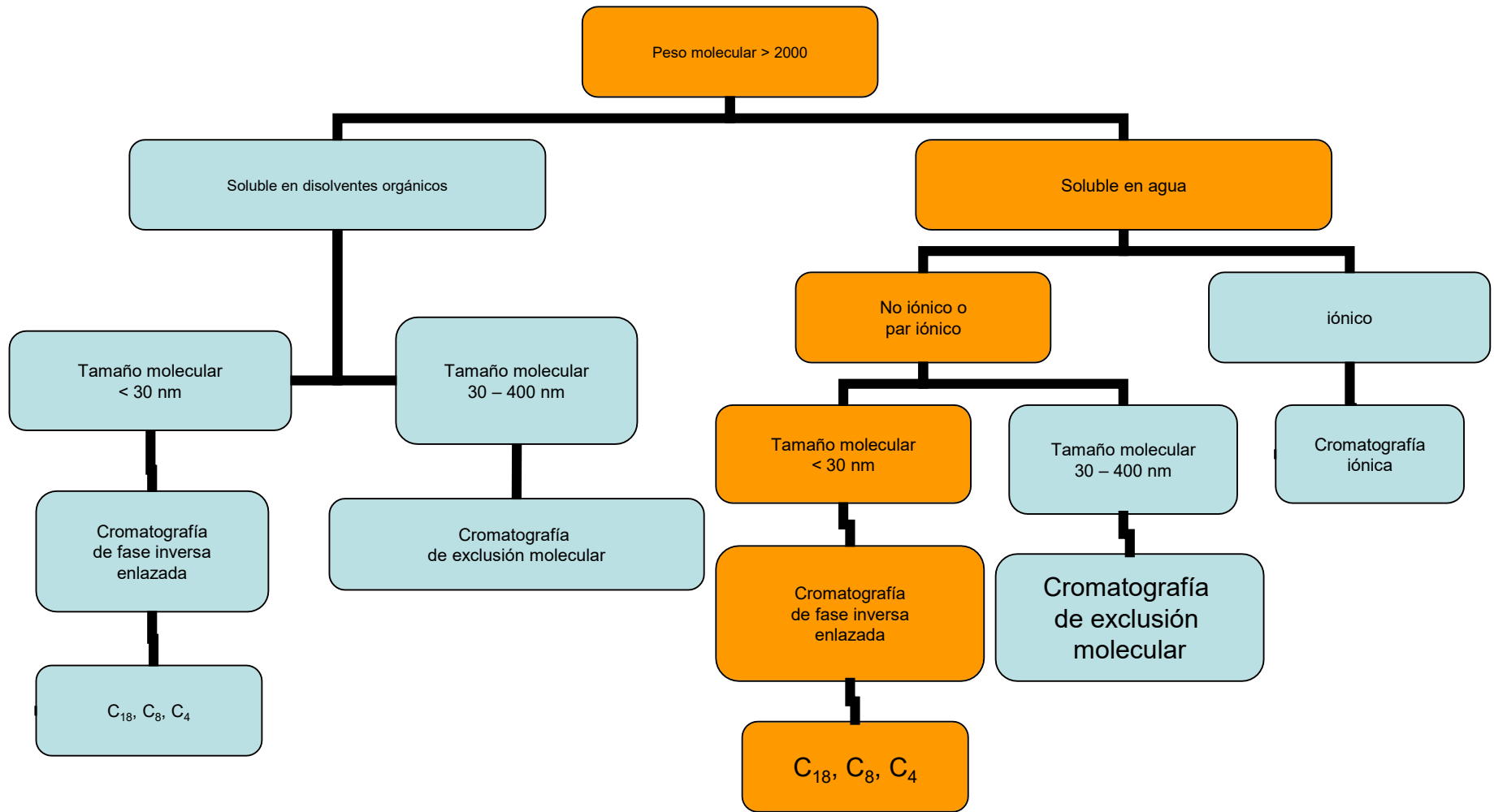
# Selección del modo de separación



# Selección del modo de separación



# Selección del modo de separación



# Desarrollo de un método de separación cromatográfica

## **Atributos de un método cromatográfico:**

- separación adecuada de los analitos que interesan
- rapidez
- robustez (no estar muy afectado por pequeñas variaciones de las condiciones)

## **Pasos iniciales en el desarrollo de un método:**

- determinar la finalidad
- seleccionar el método de preparación de muestra
- escoger el detector
- selección del modo de separación

# Desarrollo de un método de separación cromatográfica

## Criterios de una separación adecuada:

- $0,5 \leq k' \leq 20$
- resolución  $\geq 2$
- $0,9 \leq \text{factor asimetría} \leq 1,5$
- presión  $\leq 150 \text{ atm}$

## ¿Elución isocrática o en gradiente?

Aplicar gradiente aproximado, en el que se consiga separar los analitos

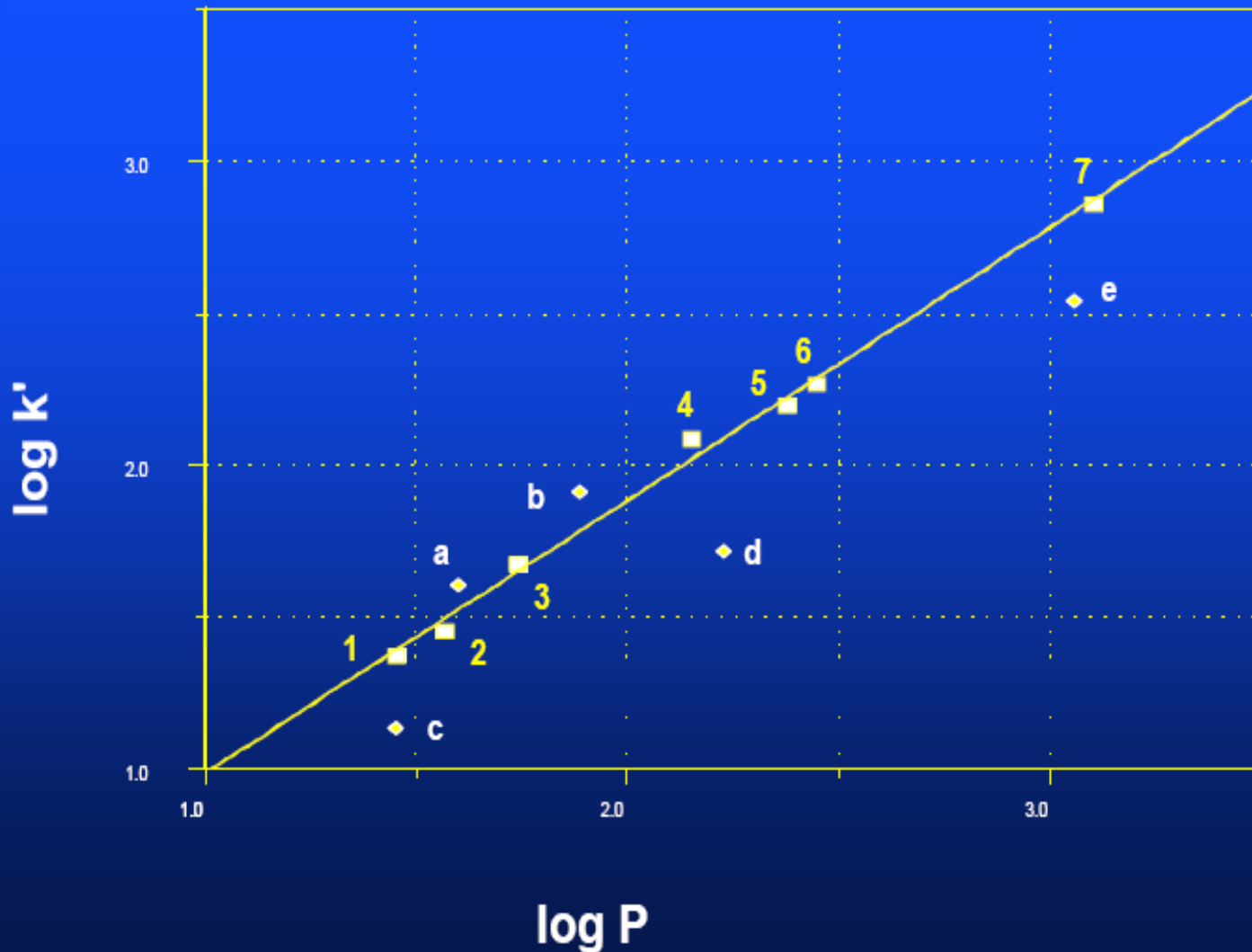
$\Delta t/t_G > 0,25 \longrightarrow$  Elución en gradiente

$\Delta t/t_G < 0,25 \longrightarrow$  Elución isocrática

$\Delta t$ , diferencia de tiempos de retención del primer pico y el último del cromatograma  
 $t_G$ , tiempo de gradiente, tiempo a lo largo del cual cambia la composición de la fase móvil

- Separación sistemática en CLAR por fase reversa

# Fase reversa Hidrofobicidad





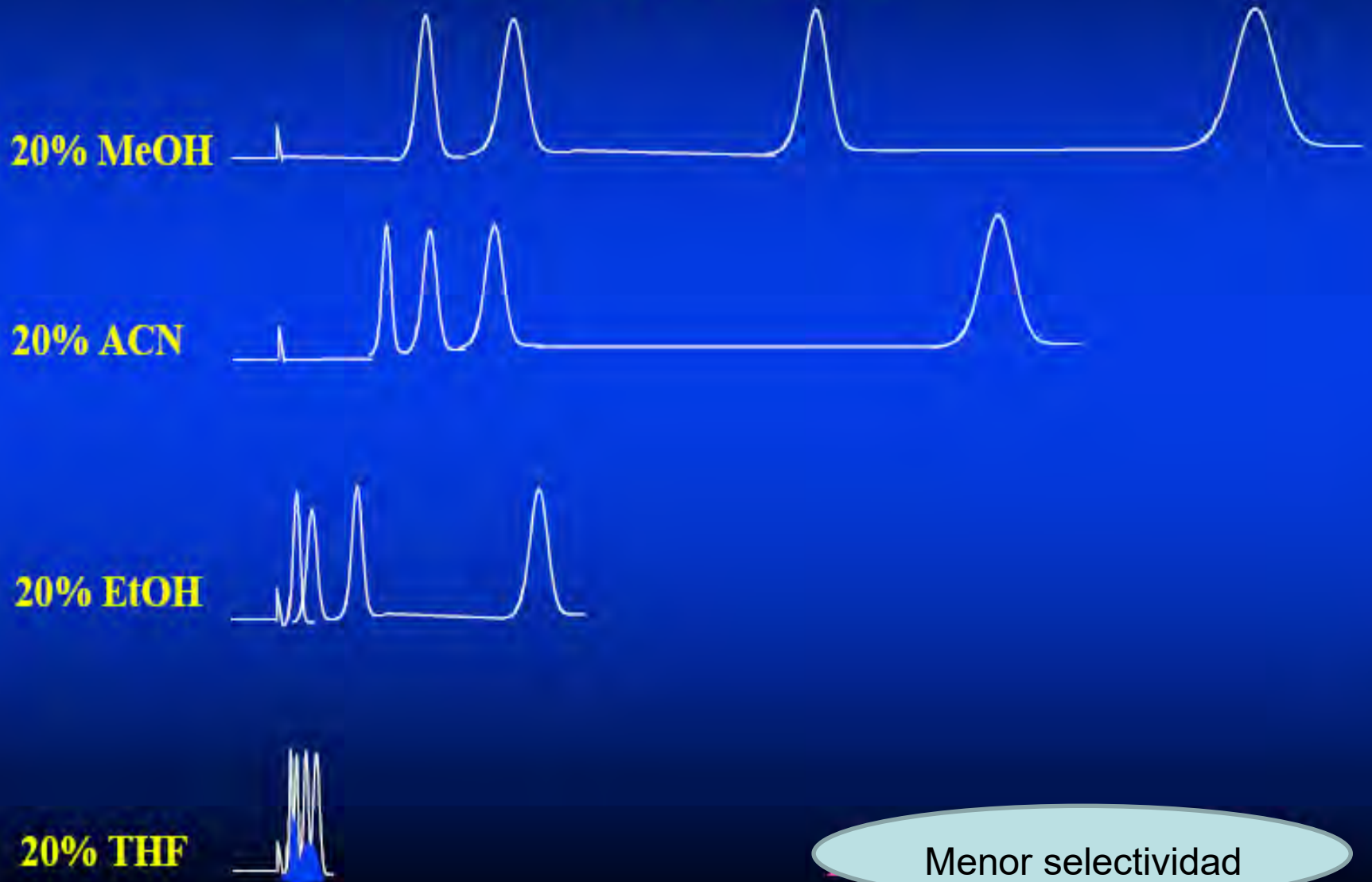
# Fase reversa

## Fase móvil

- Tipo de modificador orgánico (MeOH, THF, AcN)
- Fuerza de elución (% de modificador)
- pH
- Tipo de amortiguador
- Fuerza iónica (concentración de iones)
- Formación de pares iónicos

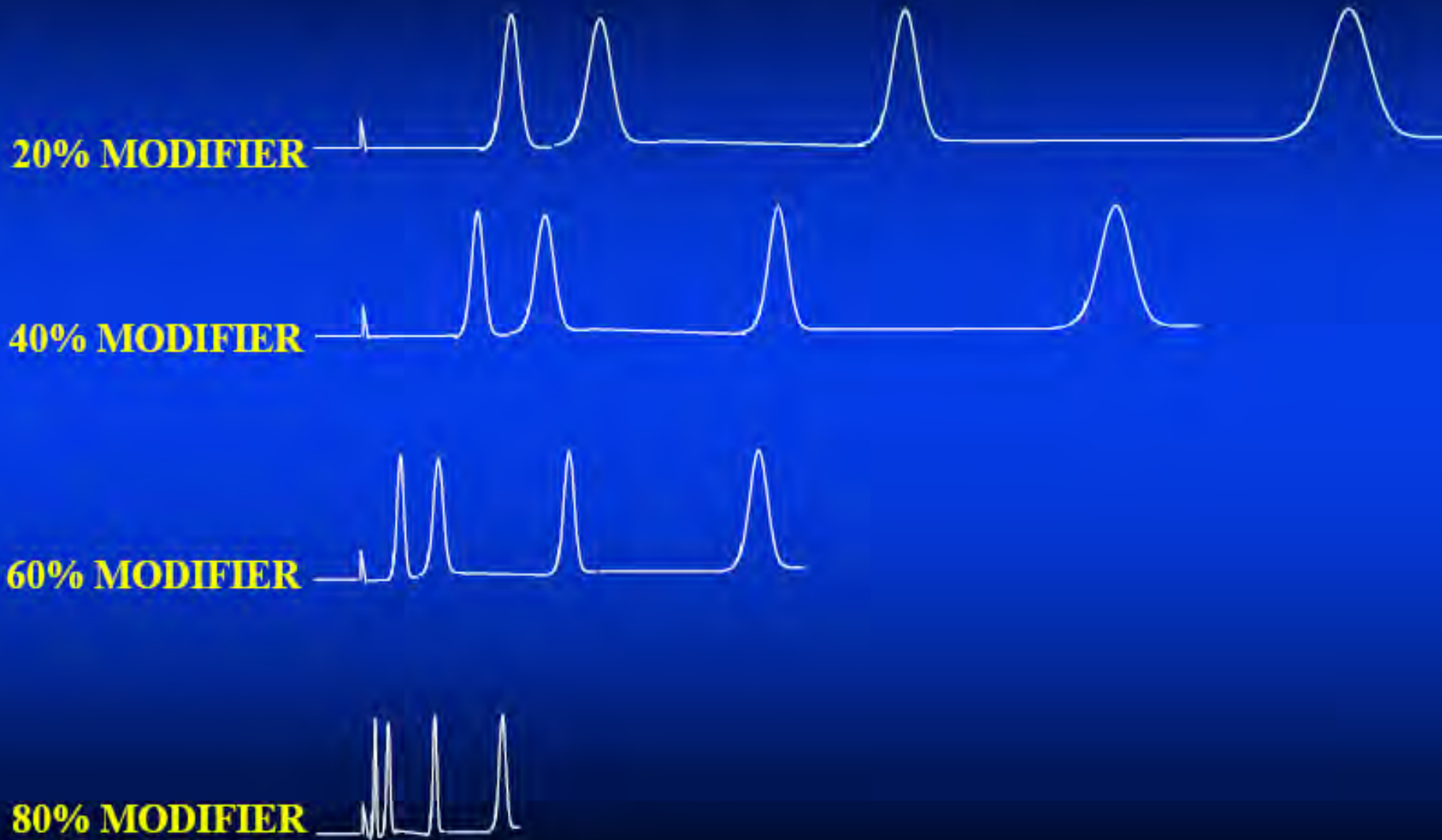
# Fase reversa

## Modificador orgánico



# Fase reversa

## Optimización del porcentaje de modificador



# Fase reversa

## Ionización y retención

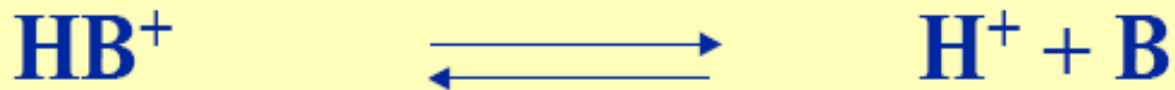
Ácidos débiles



$\text{pK}_a \sim 4-5$

pH menor de 6 a 7 los ácidos están ionizadas

Bases débiles

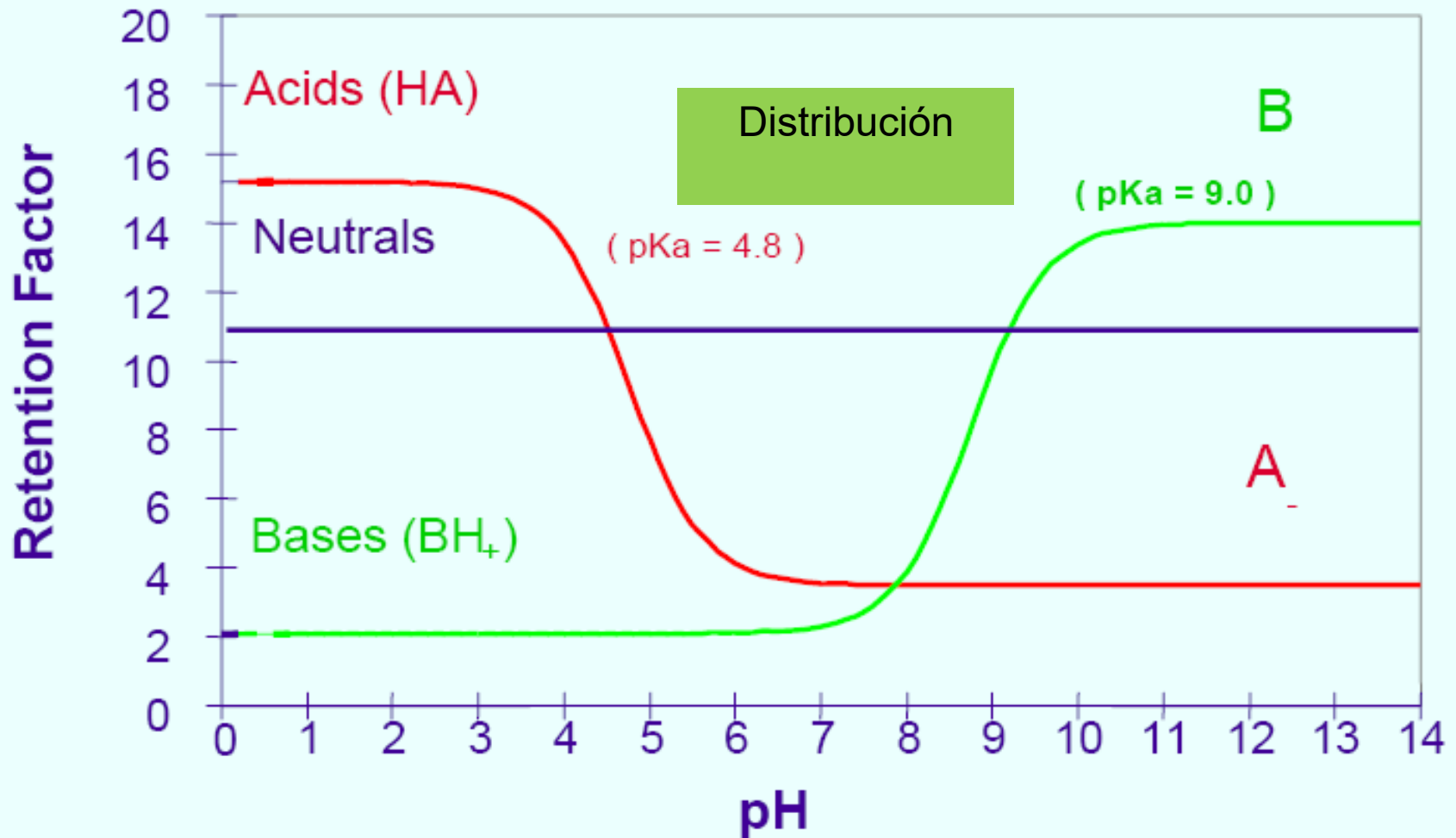


$\text{pK}_a \sim 7-8$

pH menor de 5 a 6 las bases están ionizadas

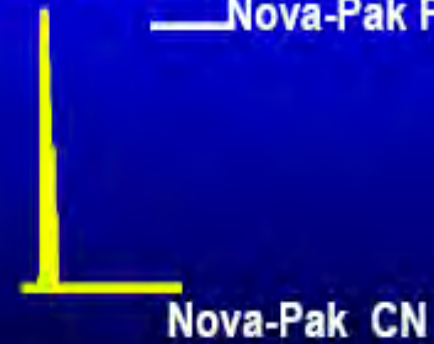
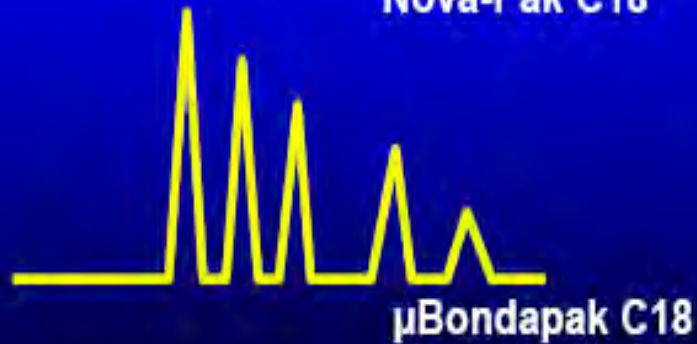
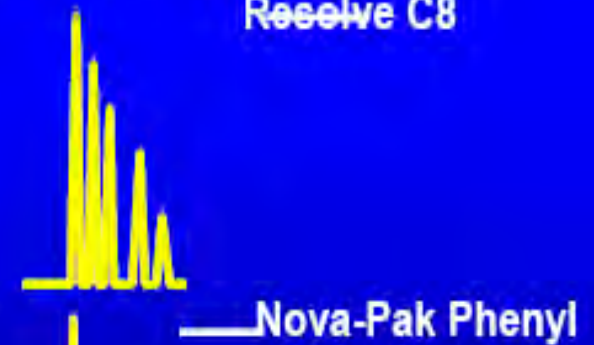
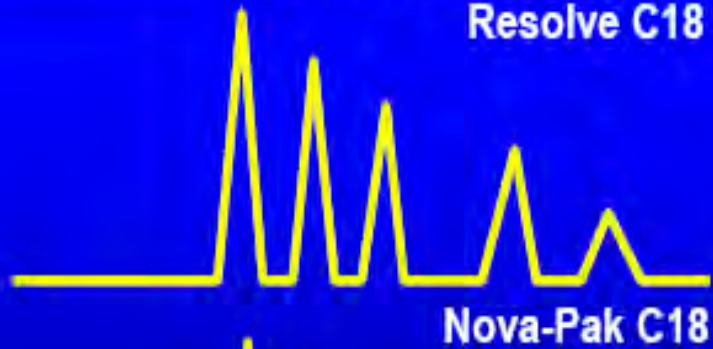
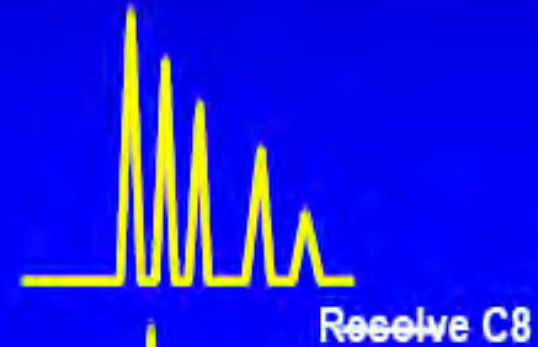
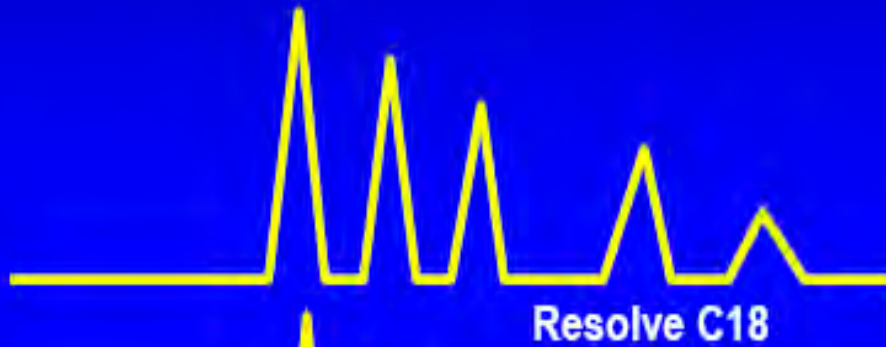
# Fase reversa

## Efecto del pH en la retención



# Fase reversa

## Tipos de fases reversas



# Fase reversa

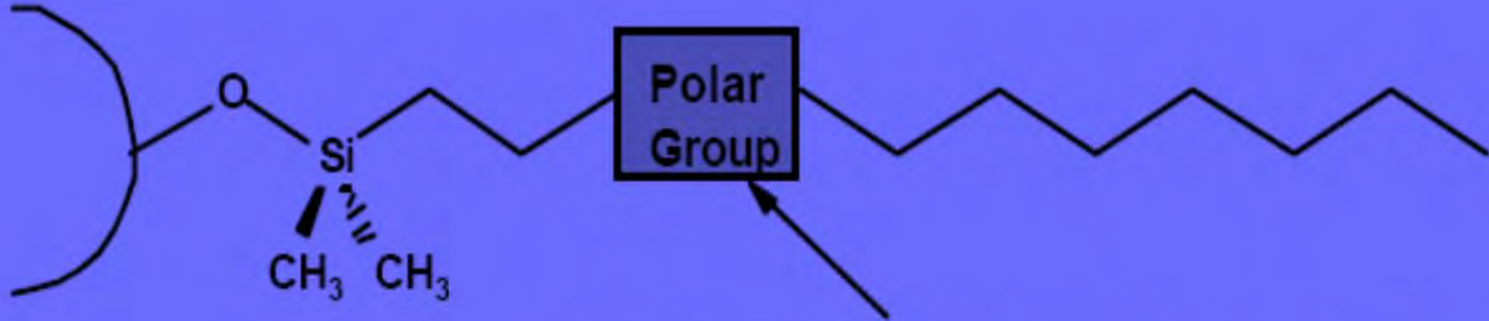
## Propiedades de las fases estacionarias

- Tipo de soporte (sílice, zirconia, titania)
- Tipo de derivatización (C2, C8, C18 C40) (grupo polar intermedio)
- Porcentaje de recubrimiento
- Porcentaje de carbono (12-20%)
- Posee endcapping
- Forma irregular o esférica
- Porosidad (90-120 Å)
- Tamaño de partícula (3-10  $\mu\text{m}$ )

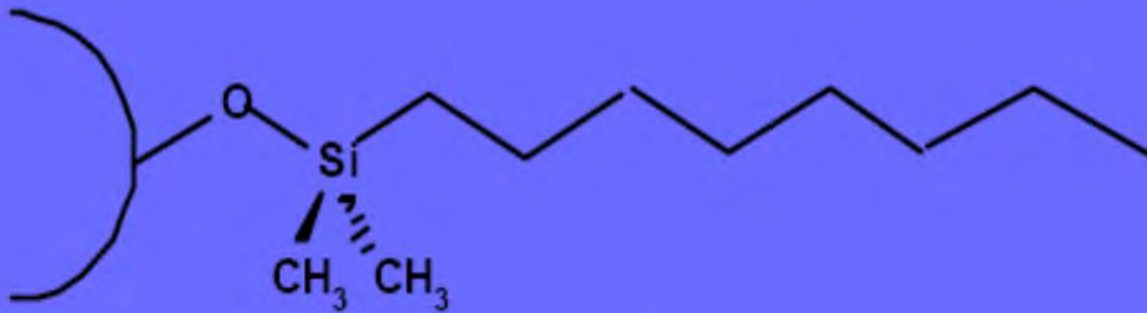


# Fase reversa

## Fases para elución con agua 100%



Derivatización intermedia con grupo polar

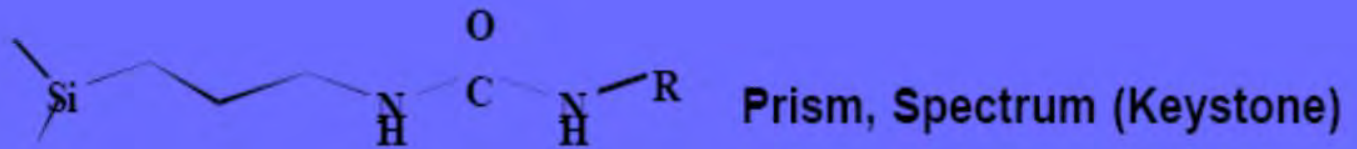
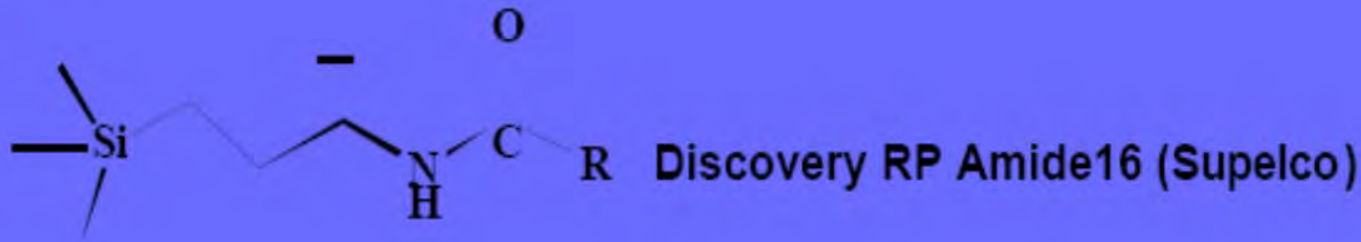
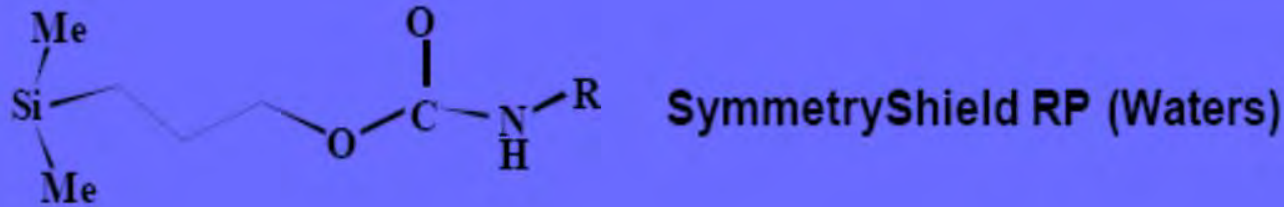


Derivatización clásica



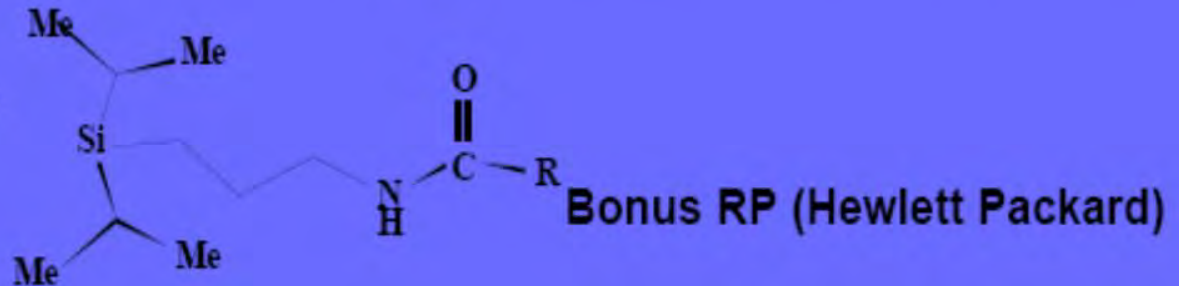
# Fase reversa

## Fases para elución con agua 100%



- Reducción de interacción con los grupos silanol

- Modificación de selectividad



# Fase reversa

## Porcentaje de carbono

Mayor tiempo de retención

Porcentaje de  
carbono

5% 7% 9% 12% 15% 17%

# Fase reversa

## Soportes a base de sílice

### Ventajas

- Mecánicamente fuertes
- Alta eficiencia

### Desventajas

- Coleo para compuestos básicos
- Rango limitado de pH

## Fases poliméricas (PS-DB)

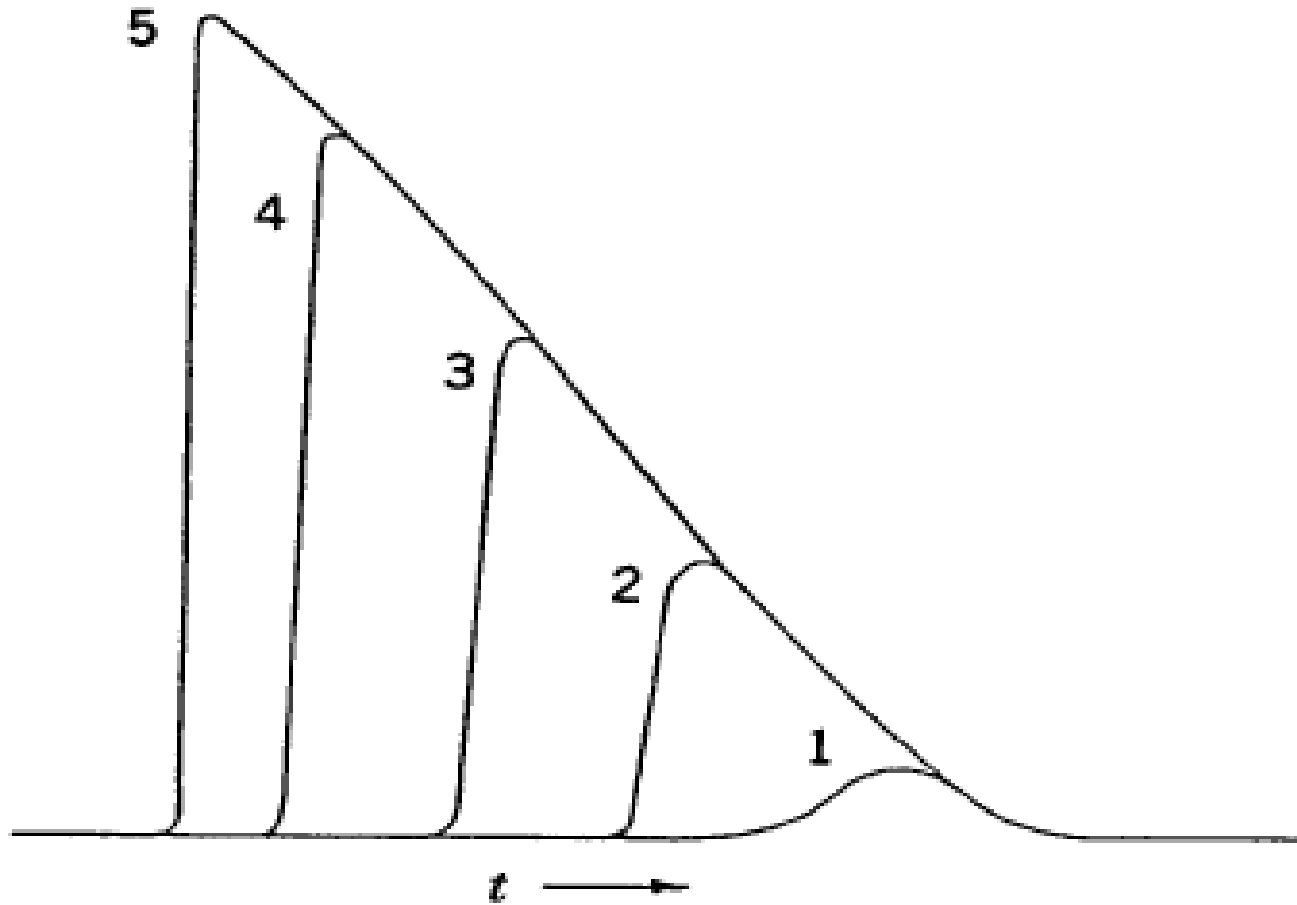
### Ventajas

- Amplio rango de pH (0-14)
- No existe coleo para compuestos básicos

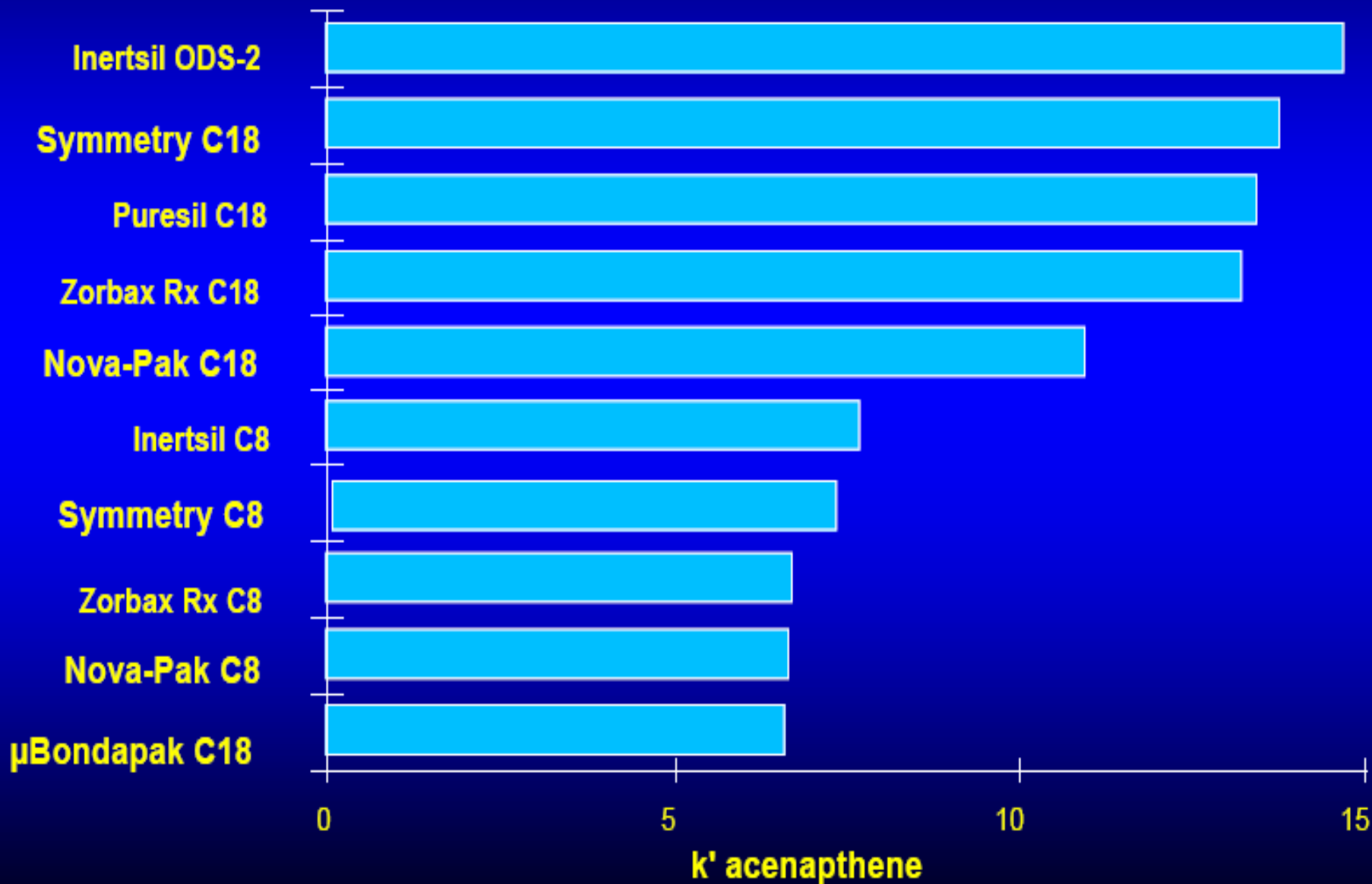
### Desventajas

- Menor eficiencia
- Mecánicamente más débiles

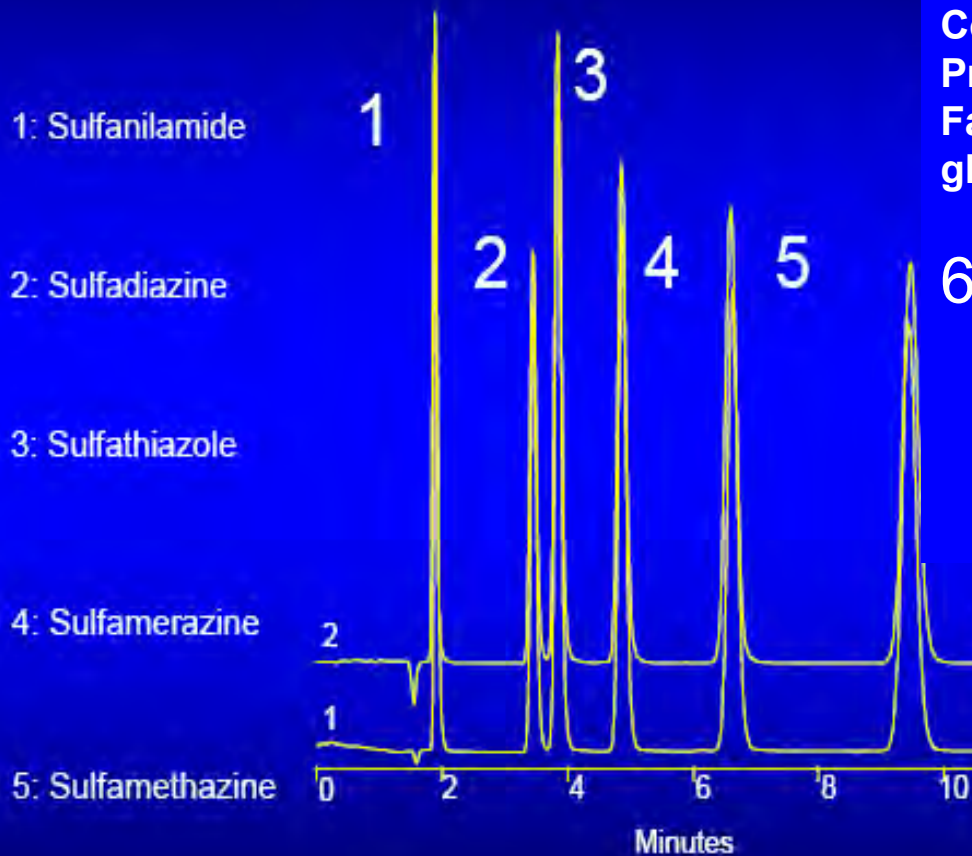
# Fase reversa Inyección



# Hidrofobicidad relativa



# Fase reversa



## Condiciones

Columna C18 3.9 x 150 mm

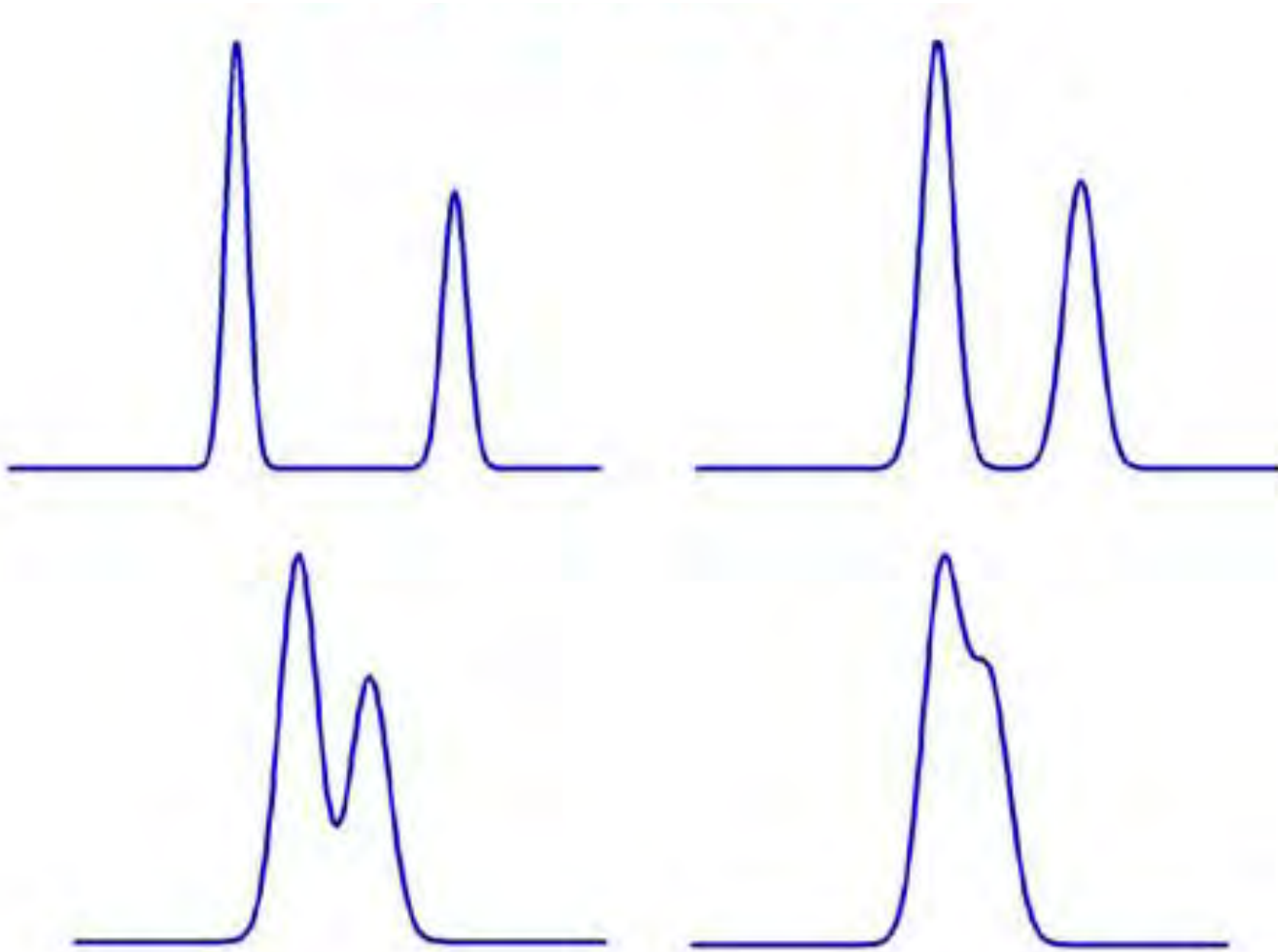
Precolumna 3.9 x 20 mm

Fase móvil: agua: MeOH:ácido acético  
glacial 79:20:1

Inyección 5000

Inicio

# Fase reversa



# Fase reversa





# Fase reversa

$$R_S \approx \frac{1}{4} N^{1/2} (\alpha - 1) [k' / (k' + 1)]$$

Eficiencia

selectividad

retención

# Fase reversa

## Variables continuas y discontinuas (selectividad)

### Continuas

- Fuerza de elución
  - Temperatura
- Tipo de fase móvil
  - Aditivos

### Discontinuas

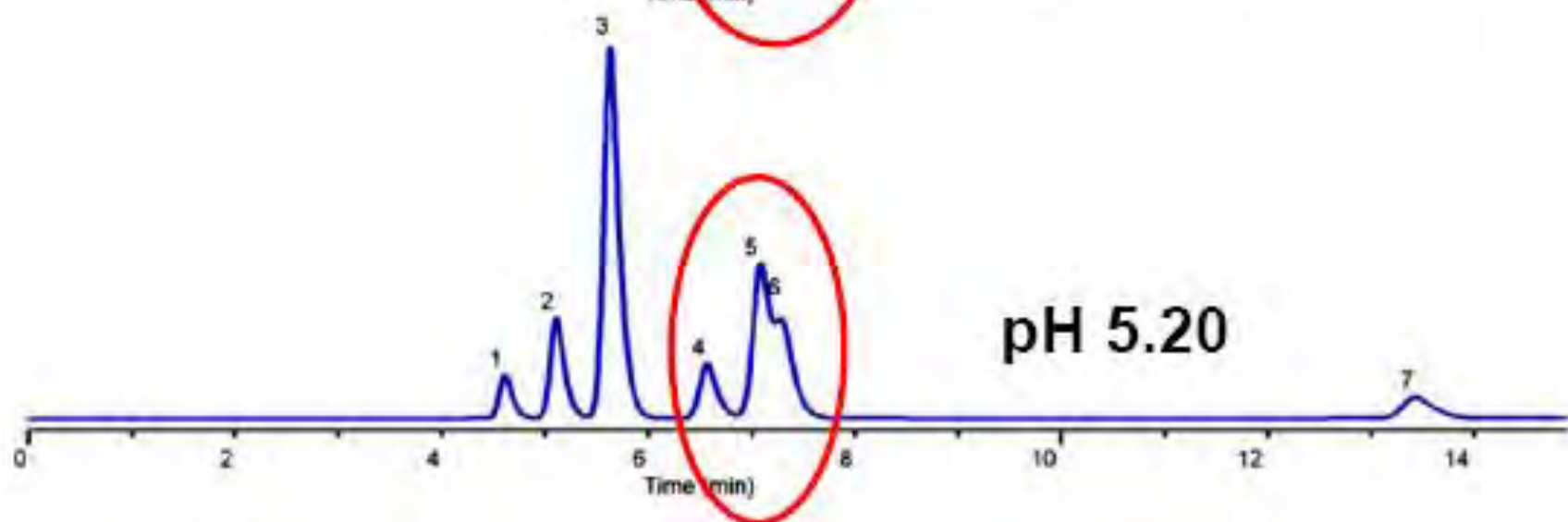
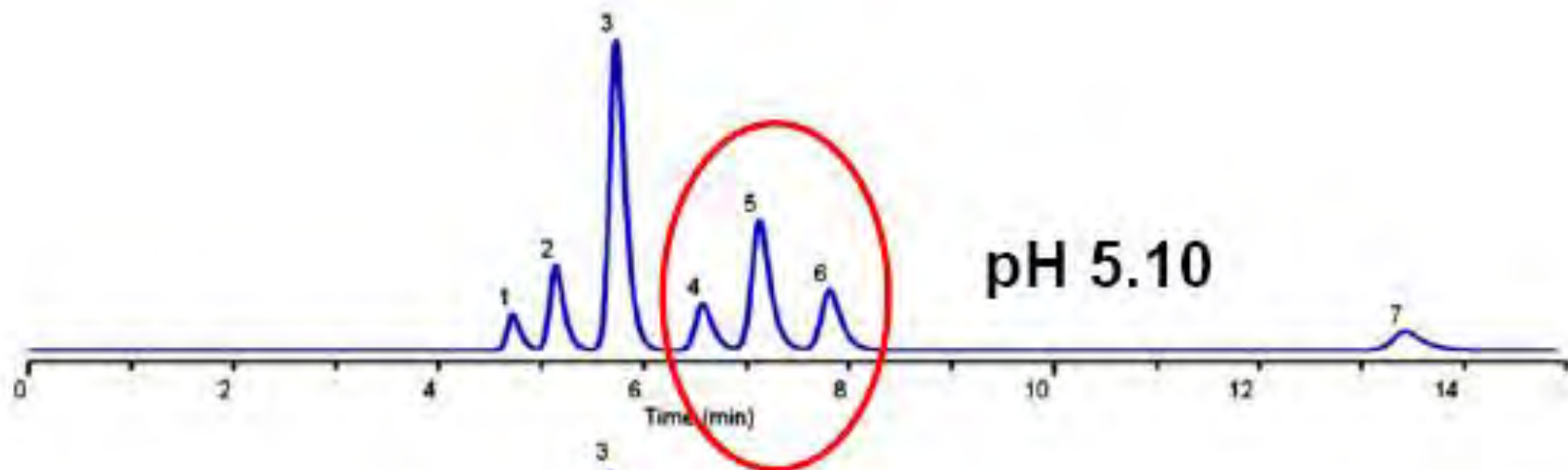
- Tipo de columna

### Cuasi-discontinua

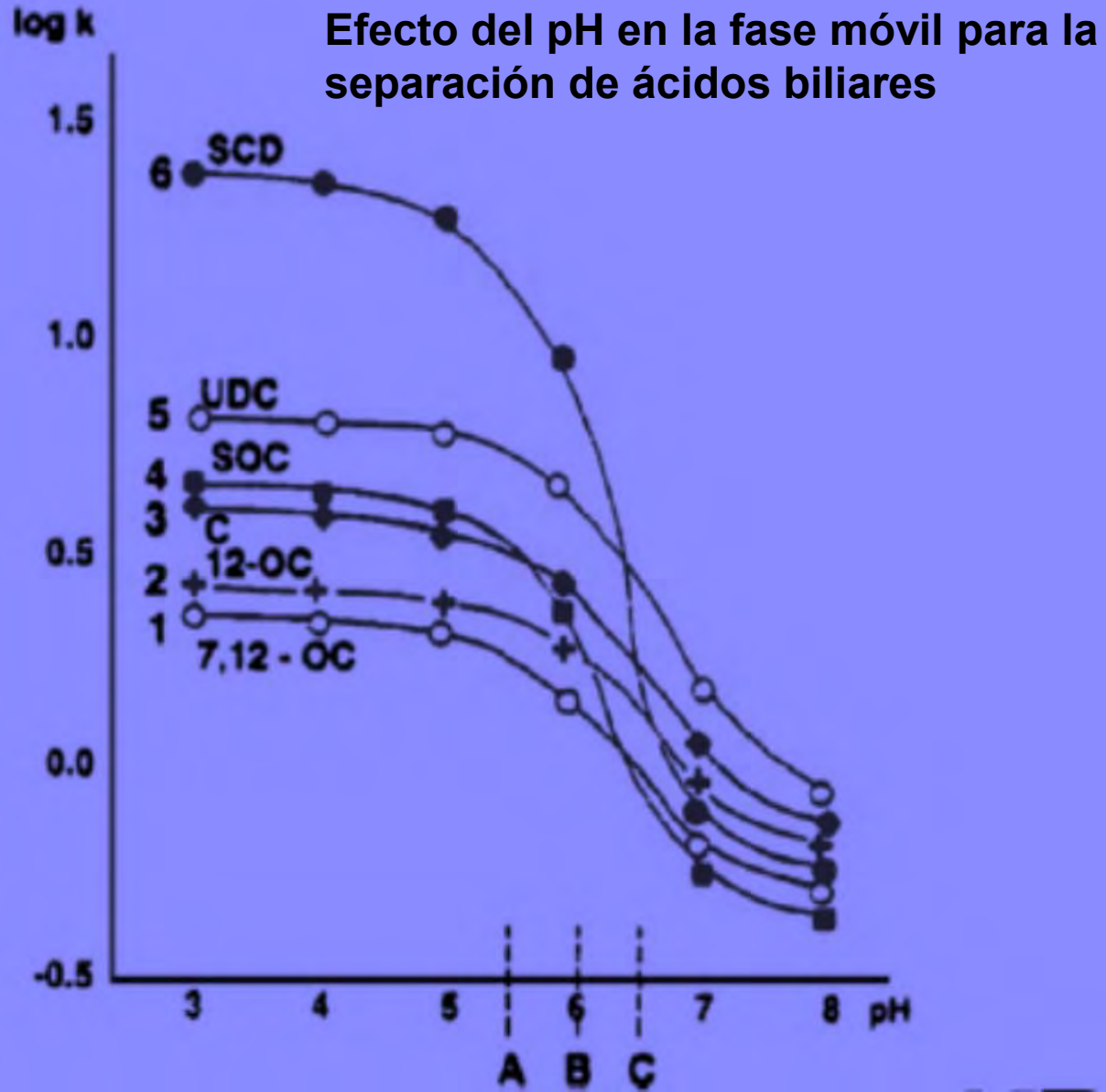
- pH

# Importancia del pH en fase reversa

## Ej. Ácidos orgánicos



# Importancia del pH en fase reversa



# Importancia del pH en fase reversa

Muestra:

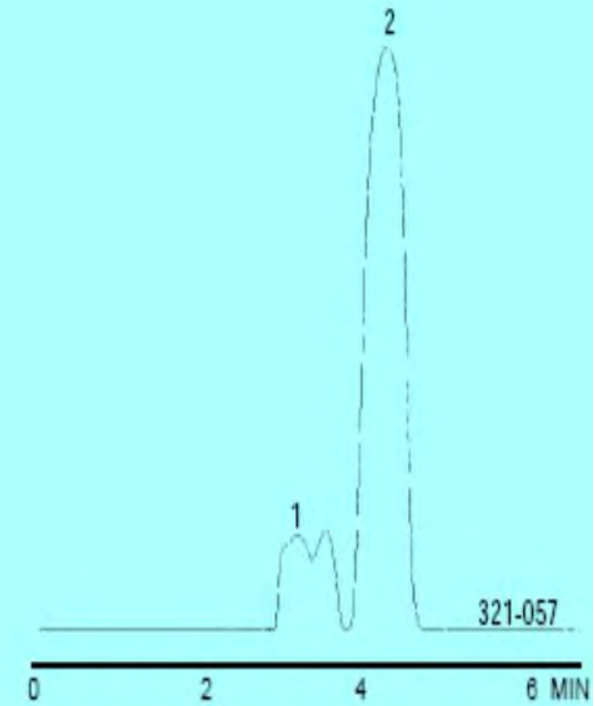
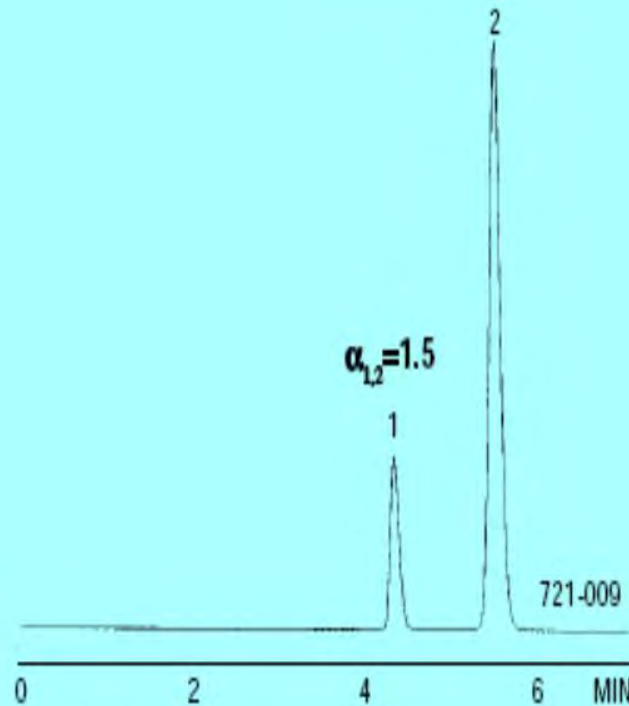
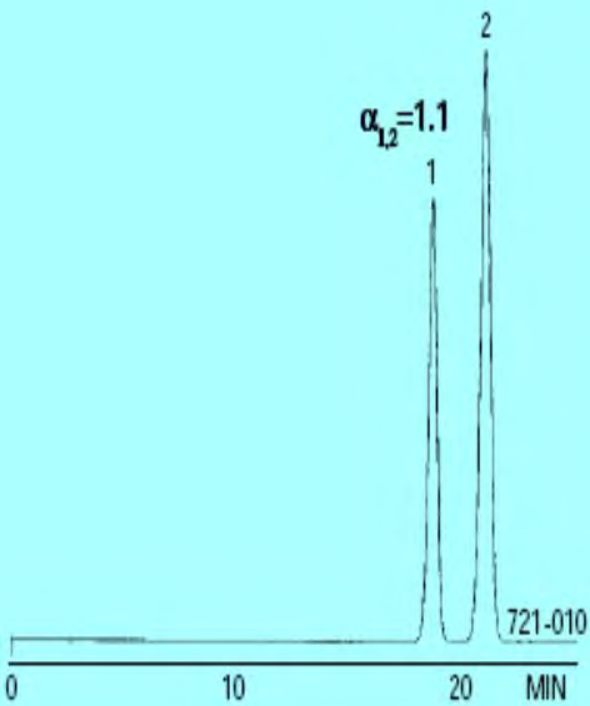
1. Ácido benzoico
2. Ácido sórbico

3. Condiciones: MeOH:agua 20:80 F=1 mL/min UV 235 nm

pH amortiguado de 3

pH amortiguado de 7

pH de 7 sin amortiguar



# Importancia del pH en fase reversa

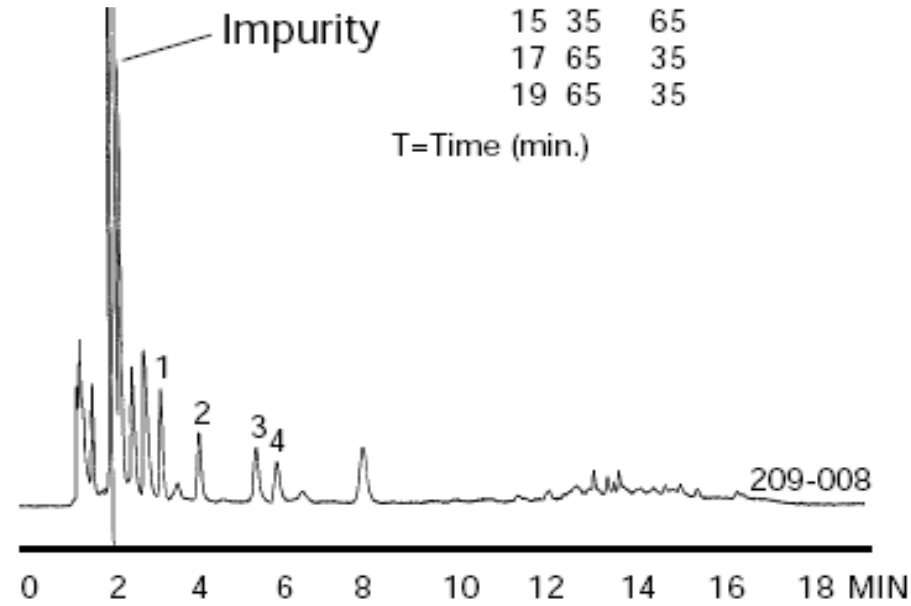
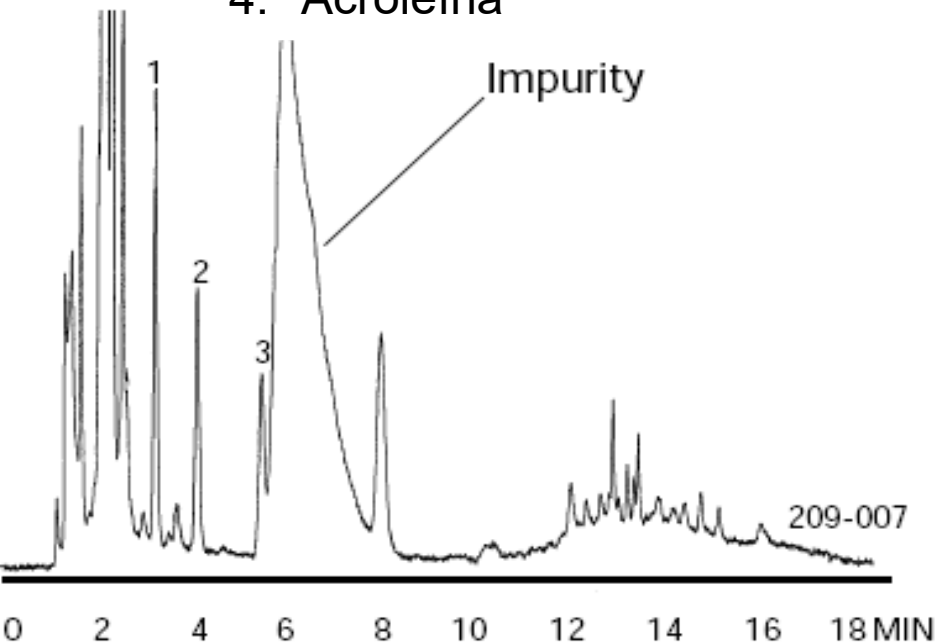
A: H<sub>2</sub>O/ACN

B: 0.05M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2.5/ACN

Muestra derivatizada con DNPH

1. Formaldehído
2. Acetaldehído
3. Acetona
4. Acroleína

Gradient:	I	%A	%B
	0	65	35
	8	65	35
	12	35	65
	15	35	65
	17	65	35
	19	65	35



T=Time (min.)

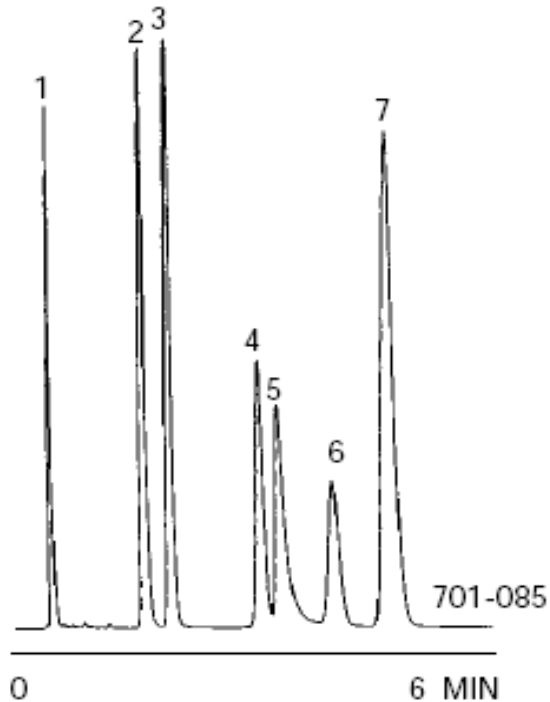
**Condiciones:**

1. Columna C18 4.6 x 150 mm 5 mm
2. F=1.5 mL/min
3. UV 365 nm

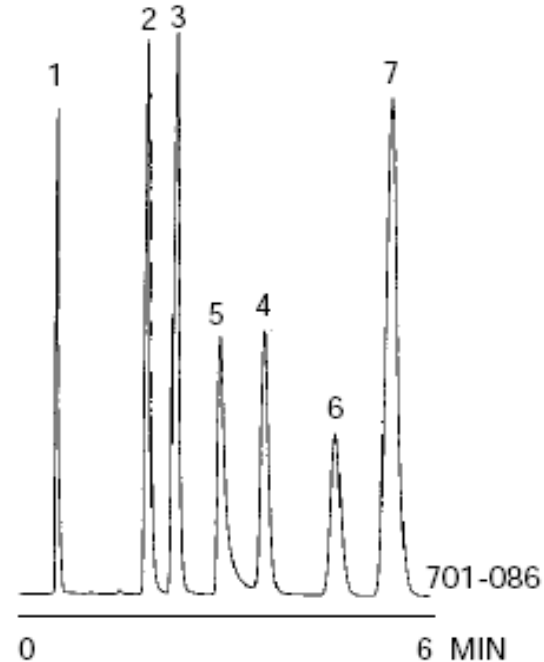
# Importancia del pH en fase reversa

1. Uracilo
2. Tolmetina
3. Naproxeno
4. Fenopropeno
5. Difunisal
6. Indometacina
7. Ibuprofeno

**A: pH 2.1**



**B: pH 2.5**



**Condiciones:**

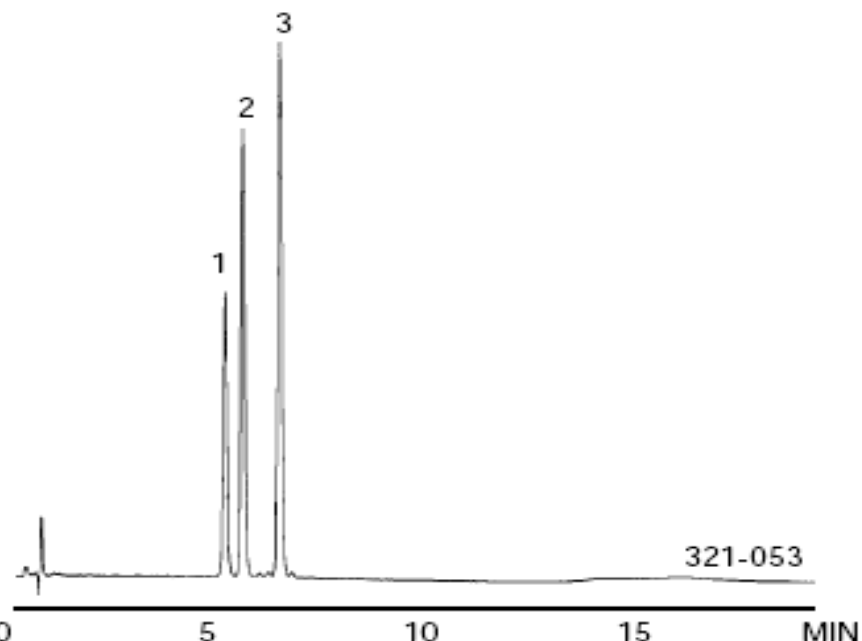
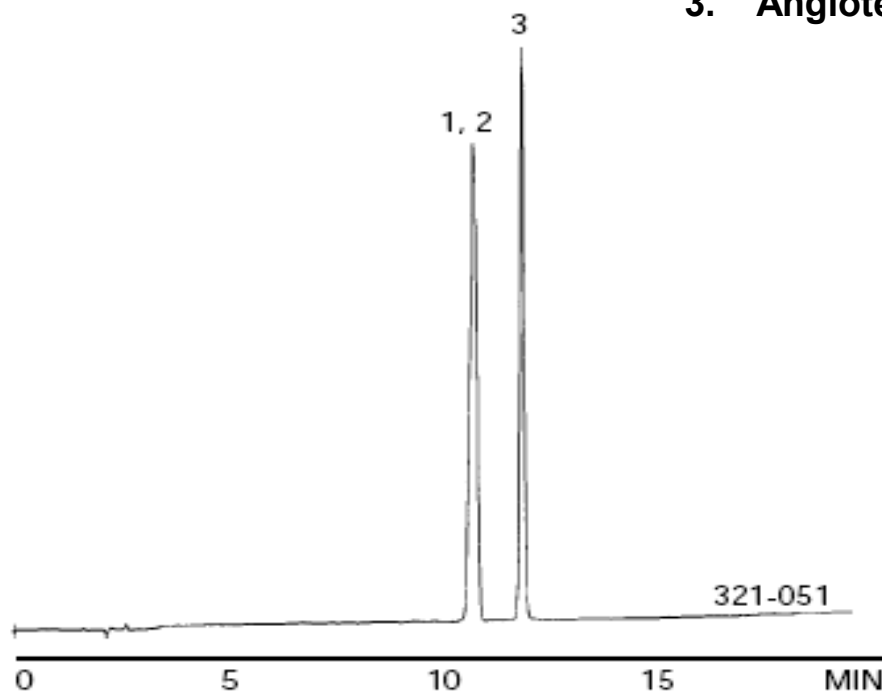
1. Columna C18 4.6 x 150 mm 5 mm
2. F=1.5 mL/min
3. UV 365 nm
4. AcN:amortiguador de fosfatos 50:50

# Importancia del pH en fase reversa

**A: 0.1% TFA (v/v)  
pH 2.0**

**B: 0.01% TFA (v/v)  
pH 2.4**

1. Angiotensina III
2. Angiotensina II
3. Angiotensina I



## Condiciones:

1. Columna C18 4.6 x 150 mm 5 mm
2. F=1.5 mL/min
3. UV 220 nm
4. Fase móvil: gradiente TFA en agua:TFA en AcN 10-50% en 20 min

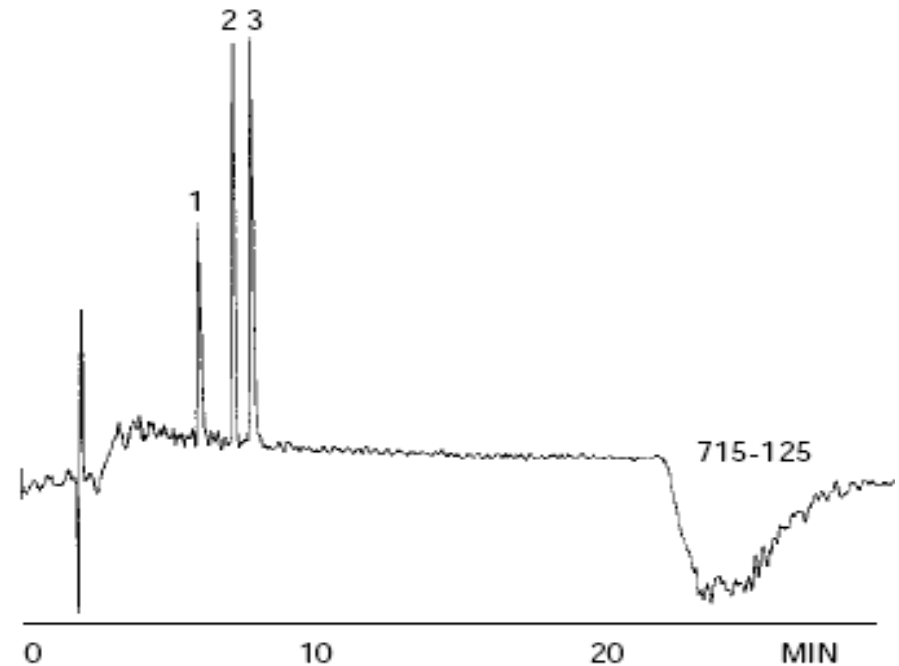
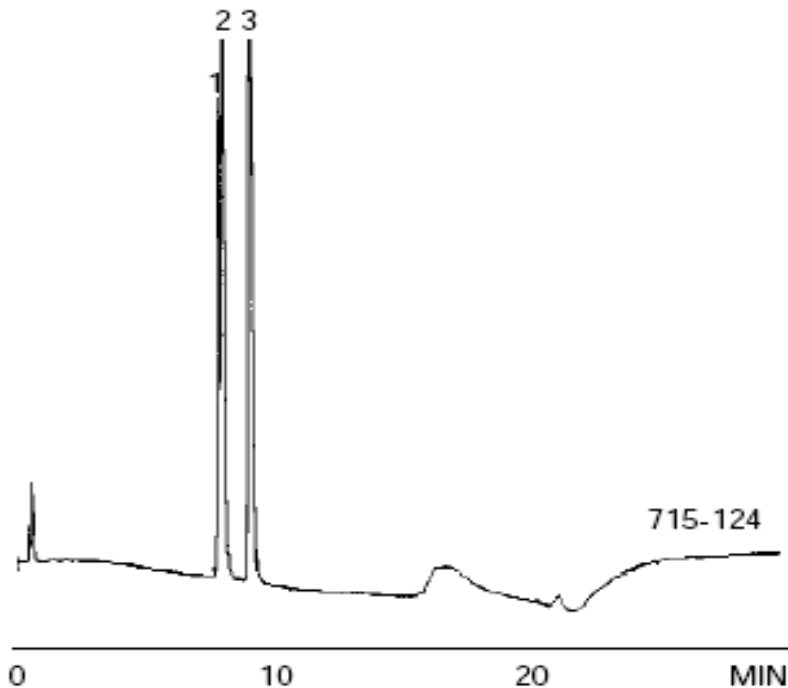


# Importancia del pH en fase reversa

**A: 0.01% TFA  
pH 2.4**

1. Angiotensina III
2. Angiotensina II
3. Angiotensina I

**B: 1.0% Acetic Acid  
pH 3.0**

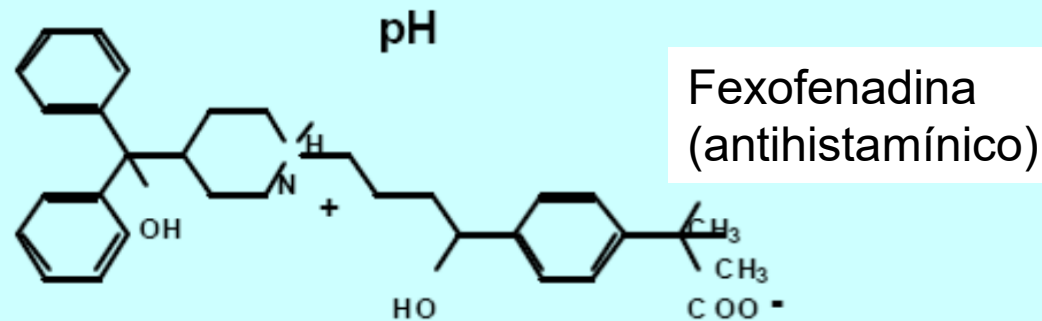
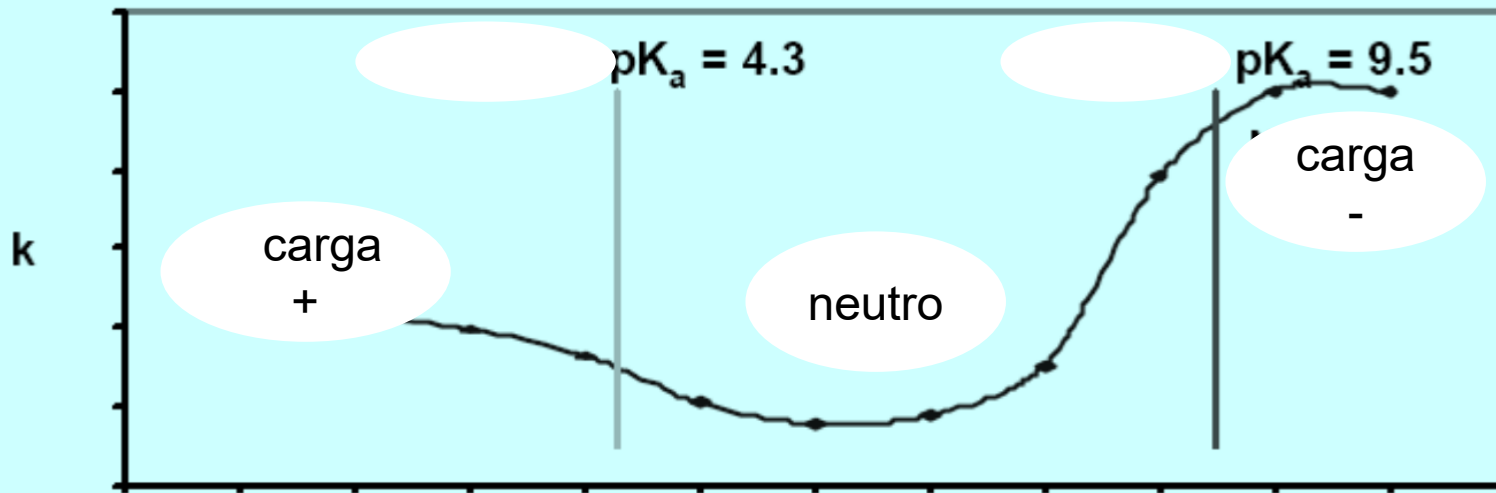


## Condiciones:

1. Columna C18 4.6 x 150 mm 5 mm
2. F=1.5 mL/min
3. UV 220 nm
4. Fase móvil: gradiente TFA en agua:TFA en AcN 10-50% en 20 min (A)
5. Fase móvil: gradiente AcH en agua:AcH en AcN 10-50% en 20 min (A)

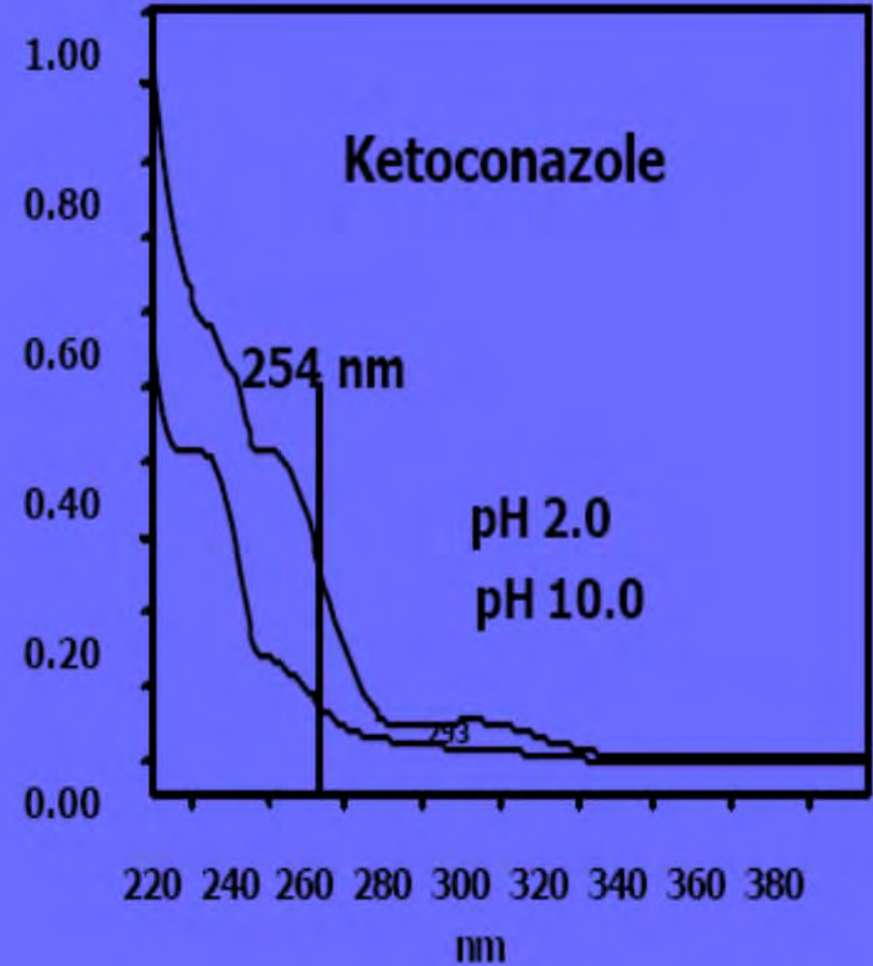
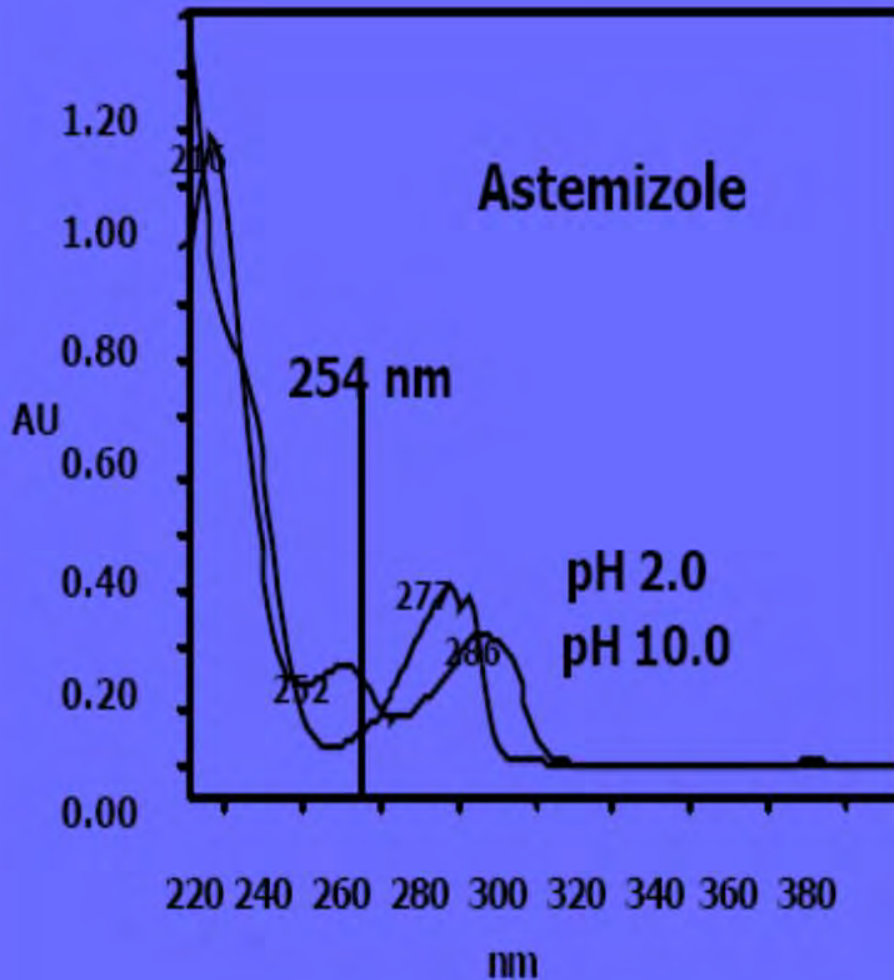
# Importancia del pH en fase reversa

Principio activo que es un anfólito

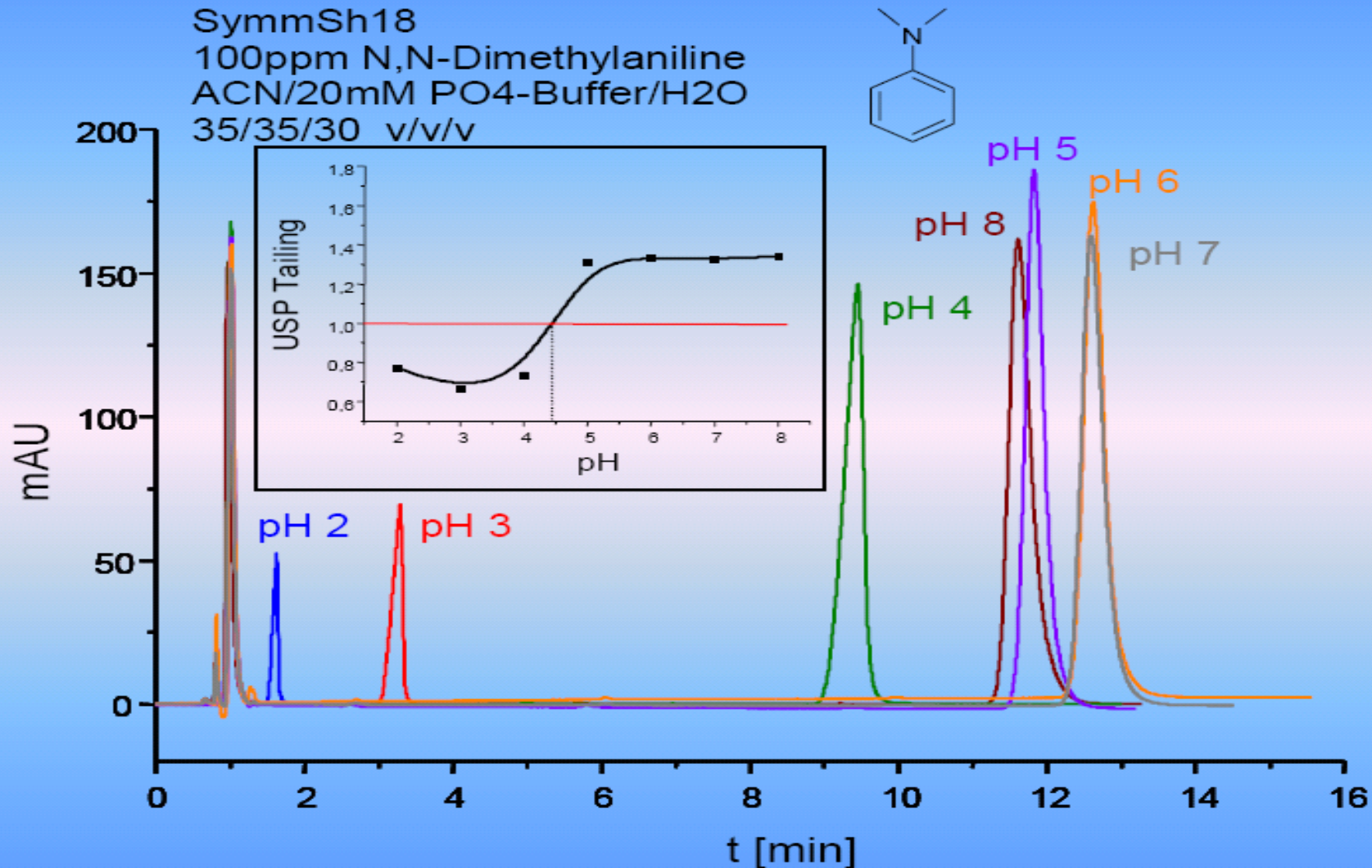


# Importancia del pH en fase reversa

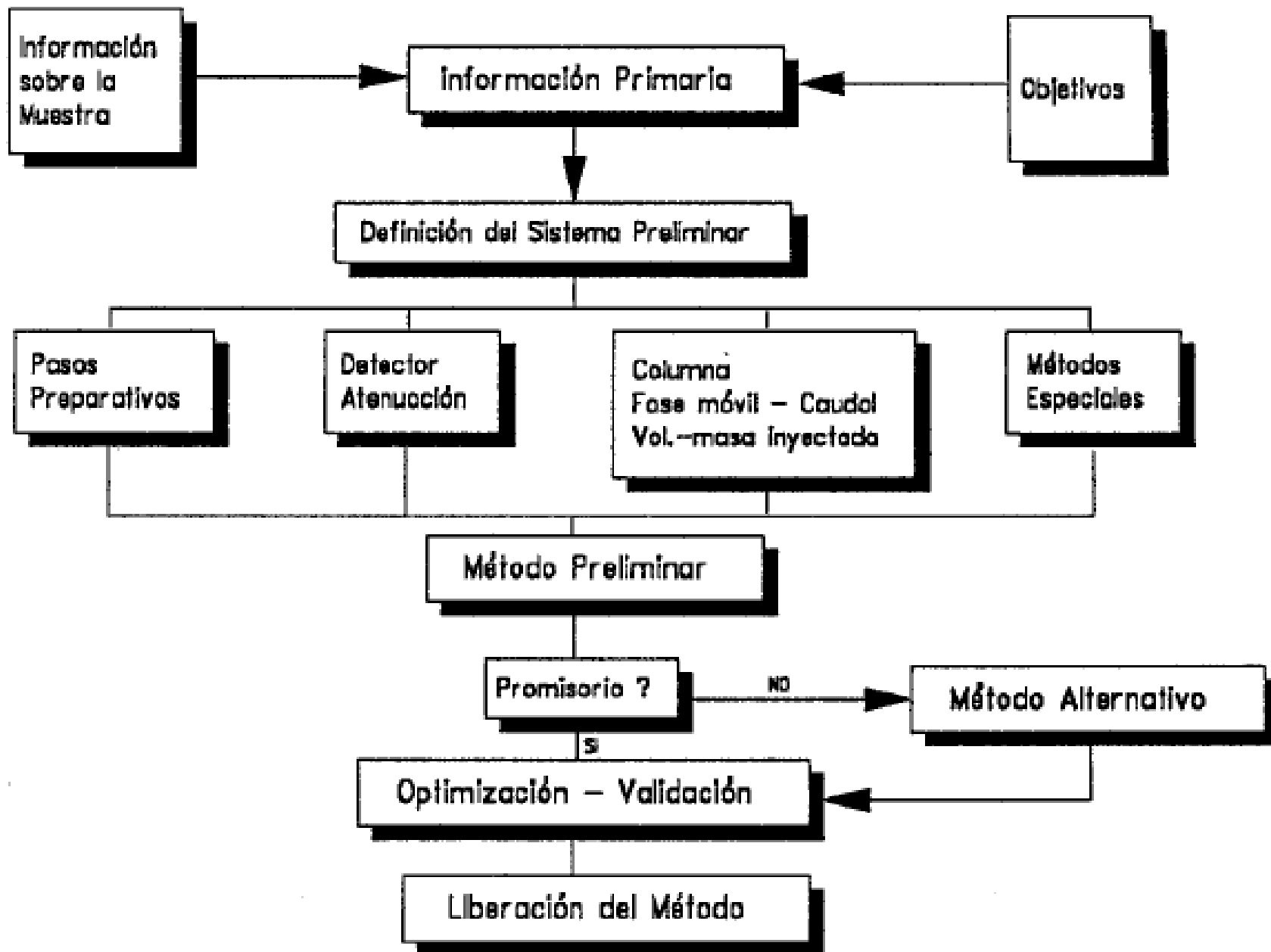
## Influencia del pH en la absorción



# Efecto del pH en la retención y asimetría.



# Bases del desarrollo de métodos



# Bases del desarrollo de métodos

¿Se requiere identificación o cuantificación?

¿Cual es el nivel presente (macro o microcomponentes)?

¿Cual es la precisión requerida?

¿Cuantos analitos se desea determinar?

¿Cuantas muestras se desea procesar?

# Bases del desarrollo de métodos

## Estrategias

### Incrementales (una variable )

#### **Ventajas**

- Control estricto
- Pocos experimentos

#### **Desventajas**

- El efecto puede no ser claro

### Estructurada (multivariable)

#### **Ventajas**

- Más control de muestras complejas
- Puede automatizarse

#### **Desventajas**

- Más experimentos
- Dificultad de interpretar resultados

# Bases del desarrollo de métodos

## Estrategias

### Temperatura vs fuerza de la fase móvil

#### Ventajas

- Fácil de manipular
- Se maneja robustez

#### Desventajas

- Se puede perder resolución
- Se pueden deformar los picos

### Tipo de fase móvil vs fuerza de fase móvil

#### Ventajas

- Manejo de 3 disolventes
- Cambio de selectividad

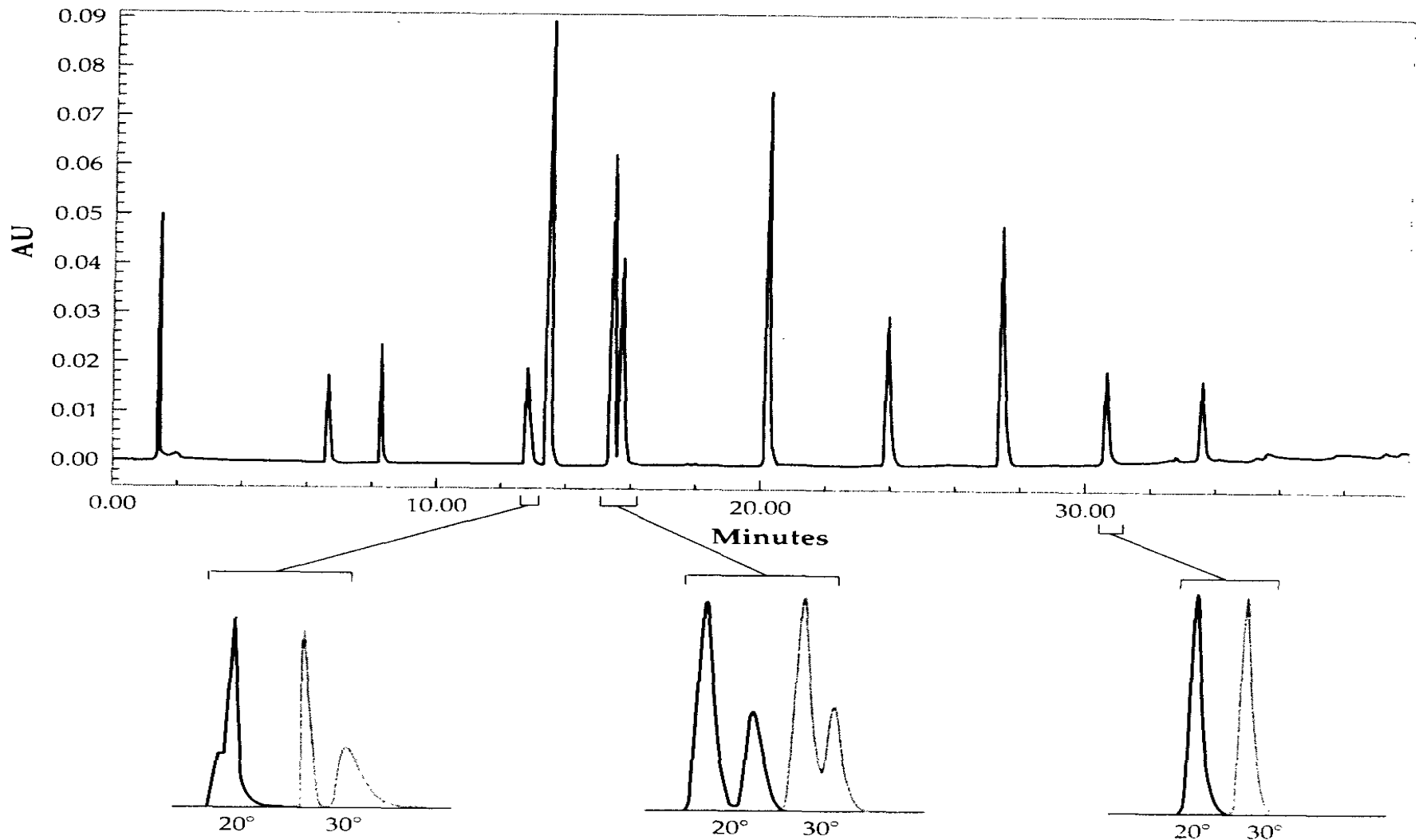
#### Desventajas

- Pérdida de selectividad



# Bases del desarrollo de métodos

## Efecto de la Temperatura



# Bases del desarrollo de métodos

## Estrategias

### pH vs fuerza de la fase móvil

#### Ventajas

- Útil para compuestos ionizables
- Utilización de pares iónicos
- Utilización de columnas en serie
- Se puede evaluar robustez

#### Desventajas

- No aplica a compuestos neutros o fácilmente hidrolizables

### pH vs concentración del amortiguador

#### Ventajas

- Efecto en CII

#### Desventajas

- Precipitación

# Bases del desarrollo de métodos

- 1. Definición de objetivos (10%).**
- 2. Condiciones cromatográficas iniciales (20%).**
- 3. Preparación de muestra (10 %).**
- 4. Estandarización (10 %).**
- 5. Optimización del método y robustez (20%).**
- 6. Validación del método (30%).**

# Bases del desarrollo de métodos

## 1. Definición de objetivos (10%).

**Método de análisis de componentes como materia prima, forma farmacéutica (proceso y terminada), estabilidad e impurezas.**

**.Sustancias relacionadas significativas y no significativas.**

**.Usualmente 3 sustancias deben ser elegidas .**

**.Tener en cuenta el parámetro de resolución.  $R \geq 2$ . LDC.**

**. Tiempo de análisis 3.5-10 minutos. (análisis rutinario).**

# Bases del desarrollo de métodos

## 2. Condiciones cromatográficas iniciales (20%).

**Propiedades de los analitos.  
(solubilidad, pka, estabilidad, absorción)**

**Uso de concentraciones altas para sustancias relacionadas y productos de degradación.**

**Revisión bibliográfica.**

**.Selección del tipo de análisis cromatográfico.**

**.Emplear una columna con previo uso.**

# Bases del desarrollo de métodos

## 3. Preparación de muestra (10 %).

**.Componentes de la matriz.  
(forma farmacéutica).**

**.Protocolo de extracción (ELL, EFS o EFSu)  
(Eficiencia de la extracción 90-100%)**

**.Selección del disolvente de la muestra  
(preferentemente la fase móvil)**

# Bases del desarrollo de métodos

## 4. Estandarización (10 %).

**Estándar externo.**

**Adición Estándar.**

**Estándar Interno.**

**Normalización.**

**.Sistema de cuantificación.**

**Directo o indirecto**

# Bases del desarrollo de métodos

## 5. Optimización del método y robustez (20%).

.Linealidad.

.Volumen de inyección.

.Robustez (cambios de las condiciones cromatográficas).

.**Condiciones HPLC:** %disolvente, pH, F,  $\lambda$ , columna.

.**Preparación de muestra:** pH, sonicación, fase extractiva.

.**Estandarización:** Integración,  $\lambda$ , tiempo de respuesta.



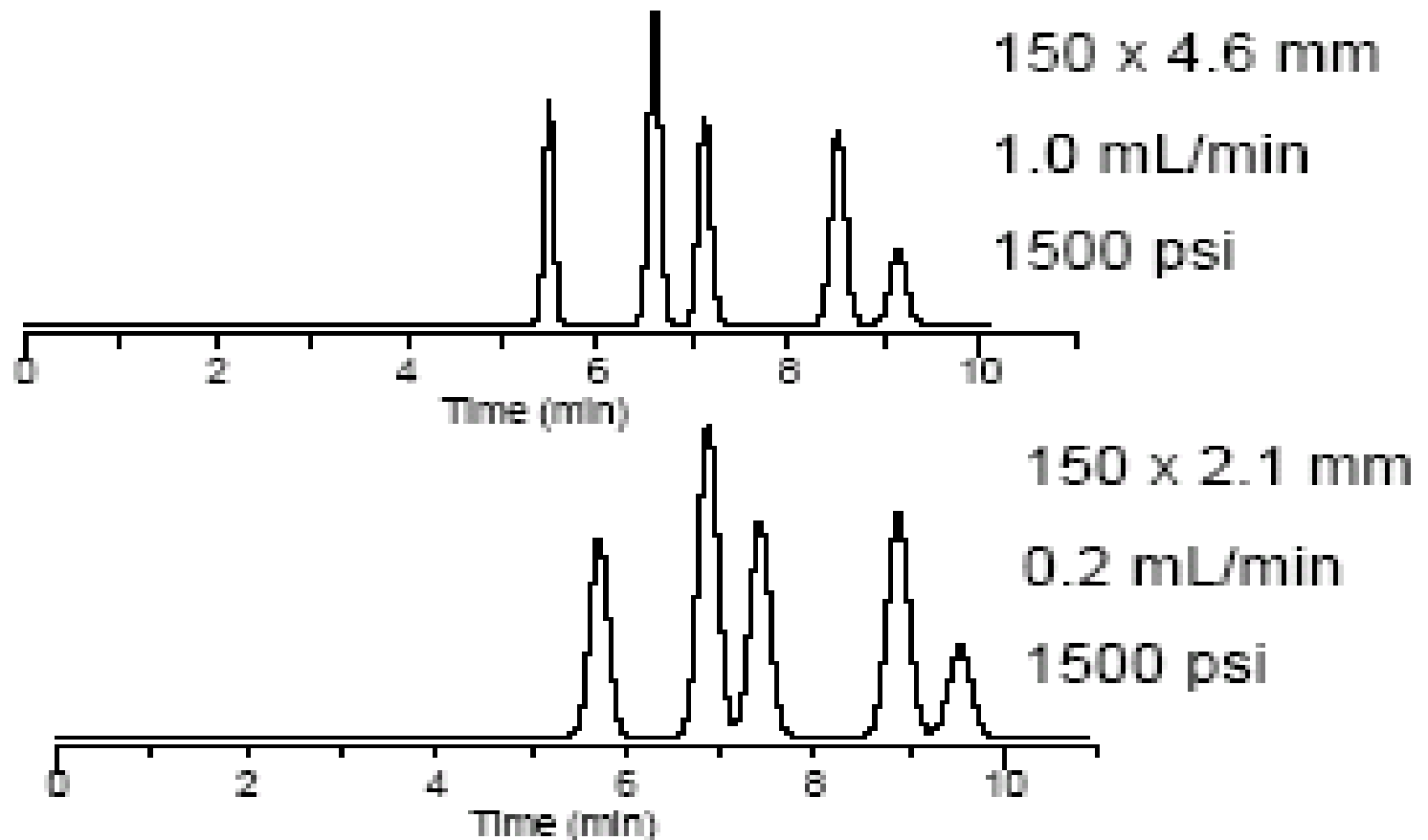
# Bases del desarrollo de métodos

## Efecto del cambio del diámetro de columna (mm)

- 4.6 a 4.0:
- $(2.3)^2 / (2)^2 = 5.29x=4$   **$x=0.75$**
  
- 4.0 a 3.0:
- $(2.0)^2 / (1.5)^2 = 4x=2.25$   **$x=0.56$**
  
- 4.6 a 3.0:
- $(2.3)^2 / (1.5)^2 = 5.29x= 2.25$   **$x=0.42$**
  
- 4.0 a 2.0:
- $(2.0)^2 / (1)^2 = 4x= 1$   **$x=0.25$**
  
- 4.6 a 2.1:
- $(2.1)^2 / (1.05)^2 = 5.29x= 1.1025$   **$x=0.20$**

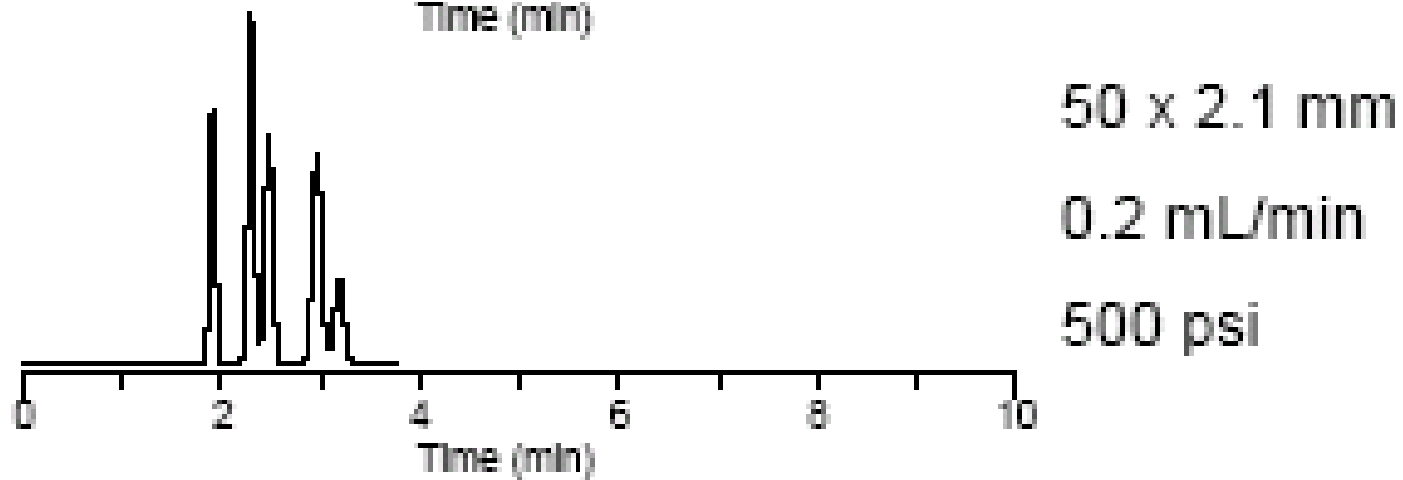
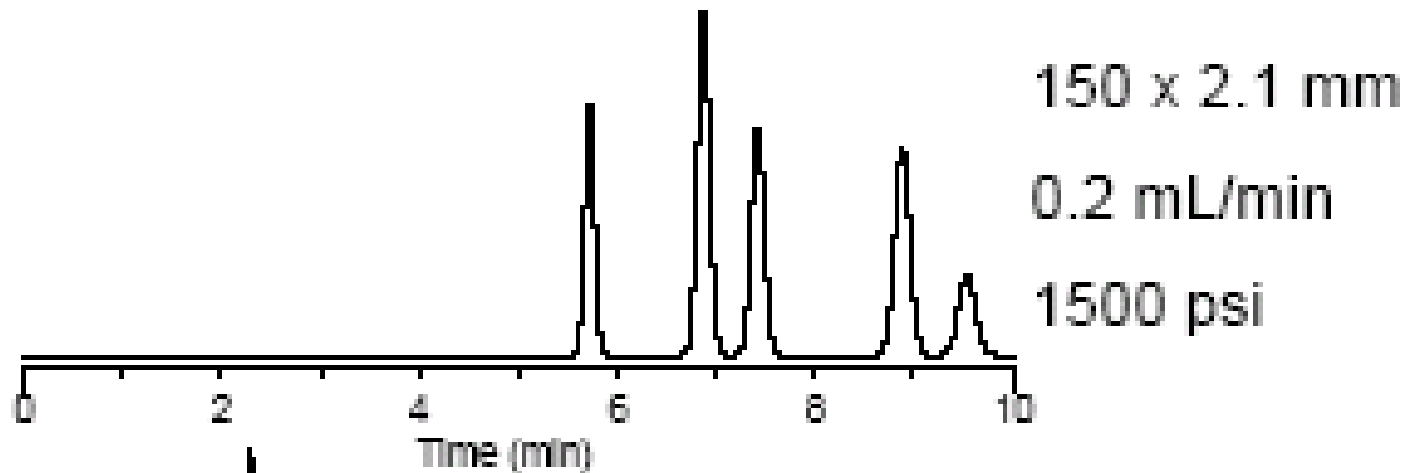
# Bases del desarrollo de métodos

## Efecto del cambio del diámetro de columna (mm)



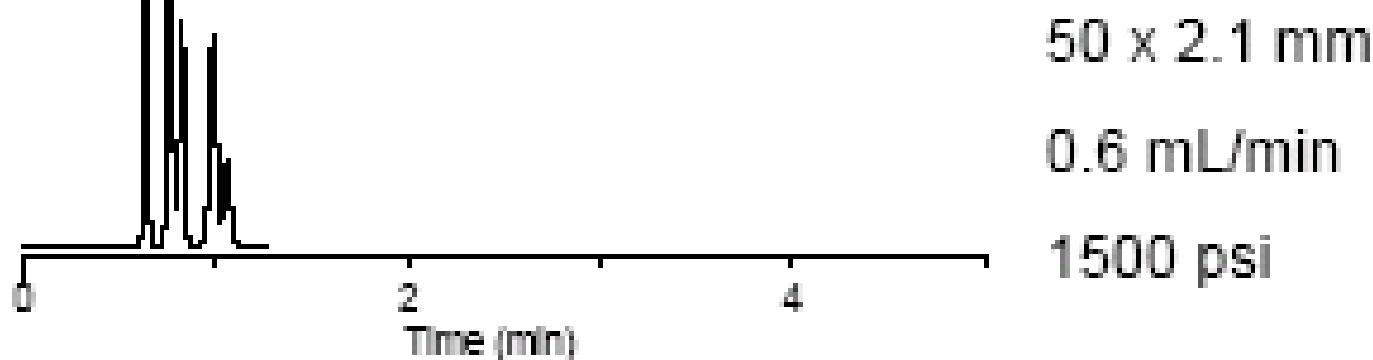
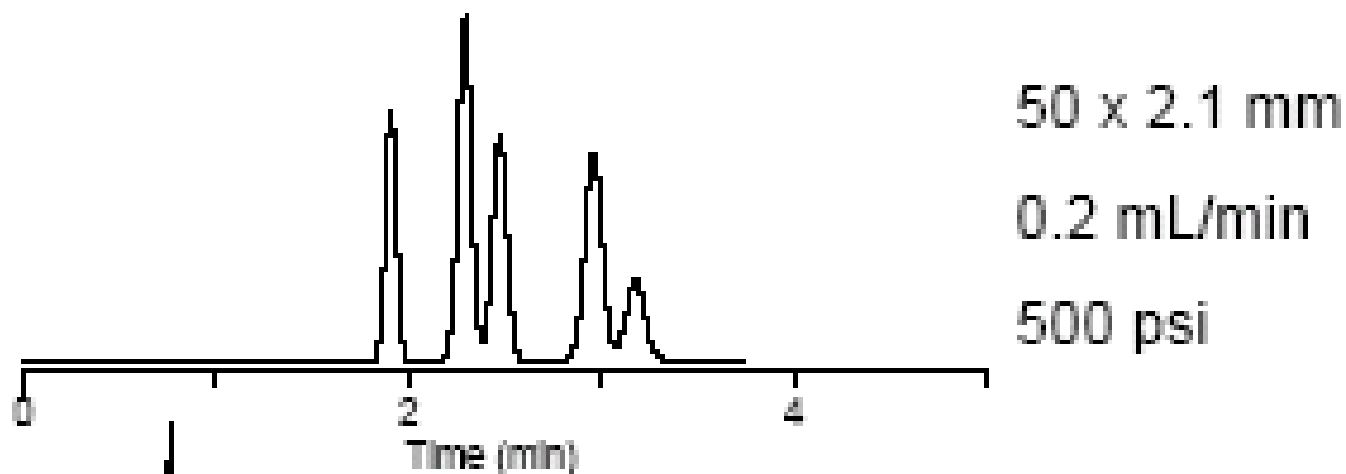
# Bases del desarrollo de métodos

## Efecto del cambio de la longitud de columna (cm)



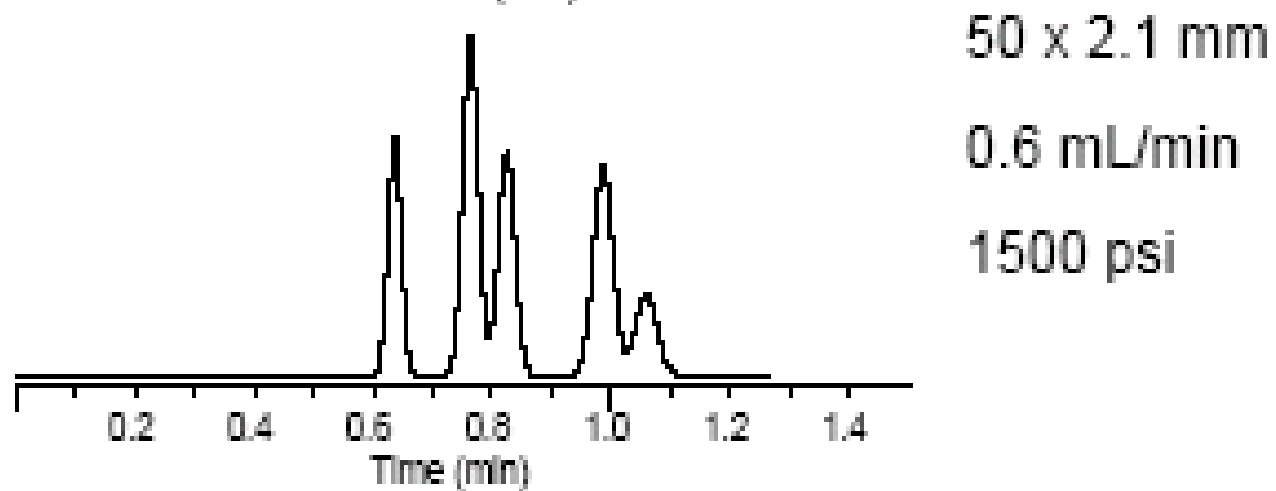
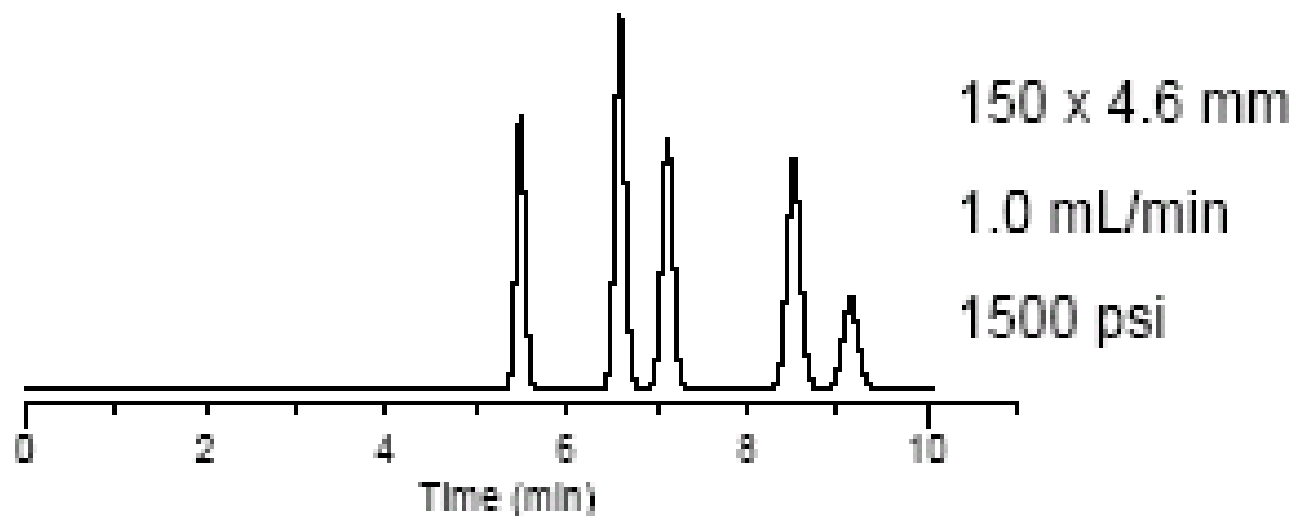
# Bases del desarrollo de métodos

## Efecto del cambio de F



# Bases del desarrollo de métodos

## Cambio final



# Bases del desarrollo de métodos

## **6 Validación del método (30%).**

**Calibración.**

**Verificación final.**

**Linealidad, exactitud, repetibilidad  
reproducibilidad, LDC LDD.**

**Adecuabilidad del sistema que viene del paso de  
optimización.**

# Bases del desarrollo de métodos

## Diferentes clases de ensayos analíticos

- Clase A: Para establecer identidad
- Clase B: Para detectar y cuantificar impurezas.
- Clase C: Para determinar cuantitativamente la concentración
- Clase D: Para evaluar las características

# Bases del desarrollo de métodos

<b>Característica</b>	A	B cuant.	B Ensayo límite	C	D
Exactitud		X		X	X
Precisión		X		X	X
Robustez	X	X	X	X	X
Linealidad		X		X	X
Especificidad	X	X	X	X	X
Límite de detección			X		
Límite de cuantificación		X			



# Bases del desarrollo de métodos

Parámetro	Métodos de Rutina				Métodos especiales		
	Valoración	Identidad	Pruebas límite	Cuantificación de impurezas	Indicativos de Estabilidad	Bioanalíticos	Perfil de Disolución
Especificidad/ Selectividad	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗
Linealidad	↗			↗	↗	↗	↗
Exactitud	↗			↗	↗	↗	↗
Precisión <ul style="list-style-type: none"> <li>• Repetibilidad</li> <li>• Intermedia</li> <li>• Reproducibilidad</li> </ul>	↗↗↗			↗	↗	↗	↗
Estabilidad de la muestra analítica	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗
Límite de detección			↗	↗	↗	↗	↗
Límite de Cuantificación			↗	↗	↗	↗	↗
Robustez	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗

↗ Deberá evaluarse el parámetro en cualquier aplicación.

↘ Deberá evaluarse el parámetro si la aplicación del método lo requiere.

# Bases del desarrollo de métodos

<b>Fuerza del disolvente de muestra</b>	<b>Volumen</b>
<b>100 % disolvente fuerte</b>	<b><math>\leq 10 \mu\text{L}</math></b>
<b>Más fuerte que la fase móvil</b>	<b><math>\leq 25 \mu\text{L}</math></b>
<b>Fase móvil</b>	<b><math>\leq 20\%</math> volumen del pico</b>
<b>100% disolvente débil</b>	<b>50 -100 <math>\mu\text{L}</math></b>

# Bases del desarrollo de métodos

- **Seleccionar la técnica cromatográfica**

**pH de trabajo: analitos iónizables y/o neutros.**

- **Isocrático vs Gradiente**

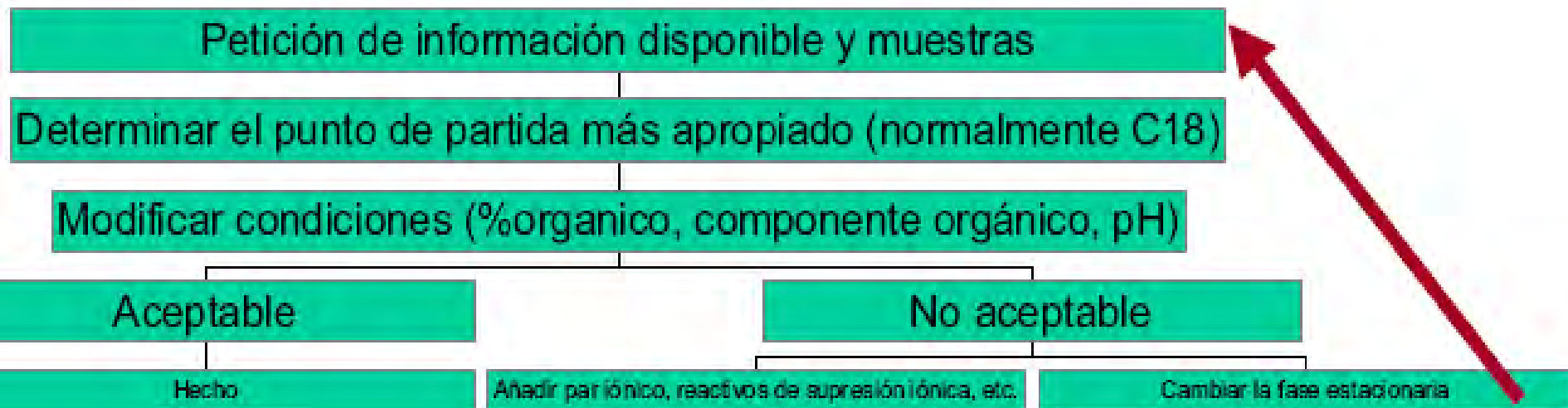
- **Tipo de gradiente: lineal o escalonado.**

- **Concentración y composición de fase móvil: fuerza y control de pH.**

- **Concentración de analitos: forma del pico.**

# Bases del desarrollo de métodos

## Acelerar el proceso de desarrollo de método

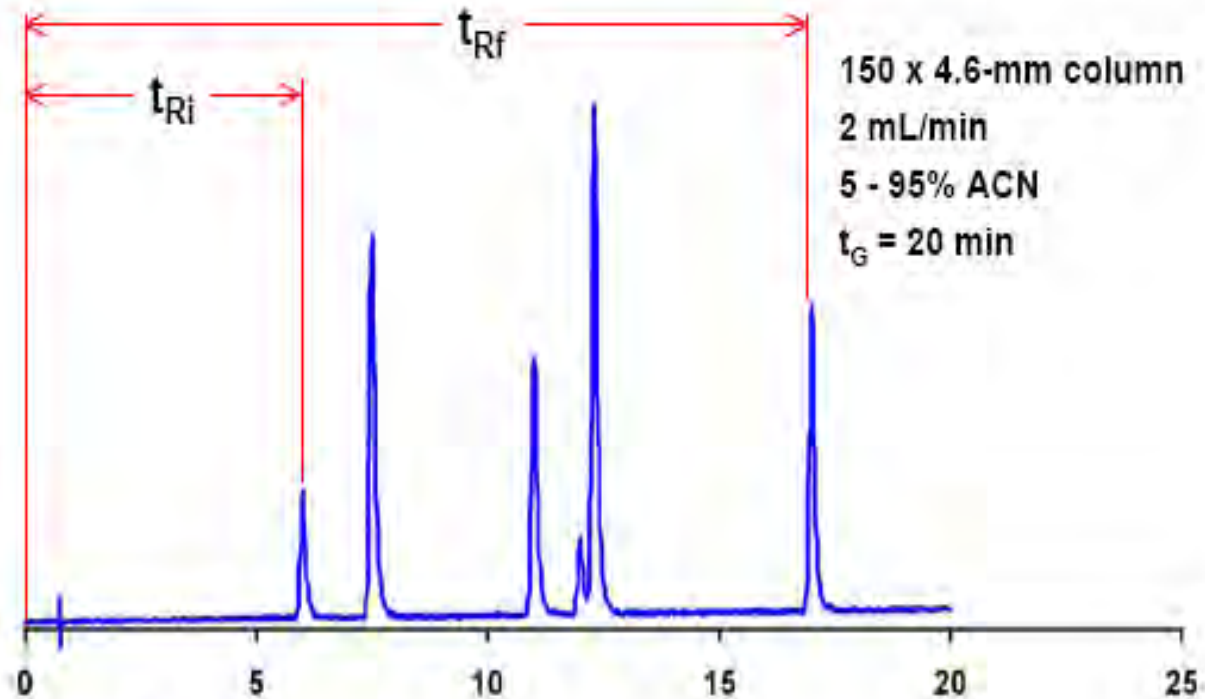


A menudo es una elección pobre

- **Elución por gradiente**

# Desarrollo

## Isocrático o gradiente



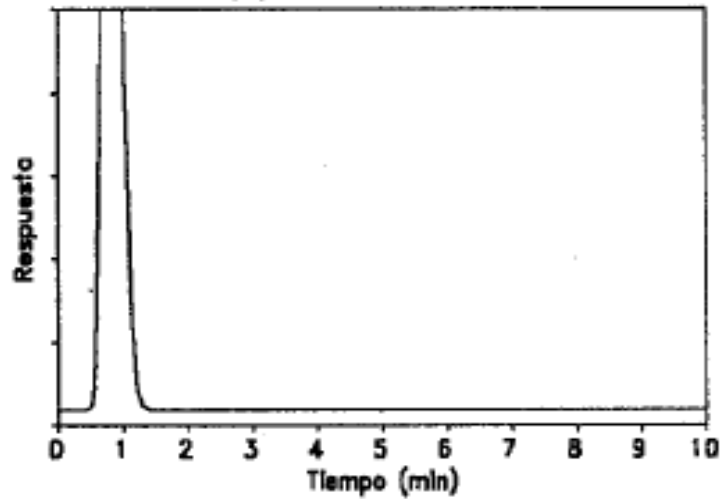
$$\Delta t_R = (t_{Rf} - t_{Ri})$$

$$\Delta t_R / t_G \leq 0.25 \rightarrow \text{isocratic}$$

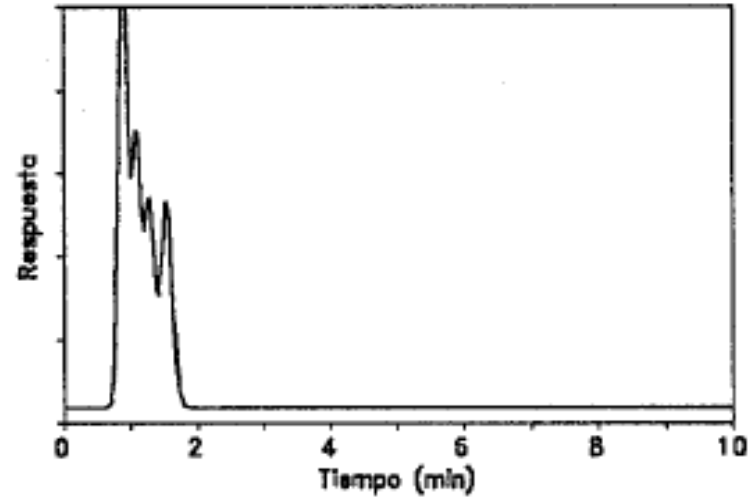
$$\Delta t_R / t_G \geq 0.40 \rightarrow \text{gradient}$$

# Desarrollo

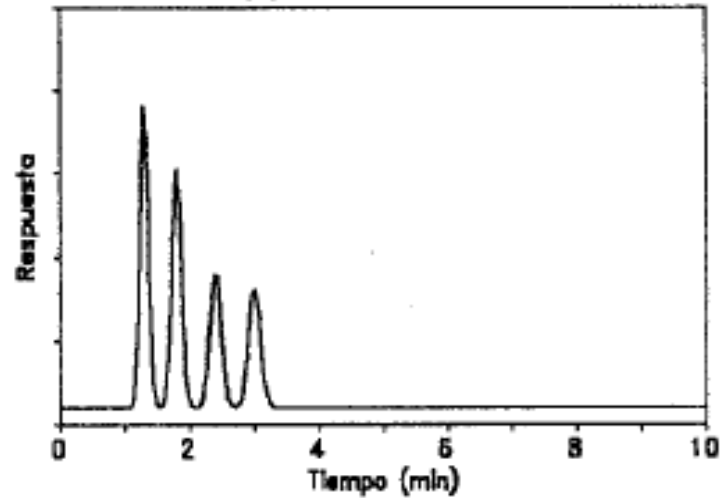
(a) 100% acetonitrilo



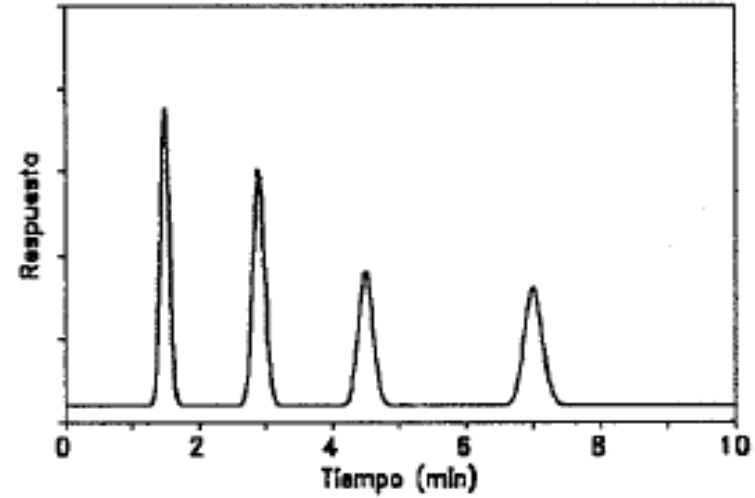
(b) 80% acetonitrilo



(c) 60% acetonitrilo



(d) 40% acetonitrilo



# Selección del tiempo de gradiente

$$k^* \approx \frac{t_G}{\Delta\Phi} \frac{F}{V_m} \frac{1}{S}$$

$$t_G \approx \frac{S k^* \Delta\Phi V_m}{F}$$

$$t_G \approx 25 \Delta\Phi V_m / F$$

Ejemplo:

Cual será el tiempo para un gradiente desde una composición del 5 al 100% en una columna de 4.6 x 150 mm a un flujo de 2 mL/min

$$V_m = 1.5$$

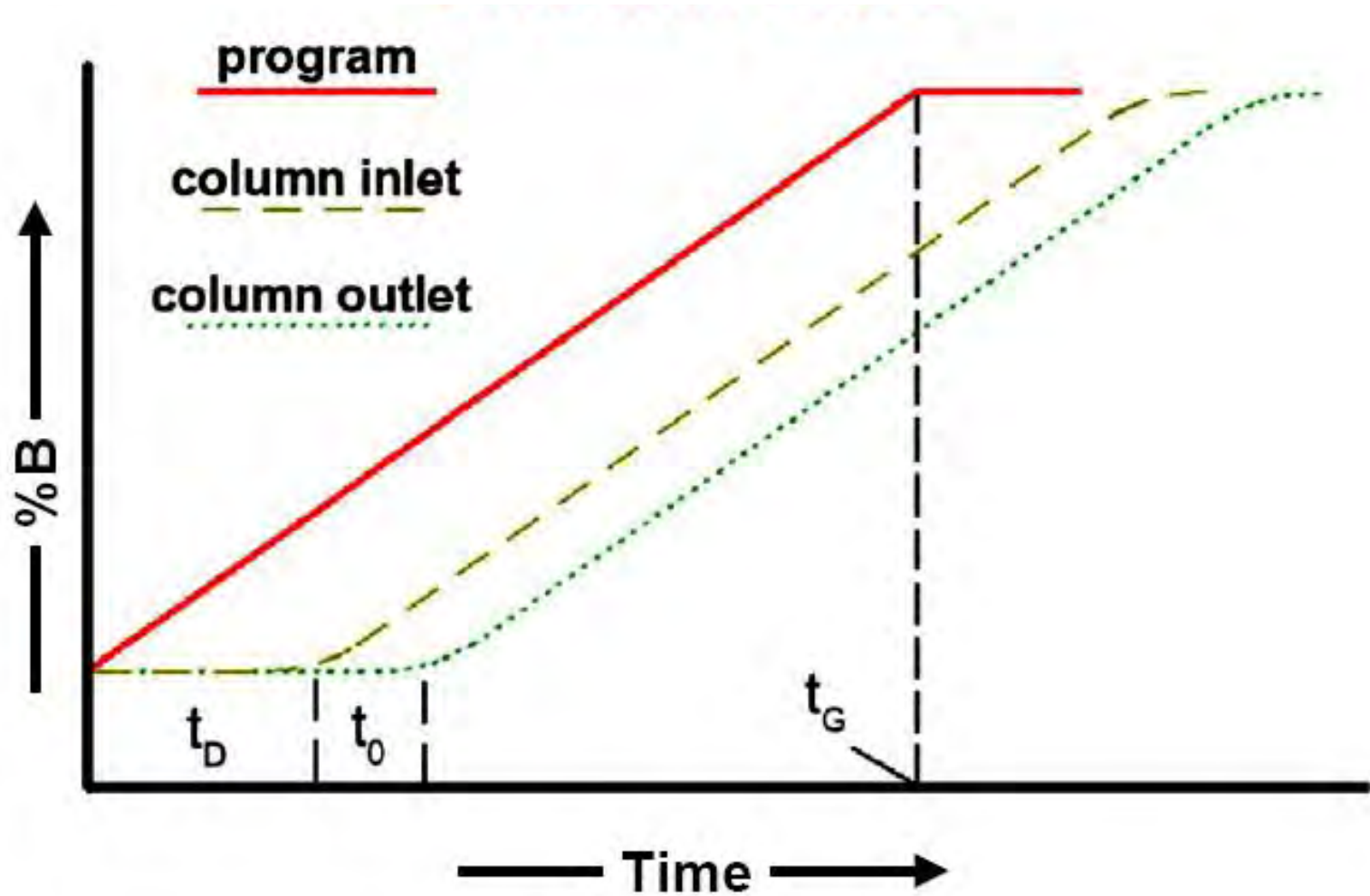
$$F = 2$$

$$\Delta\Phi = 0.95$$

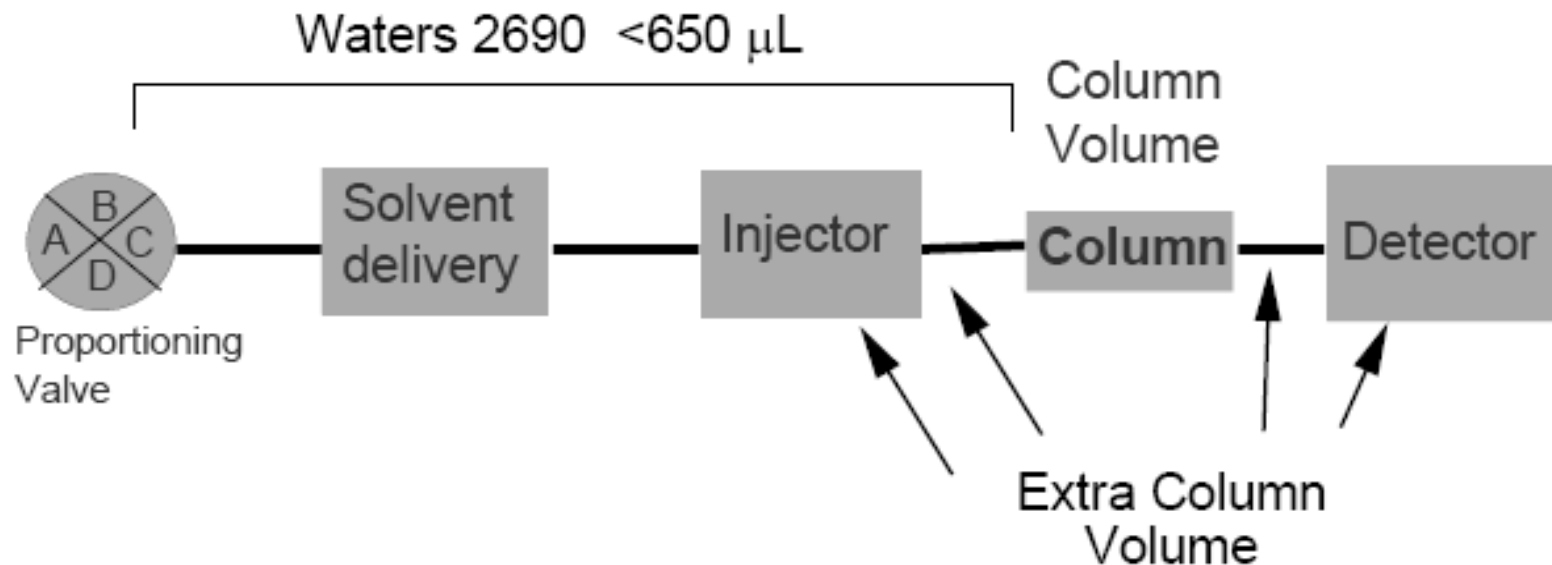
$$t_G \approx (25) (0.95) (1.5) / (2) \approx 20 \text{ min}$$



# Perfiles de gradiente

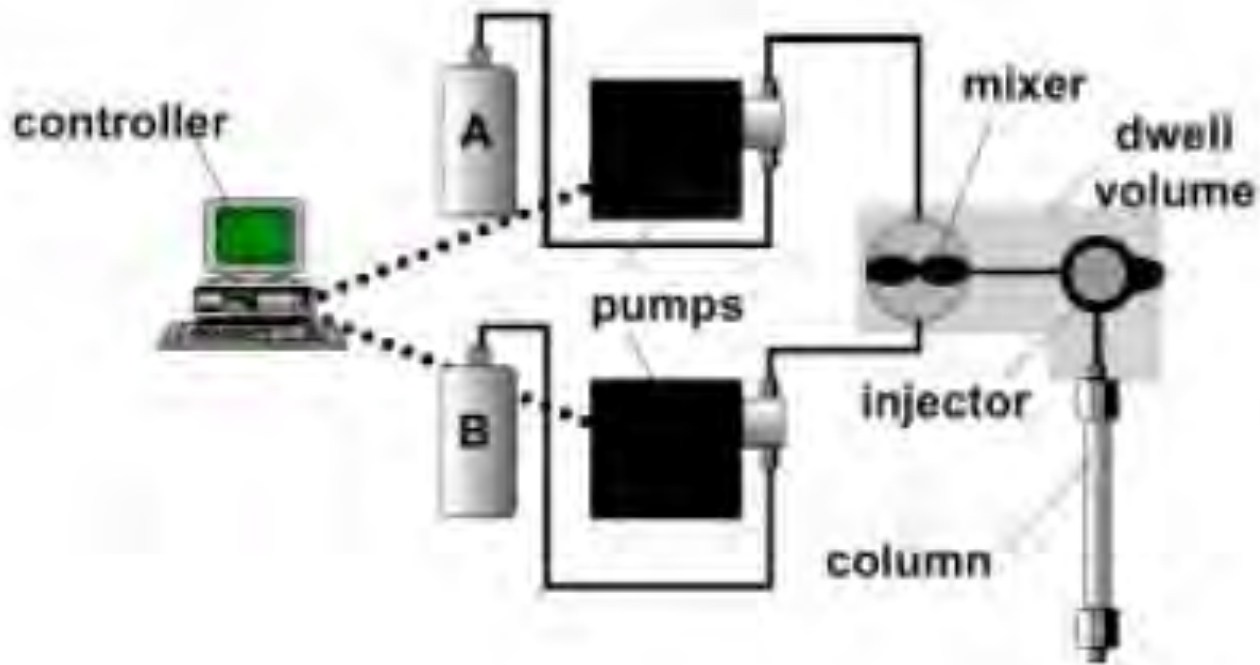


# Volumen de retardo



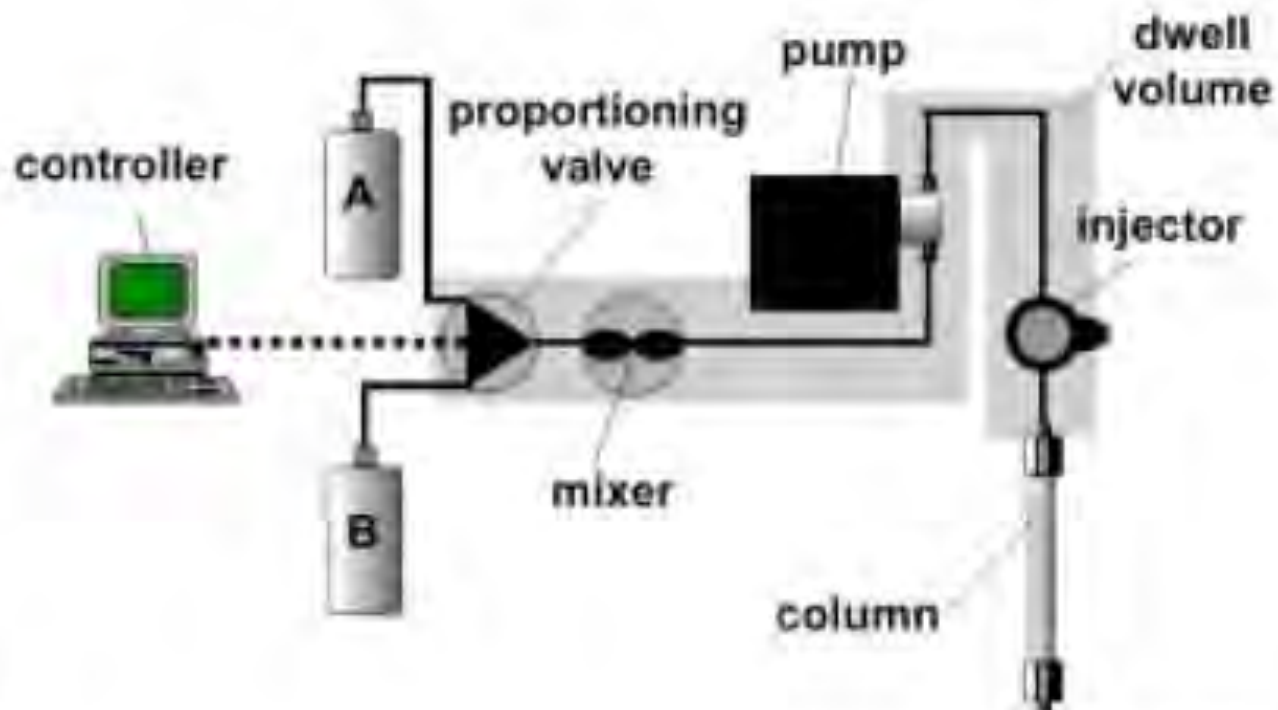
# Volumen de retardo

## Sistema de alta presión



# Volumen de retardo

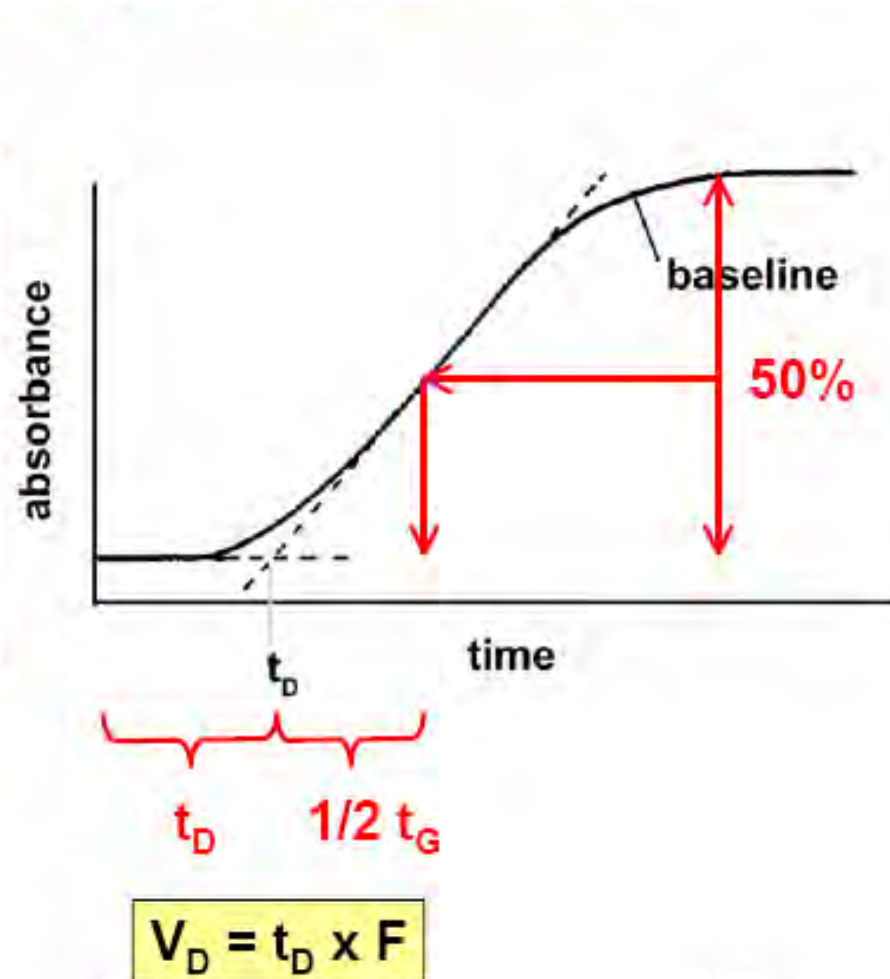
## Sistema de baja presión



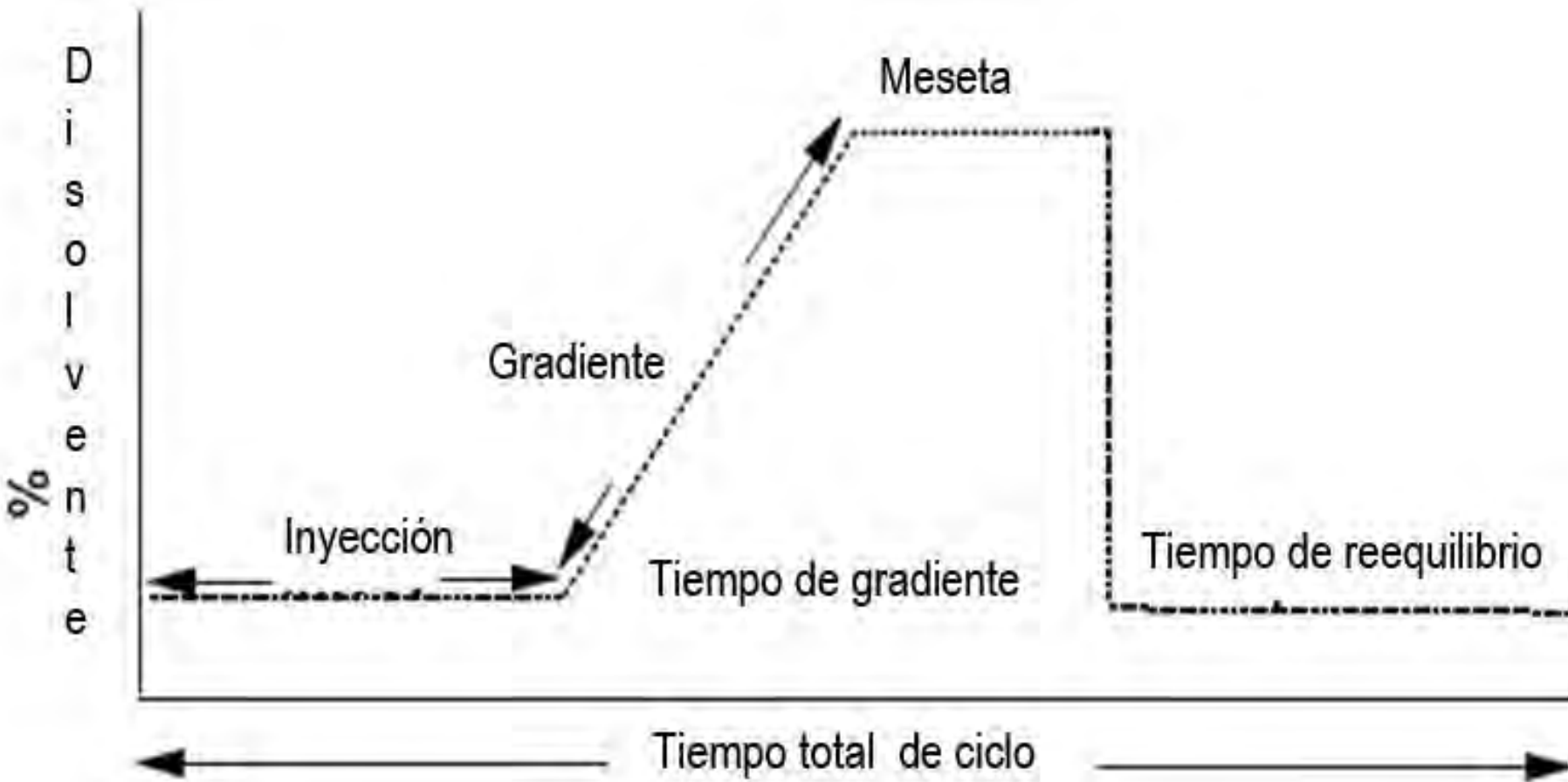
# Desarrollo

## Medición del volumen de retardo

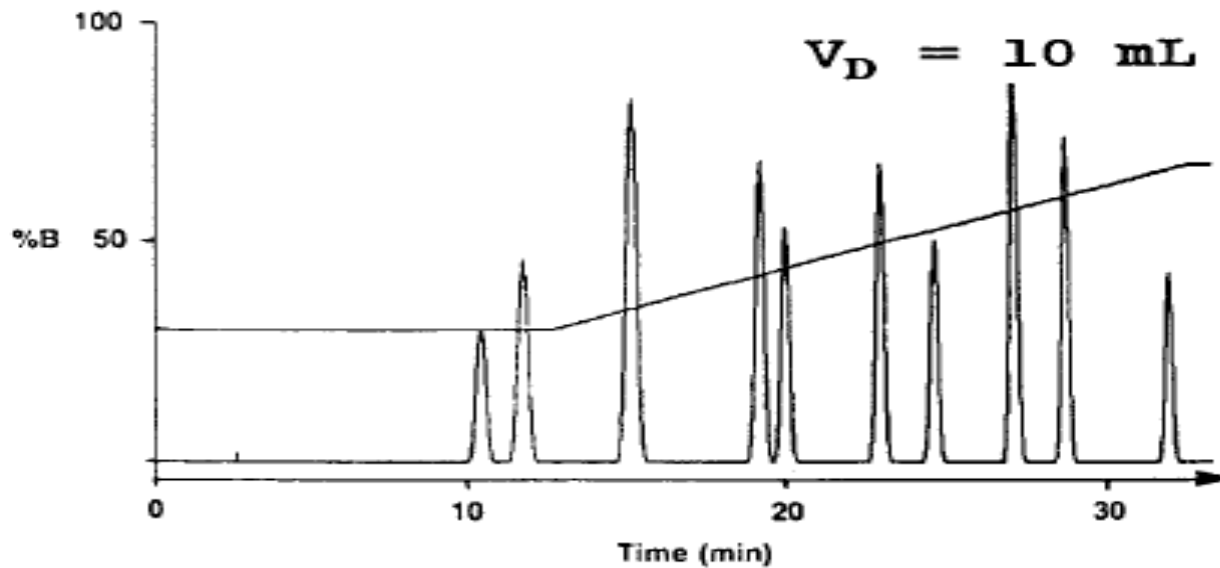
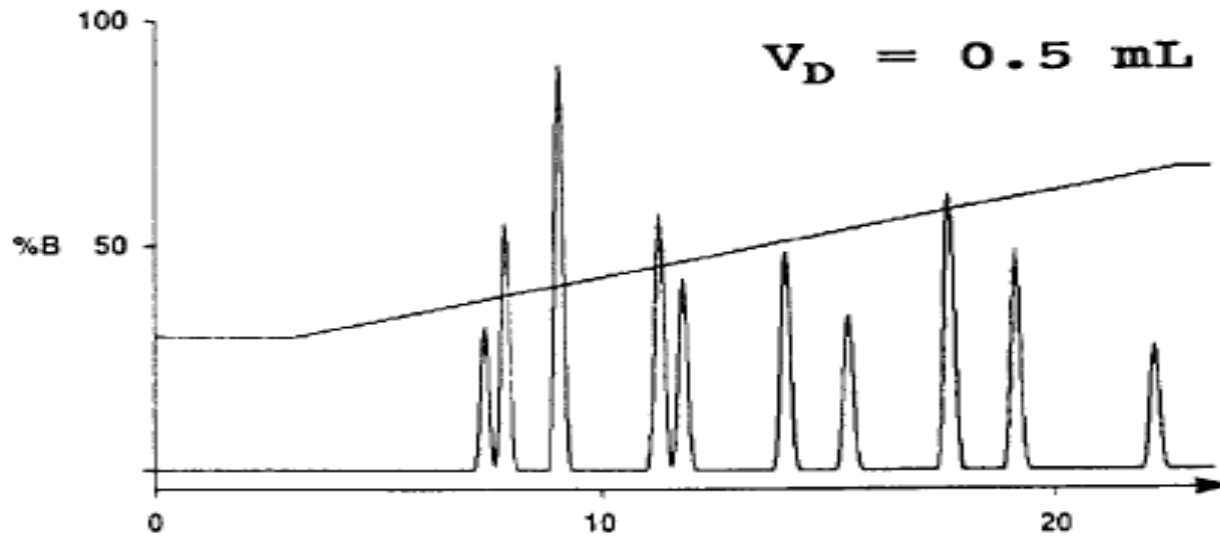
- Sin columna
- A= agua
- B= 0.1% de acetona/agua
- 265 nm
- 0-100% 20 min
- 2 mL/min



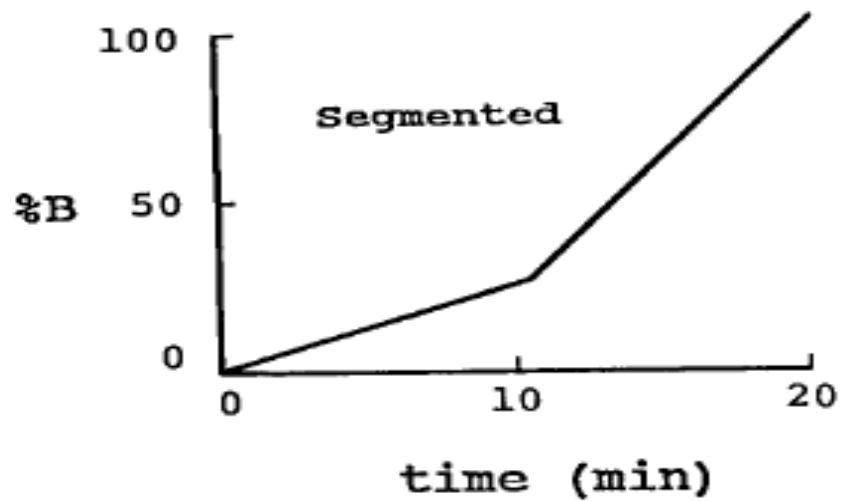
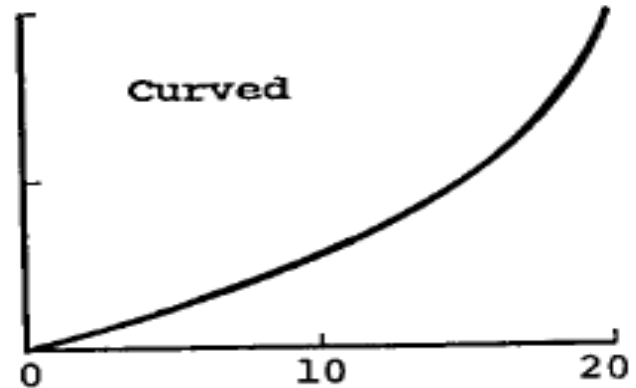
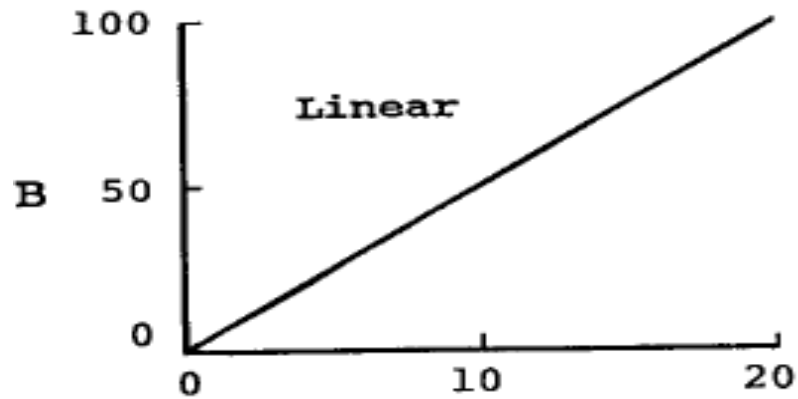
# REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE UN ANÁLISIS



# VOLUMEN DE RETARDO



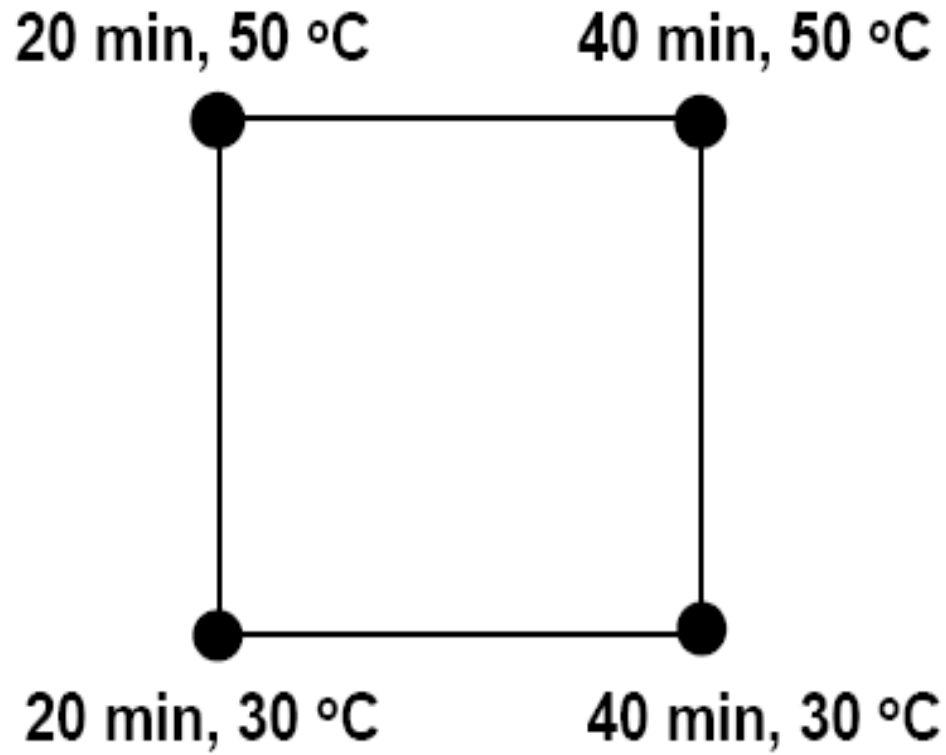
# REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE UN ANÁLISIS POR GRADIENTE





# Desarrollo

## Optimización de temperatura y tiempo de gradiente

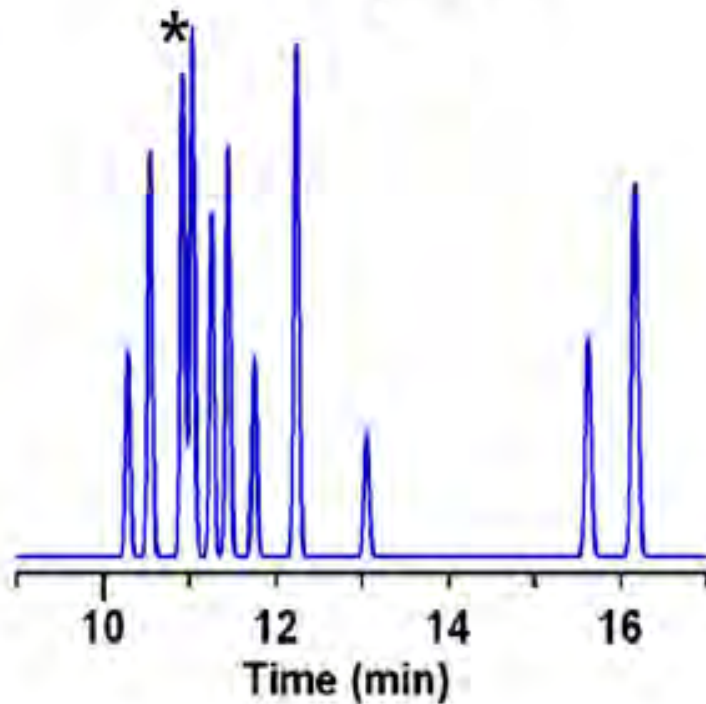


# Desarrollo

## Cuantificación de testosterona

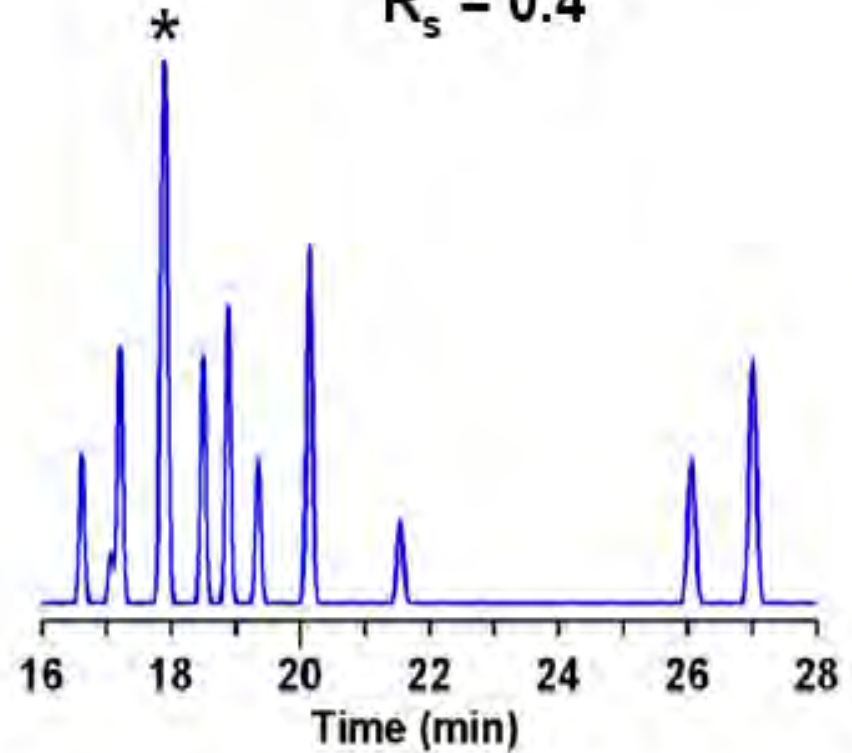
0-80% B in 20 min, 30°

$R_s = 0.2$



0-80% B in 40 min, 30°

$R_s = 0.4$

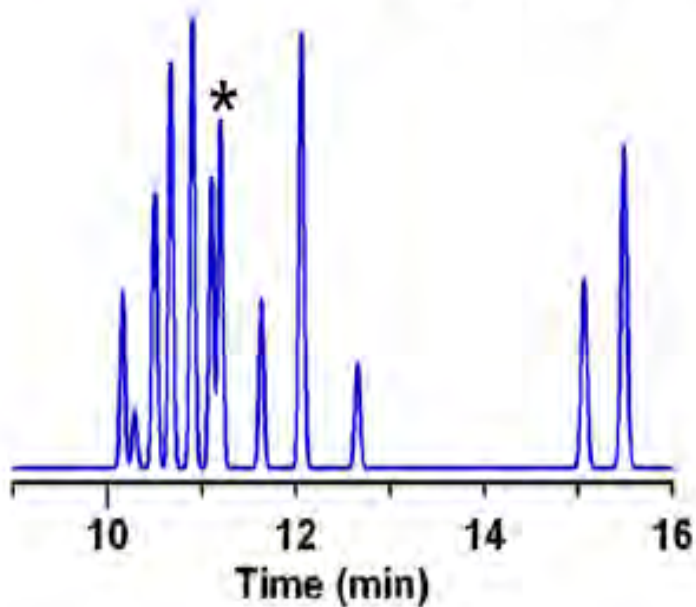


# Desarrollo

## Cuantificación de testosterona

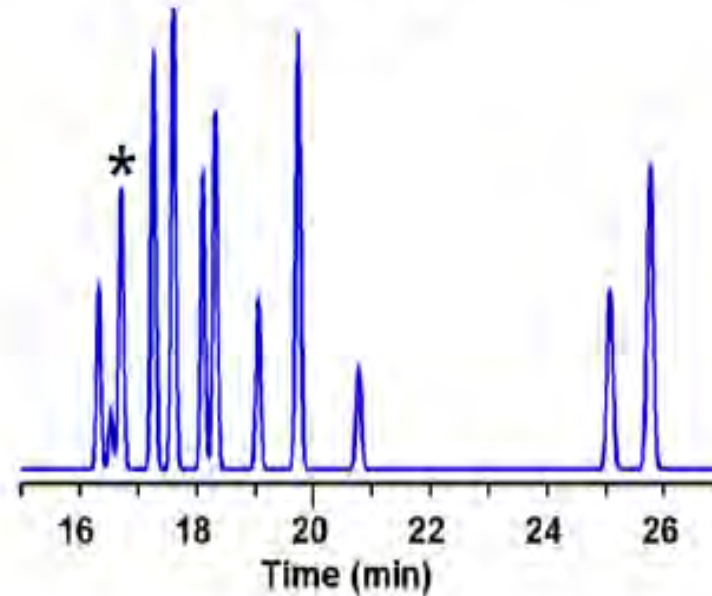
0-80% B in 20 min, 50°

$R_s = 1.0$



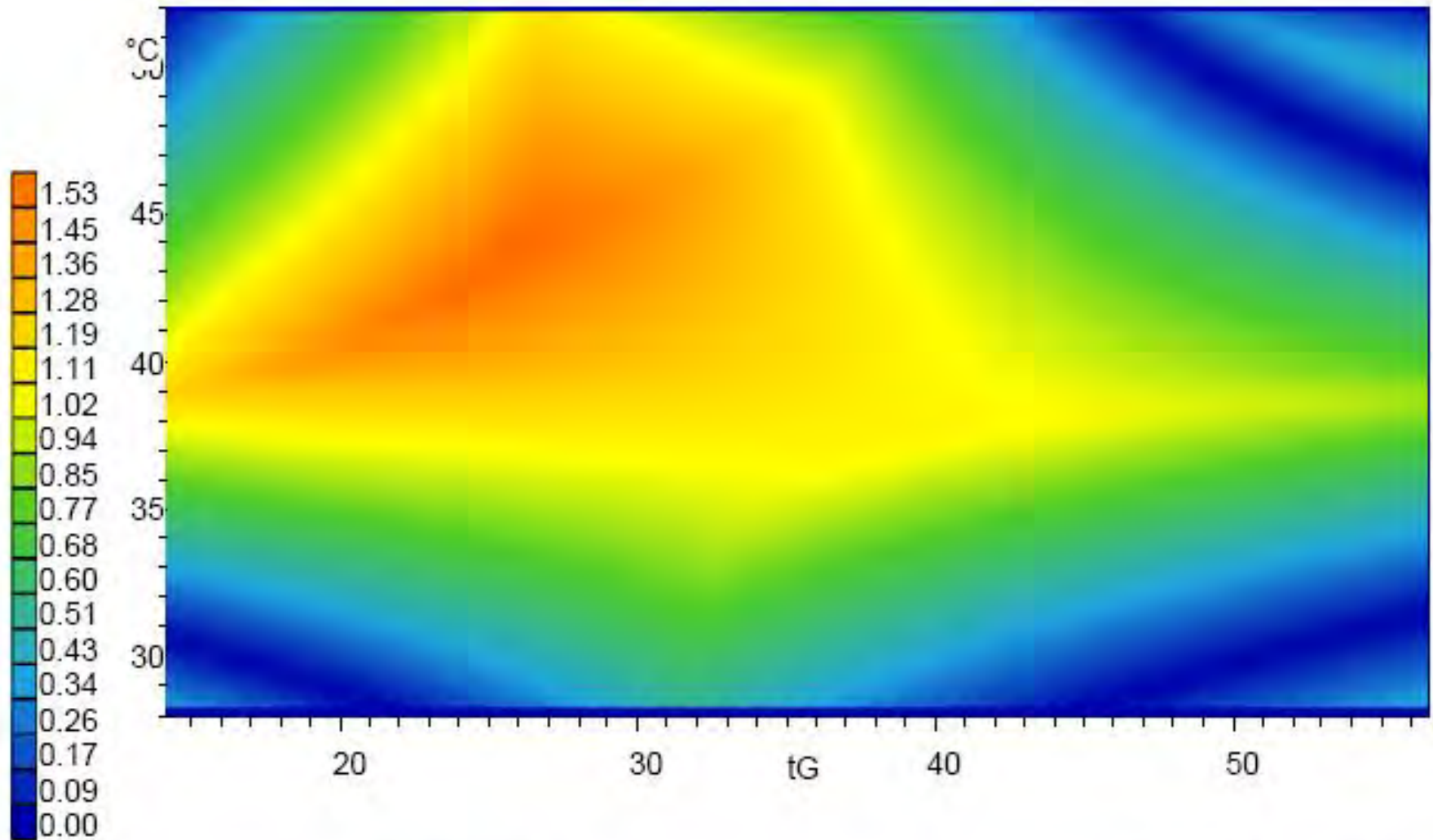
0-80% B in 40 min, 50°

$R_s = 1.2$



# Desarrollo

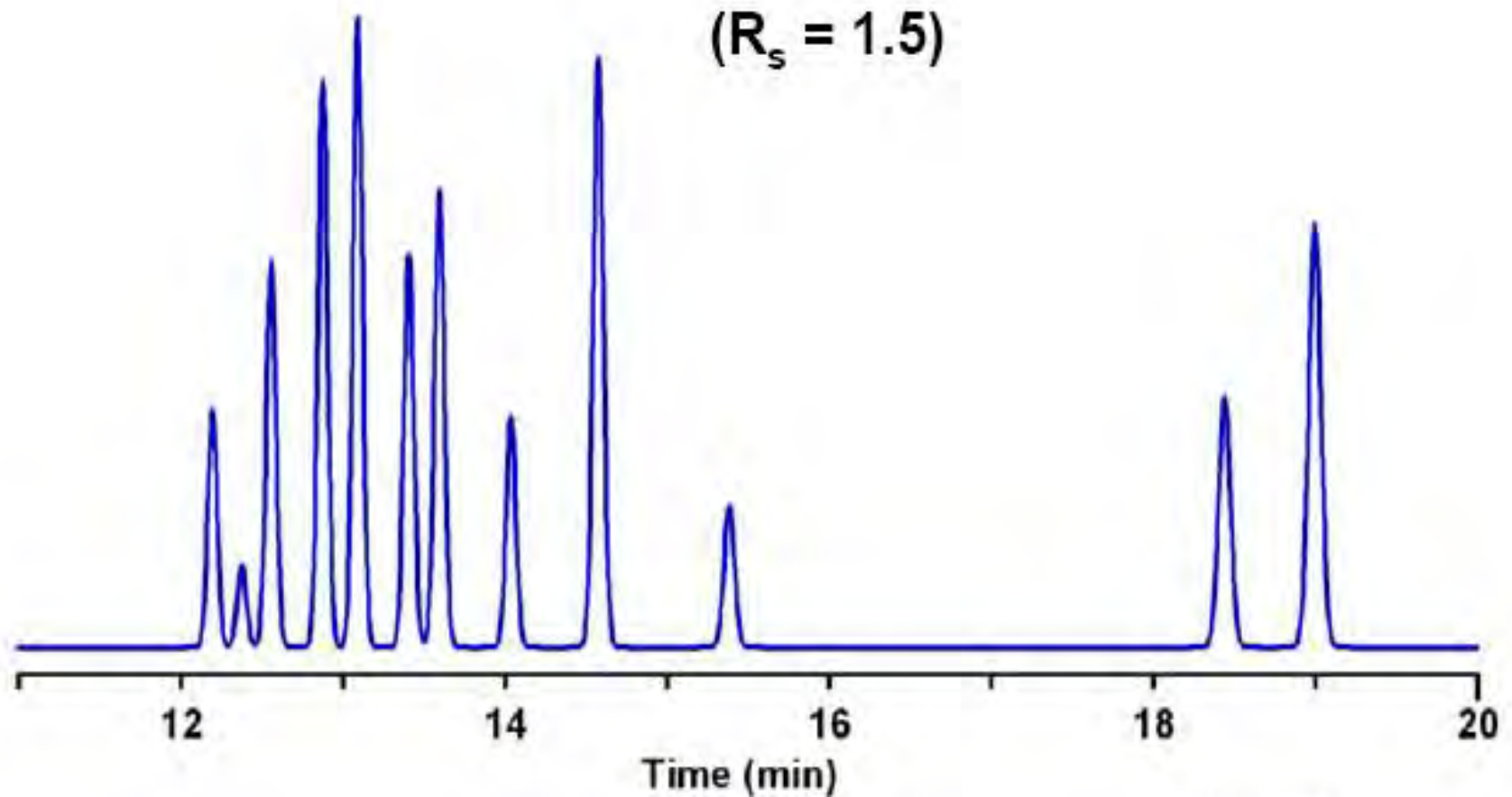
## Mapa de resolución



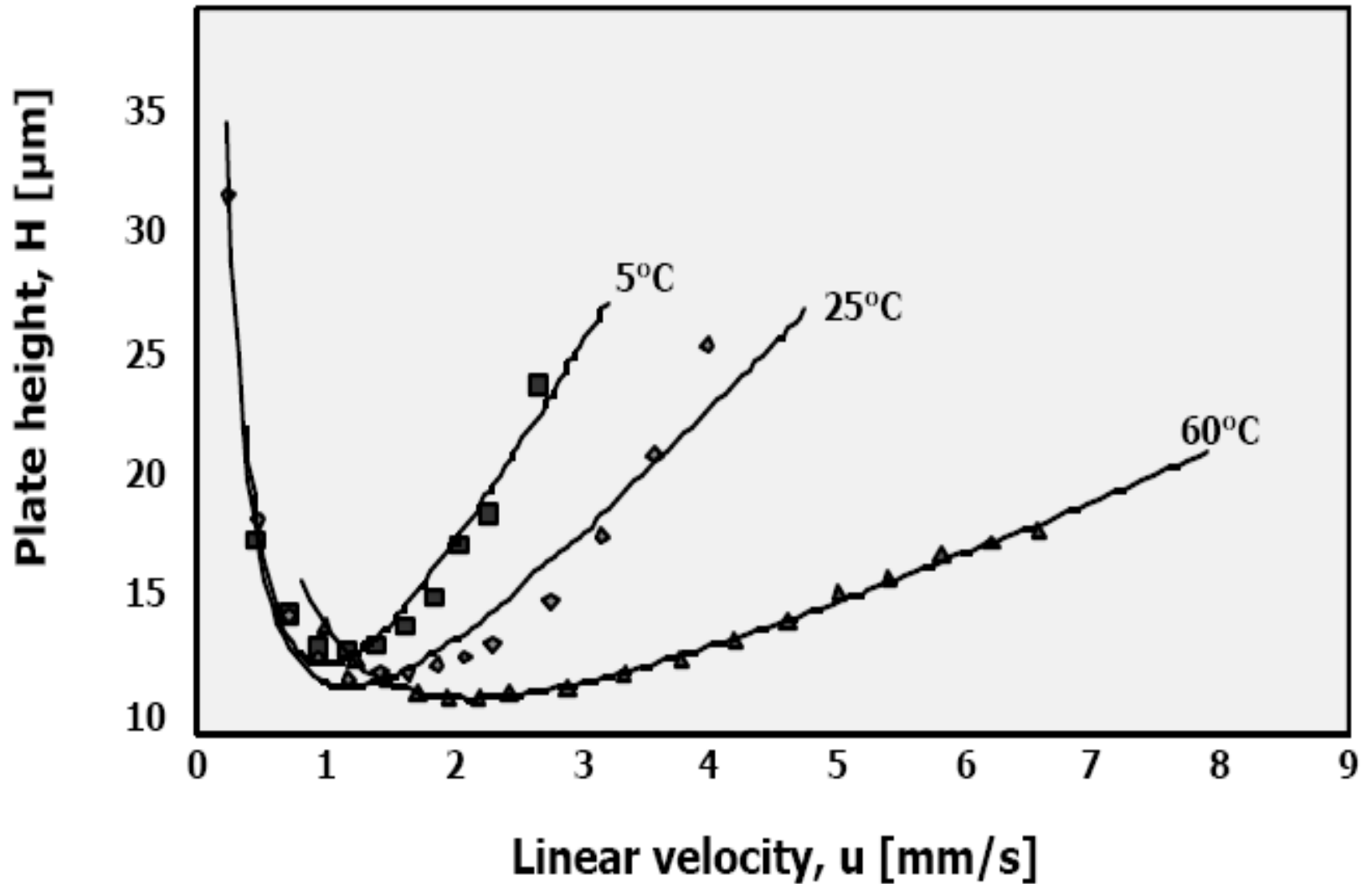
# Desarrollo

## Cuantificación de testosterona

### Optimización 26 min 44 °C



# Efecto de la temperatura



## **ESTRATEGIAS A EMPLEAR EN UN ANÁLISIS POR GRADIENTE**

- **Antes de comenzar: Realizar una corrida blanco.**
- **Corrida inicial: iniciar con un gradiente 5-95% ACN-amortiguador (30-45 min a una velocidad de flujo entre 1.5-2 mL/min).**
- **Optimización del número de pasos del gradiente. Depende del número de pares críticos.**
- **Optimización de volumen extracolumna.**
- **Optimización de condiciones (fase móvil y estacionaria)**

# **INCONVENIENTES EN ANÁLISIS POR GRADIENTE**

- **Tiempos de retención no reproducibles**
- **Dificultades para transferencia entre columnas**
- **Largos tiempos de equilibrios**
- **Largos tiempos de ciclo (entre inyección e inyección)**



# Estrategias para la utilización de gradiente

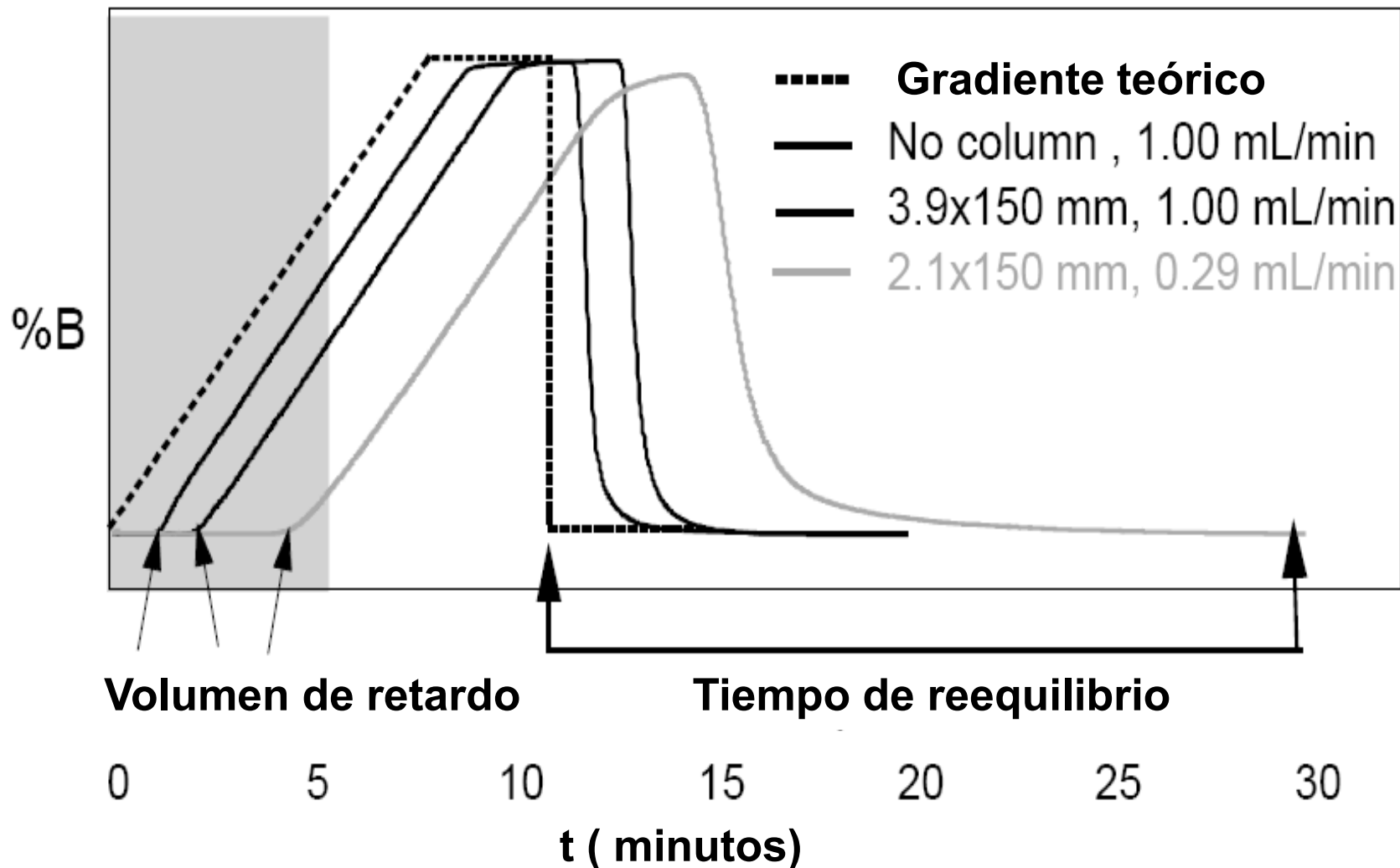
## Soluciones de sistema

- Reducción del volumen de retardo
- Disminución del tiempo de reequilibrio
- Reducción del ciclo de inyección
- Utilización de columnas paralelas

## Soluciones de método

- Emplear gradientes cortos
- Emplear flujo alto
- Emplear columnas cortas
- Disminuir el tamaño de partícula
- Disminuir el tiempo de reequilibrio
- Aumentar la temperatura

# FORMA DEL GRADIENTE Y VOLUMEN DE PRECOLUMNA



## CÁLCULO DEL TIEMPO DE EQUILIBRIO UTILIZADO EN UN GRADIENTE

$$t_{reequilibrio} = \frac{(3V_T + 5V_0)}{F}$$

*donde*

$V_T$  = volumen de sistema en mL

$V_0$  = volumen muerto de la columna en mL

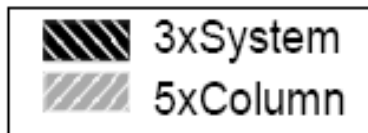
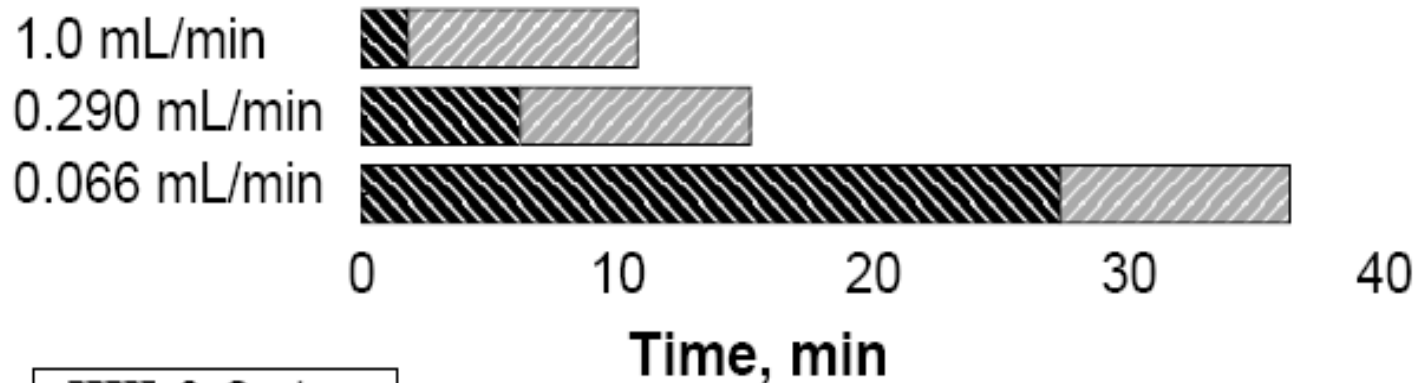
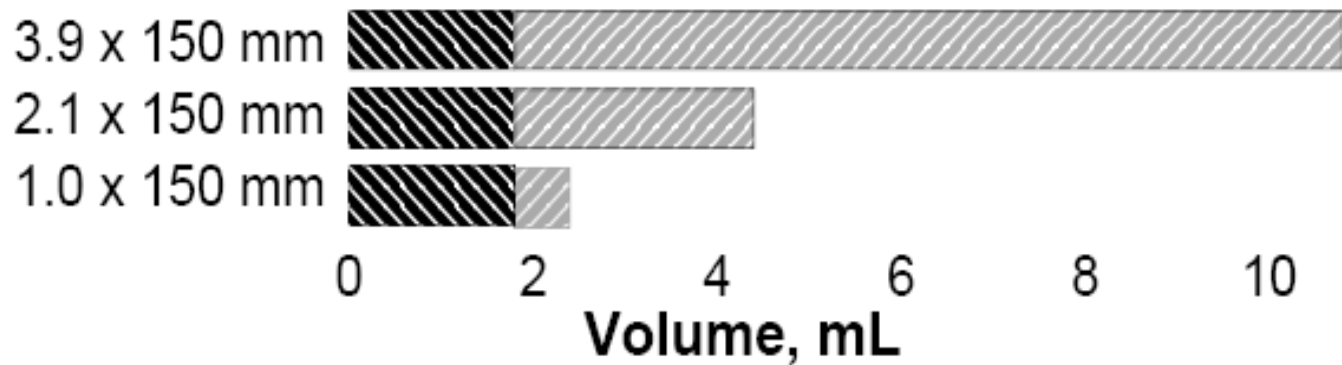
$F$  = velocidad de flujo en mL/min

volumen de sistema 0.65 a 3 mL

El volumen de reequilibrio se divide

en el volumen de lavado y el volumen de equilibrio

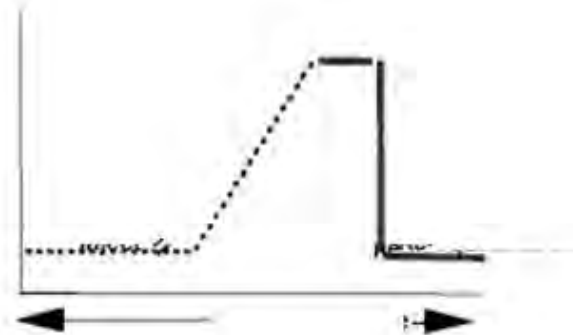
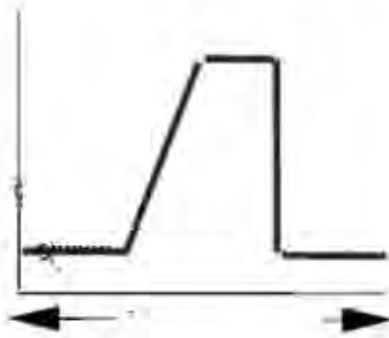
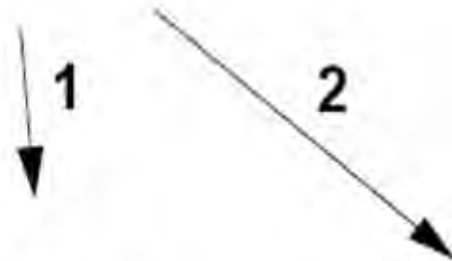
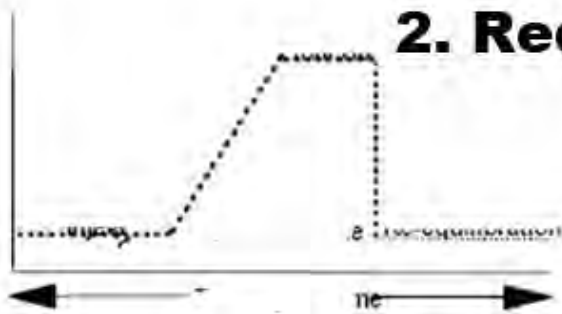
# REEQUILIBRIO DE LA COLUMNA



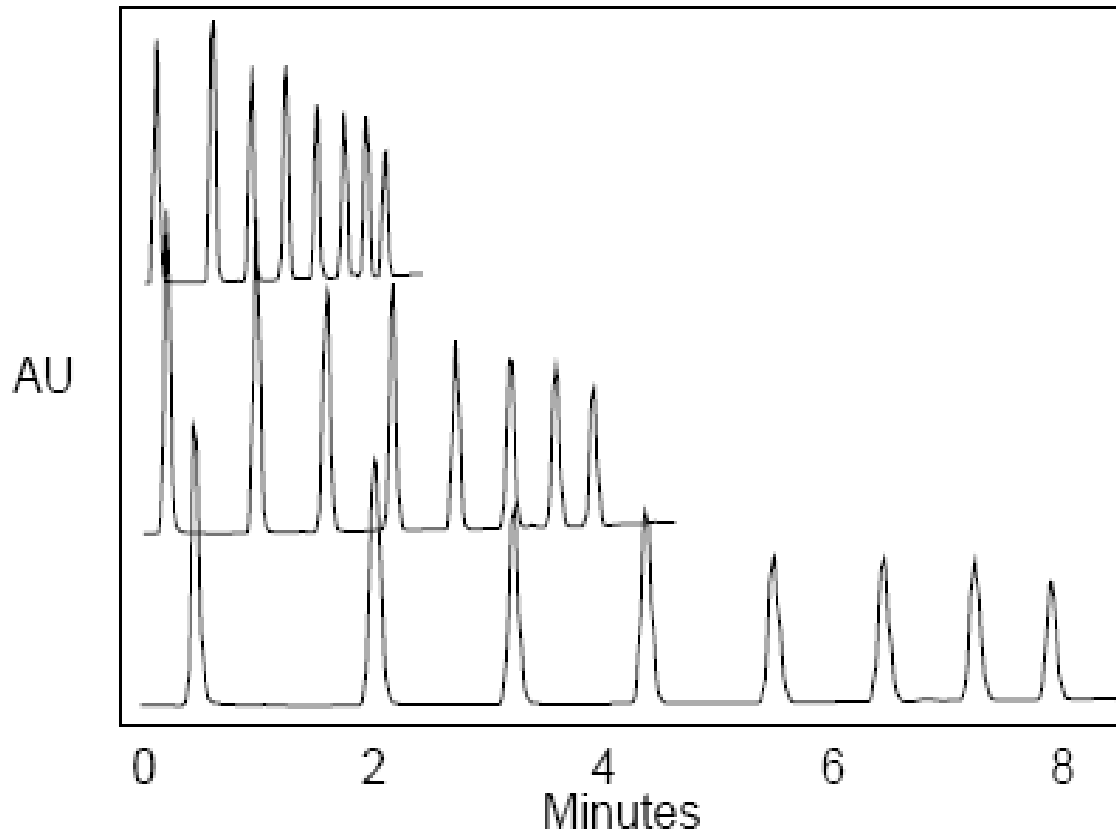
# REDUCCIÓN DEL TIEMPO DE REEQUILIBRIO

**1. Incremento de velocidad de flujo**

**2. Reducción del volumen de la columna**



# REDUCCIÓN DEL TIEMPO DE REEQUILIBRIO INCREMENTO DE LA VELOCIDAD DE FLUJO



Symmetry C<sub>18</sub>

Alkylphenones

3.9 x 50 mm

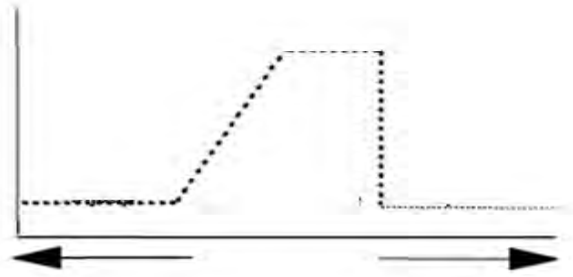
40-100%B

3.0 min, 3 mL/min

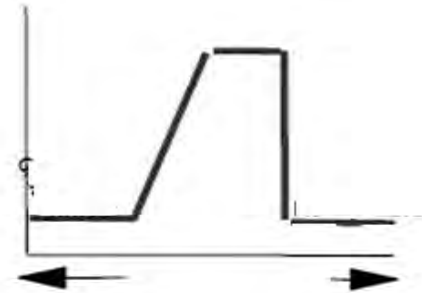
4.5 min, 2 mL/min

9.0 min, 1 mL/min

# REDUCCIÓN DEL TIEMPO DE REEQUILIBRIO INCREMENTO DE LA VELOCIDAD DE FLUJO



Column: 3.9 X 50 mm



Column: 3.9 X 50 mm

$$t_{reequilibrio} = \frac{(3V_T + 5V_0)}{F}$$

Vol de columna 0.6 mL

$V_0 = 70\%$  de volumen de columna

Volumen de sistema o retraso 0.65 mL

5 min de gradiente 1 mL/min

$$t_{reequilibrio} = 4 \text{ min}$$

$$t_{reequilibrio} = \frac{(3V_T + 5V_0)}{F}$$

Vol de columna 0.6 mL

$V_0 = 70\%$  de volumen de columna

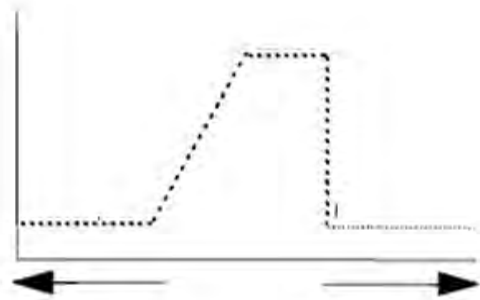
Volumen de sistema o retraso 0.65 mL

5 min de gradiente 2 mL/min

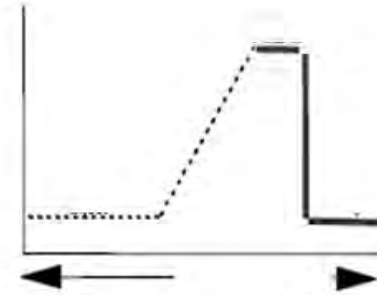
$$t_{reequilibrio} = 2 \text{ min}$$

# REDUCCIÓN DEL TIEMPO DE REEQUILIBRIO

## REDUCCIÓN DEL VOLUMEN DE LA COLUMNA



Column: 2.1 X 50 mm



Column: 2.1 X 20 mm

$$t_{reequilibrio} = \frac{(3V_T + 5V_0)}{F}$$

Vol de columna 0.17 mL

$V_0 = 70\%$  de volumen de columna

Volumen de sistema o retraso 0.65 mL

5 min de gradiente 1 mL/min

$$t_{reequilibrio} = 2.5 \text{ min}$$

$$t_{reequilibrio} = \frac{(3V_T + 5V_0)}{F}$$

Vol de columna 0.069 mL

$V_0 = 70\%$  de volumen de columna

Volumen de sistema o retraso 0.65 mL

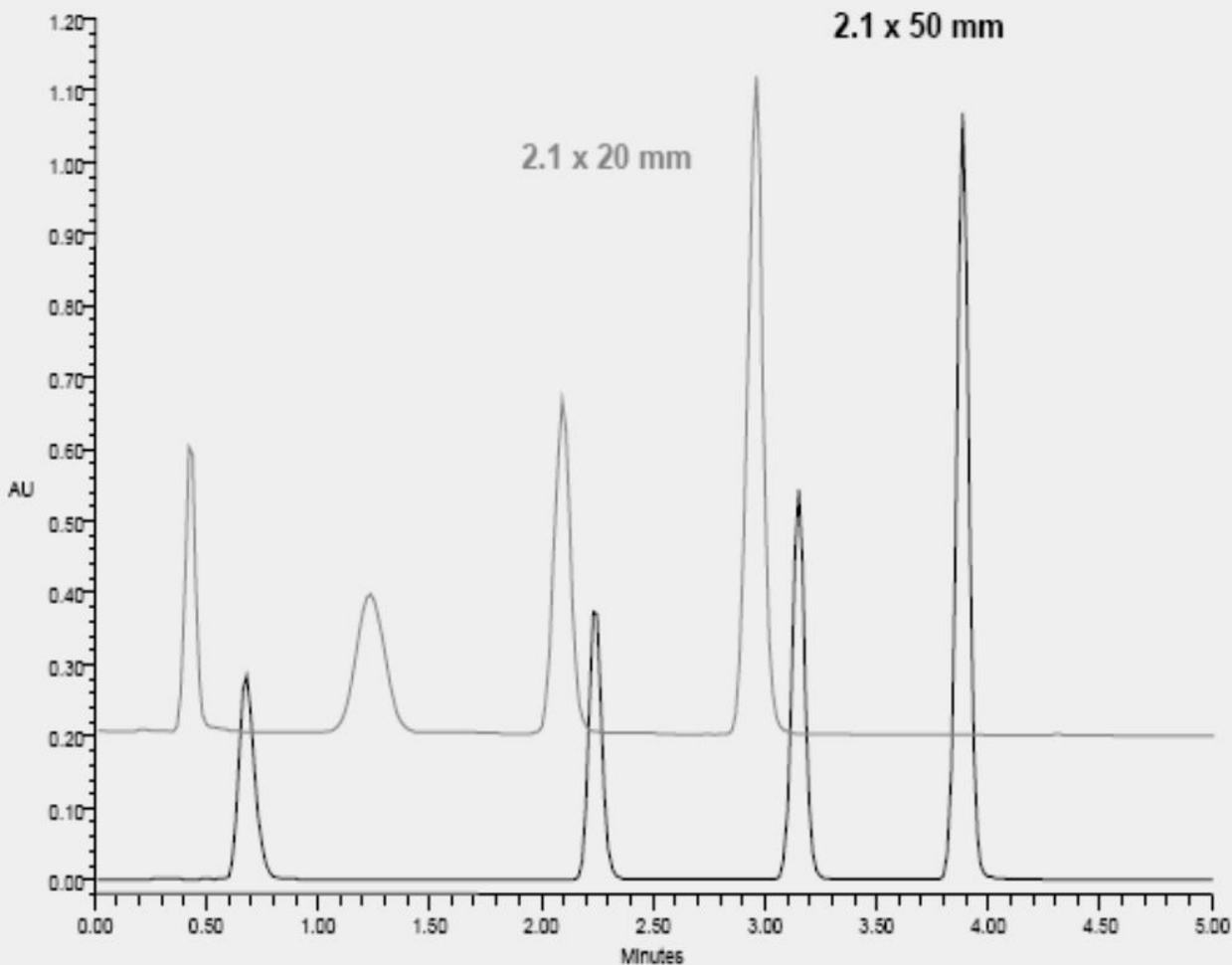
5 min de gradiente 1 mL/min

$$t_{reequilibrio} = 2 \text{ min}$$



# REDUCCIÓN DEL TIEMPO DE REEQUILIBRIO

# REDUCCIÓN DEL VOLUMEN DE LA COLUMNA



## Conditions:

Symmetry® C<sub>18</sub>, 5 μm

Mobile phase: A=0.1% TFA in water,

B=0.1% TFA in acetonitrile

Gradient: 0-60% B in 5 minutes

Column temperature: 30.0 °C

Detector: 254 nm

Injection volume: 1 μL

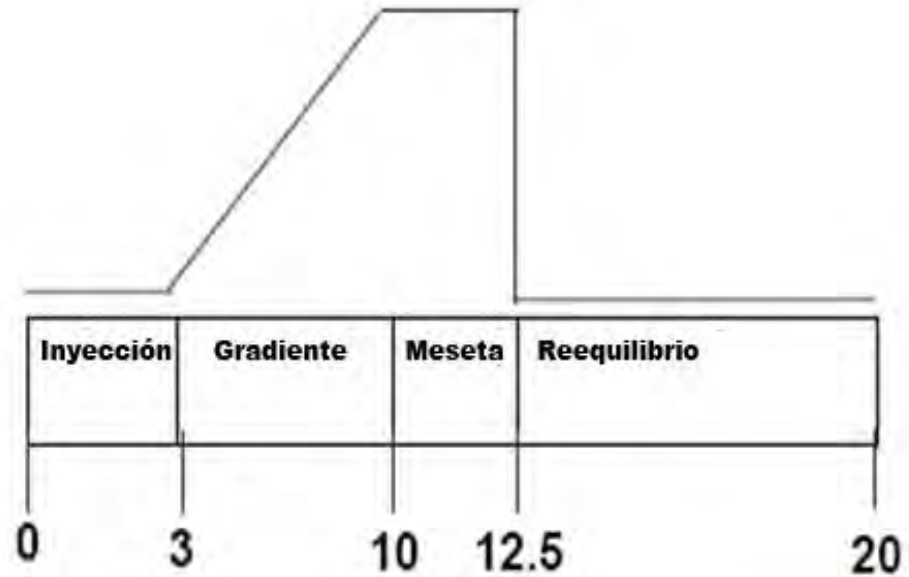
Flow rate: 1 mL/min.

# REDUCCIÓN DE LOS TIEMPOS DE CICLAJE

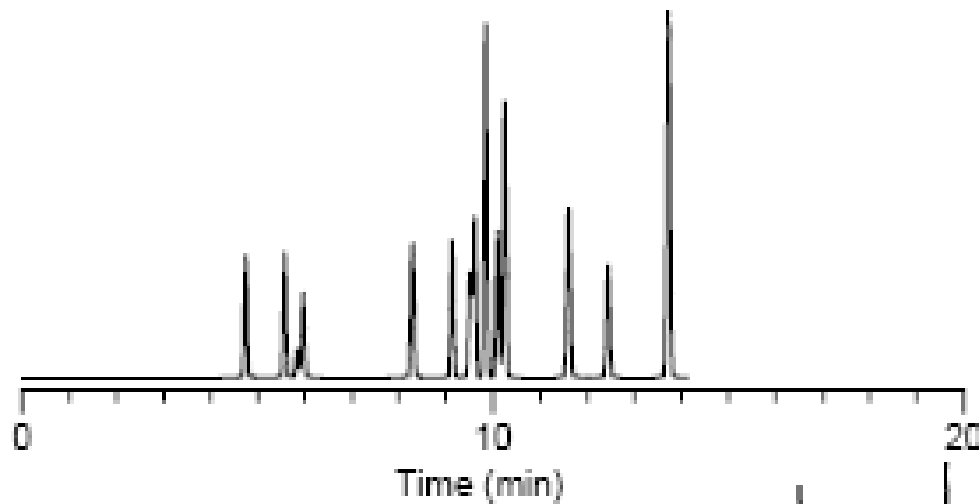
- Programar una purga del sistema
- Emplear dos columnas

# EMPLEO DE TÉCNICAS DE INTERCAMBIO DE COLUMNAS (COLUMN SWITCHING)

**C18 1.9x50 mm**  
**F=0.2 mL/min**  
**Reequilibrio require 5 volúmenes de columna=1.5 mL= 7.5 min**



# VOLUMEN DE RETARDO



150 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m

1.0 mL/min

20-70%B / 15 min

$V_D = 1.0$  mL

$$\frac{t_G F}{\Delta\Phi V_m S}$$



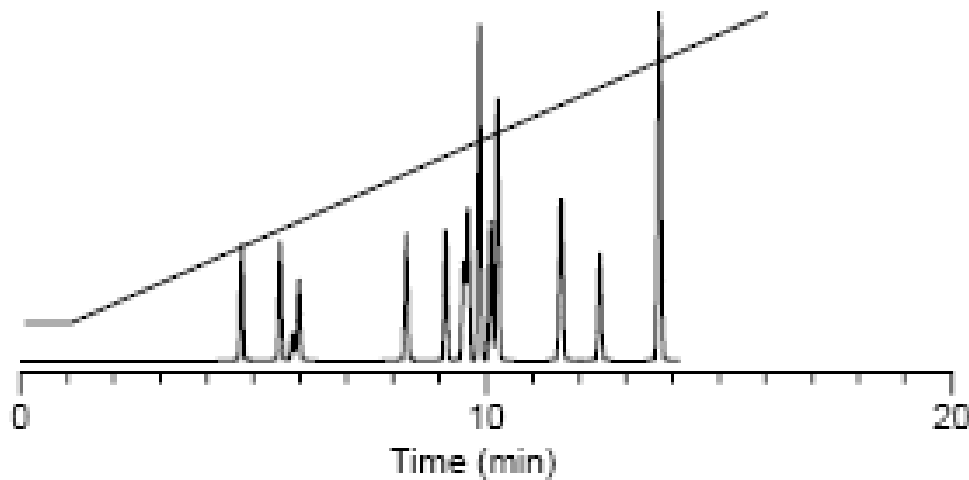
150 x 2.1 mm, 5  $\mu$ m

0.2 mL/min

20-70%B / 15 min

$V_D = 1.0$  mL

# VOLUMEN DE RETARDO



150 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m

1.0 mL/min

20-70%B / 15 min

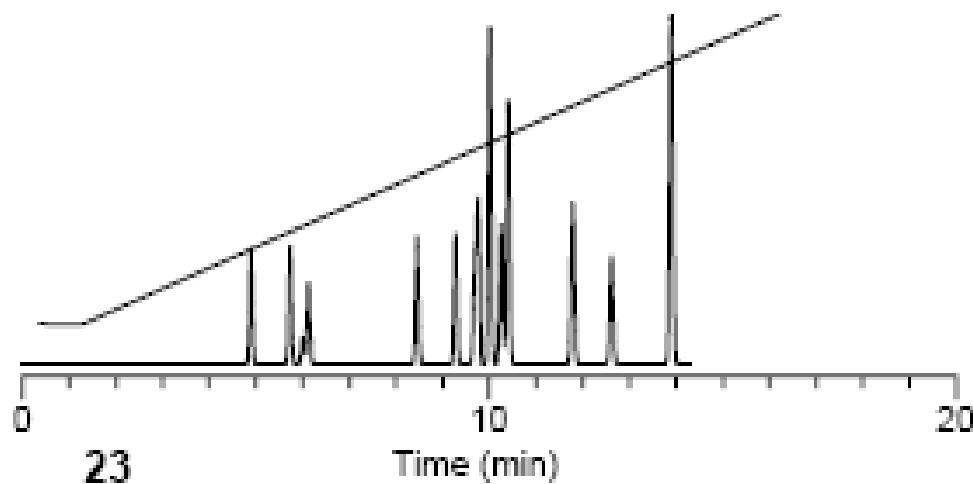
$V_D = 1.0$  mL

150 x 2.1 mm, 5  $\mu$ m

0.2 mL/min

20-70%B / 15 min

$V_D = 0.2$  mL

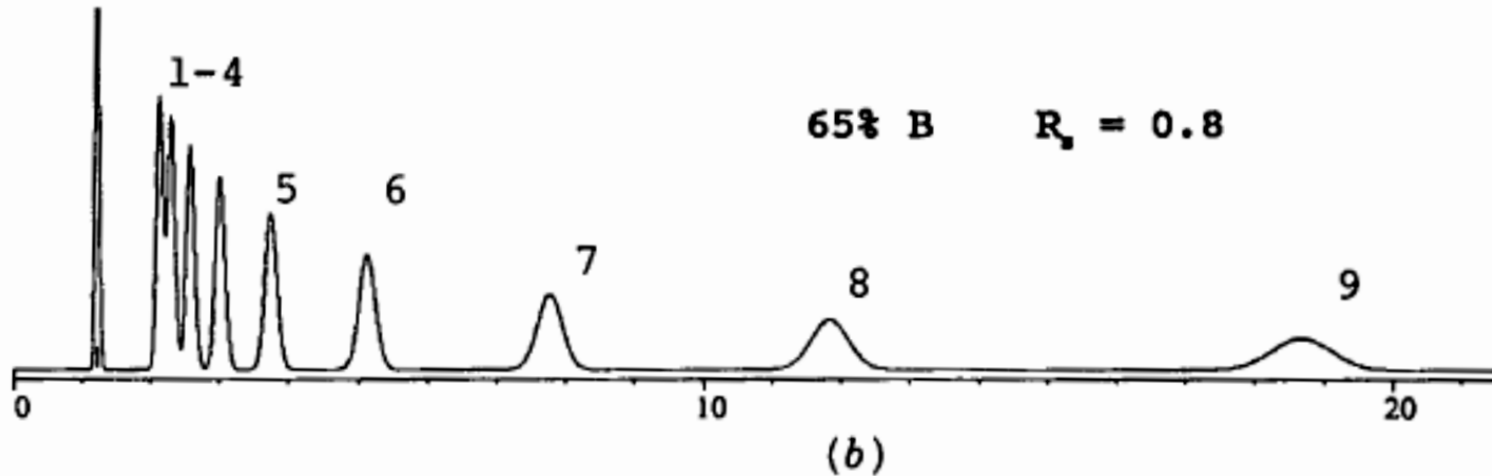
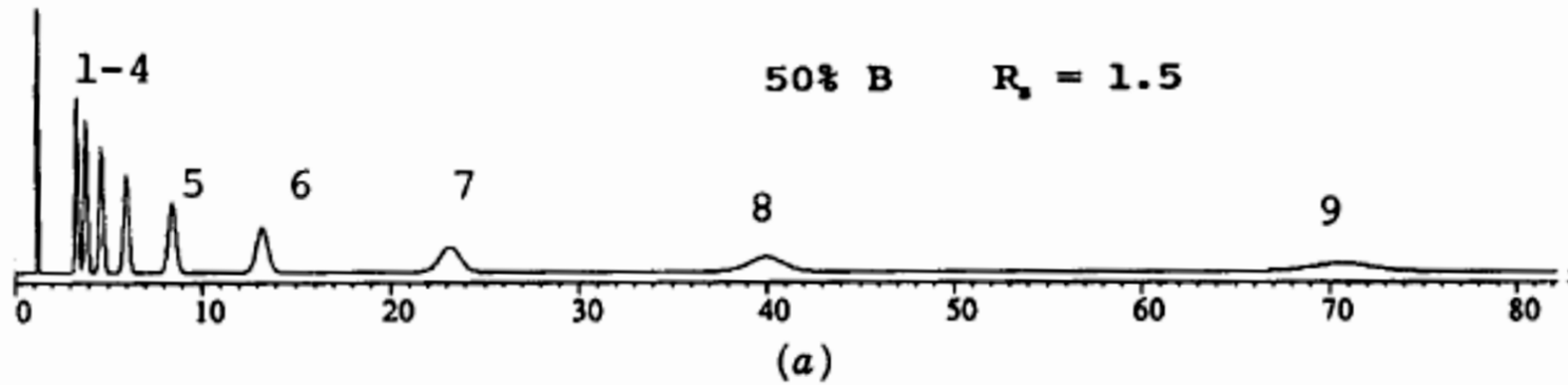


# **OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA**

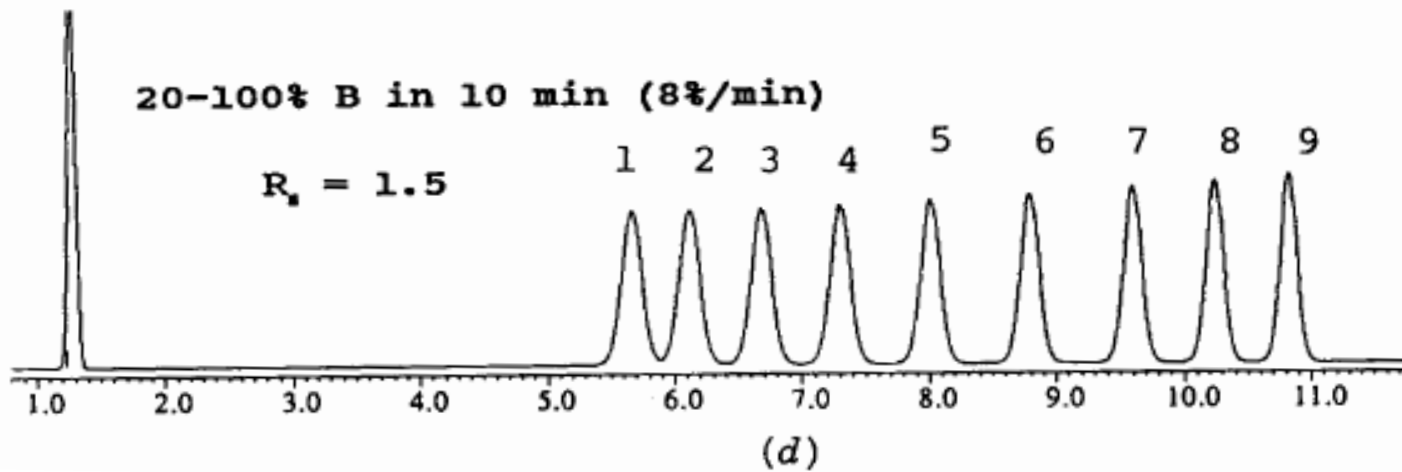
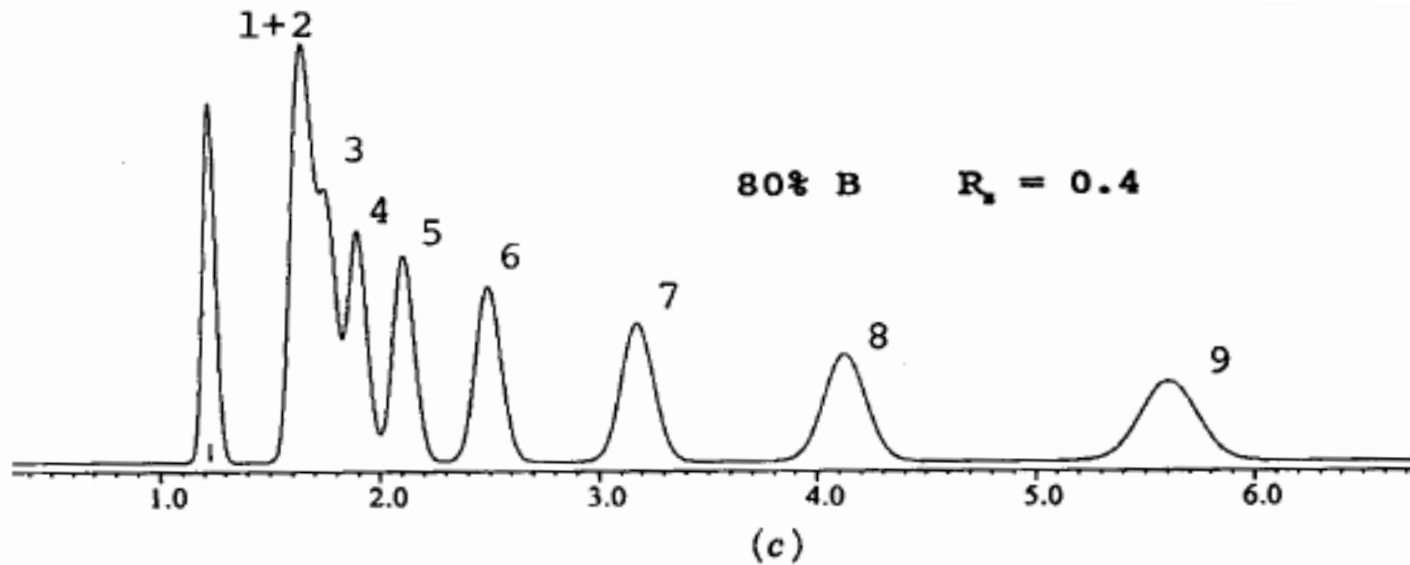
## **Reducción del volumen de retardo**

- Cambiar tuberías de 0.25 mm a .12 mm**
- Disminuir longitud de tuberías**
- Reducir el volumen extracolumna**
- Remover mezcladores de gradiente**

# OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA

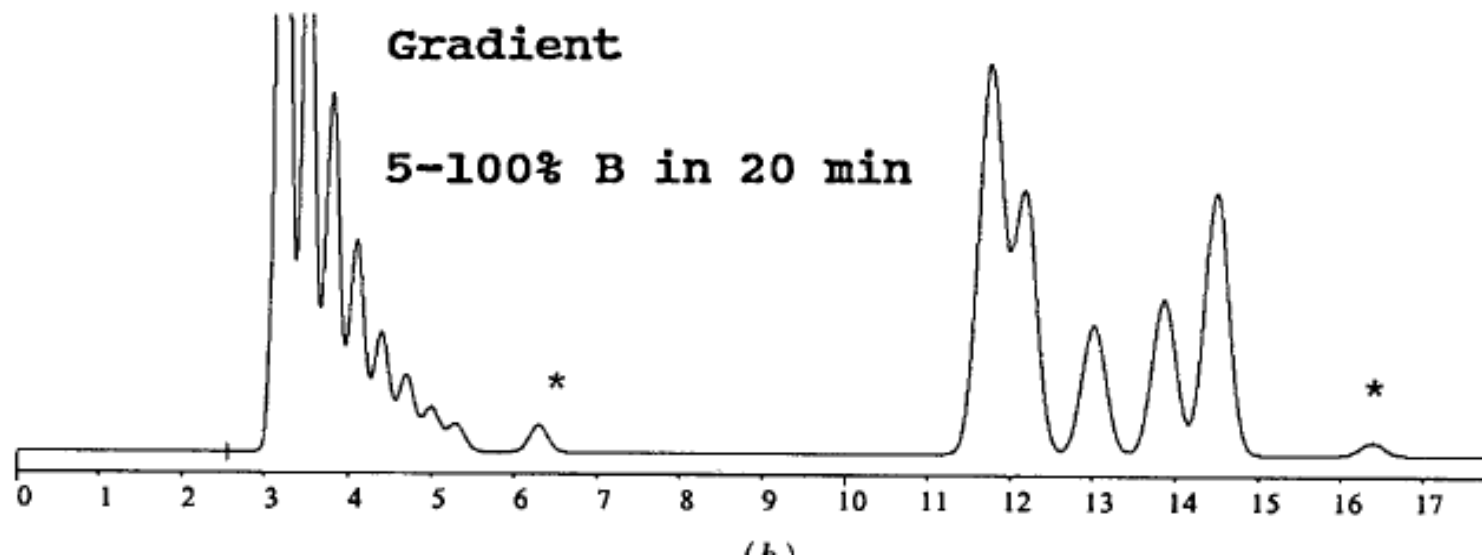
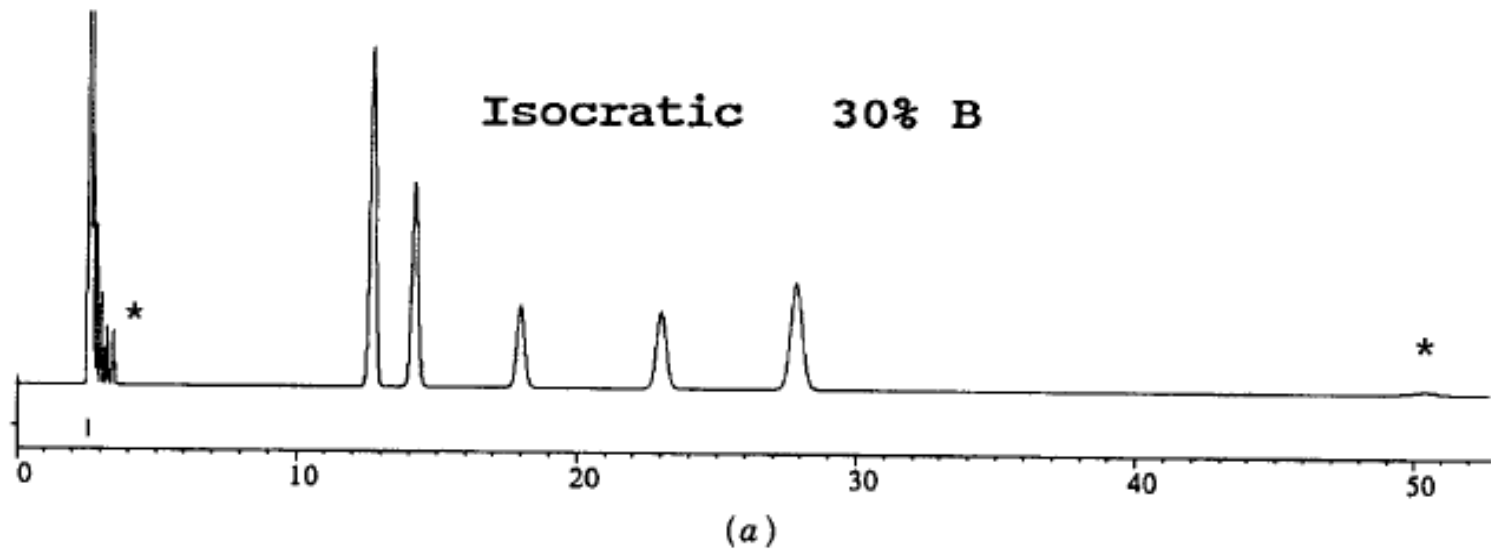


# OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA





# VENTAJAS DEL GRADIENTE DE ELUCIÓN



# GRADIENTE

$$k' = \frac{20t_G F}{V_0 (\Delta\%B)}$$

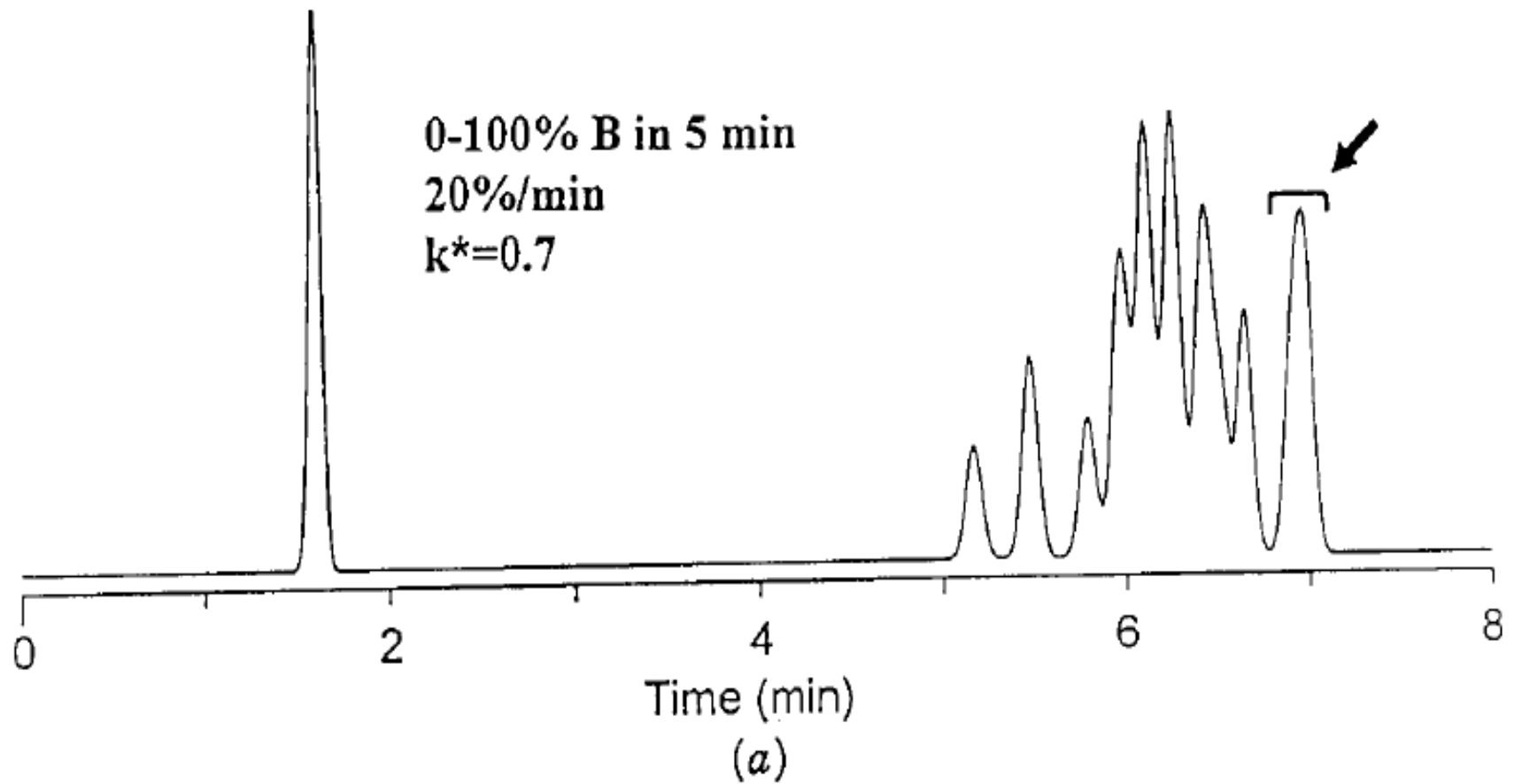
# PASOS DE UN GRADIENTE

$$G_s' = \frac{V_0 (\Delta \% B)}{t_G F}$$

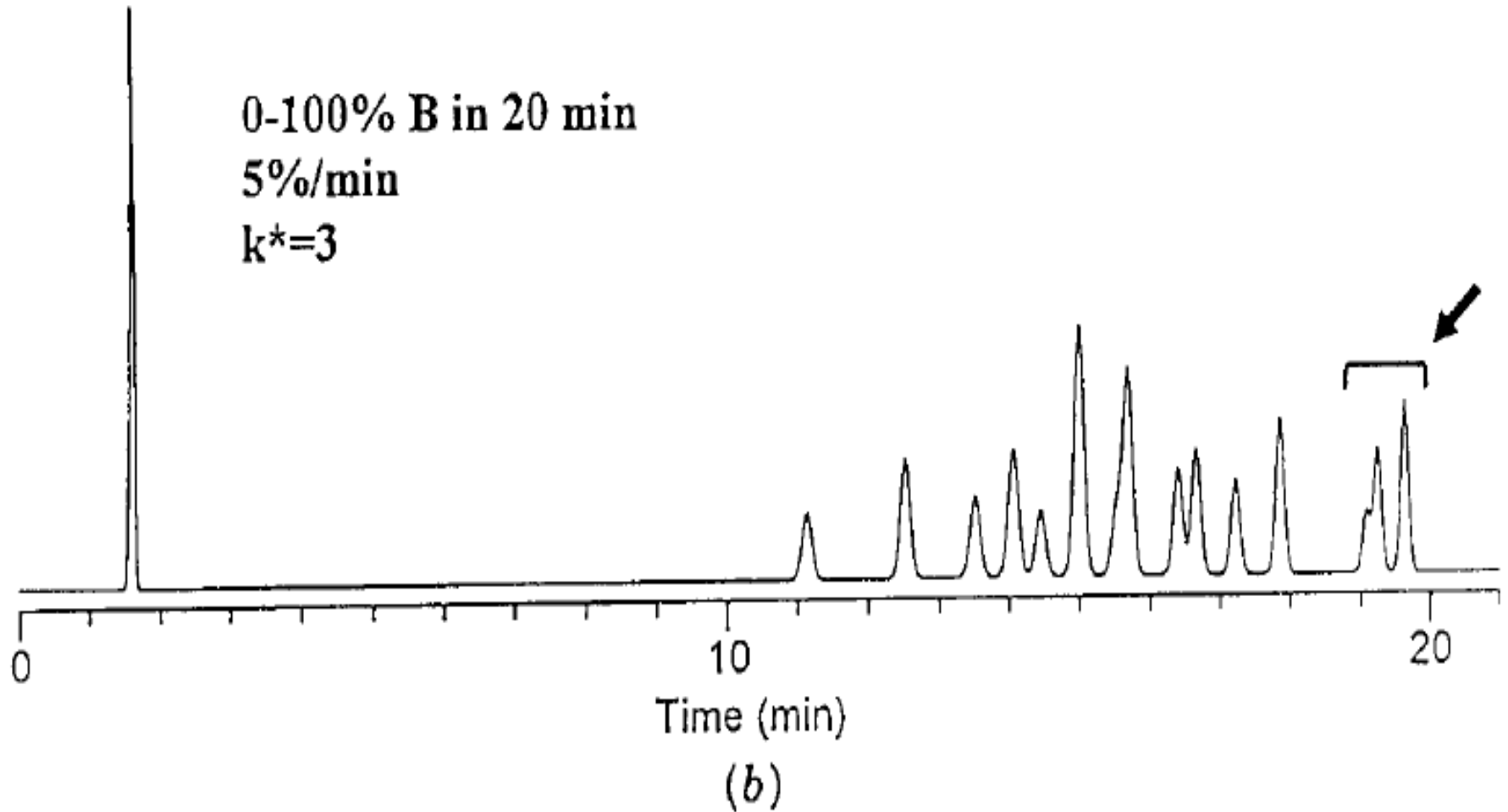
$$k' = \frac{20}{G_s}$$

Un incremento de %min es análogo a un incremento de %B en un sistema isocrático.

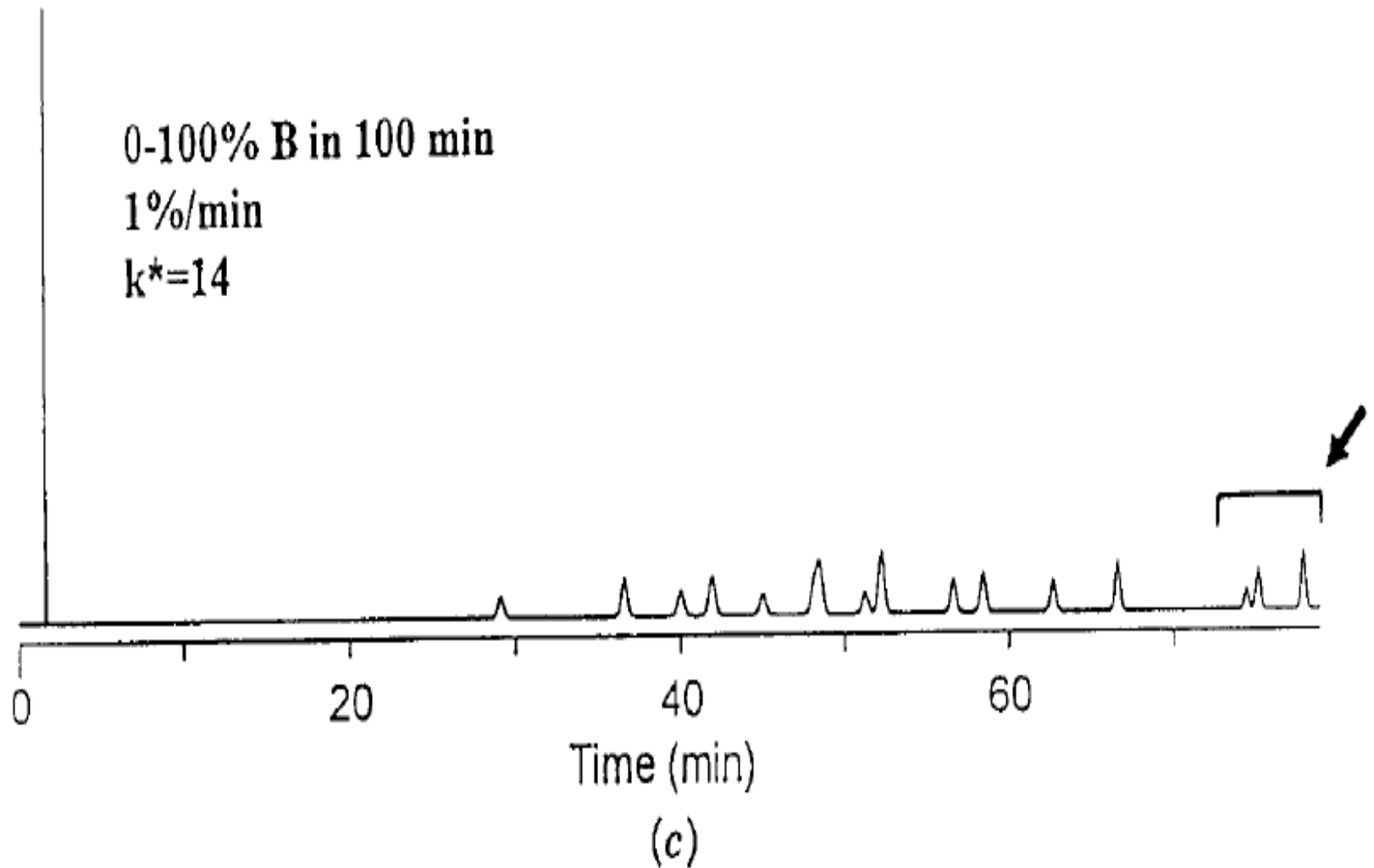
# PASOS DE UN GRADIENTE



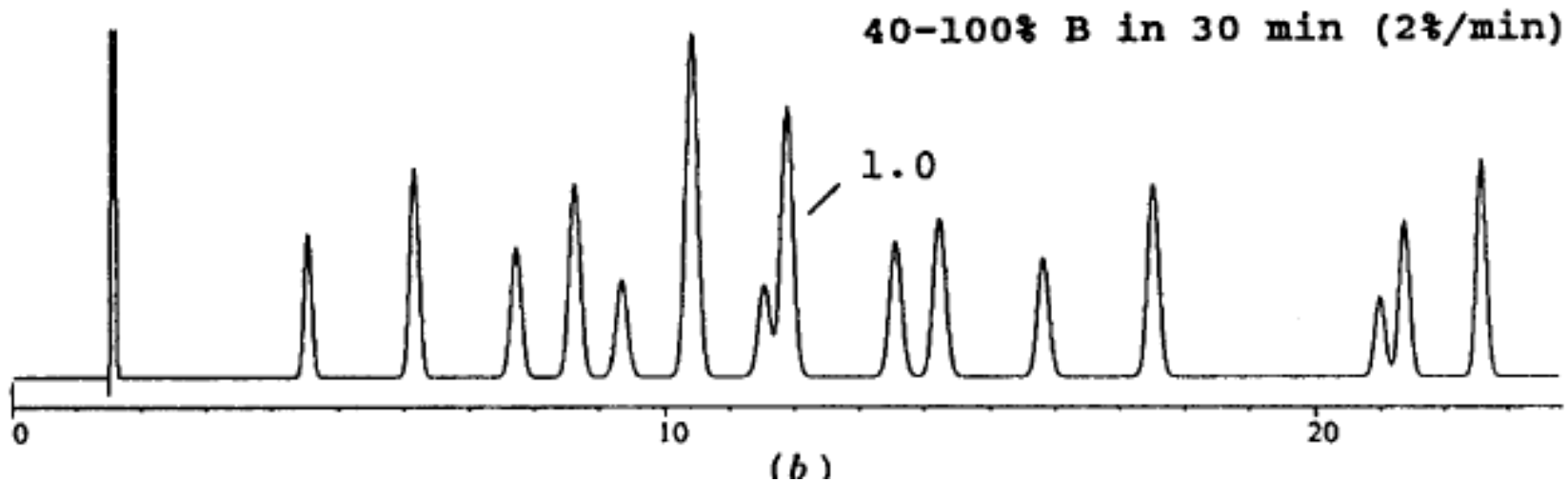
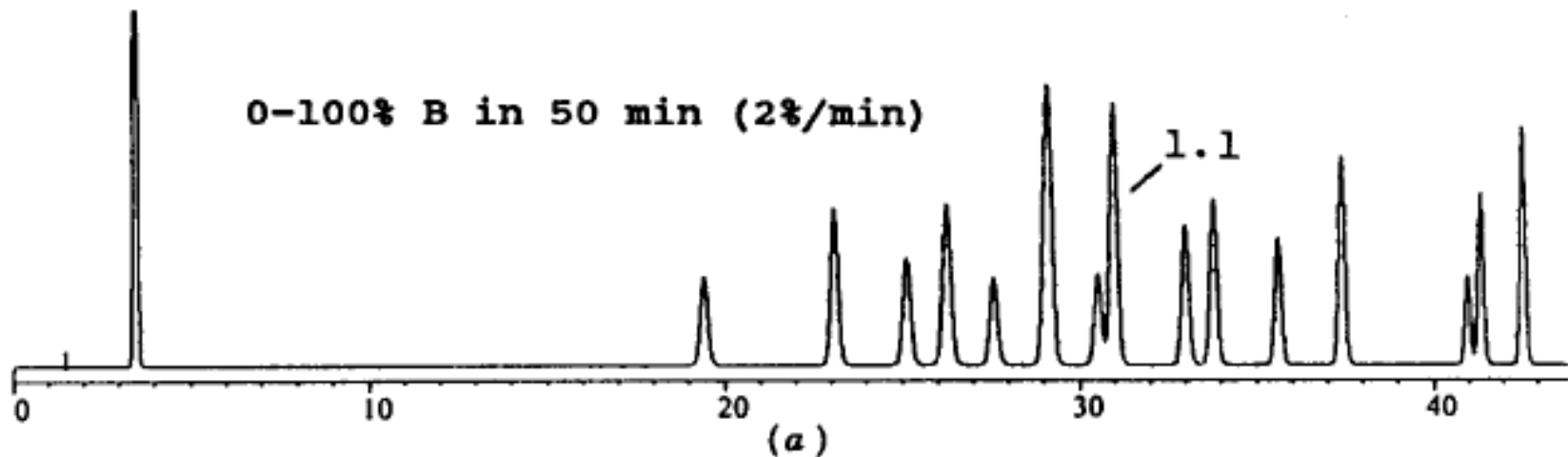
# PASOS DE UN GRADIENTE



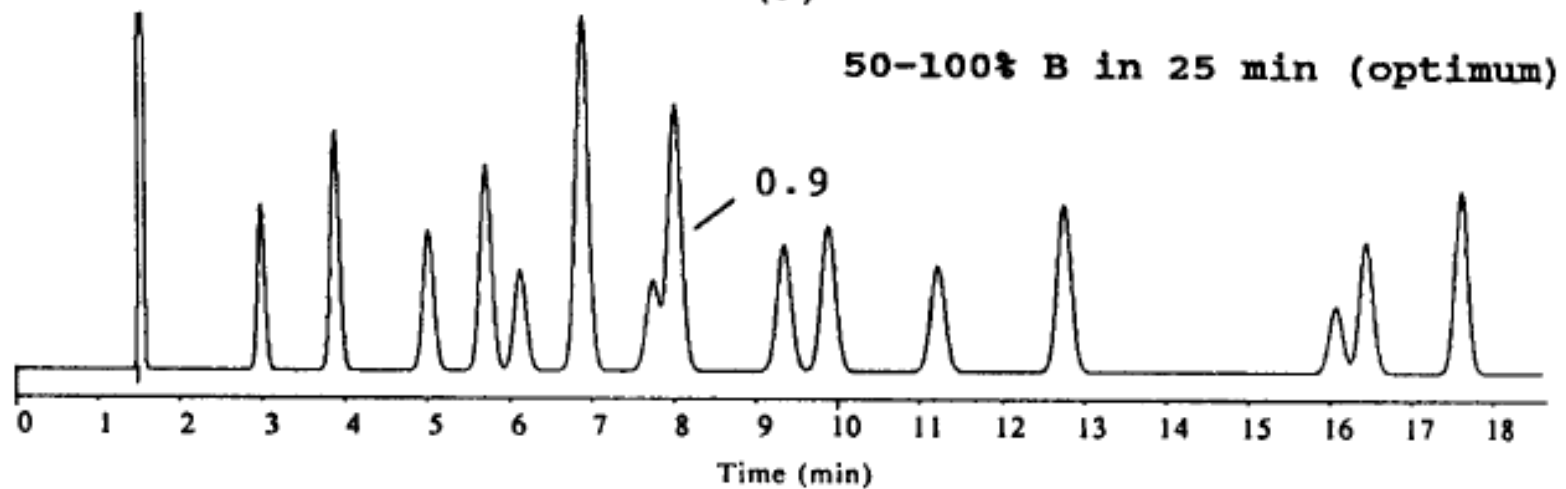
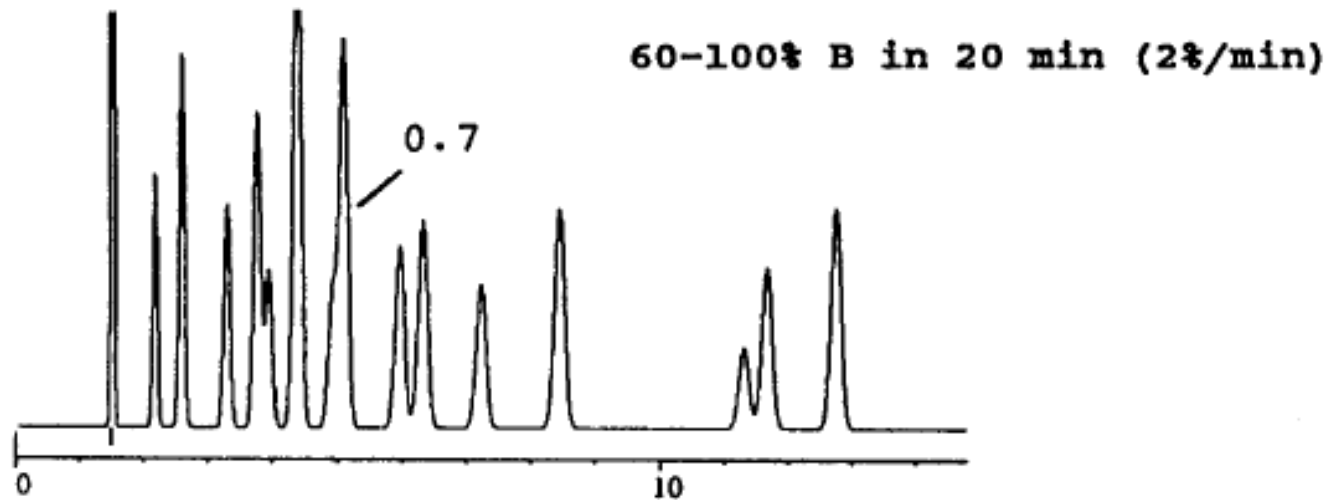
# PASOS DE UN GRADIENTE



# PASOS DE UN GRADIENTE

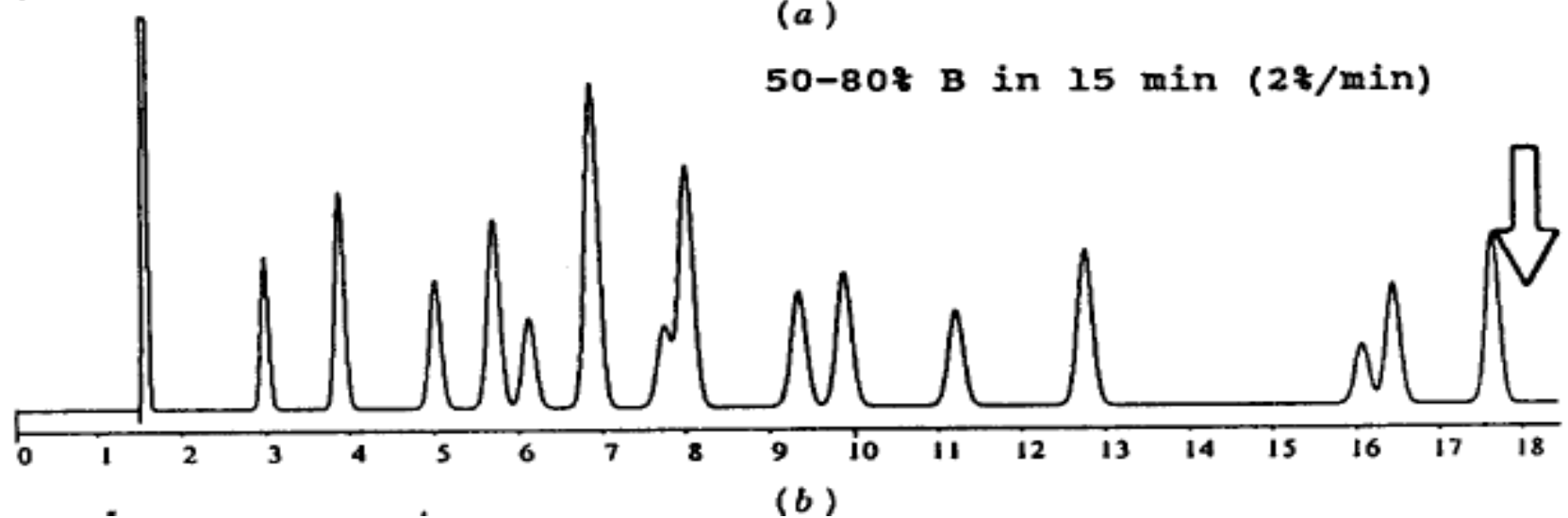
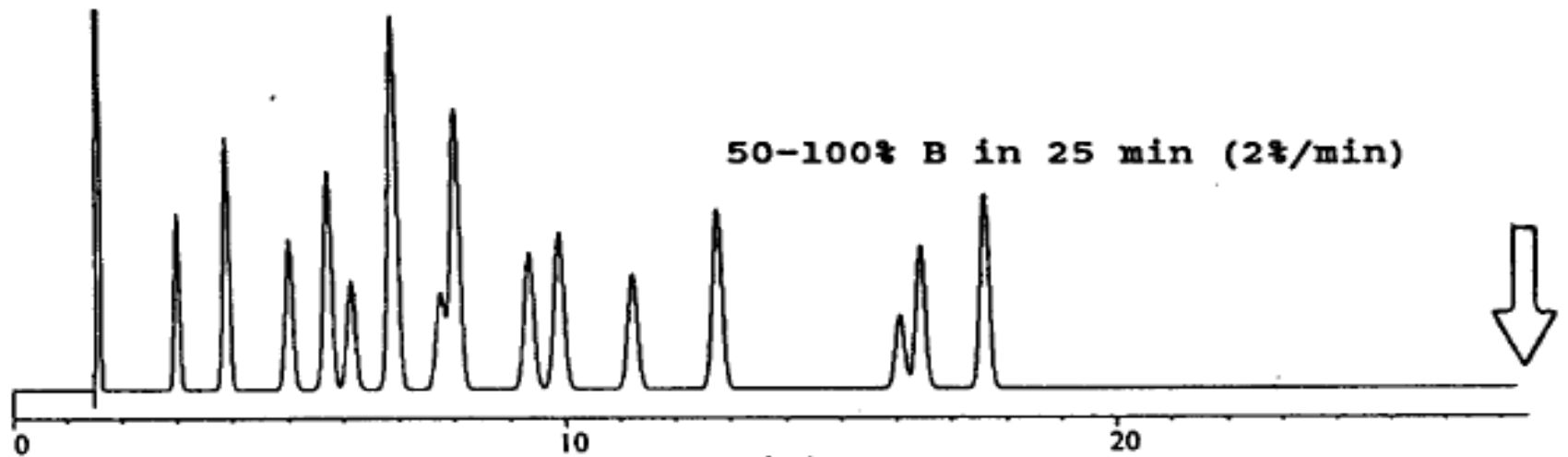


# PASOS DE UN GRADIENTE

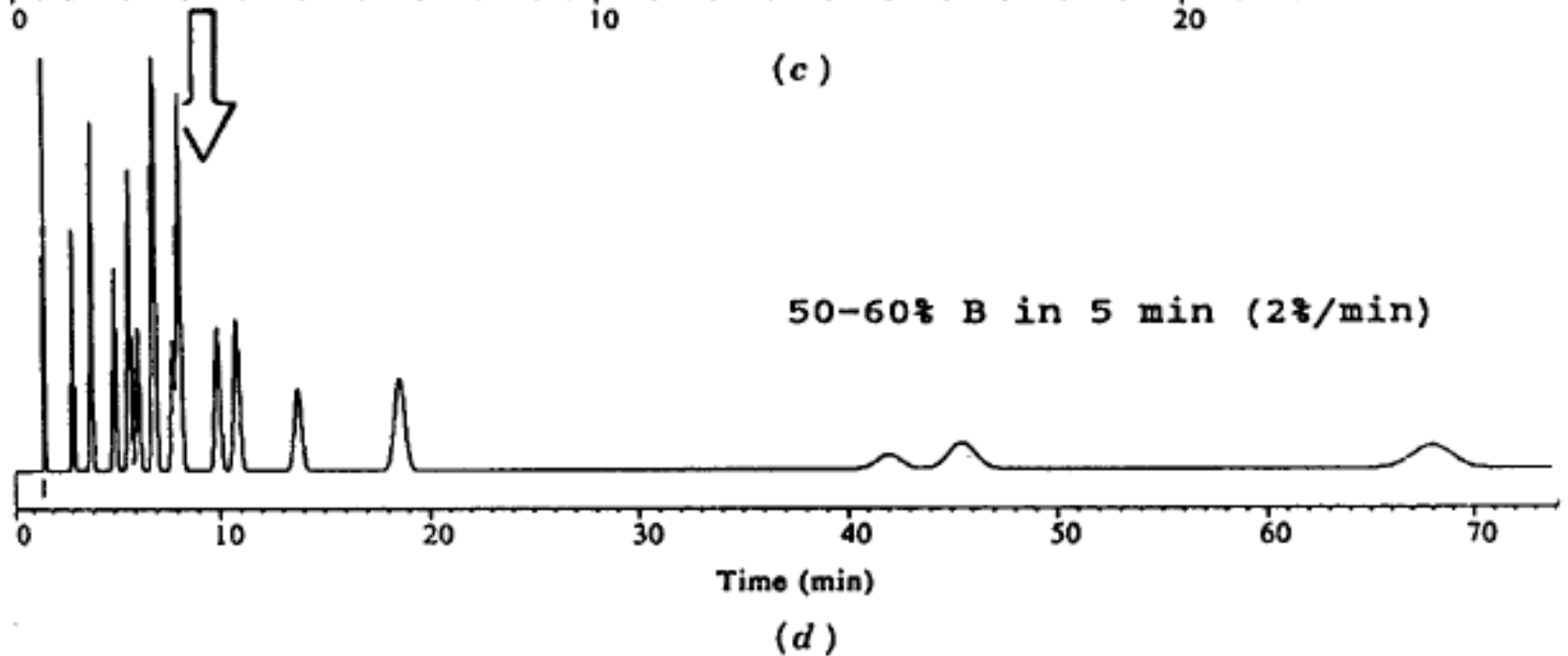
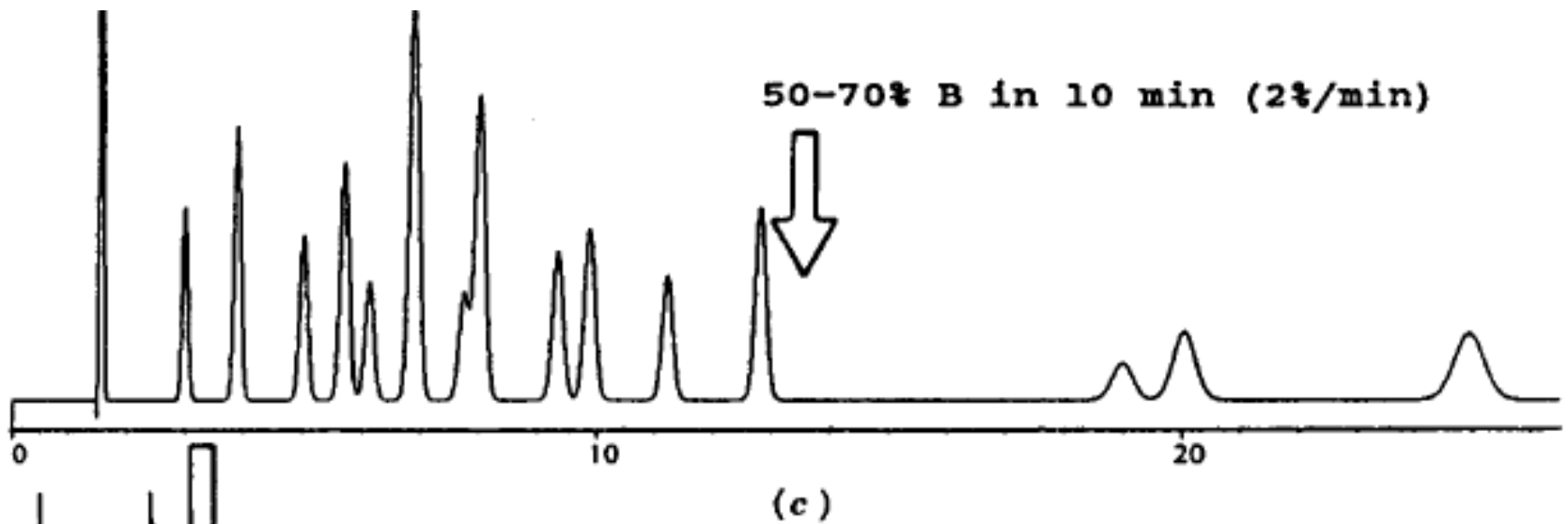




# PASOS DE UN GRADIENTE



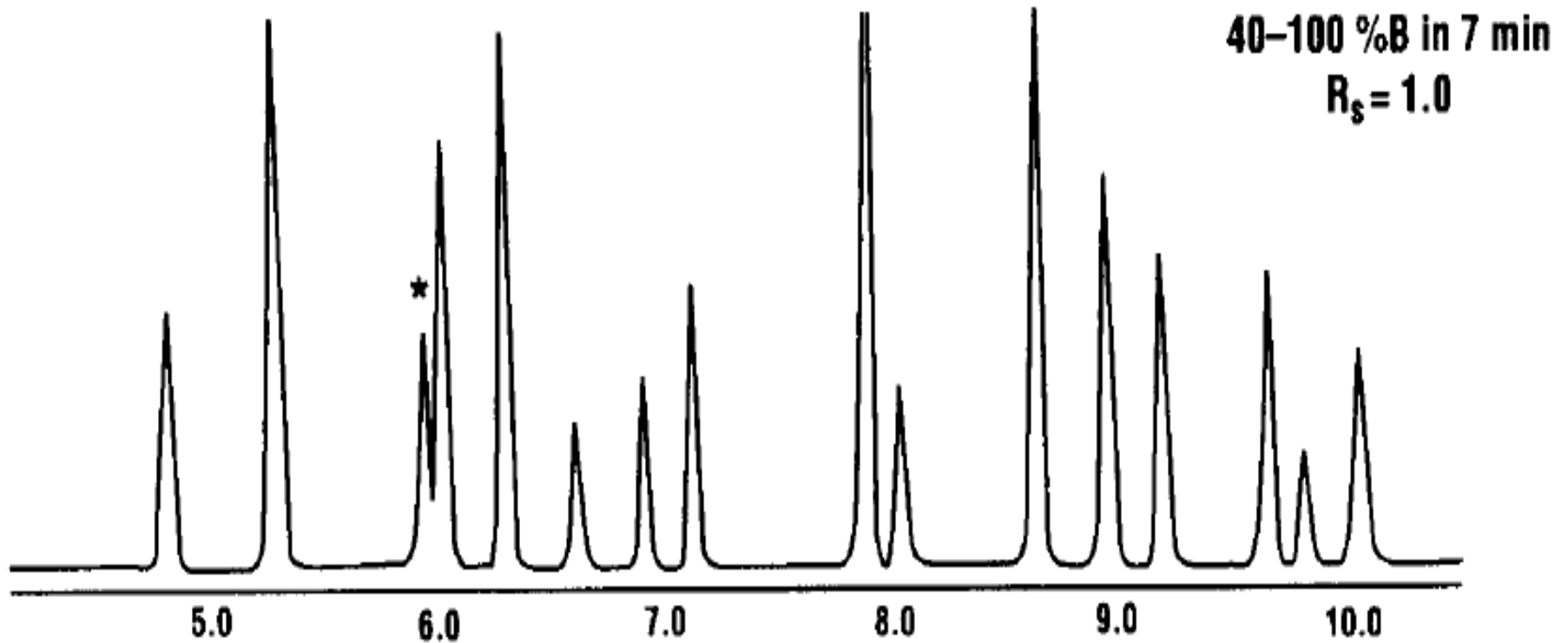
# PASOS DE UN GRADIENTE



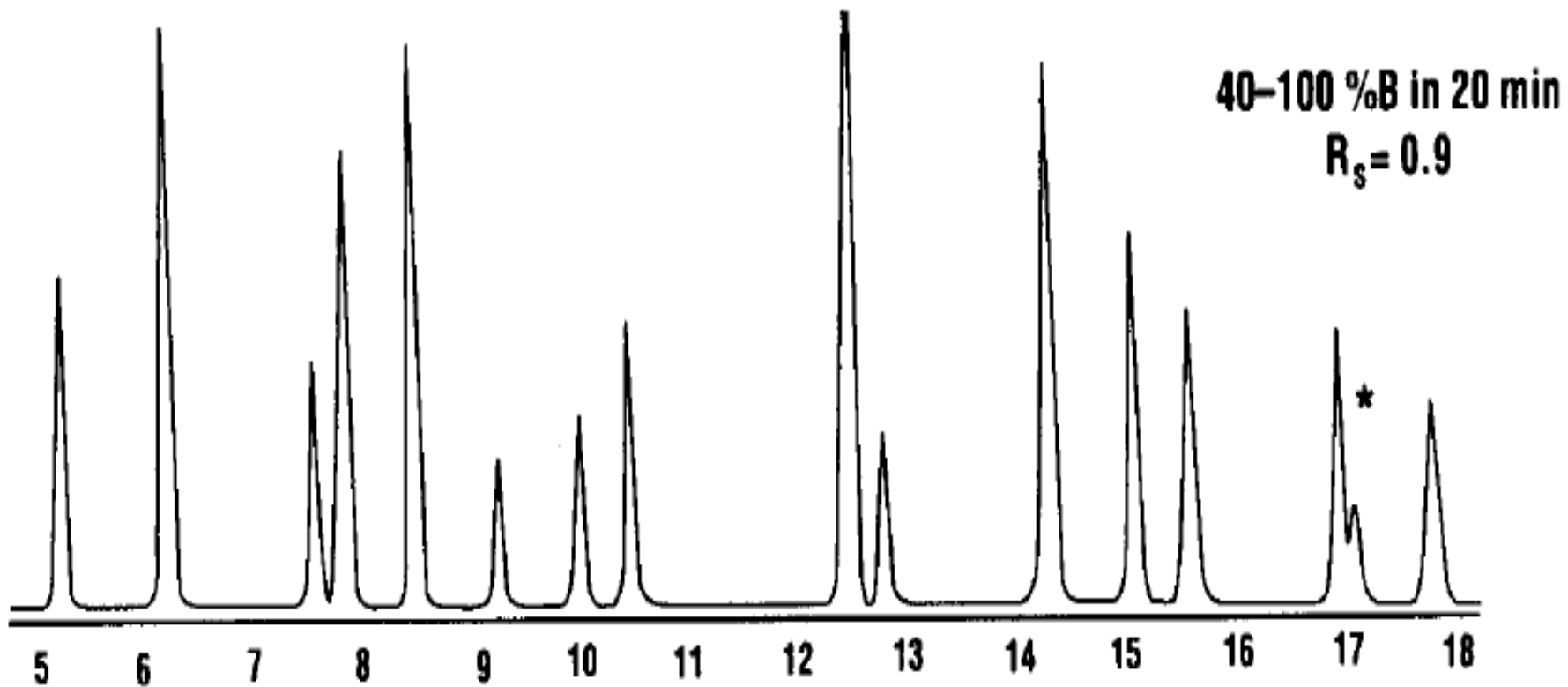
## Tiempo de gradiente

$$t_G \approx 25 \frac{V_m}{F} \quad (5-100\% \text{ B})$$

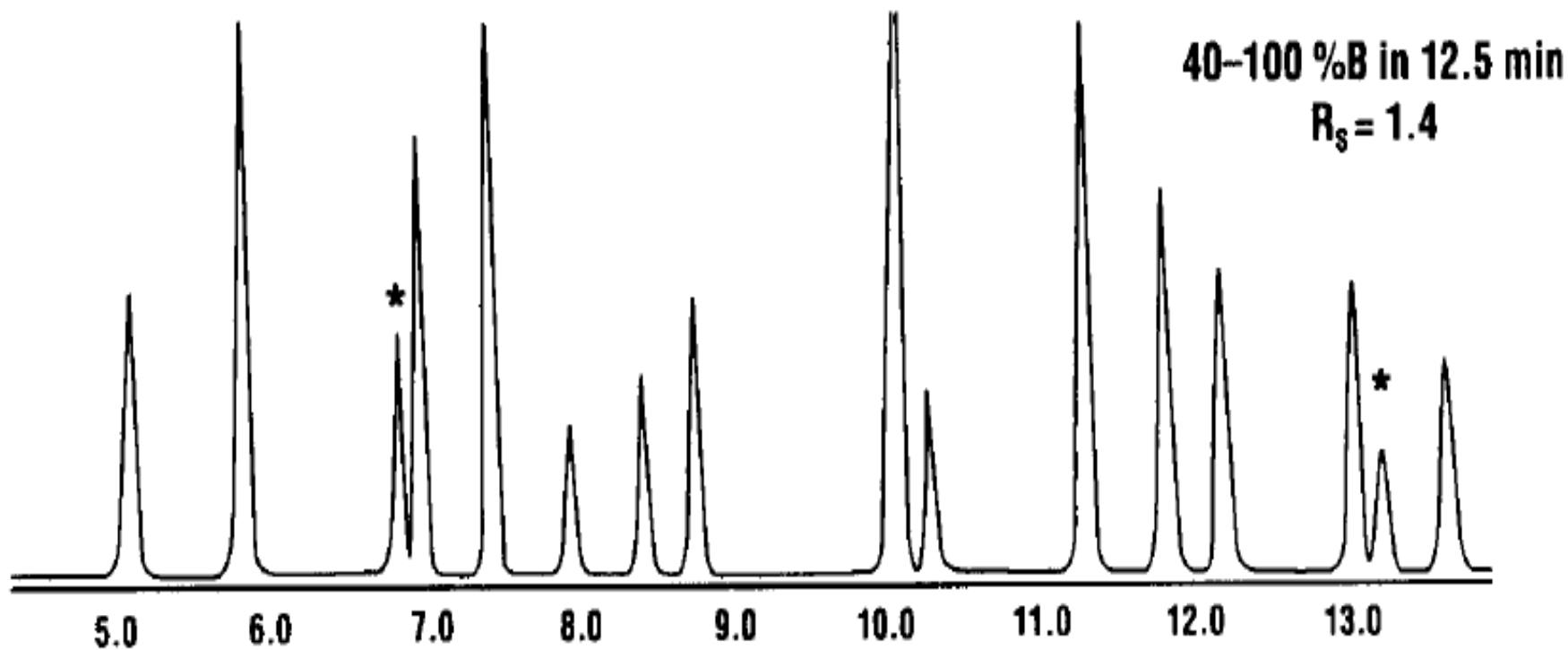
# Optimización de gradiente



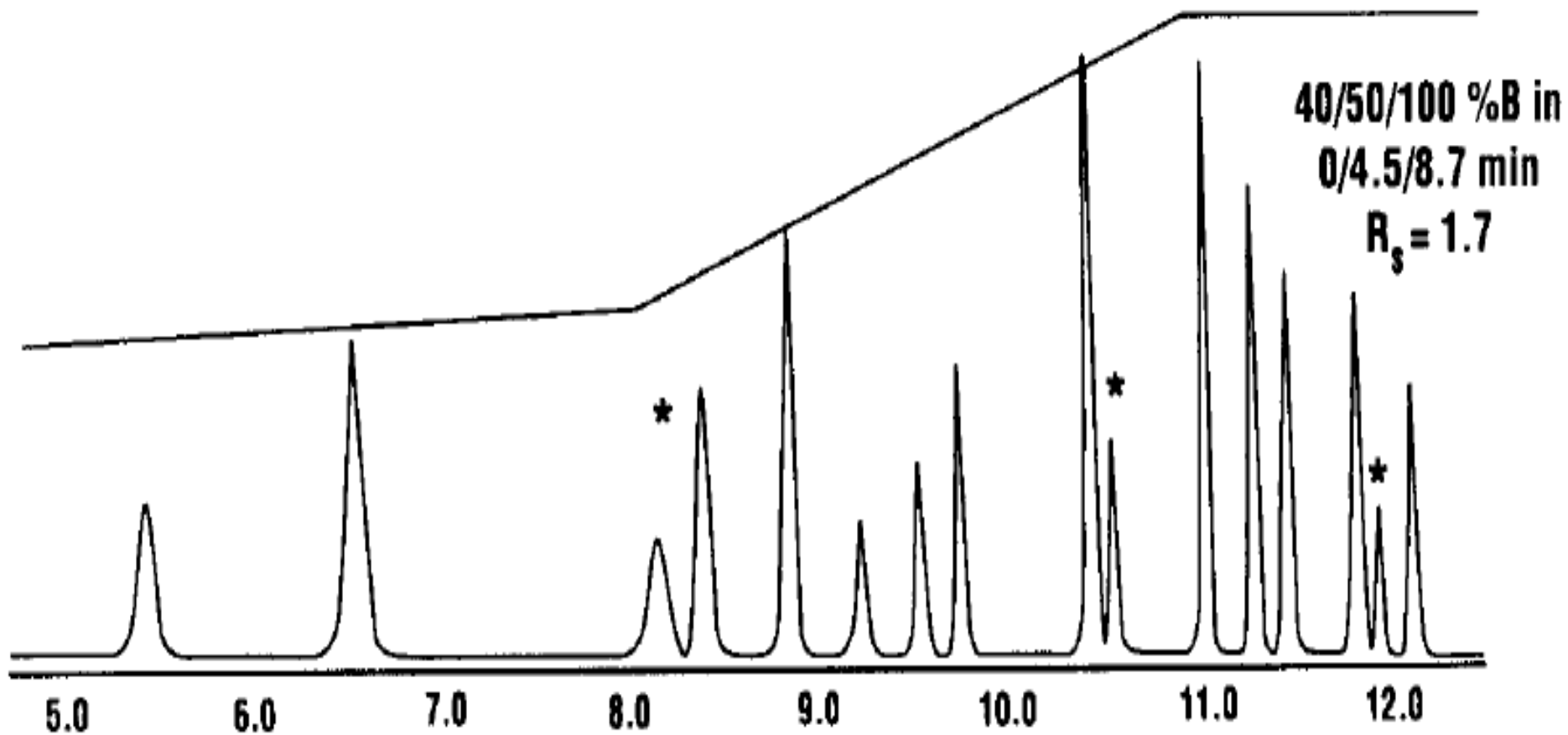
# Optimización de gradiente



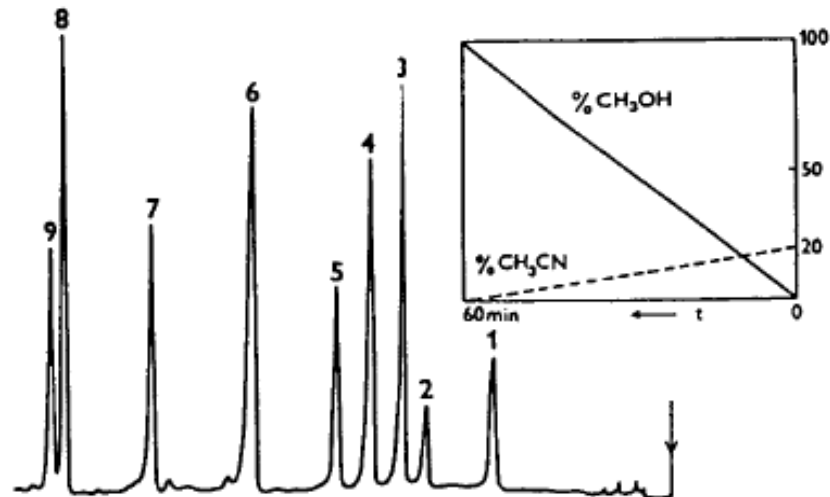
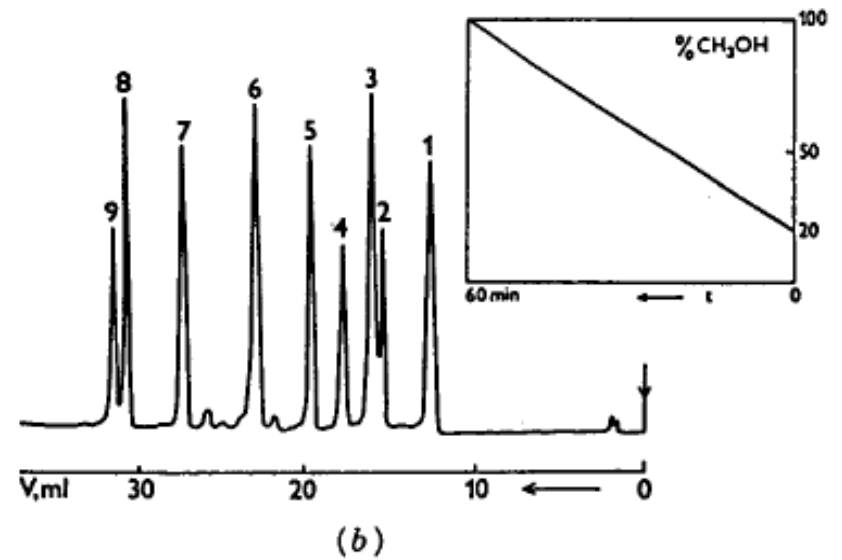
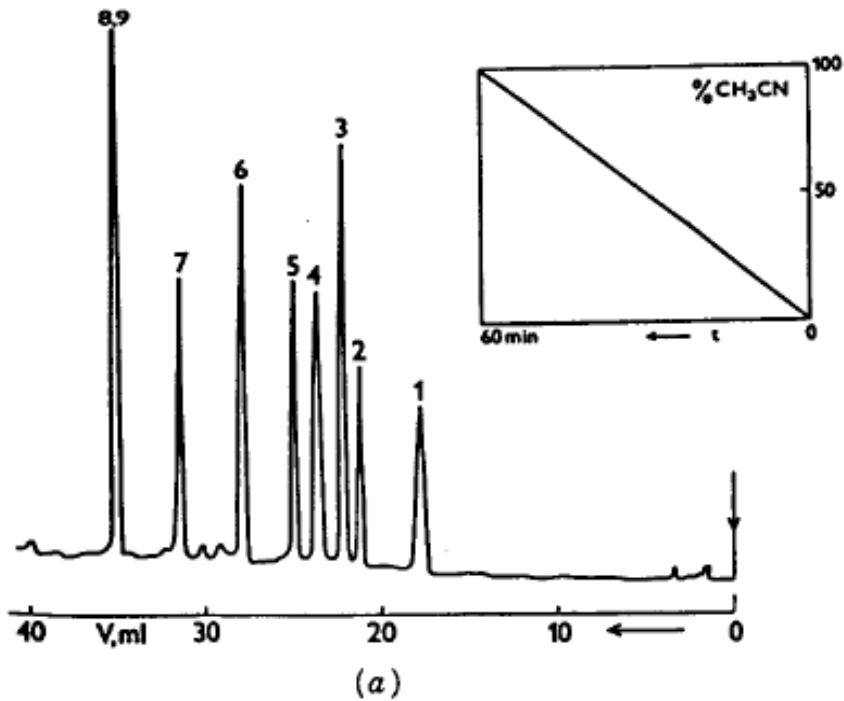
# Optimización de gradiente



## Optimización de gradiente

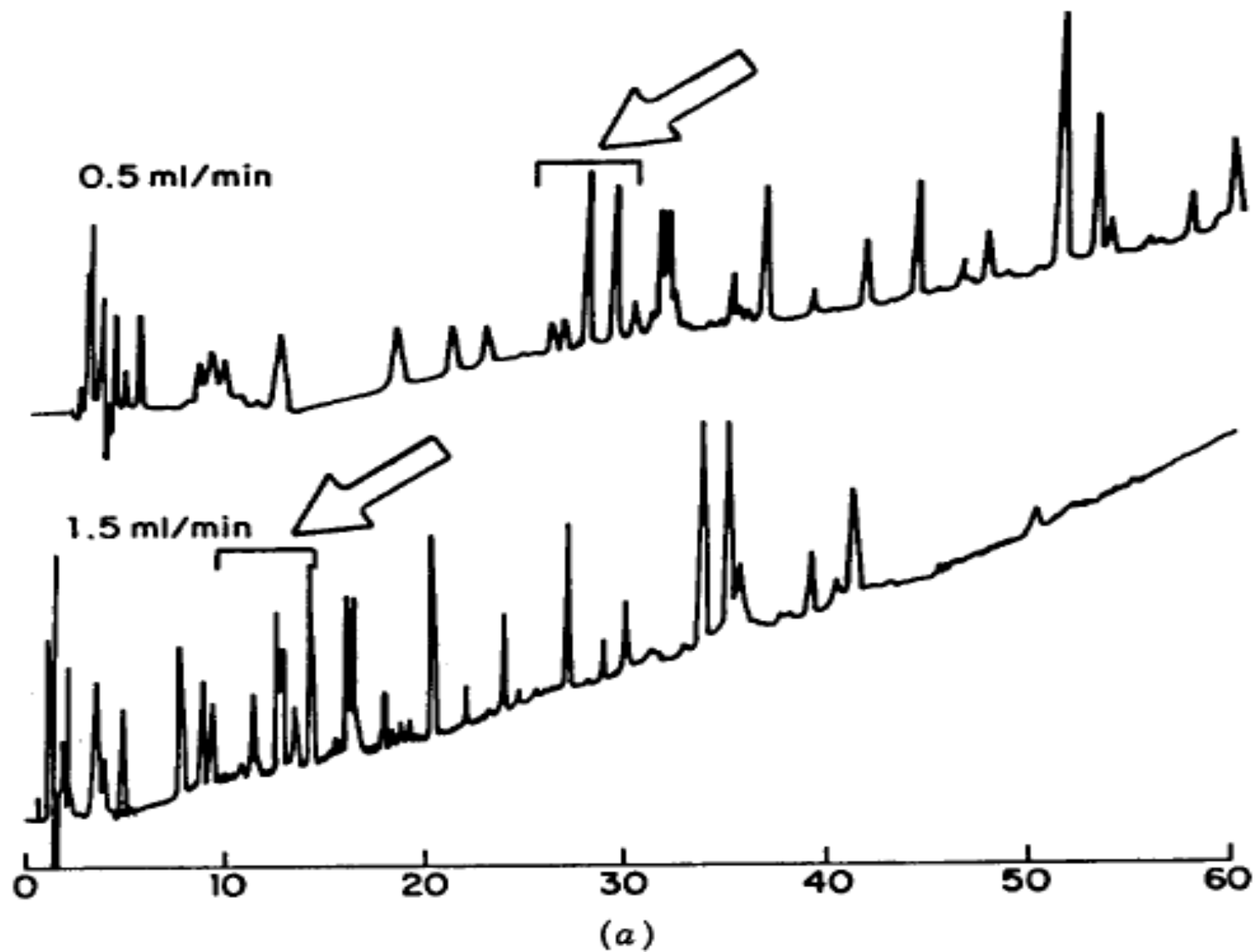


# Optimización de un gradiente combinado



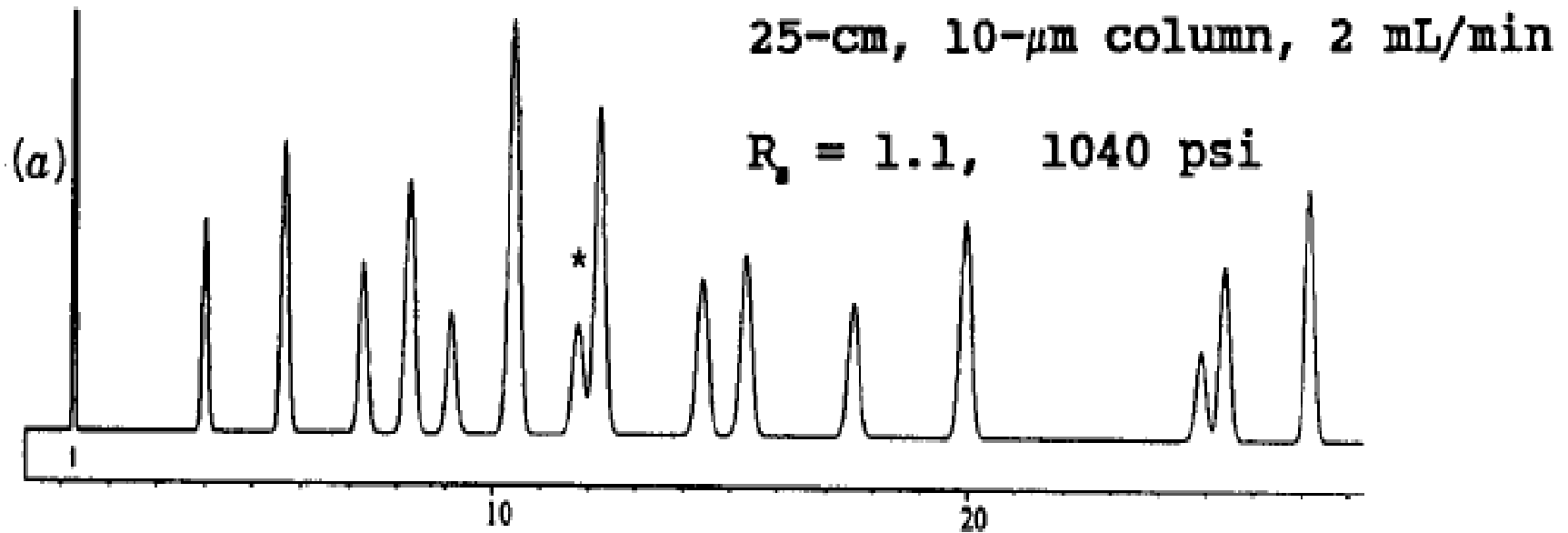


## Efectos de un gradiente de flujo



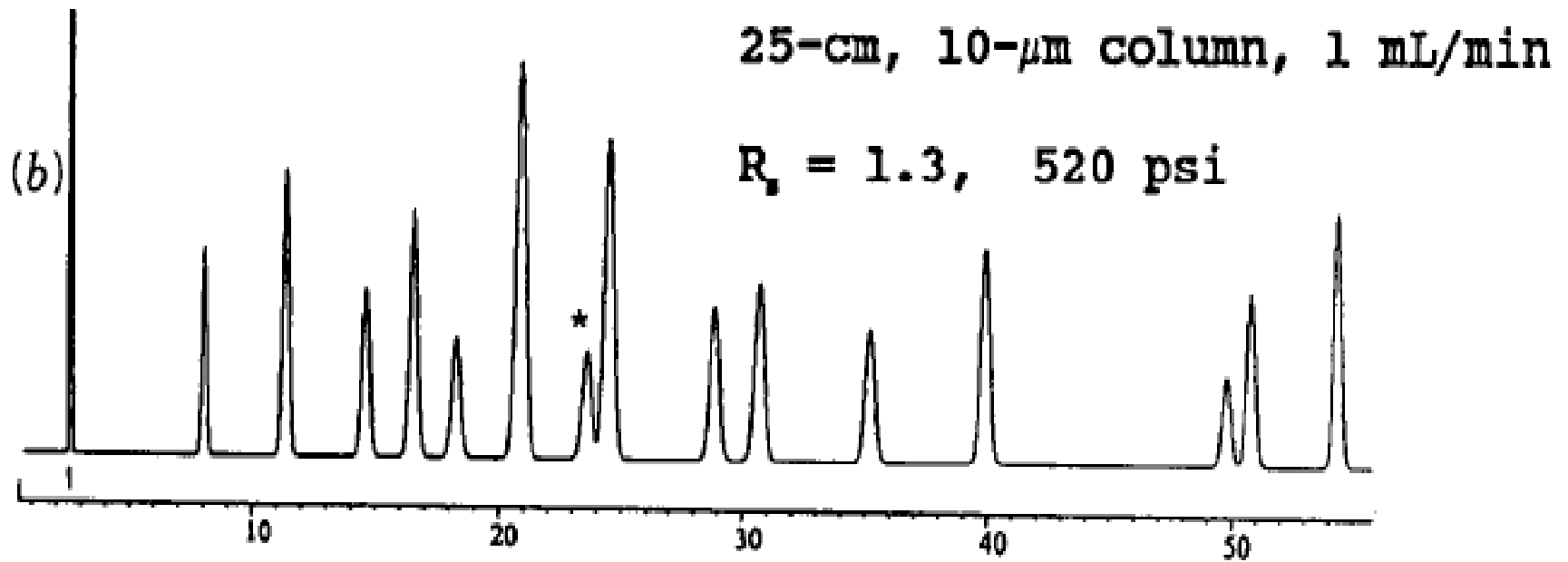
# GRADIENTE

## EFFECTO DEL CAMBIO DE DIMENSIONES Y VELOCIDAD DE FLUJO



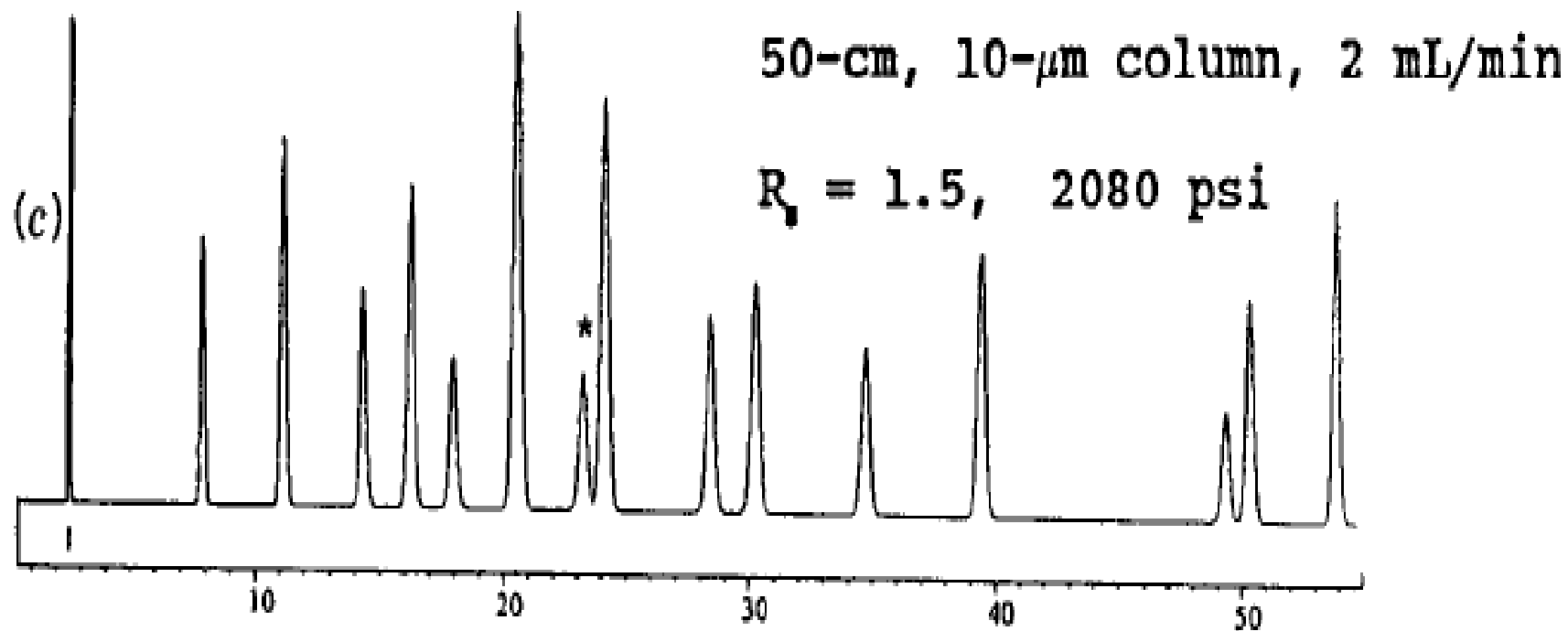
# GRADIENTE

## EFFECTO DEL CAMBIO DE DIMENSIONES



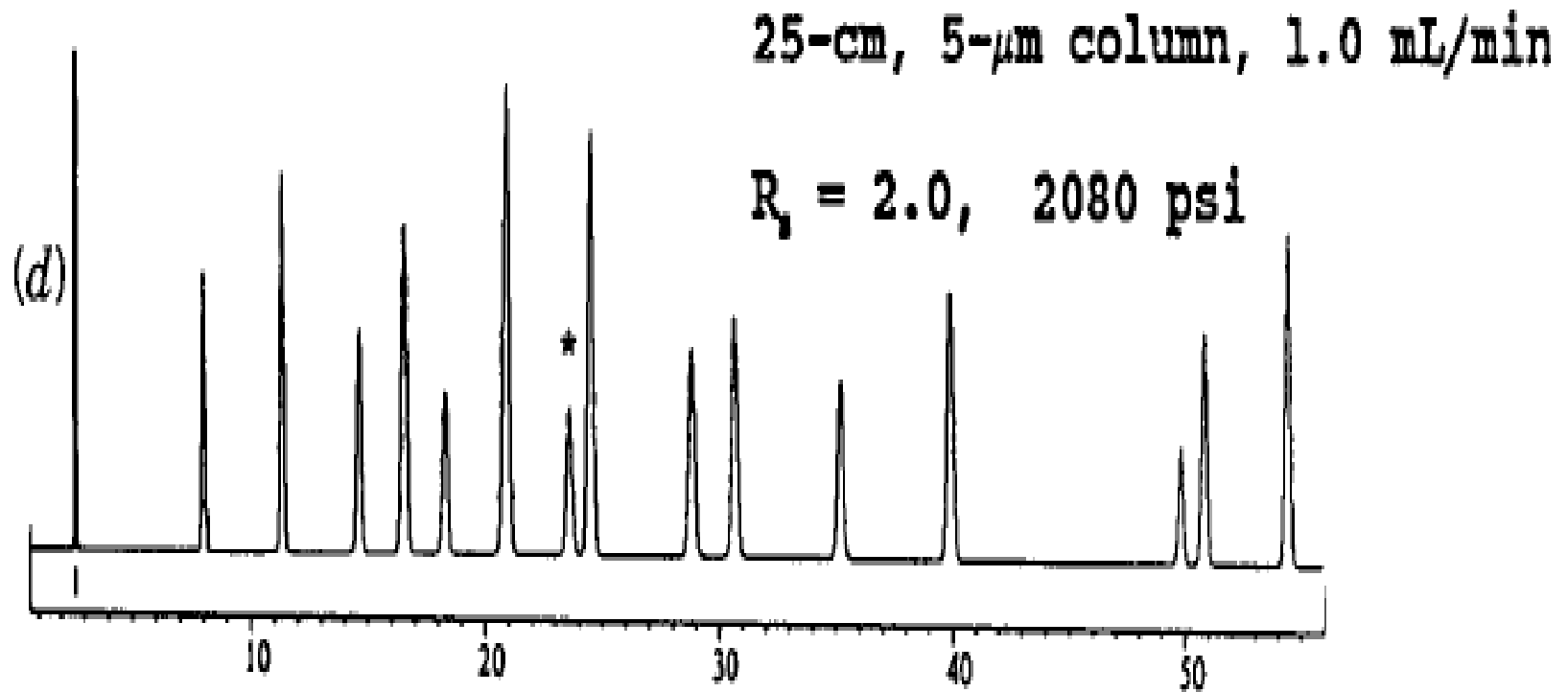
# GRADIENTE

## EFECTO DEL CAMBIO DE DIMENSIONES



# GRADIENTE

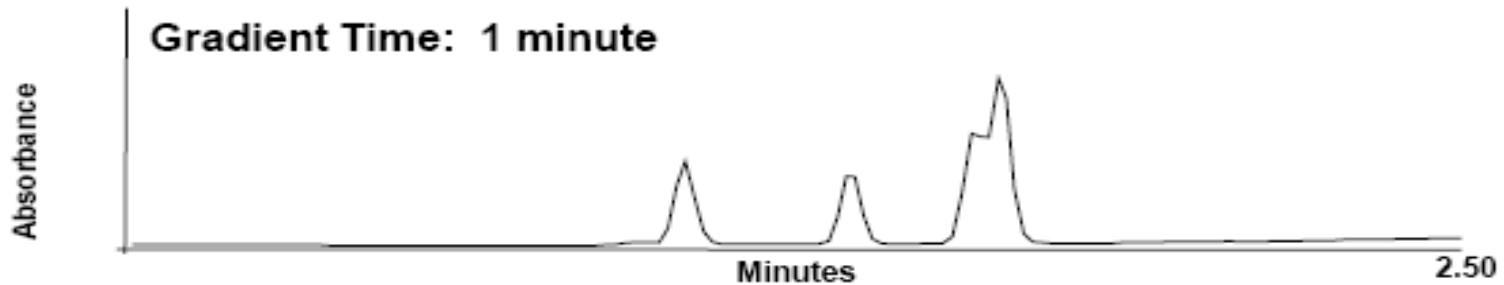
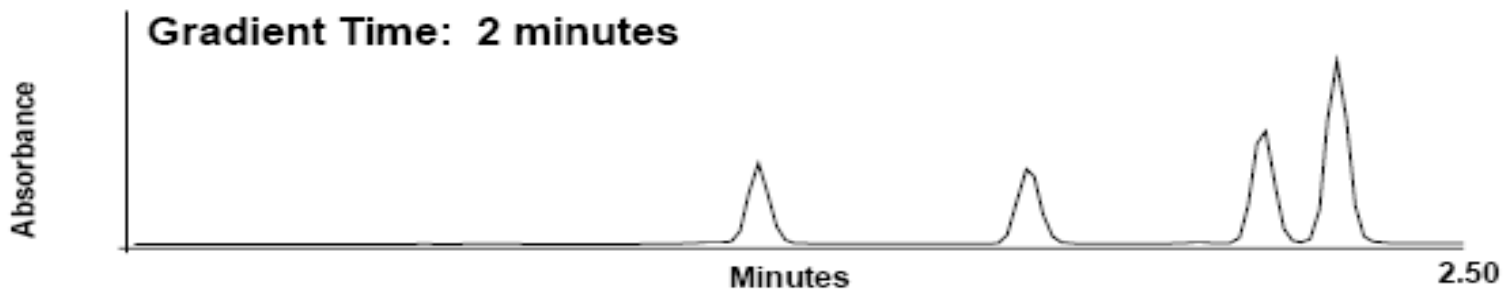
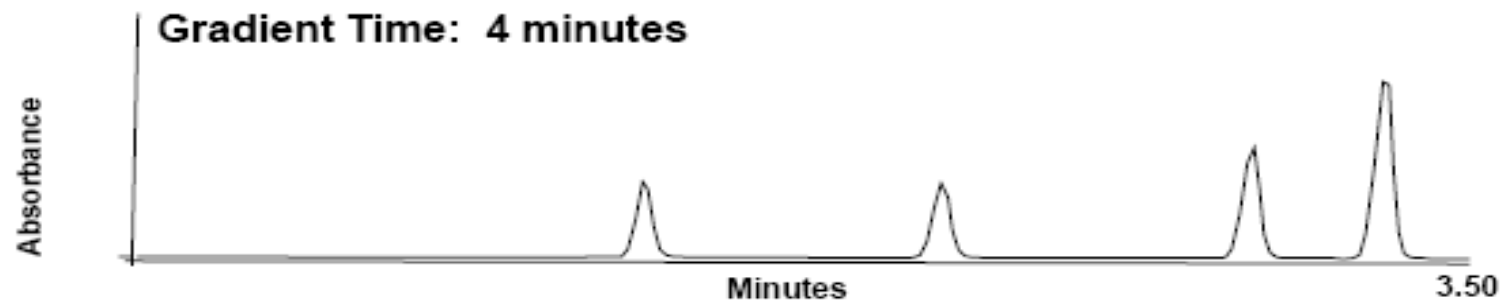
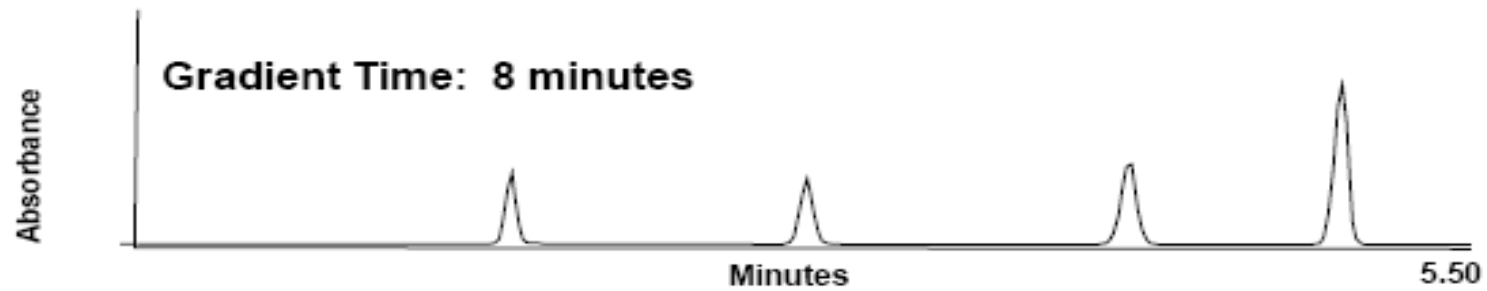
## EFEECTO DEL CAMBIO DE DIMENSIONES



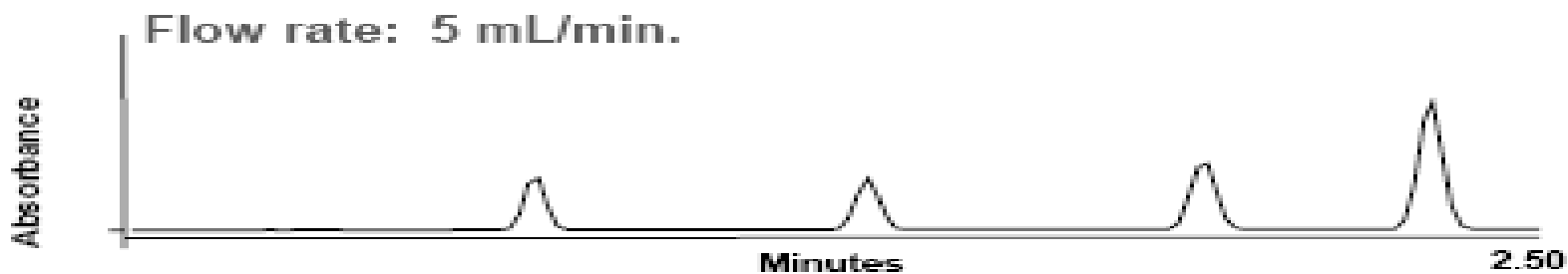
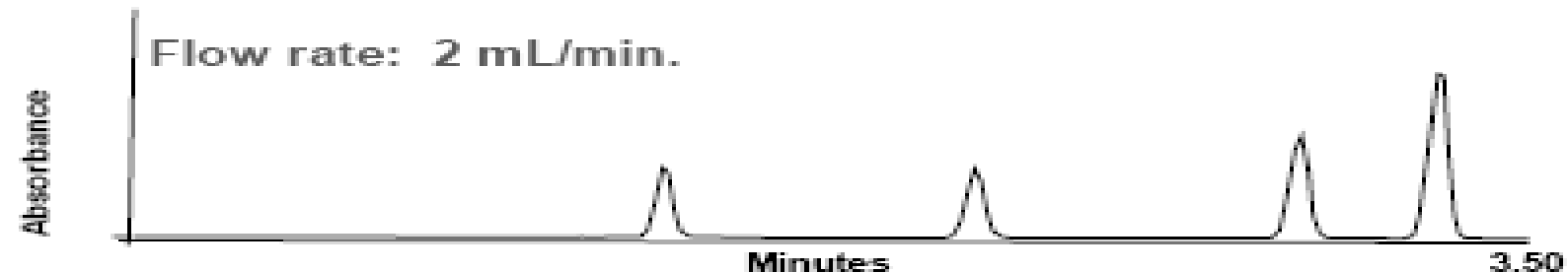
# **ALTERNATIVAS DE GRADIENTES**

- **GRADIENTE DE DISOLVENTE**
- **GRADIENTE DE VELOCIDAD DE FLUJO**
- **GRADIENTE DE LONGITUD DE ONDA**
- **GRADIENTES COMBINADOS**

# RESOLUCIÓN



# RESOLUCIÓN





# GASTO Y TIEMPO DE ANÁLISIS

**El volumen de gradiente no se escala a volumen de columna**

50 mm column



**Vol de columna 0.5 mL**

**5 min de gradiente a 1 mL/min**

**Vol de gradiente = 5 mL**

**Volumen total =  $5/0.5=10$  volúmenes de columna**

20 mm column



**Vol de columna 0.2 mL**

**5 min de gradiente a 1 mL/min**

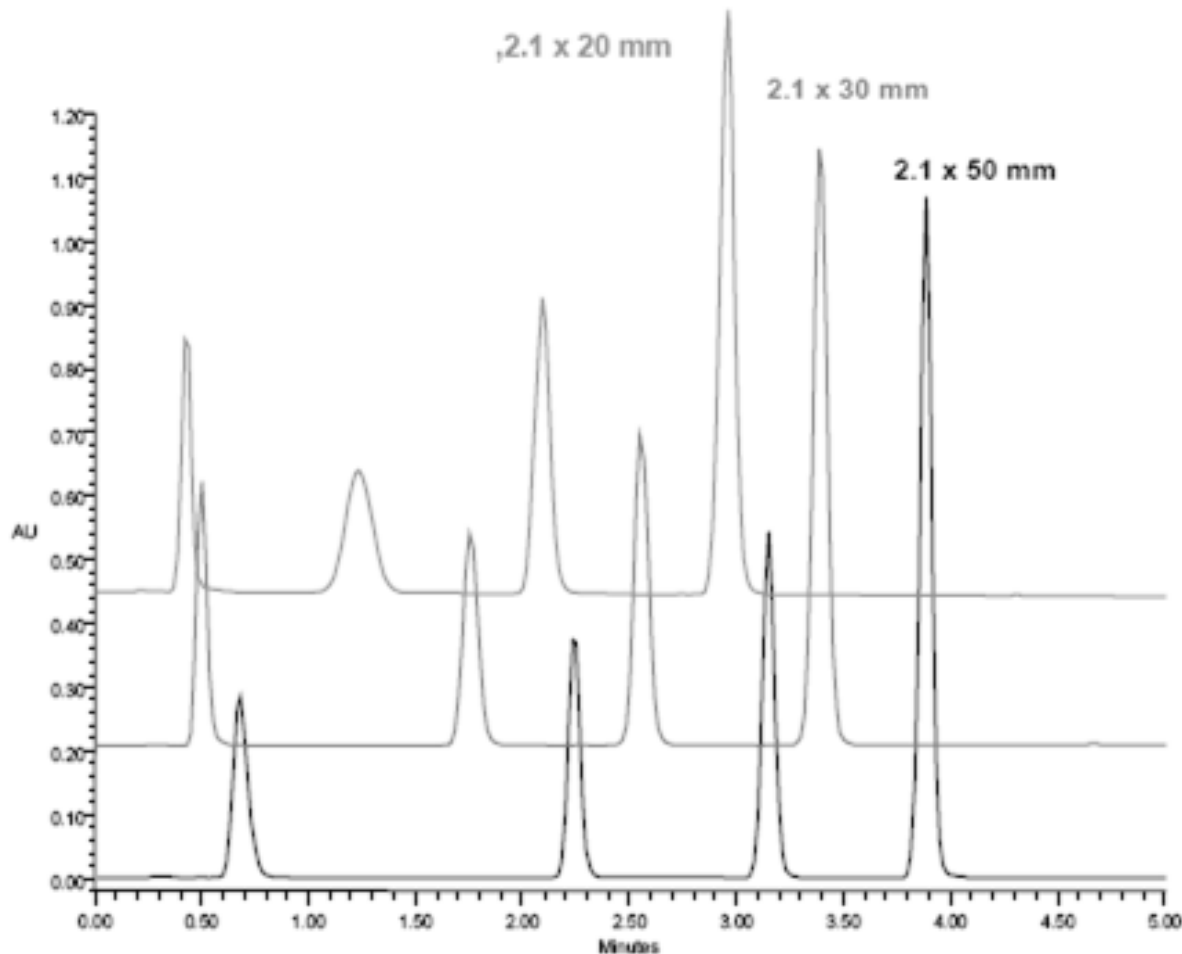
**Vol de gradiente = 5 mL**

**Volumen total =  $5/0.2=25$  volúmenes de columna**



# RESOLUCIÓN

**El volumen de gradiente no se escala a volumen de columna**



## Conditions:

Symmetry® C18, 5  $\mu$ m

Mobile phase: A=0.1% TFA in water,  
B=0.1% TFA in acetonitrile

Gradient: 0-60% B in 5 minutes

Column temperature: 30.0 °C

Detector: 254 nm

Injection volume: 1  $\mu$ L

Flow rate: 1 mL/min.

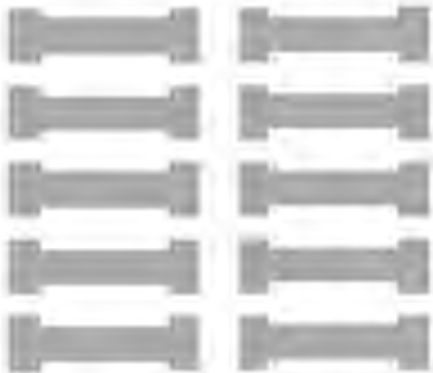
# GASTO Y TIEMPO DE ANÁLISIS

**El volumen de gradiente se escala a volumen de columna**

50 mm column



**Vol de columna 0.5 mL**  
**5 min de gradiente a 1 mL/min**  
**Vol de gradiente 5 mL**  
**Vol total=  $5/0.5= 10$  volúmenes de columna**



20 mm column



**Vol de columna 0.2 mL**  
**2 min de gradiente a 1 mL/min**  
**Vol de gradiente 2 mL**  
**Vol total=  $2/0.2= 10$  volúmenes de columna**



# GASTO Y TIEMPO DE ANÁLISIS

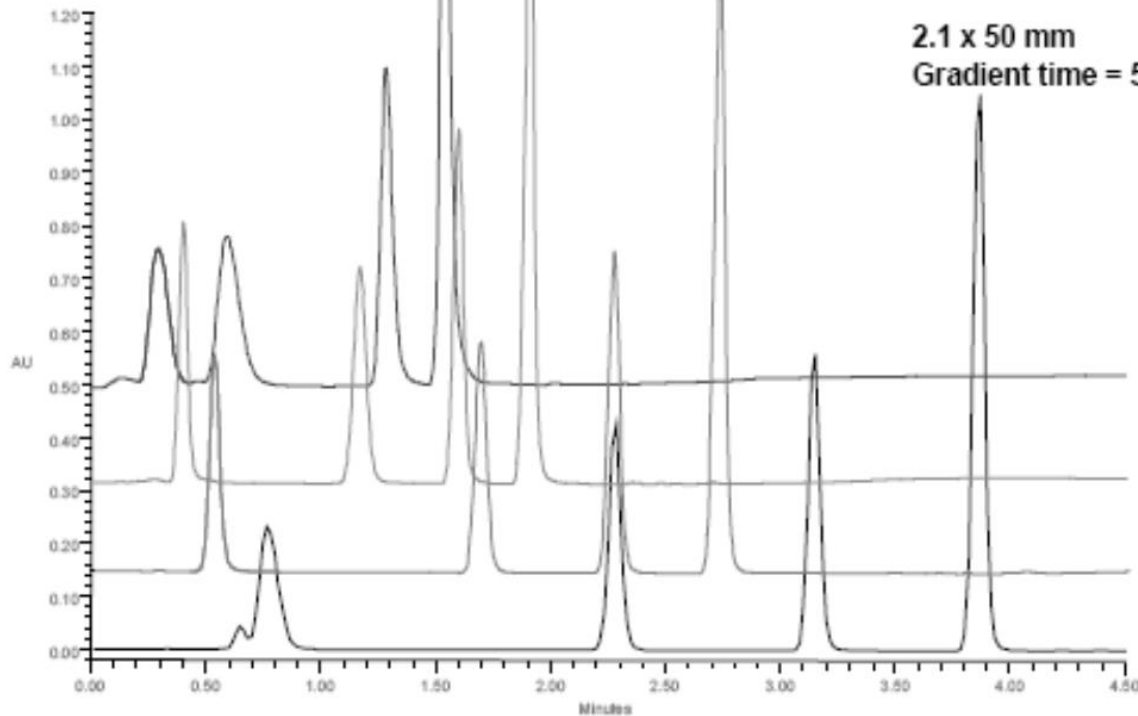
El volumen de gradiente se escala a volumen de columna

2.1 x 10 mm  
Gradient time = 1 minute

2.1 x 20 mm  
Gradient time = 2 minutes

2.1 x 30 mm  
Gradient time = 3 minutes

2.1 x 50 mm  
Gradient time = 5 minutes



## Conditions:

Symmetry® C<sub>18</sub>, 3.5 μm

Mobile phase: A=0.1% TFA in water, B=0.1% TFA in acetonitrile

Gradient: 0-60% B in noted time

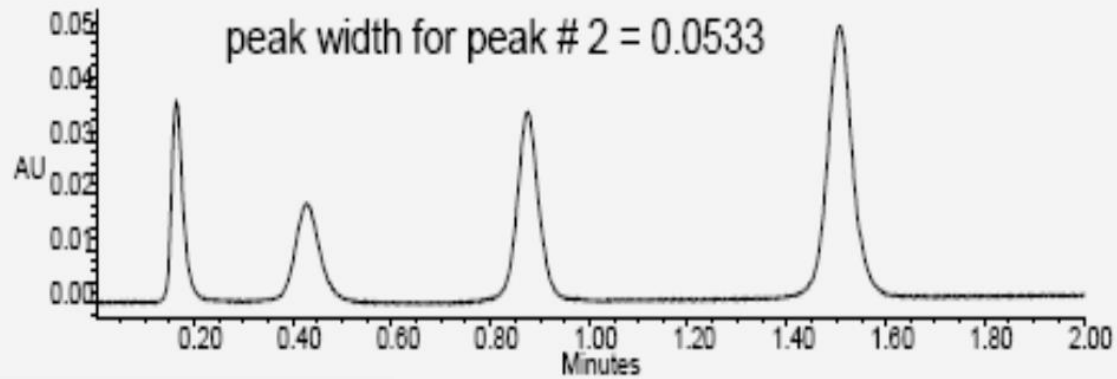
Column temperature: 30.0 °C

Detector: 254 nm

Injection volume: 1 μL

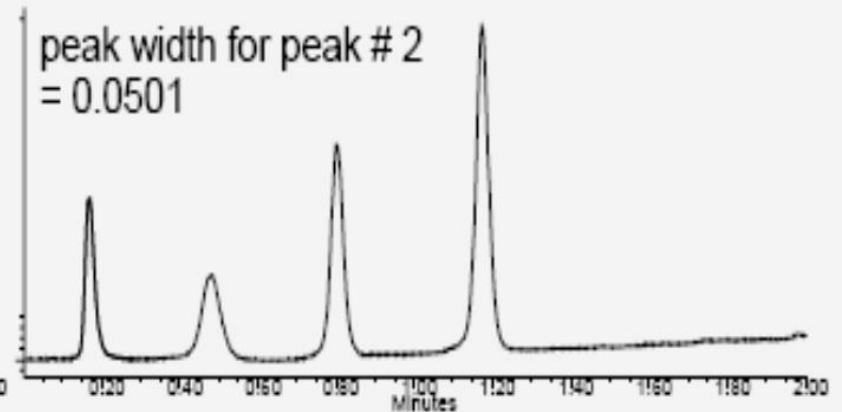
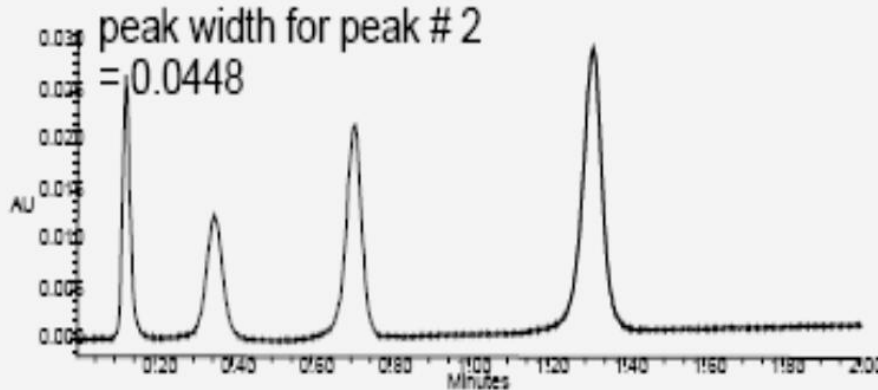
Flow rate: 1 mL/min.

# EFICIENCIA

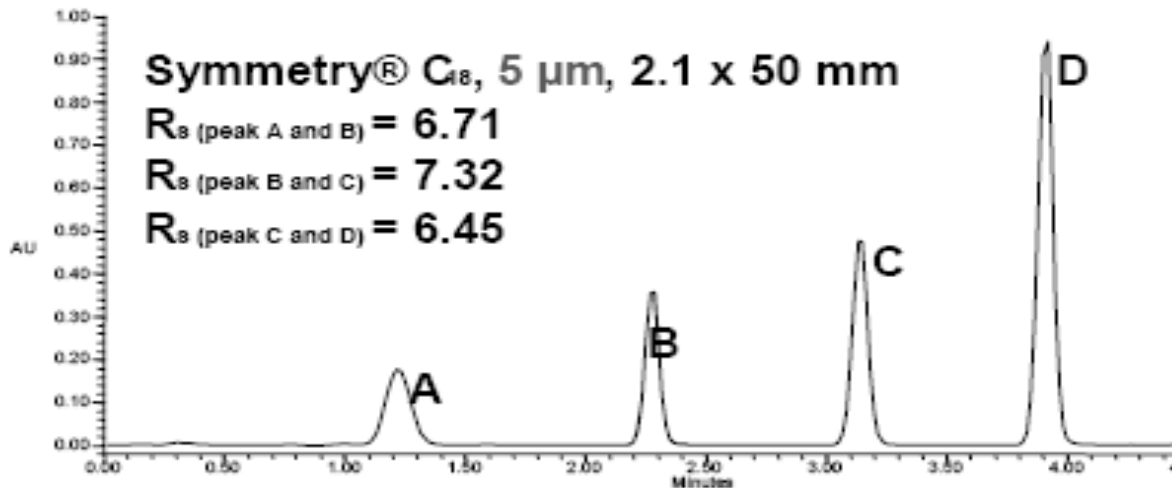
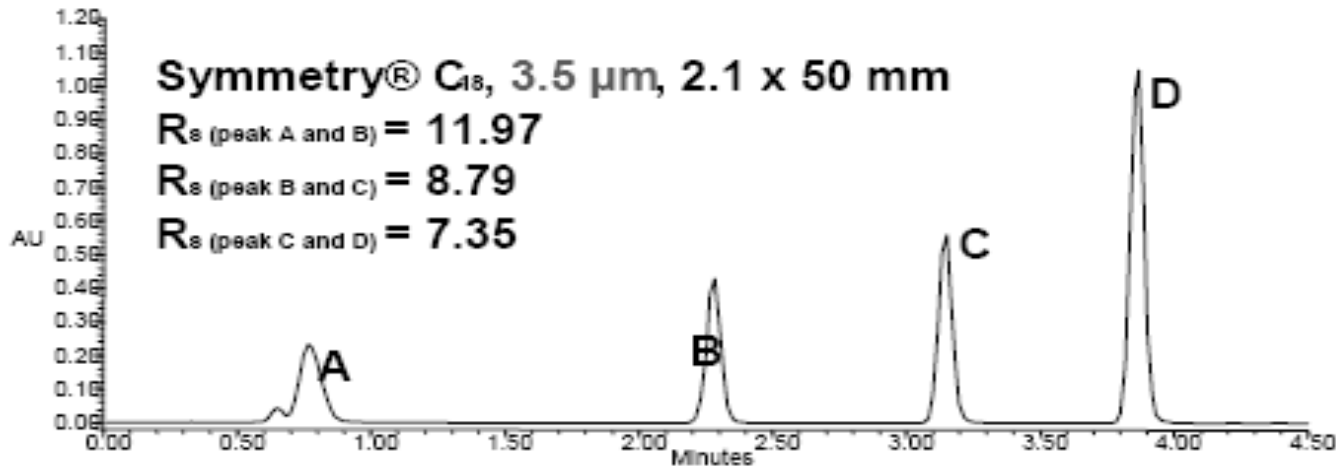


Incremento de velocidad de flujo de 2 a 3 mL/min

Incremento de pendiente del gradiente en un 50%



# RESOLUCIÓN Y TAMAÑO DE PARTÍCULA



**Incremento de resolución en un análisis por gradiente**

**La velocidad de flujo puede ser aumentada**

# ESTRATEGIAS DE OPTIMIZACIÓN

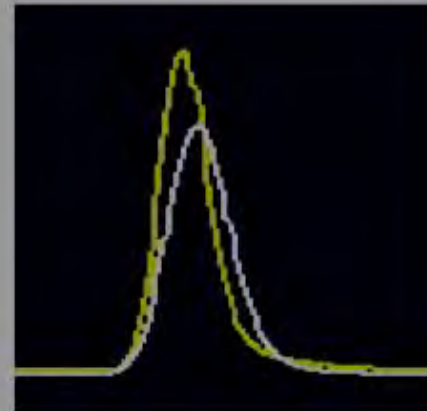
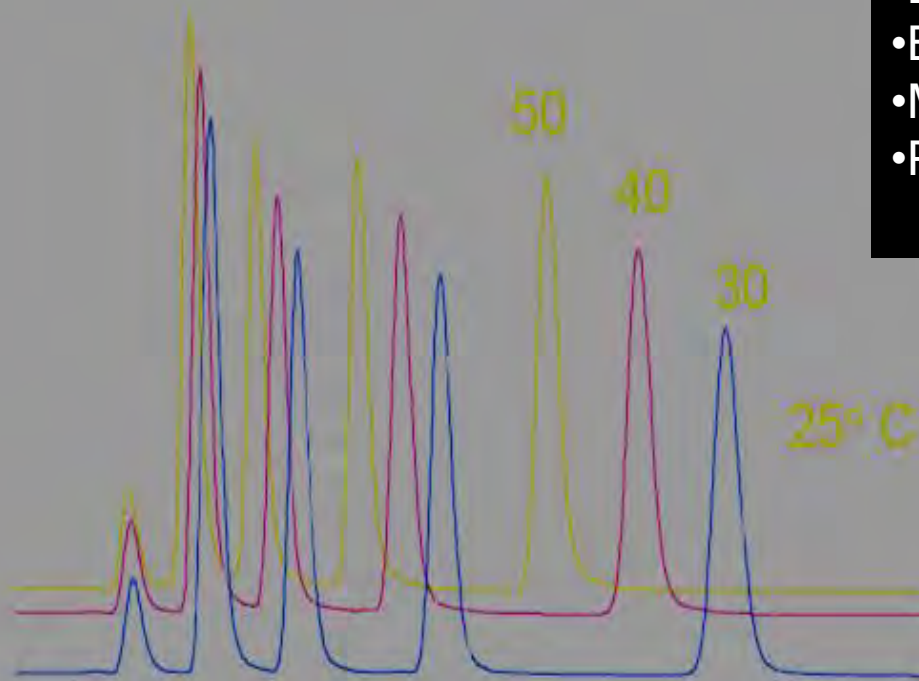
## Soluciones del método

- Gradientes cortos
- Incremento de velocidad de flujo
- Utilización de columnas cortas
- Reducción de tamaño de partícula
- Incremento de temperatura

# ESTRATEGIAS DE OPTIMIZACIÓN

## Temperatura

- Separaciones más rápidas
- Baja caída de presión
- Baja viscosidad
- Más sensibilidad
- Picos más eficientes





# ESTRATEGIAS DE OPTIMIZACIÓN

**Para obtener separaciones más rápidas y eficientes**

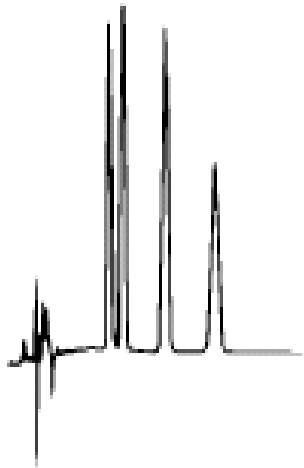
- Incrementar velocidad de flujo
- Disminuir volumen de la columna
- Disminuir tamaño de partícula
- Escalar el volumen de gradiente con el decremento de volumen de columna

- **Resolución de problemas**

# Resolución de problemas en CLAR

## Desaparición de picos o picos pequeños

Normal



Problem



Problem



### Problema

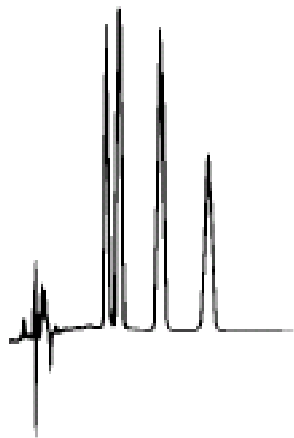
1. Detector apagado
2. Conexión entre detector y computadora o integrador
3. Flujo nulo en la fase móvil
4. Muestra descompuesta o no inyecta
5. Detector con baja sensibilidad

### Solución

1. Checar el detector
2. Checar conexiones
3. Checar flujo
4. Checar las propiedades de la muestra o checar la inyección automática
5. Checar la atenuación

# Resolución de problemas en CLAR

Normal



Problem



No existe flujo

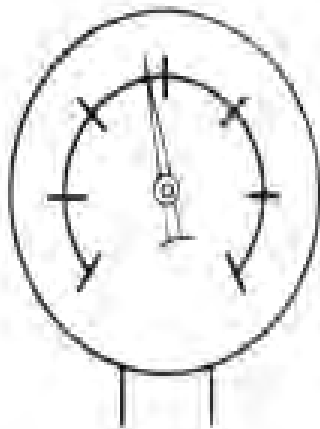
**Problema**

**Solución**

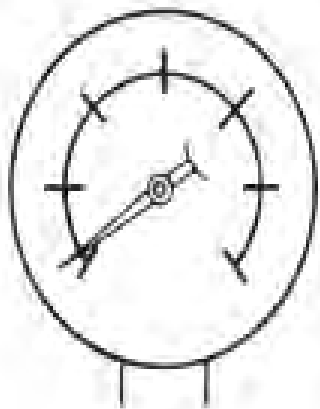
- | Problema   | Solución  |
|--|---|
| 1. Detector apagado                                      | 1. Checar el detector   |
| 2. Flujo interrumpido u obstruido                        | 2. Checar los niveles de fase móvil. Checar miscibilidad de la muestra con la fase móvil  |
| 3. Fuga de la fase móvil                                 | 3. Checar las conexiones  |
| 4. Aire atrapado en la bomba (fluctuación de la presión) | 4. Desconectar las tuberías de la precolumna y checar el flujo. Desconectar las tuberías de la columna analítica y checar flujo. Purgar las tomas de fase móvil |

# Resolución de problemas en CLAR

Normal



Problem



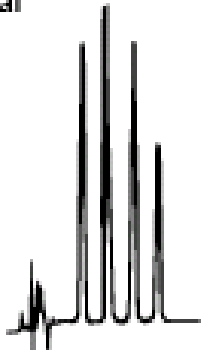
## Nula o baja presión

Problema	Solución
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Fuga</li><li>2. Flujo interrumpido u obstruido</li></ol>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Checar las conexiones</li><li>2. Checar el nivel de la fase móvil. Obstrucción en el loop de muestra. Checar miscibilidad de la muestra con la fase móvil.</li></ol>
<ol style="list-style-type: none"><li>3. Aire atrapado en la bomba (fluctuación de la presión)</li></ol>	<ol style="list-style-type: none"><li>3. Desconectar la precolumna y columna analítica y purgar el sistema</li></ol>
<ol style="list-style-type: none"><li>4. Fuga en las conexiones</li></ol>	<ol style="list-style-type: none"><li>4. Reconectar el sistema</li></ol>
<ol style="list-style-type: none"><li>5. Aire atrapado en el sistema</li></ol>	<ol style="list-style-type: none"><li>5. Emplear isopropanol sin precolumna y columna analítica</li></ol>
<ol style="list-style-type: none"><li>6. Sello de la bomba inadecuado</li></ol>	<ol style="list-style-type: none"><li>6. Checar los sellos. Reemplazar el sello o pistón</li></ol>

# Resolución de problemas en CLAR

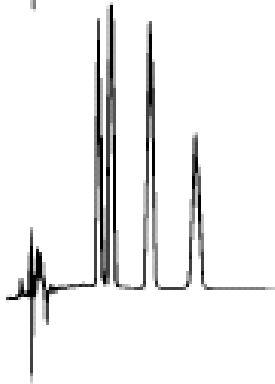
## Cambio en los tiempos de retención

Normal



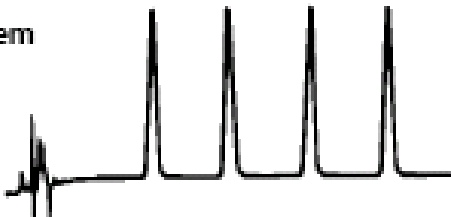
794-0753

Problem



794-0747

Problem

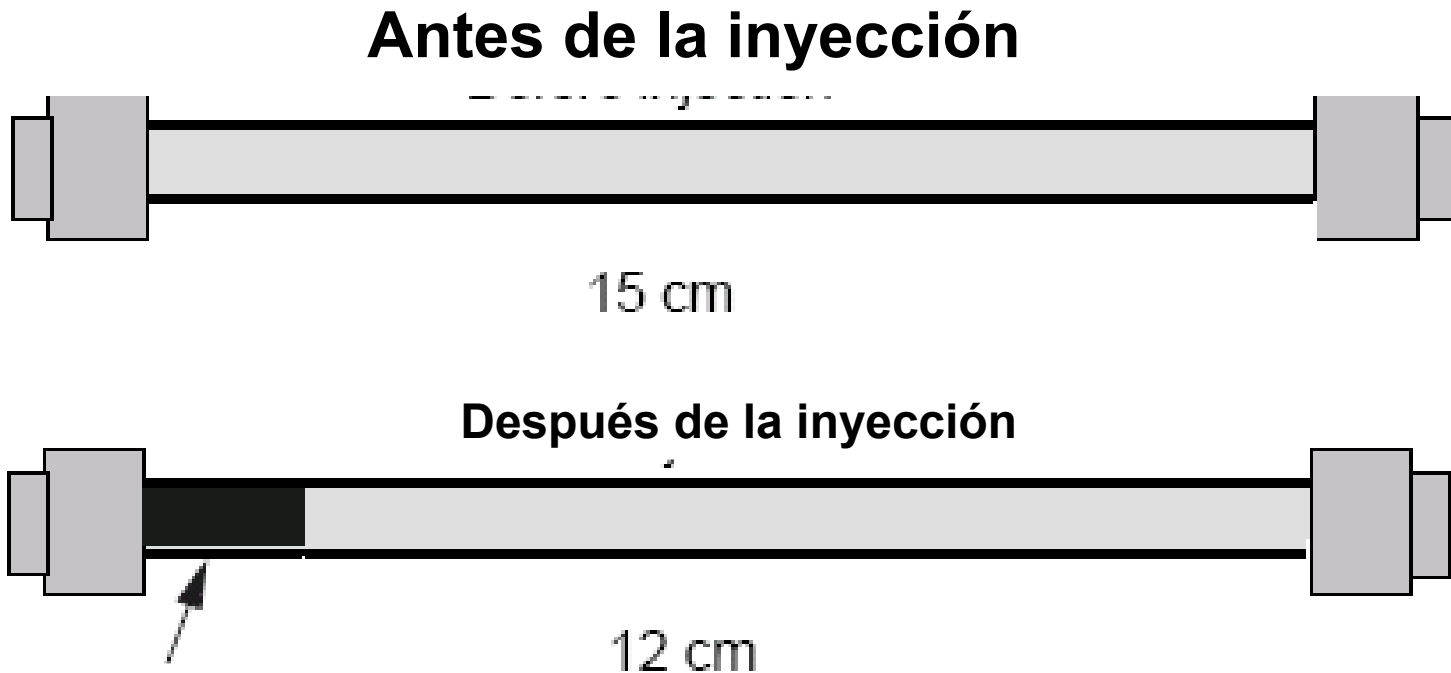


- | Problema  | Solución   |
|---|--|
| 1. Fuga   | 1. Checar las conexiones                                       |
| 2. Cambio en la composición de la fase móvil        | 2. Checar la composición de la fase móvil.                     |
| 3. Aire atrapado en la bomba                        | 3. Purgar el aire atrapado                                     |
| 4. Fluctuaciones de temperatura                     | 4. Usar el termostato de la columna analítica                  |
| 5. Sobrecarga de la columna                         | 5. Inyectar volúmenes pequeños. Diluir la muestra              |
| 6. Incompatibilidad de la muestra con la fase móvil | 6. Ajustar la muestra  |
| 7. Problema en la columna.                          | 7. Checar eficiencia de la columna . Sustitución de la columna |

# Resolución de problemas en CLAR

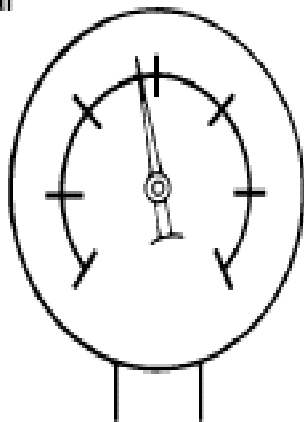
## Cambios en los tiempos de retención

Retención de analitos en el cabezal de la columna

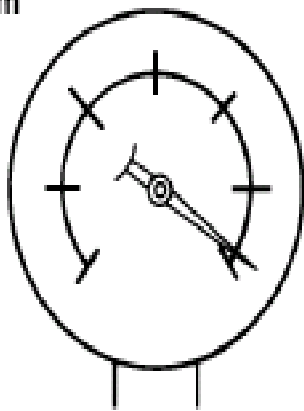


# Resolución de problemas en CLAR

Normal



Problem



## Presión alta

### Problema

1. Problema en la bomba, inyector, filtros o tuberías
2. Precolumna o columna analítica obstruida

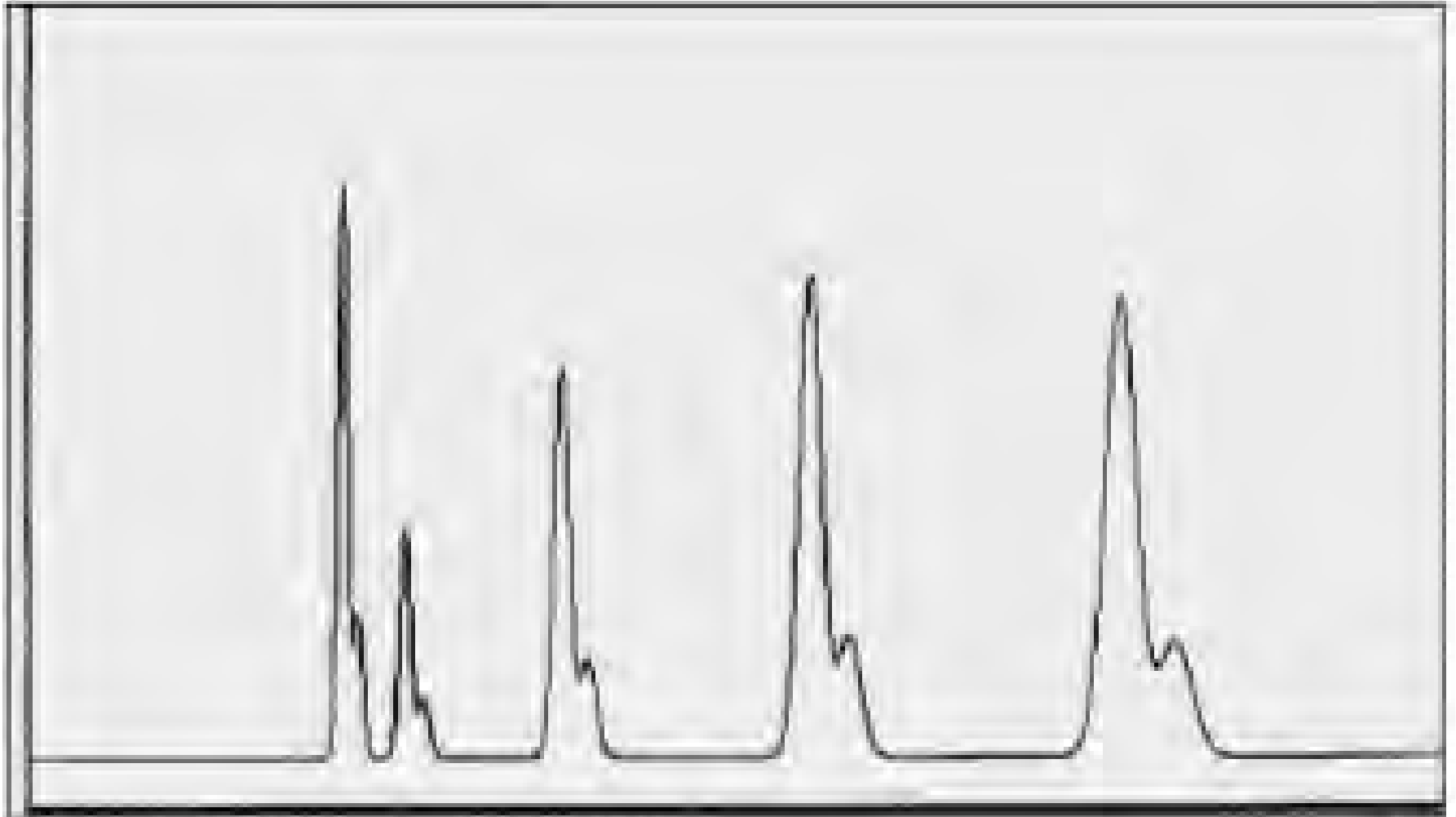
### Solución

1. Remover la precolumna y columna analítica. Reemplazar las uniones (DI 0.010pulgadas). Lavar y sonicar los filtros o en su defecto reemplazarlos
2. Remover la precolumna y checar la presión. Remover la columna analítica y checar la presión. Lavar la precolumna y/o columna analítica con un adecuado lavado de restauración



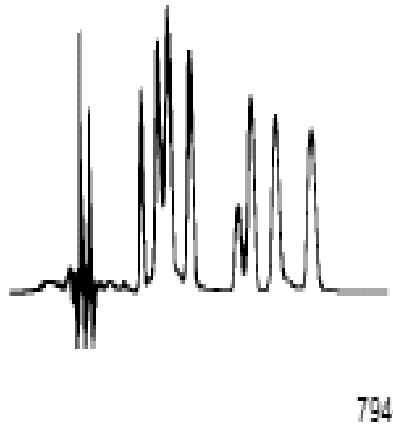
# Resolución de problemas en CLAR

## Presión alta

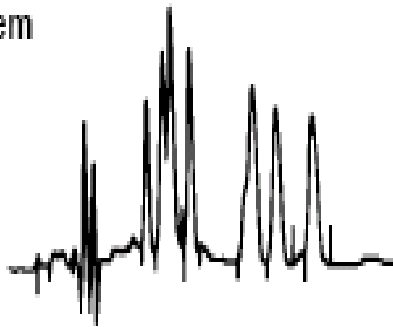


# Resolución de problemas en CLAR

Normal



Problem



## Pérdida de resolución

### Problema

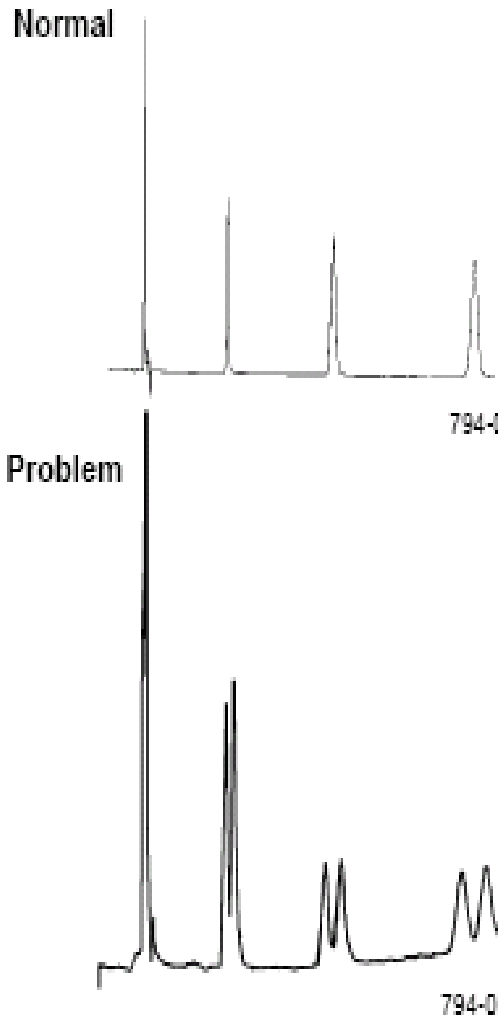
1. Fase móvil contaminada o deteriorada (cambio de selectividad)
2. Precolumna o columna analítica obstruida

### Solución

1. Preparar nueva fase móvil. Purgar la línea.
2. Remover la precolumna y columna analítica. Checar cual es la del problema. Si alguna es la causante realizar un lavado adecuado. Lavar los filtros de la precolumna y columna analítica.

# Resolución de problemas en CLAR

## Picos dobleteados o partidos



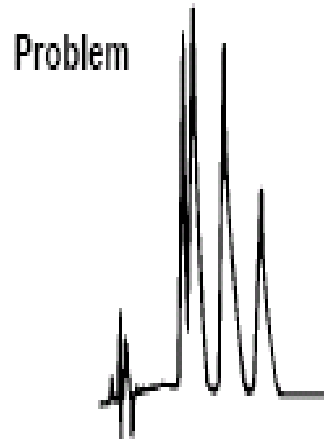
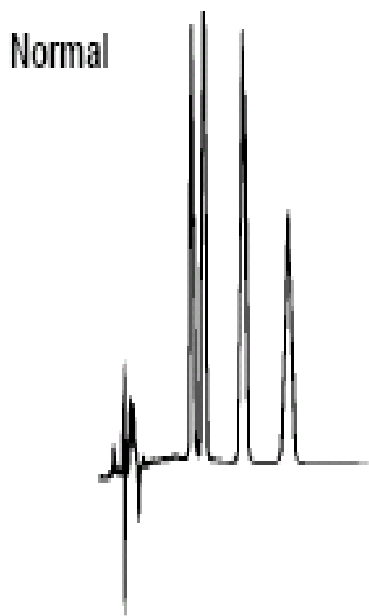
### Problema

1. Contaminación en el cabezal de la precolumna o columna analítica
2. Bloqueo de los filtros de la precolumna o columna analítica
3. Volumen vacío en el cabezal de la columna analítica
4. Muestra incompatible con la fase móvil

### Solución

1. Remover la precolumna, lavarla o en su defecto reemplazarla. Remover la columna analítica. Lavarla o en su defecto reemplazarla. Lavar o cambiar los filtros de precolumna y columna analítica
2. Lavar o reemplazar los filtros
3. Cambiar el sentido de la columna
4. Ajustar la composición de la matriz en la muestra

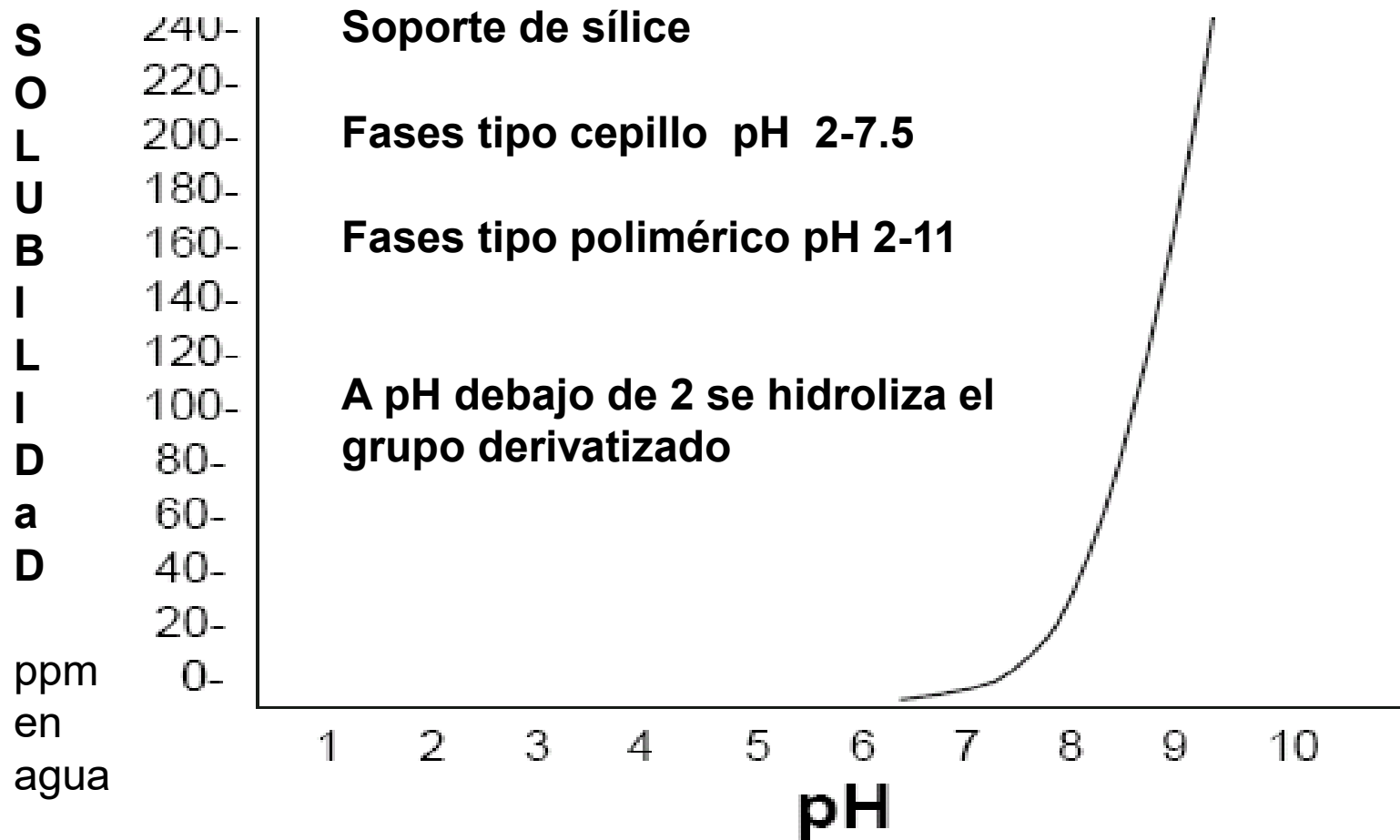
# Resolución de problemas en CLAR



## Picos coleados

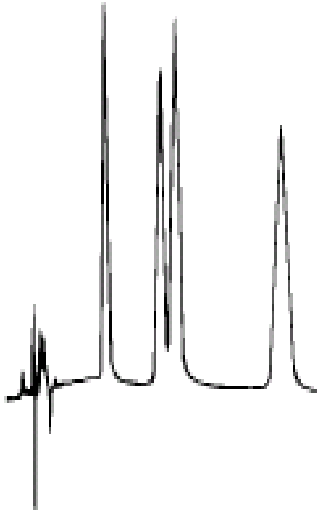
Problema	Solución
1. Muestra reacciona con los sitios activos de la fase estacionaria (silanoles residuales)	1. Checar la calidad de la columna. Agregar un modificador (base) en la fase móvil.
2. Mal pH de la fase móvil	2. Ajustar el pH. Para compuestos básicos trabajar pH ácido (2-3)
3. Mala elección de la fase estacionaria	3. Cambiar de fase estacionaria (columna endcapping)
4. Volumen vacío en el cabezal de la columna analítica	4. Cambiar el sentido de la columna
5. Matriz de la muestra inadecuada con la fase móvil	5. Matriz más débil que la fase móvil. Disolver o diluir en fase móvil
6. Filtros sucios	6. Lavar o cambiar los filtros

# Resolución de problemas en CLAR

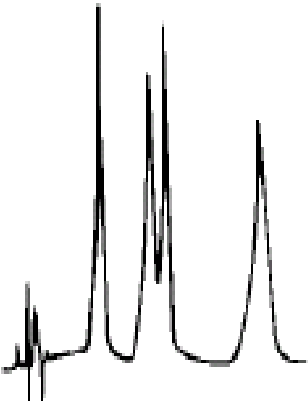


# Resolución de problemas en CLAR

Normal



Problem

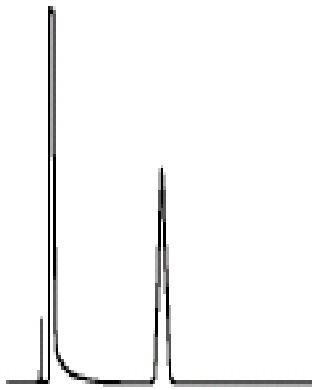


## Picos cabeceados

Problema	Solución
1. Sobrecarga de la columna analítica	1. Inyectar volúmenes más pequeños. Diluir la muestra.
2. Matriz de muestra incompatible con la fase móvil	2. Ajustar la matriz de la muestra. Si es posible utilizar la fase móvil.
3. Picos sobrepuestos	3. Incrementar la eficiencia o cambiar la selectividad. Utilizar una columna CN

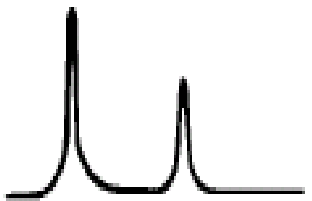
# Resolución de problemas en CLAR

Normal



794-C

Problem



794-C

## Picos redondeados

### Problema

1. Detector opera fuera del rango dinámico
2. Detector con bajo tiempo de respuesta
3. Sobrecarga de la columna
4. Interacción de la muestra con la fase estacionaria
5. Detector con atenuación muy alta

### Solución

1. Reducir el volumen y/o concentración de la muestra.
2. Ajustar el tiempo de respuesta
3. Reducir el volumen y/o concentración de la muestra
4. Cambiar la concentración del amortiguador, pH o composición de la fase móvil. Cambiar de fase estacionaria
5. Reducir la atenuación

# Resolución de problemas en CLAR

## Deriva de la línea base

Normal



Problem



Problema	Solución
1. Fluctuación de la temperatura. Efecto marcado en detectores de IR, conductividad y UV con alta sensibilidad	1. Utilizar el termostato
2. Fase móvil heterogénea	2. Utilizar disolventes grado HPLC
3. Contaminación o aire en la celda del detector	3. Lavar la celda con metanol o isopropanol (no usar ácido nítrico en columnas y tuberías PEEK)
	4. Lavar la celda de flujo. Checar las uniones
4. Obstrucción en el detector	5. Monitorear la bomba
5. Problemas de mezclado de la fase móvil	
6. Tiempo de equilibrio corto	6. Corregir el tiempo de equilibrio
7. Contaminación de la fase móvil	7. Checar la fase móvil
8. Analitos fuertemente retenidos que eluyen tardíamente. Un gradiente agrava el problema	8. Usar precolumna. Lavar columna analítica
9. Detector longitud de onda inadecuada	9. Cambiar la longitud de onda



# Resolución de problemas en CLAR

Normal



Problem



## Línea base ruidosa

Problema	Solución
1. Aire en la fase móvil, detector o bomba	1. Desgasificar la fase móvil
2. Pulsaciones de la bomba	2. Incorporar un amortiguador de pulsaciones
3. Incompleto mezclado de la fase móvil	3. Mezclar la fase móvil fuera de línea
4. Efecto de temperatura	4. Reducir la temperatura o agregar un intercambiador de calor
5. Fluctuación del potencial eléctrico	5. Colocar un controlador de voltaje y si se puede un no-break
6. Fugas	6. Checar las fugas, sellos y uniones.

# Resolución de problemas en CLAR

Normal



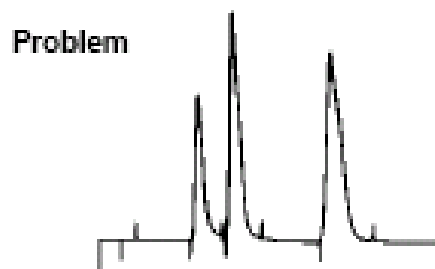
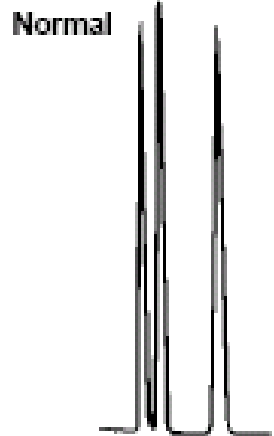
Problem



## Línea base irregular

Problema	Solución
1. Fugas	1. Checar las fugas
2. Fase móvil contaminada	2. Revisar la fase móvil
3. Detector con baja atenuación	3. Corregir la atenuación
4. Aire atrapado en el sistema	4. Eliminar el aire con isopropanol
5. Burbujas en el detector	5. Purgar el detector con isopropanol
6. Celda del detector contaminada	6. Lavar celda de flujo
7. Lámpara del detector	7. Reemplazar la lámpara
8. Sangrado de la columna	8. Reemplazar la columna

# Resolución de problemas en CLAR



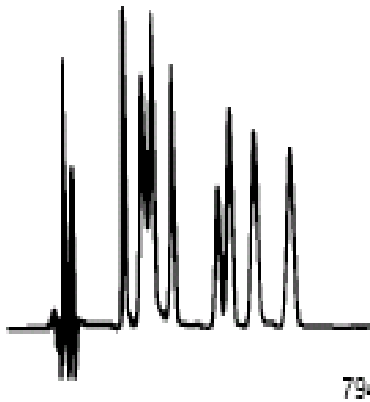
## Pérdida de eficiencia

Problema	Solución
1. Composición de la fase móvil cambiada	1. Preparar nueva fase móvil
2. Reducción en el flujo	2. Ajustar el flujo
3. Fugas	3. Checar las fugas
4. Condiciones del detector incorrectos	4. Ajustar las condiciones del detector
5. Efectos extracolumna: Sobrecarga, bajo tiempo de respuesta, exceso de tubería después de la columna	5. Inyectar menos volumen o diluir la muestra. Reducir el tiempo de respuesta. Usar tubería de DI 0.007-0.01pulgadas
6. Concentración del amortiguador muy baja	6. Incrementar la concentración al menos 0.005 M
7. Precolumna contaminada	7. Reemplazar la precolumna
8. Columna analítica contaminada	8. Lavar o reemplazar la columna
9. Volumen vacío en el cabezal de la columna analítica	9. Cambiar de sentido la columna
10. Los picos representan uno o más picos no resueltos	10. Cambiar el tipo de columna
11. Temperatura de la columna muy baja	11. Incrementar la temperatura

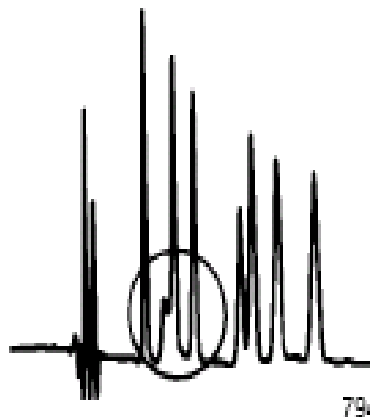
# Resolución de problemas en CLAR

## Cambio en la altura del pico

Normal



Problem



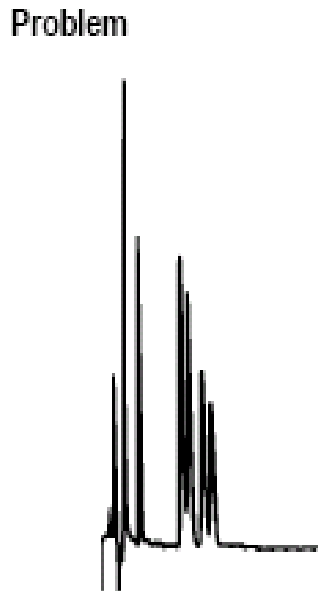
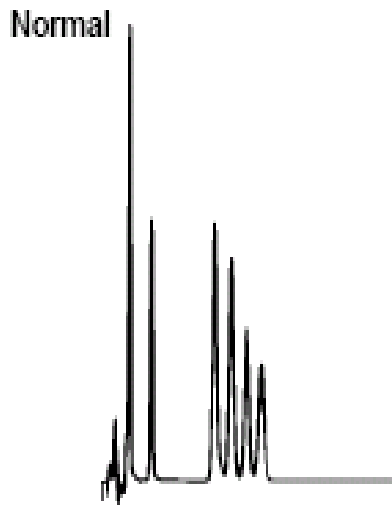
### Problema

1. Uno o más analitos en la muestra se descomponen o la actividad de la columna ha cambiado
2. Fugas entre el puerto de inyección y la columna
3. Inconsistente volumen de muestra
4. Condiciones del detector cambiadas
5. Lámpara del detector
6. Contaminación en la celda del detector

### Solución

1. Utilizar muestras recién preparadas o conservadas adecuadamente
2. Checar las fugas
3. Lavar el inyector, utilizar loop más pequeño. Si es automuestreador checar que los viales estén llenos y sin aire. Revisar que no exista precipitación
4. Checar las condiciones
5. Reemplazar la lámpara
6. Lavar la celda de flujo

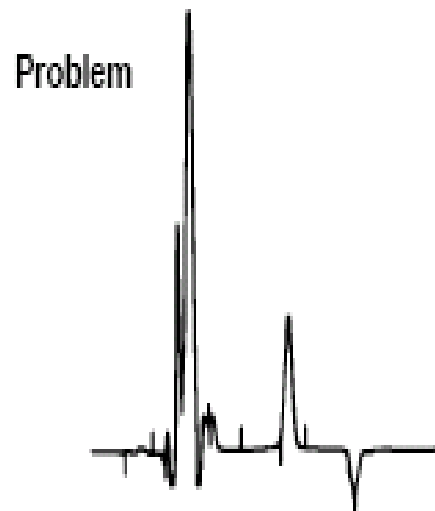
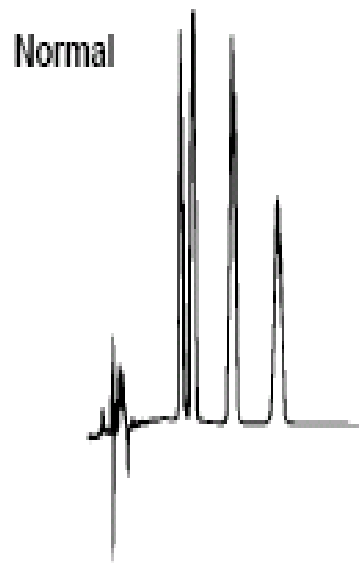
# Resolución de problemas en CLAR



## Cambio de selectividad

Problema	Solución
1. Incremento o reducción de la fuerza iónica	1. Checar la fase móvil
2. Cambio de columna. La nueva columna tiene diferentes propiedades	2. Confirmar la identidad de la nueva columna
3. Muestra inyectada incompatible con la fase móvil	3. Ajustar la matriz de la muestra
4. Cambio de temperatura de la columna	4. Ajustar la temperatura. Utilizar el termostato

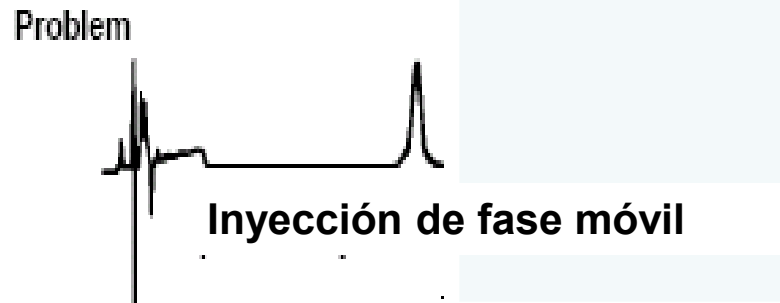
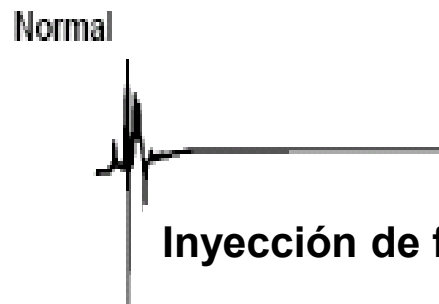
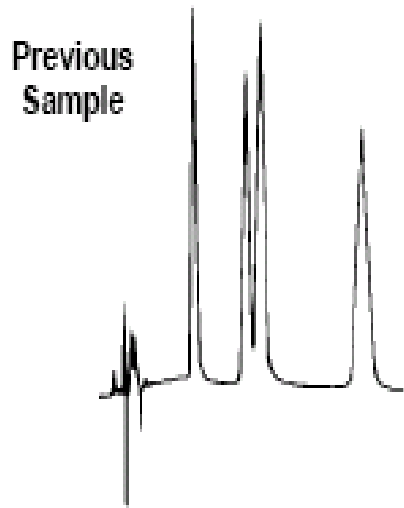
# Resolución de problemas en CLAR



## Picos negativos

Problema	Solución
1. Condiciones del detector	1. Checar la polaridad
2. Índice de refracción del soluto menor al de la fase móvil	2. Utilizar fases móviles con bajo índice de refracción
3. Matriz de la muestra y fase móvil incompatibles	3. Ajustar la muestra con la fase móvil
4. La fase móvil absorbe más que los componentes de la muestra.	4. Cambiar la polaridad en detección UV. Cambiar la longitud de onda donde la fase móvil sea más transparente

# Resolución de problemas en CLAR



## Picos fantasma

### Problema

1. Contaminación en el inyector, precolumna o columna analítica
2. Elución de solutos muy retenidos

### Solución

1. Lavar el inyector. Lavar o reemplazar la precolumna. Lavar o reemplazar la columna analítica
2. Checar la preparación de muestra. Checar un blanco del gradiente de elución

# Validación vs. Calificación

## ■ Validación

- Proceso de proporcionar evidencia documentada de que algo hace lo que se pretende que haga
- Proceso, sistema, método

## ■ Calificación

- Inspección, pruebas y revisión de documentación
- Es una parte del proceso de validación que verifica el rendimiento del módulo y del sistema antes de ser puesto en línea
- Equipo



# Validación de métodos cromatográficos por CLAR

# DEFINICIÓN

Proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas

# MEDICIONES ANALÍTICAS VÁLIDAS

- **Las mediciones analíticas deben ser realizadas para satisfacer requerimientos preestablecidos.**
- **Las mediciones analíticas deben ser realizadas utilizando métodos y equipos que hayan sido verificados de tal manera que aseguren que son adecuados a su propósito.**
- **El personal que realiza las mediciones analíticas debe**
- **ser calificado y competente para asumir esta tarea.**

# **MEDICIONES ANALÍTICAS VÁLIDAS**

- **En forma regular, debe existir una evaluación independiente del desempeño técnico del laboratorio**
- **Las medidas analíticas realizadas en un laboratorio deben ser consistentes con las que se realizan en otros laboratorios.**
- **Las instituciones que realizan medidas analíticas deben tener procedimientos de control y aseguramiento de calidad bien definidos.**

# ASPECTOS DE LA VALIDACIÓN DE MA

- **Especificaciones analíticas.**
- **Evaluación de su exactitud.**
- **Evaluación de su precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad).**
- **Evaluación de incertidumbre.**
- **Sensibilidad.**
- **Especificidad**
- **Robustez.**

# ASPECTOS DE LA VALIDACIÓN DE MA

- Rango de concentraciones de trabajo y rango de linealidad.
- Límite de detección.
- Límite de cuantificación.
- Ensayos de recuperación.
- Grado de validación necesario según objetivos.

# ASPECTOS DE LA VALIDACIÓN DE MA

## ¿Qué requiere la Validación?

- Instrumentos calificados y calibrados.
- Métodos documentados.
- Estándares de Referencia confiables.
- Analistas calificados.
- Integridad de la muestra.

# ASPECTOS DE LA VALIDACIÓN DE MA

**Estándares de referencia** son sustancias de alto grado de pureza adecuadamente caracterizadas.

Son usados para tres propósitos principales: para ayudar al desarrollo de métodos analíticos apropiados (métodos de referencia), para calibrar sistemas de medición y para verificar y adecuar programas de calidad en mediciones; por lo que se requiere contar con sustancias que por su alta pureza, características críticas y disponibilidad se manejen como sustancias referencia.



# ASPECTOS DE LA VALIDACIÓN DE MA

## Material de referencia certificado (MRC).

Material de referencia, acompañado de un certificado, con una o más propiedades cuyos valores se certifican mediante un procedimiento que establece su trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la que se expresan los valores de las propiedades, y respecto del cual cada valor certificado está rodeado de incertidumbre en un determinado nivel de confianza.

# ASPECTOS DE LA VALIDACIÓN DE MA

## **Las Sustancias de Referencia Química Internacionales (ICRS).**

Son establecidas bajo consejo del *Comité Experto en Especificaciones para Preparaciones Farmacéuticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO)*. Son proveídas principalmente para uso en ensayos y pruebas físicas y químicas descritos en las especificaciones para el control de calidad de fármacos, que están publicados en *la Farmacopea Internacional* o propuestos en una monografía preeliminar. El propósito principal de las **Sustancias de Referencia Química Internacionales** es ser usadas como estándares primarios para calibrar estándares secundarios.

# ASPECTOS DE LA VALIDACIÓN DE MA

Se recomienda que las **ICRS** sean almacenadas y protegidas de luz y humedad, y preferentemente que estén a una temperatura de aproximadamente +5°C. Cuando se requieran condiciones especiales de almacenamiento, la etiqueta o el certificado del producto lo indicará. Se recomienda al usuario comprar únicamente la cantidad necesaria y suficiente para uso inmediato.

La estabilidad de las **ICRS** mantenida en el *Centro de Colaboración* es monitoreada a través de una re-examinación regular y cualquier material que se ha deteriorado es reemplazado por nuevos lotes cuando es necesario. Las listas que contienen los números de control de los lotes existentes son emitidas en los reportes anuales del *Centro de Colaboración*. Nuevas listas pueden ser obtenidas bajo pedido.

# ASPECTOS DE LA VALIDACIÓN DE MA

## •Sustancias de Referencia U.S. Pharmacopeia (USP)

Los estándares químicos de referencia de la USP han sido factor clave en el desarrollo y fabricación de productos farmacéuticos de alta calidad en todo el mundo. Estos estándares proveen un medio para comparar la fuerza, la calidad, pureza e identidad de fármacos, suplementos nutricionales y otros productos terapéuticos. La USP provee de más de 1500 estándares de referencia –el catálogo más grande del mundo- además de otros productos que están en fase de desarrollo.

# ASPECTOS DE LA VALIDACIÓN DE MA

- **Sustancias de Referencia European Pharmacopoeia (EP).**

- 

**El departamento Europeo para la Calidad de los Medicamentos (EDQM por sus siglas en inglés) pone a disposición de los usuarios estándares adecuados para su uso en las monografías de la Farmacopea Europea. Más de 1150 sustancias, preparaciones y espectros de referencia de origen químico o biológico se encuentran disponibles en nuestro catálogo.**

# ASPECTOS DE LA VALIDACIÓN DE MA

- **Sustancias de Referencia British Pharmacopoeia (BP).**

**Con más de 400 materiales de referencia, la Comisión de Medicamentos asume que la Farmacopea Británica contribuye significativamente al éxito en el control de calidad en los productos terapéuticos al proveer estándares de calidad que los productos deben cumplir en cualquier momento durante su período de uso.**

# **ASPECTOS DE LA VALIDACIÓN DE MA**

## **•Sustancias y Materiales de Referencia del National Institute of Standards and Technology (NIST)**

**El programa de materiales estándares de referencia incluye más de 1200 materiales distintos que son certificados por sus propiedades químicas o físicas. Los estándares son usados para tres propósitos principales, para ayudar al desarrollo de métodos analíticos apropiados (métodos de referencia); para calibrar sistemas de medición o para verificar y adecuar programas de calidad en mediciones. El NIST es parte esencial en los mecanismos de rastreabilidad nacional e internacional.**

# ASPECTOS DE LA VALIDACIÓN DE MA

## Sustancias de Referencia para fitofármacos

**Chromadex:** Ofrece una amplia gama de productos fitoquímicos para evaluación de productos que contengan en su formulación un componente de origen vegetal.

**Extrasynthese:** Fabricante de productos y de química fina Extrasynthese, S.A. desarrolla la venta por catálogo de productos para trabajos de investigación y desarrollo, así como para análisis cualitativo y cuantitativo para productos naturales en las industrias farmacéutica, cosmética y agroalimentaria.



# **ASPECTOS DE LA VALIDACIÓN DE MA**

## **•Cepas liofilizadas de referencia ATCC – Microbiologics.**

**Microbiologics es una compañía autorizada por la ATCC para utilizar sus cultivos de referencia para poder desarrollar y producir cepas liofilizadas utilizables en programas de control y aseguramiento de calidad en los laboratorios de microbiología. Microbiologics cumple con todos los aspectos regulatorios y de preparación de las cepas, proporcionando con cada una de ellas datos y documentos tales como: lote de cultivo, lote de preparación, fecha de caducidad y certificado de análisis.**

# ASPECTOS DE LA VALIDACIÓN DE MA

**Sustancia de referencia primaria.** Sustancia asignada o reconocida por tener la más alta calidad metrológica, cuyas propiedades se aceptan sin referencia a otras sustancias.

**Sustancia de referencia secundaria.** Sustancia cuyas propiedades se asignan por comparación con una sustancia de referencia primaria, o bien, cuando es certificada mediante un procedimiento científicamente reconocido.

# CONFIABILIDAD DEL MA

**Si un método analítico, que finalmente es el medidor de las características críticas de calidad del producto, no es confiable, se corre el grave riesgo de afectar al usuario final.**

# JUSTIFICACIÓN

- Moral y ética
- Aseguramiento de la Calidad
  - Económico
  - Regulatorio

# CLASIFICACIÓN DE LOS MA EN FUNCIÓN DE SU ESTADO REGULATORIO

- **Métodos Farmacopéicos: Todos aquellos que aparece en cualquier farmacopea (USP,BP, Europea,etc).**
- **Métodos no Farmacopéicos: Aquellos métodos no compendiados en una farmacopea**

# **CLASIFICACIÓN DE LOS M.A EN FUNCIÓN DE SU PROPÓSITO ANALÍTICO**

➤ **Métodos para cuantificar el analito**

**(contenido )**

➤ **Métodos para establecer la presencia del analito a un límite**

➤ **Métodos para identificar el analito**

# VALIDACIÓN

Un método analítico contiene dos tipos de error:

**Método analítico = error sistemático + error aleatorio**

El error aleatorio es aquel que permanece aun cuando se ha eliminado el error sistemático y da lugar a medidas imprecisas. El error sistemático es el que da lugar a medidas incorrectas y, en general, al incumplimiento de los valores establecidos como parámetros de validación.

Se divide en:

**Constante o absoluto**  
**Proporcional o relativo.**

**Las fuentes de error sistemático pueden ser:**

**Errores instrumentales.**

**Errores de método.**

**Errores operativos.**

**Errores personales.**

# VALIDACIÓN

Existen varios procedimientos para evaluar el error sistemático. El recobro experimental a un **porcentaje fijo** permite evaluar el error sistemático constante, mientras que el recobro experimental a **varias concentraciones** permite evaluar el Error Sistemático proporcional.



# VALIDACIÓN

**La técnica de medición**, también llamada distema de medición, es el procedimiento por el cual se asocia la concentración de una solución de referencia de la sustancia de interés a un valor específico de una propiedad física o química, donde sólo existe el error experimental debido a que no hay tratamiento alguno de la muestra antes de la determinación.

**El método de medición**, consiste en cuantificar la sustancia de interés después de ser extraída cuantitativamente a partir de una muestra obtenida de determinada matriz (es decir, de un tejido, fluido o medicamento). Por ende, el método de medición está sujeto a error aleatorio y error sistemático.

# VALIDACIÓN

Para validar un método analítico se requiere determinar, en la técnica o sistema de medición:

Adecuabilidad.

Precisión.

Linealidad.

Mientras que en el método de medición, se deben evaluar determinados parámetros a partir del conocimiento de las necesidades que se quieren cubrir

# Validación

## Diferentes clases de ensayos analíticos

- Clase A: Para establecer identidad
- Clase B: Para detectar y cuantificar impurezas
- Clase C: Para determinar cuantitativamente la concentración
- Clase D: Para evaluar las características

# Validación

<b>Característica</b>	A	B cuant.	B Ensayo límite	C	D
Exactitud		X		X	X*
Precisión		X		X	X
Robustez	X	X	X	X	X
Linealidad		X		X	X
Especificidad	X	X	X	X	X
Límite de detección			X		
Límite de cuantificación		X			

\* Se puede permitir un grado de desviación

Parámetro	Métodos de Rutina				Métodos especiales			
	Valoración	Identidad	Pruebas límite	Cuantificación de impurezas	Indicativos de Estabilidad	Bioanalíticos	Perfil de Disolución	
Especificidad/ Selectividad	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	
Linealidad	↗			↗	↗	↗	↗	
Exactitud	↗			↗	↗	↗	↗	
Precisión <ul style="list-style-type: none"> <li>• Repetibilidad</li> <li>• Intermedia</li> <li>• Reproducibilidad</li> </ul>	↗ ↗ ↗			↗	↗	↗	↗	
Estabilidad de la muestra analítica	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	
Límite de detección			↗	↗	↗	↗	↗	
Límite de Cuantificación			↗	↗	↗	↗	↗	
Robustez	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	

↗ Deberá evaluarse el parámetro en cualquier aplicación.

↘ Deberá evaluarse el parámetro si la aplicación del método lo requiere.

Parámetro de desempeño	Contenido	Pruebas de Impurezas		Identificación
		Contenido	Límite	
Especificidad	SI	SI	SI	SI
Exactitud	SI	SI	NO	NO
Precisión	SI	SI	NO	NO
Límite de Detección	NO	NO	SI	NO
Límite de Cuantificación	NO	SI	NO	NO
Linealidad	SI	SI	NO	NO

# Validación

## Parámetros de desempeño

### Sistema

repetibilidad, linealidad, adecuabilidad  
especificidad.

### Método

Exactitud, linealidad, precisión intermedia,  
estabilidad, LD, LC, robustez, tolerancia.

# Validación

## Separation Development Sequence



FIRST INJECTION



ADJUST  $k'$  (Retention)



ADJUST  $N$  (Plates)



ADJUST  $\alpha$  (Separation)



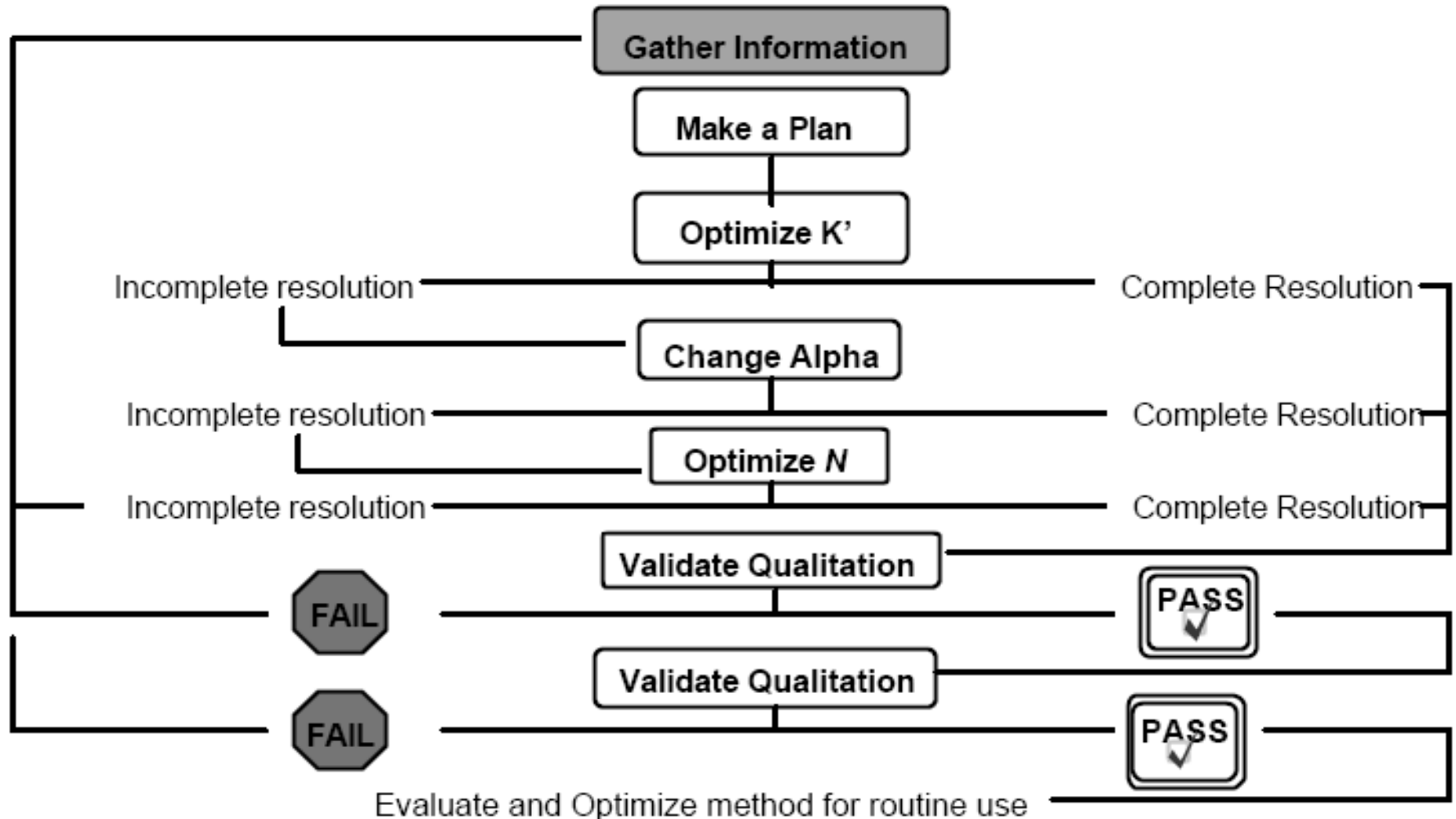
# Validación

## FACTORS CONTROLLING RESOLUTION

- k'** Strength of solvent - polarity  
Strength of packing - surface area, carbon load  
Temperature
  
- $\alpha$**  Chemistry of solvent - functionality  
Chemistry of packing - functionality  
Chemistry of sample - hydrogen bonding or derivatization
  
- N** Flow rate - linear velocity  
Average particle size  
Column bed configuration  
Viscosity of solvent  
Temperature (viscosity)  
Particle shape  
Viscosity of sample  
Mixed mechanisms
  
- Column length  
Particle size distribution  
Volume of injection  
Mass of injection  
Column diameter  
System dead volume  
Residence on column  
Pellicular vs. porous

# Validación

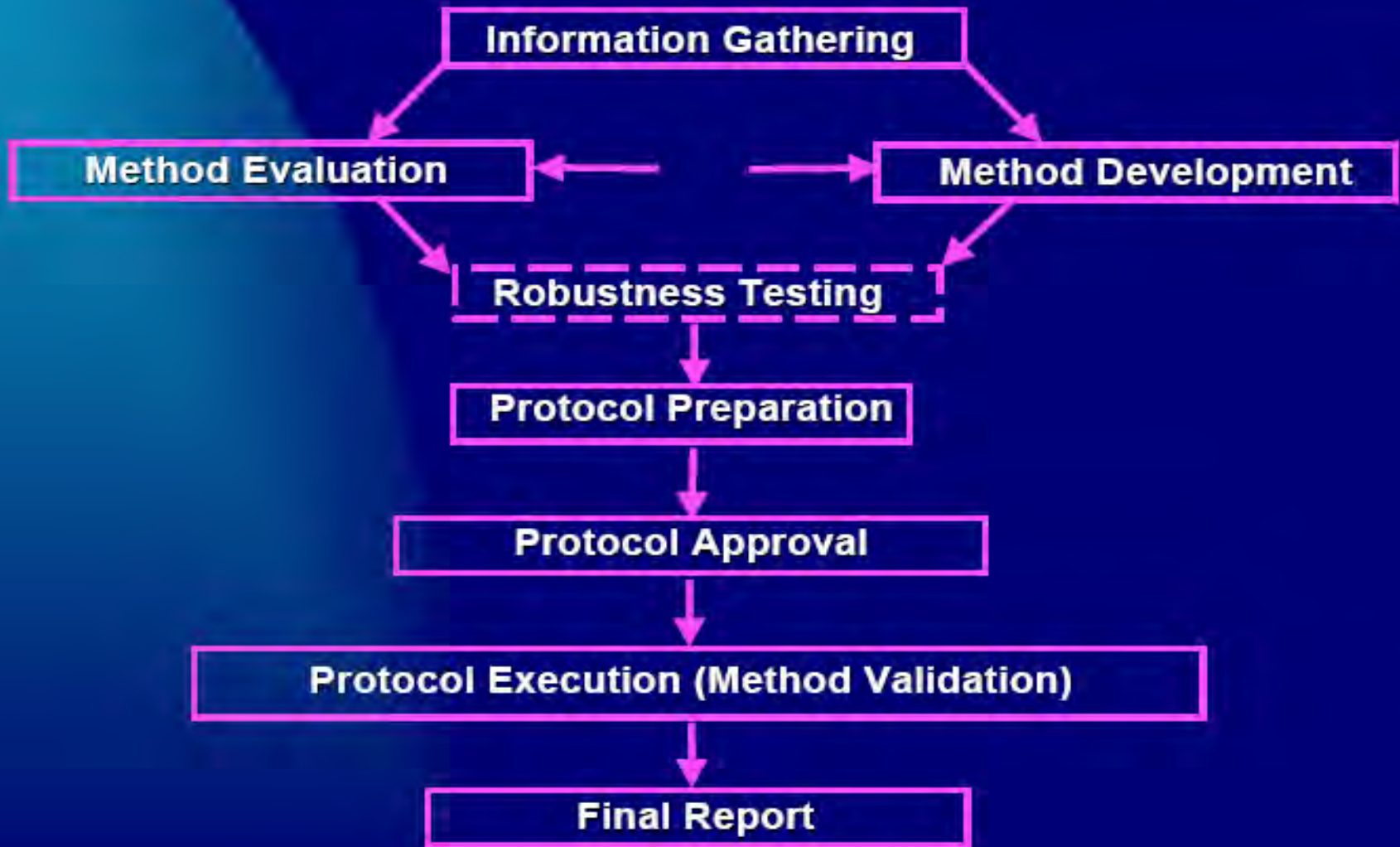
## Methods Development Strategy



- Step by step method development strategy -

# Validación

## Methods Process Flow



# **VALIDACIÓN SISTEMA**

**Durante la etapa de adecuabilidad del sistema de medición deberá corroborarse que los componentes del instrumento analítico involucrados en la obtención de datos funcionan adecuadamente, es decir, todas aquellas partes del equipo que puedan afectar la determinación, deberán cubrir las especificaciones establecidas para las mismas**

# Validación Sistema

## Validación típica de un ensayo de HPLC Competencia del sistema (verificación del desempeño –adecuabilidad-)

- precisión del sistema (inyector, bomba).
- eficiencia de la columna
- factor de simetría
- factor de capacidad
- resolución

Parameter	Limit
Capacity factor	$k' > 2$
Injection precision	RSD < 1% for $n \geq 5$
Resolution	$R_s > 2$
Tailing factor	$T \leq 2$
Theoretical plate	$N > 2000$

# Validación Sistema

**La precisión del inyector** se evalúa a partir del coeficiente de variación de cinco inyecciones de una misma solución de concentración conocida del analito de interés.

**El C.V. aceptado para repetibilidad del inyector es  $\leq 1\%$  para al menos cinco inyecciones.**

$$CV = \frac{s}{y} 100$$

# Validación Sistema

La precisión del sistema de medición es el grado de concordancia entre mediciones analíticas individuales obtenidas bajo las mismas condiciones, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea de la solución patrón. Se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación (CV).

Para determinar la precisión de la técnica o sistema de medición en un método analítico de rutina, un analista debe preparar de manera independiente por lo menos seis diluciones a partir de la misma solución patrón, correspondiente al 100 % de lo establecido en la linealidad del sistema de medición y medir su propiedad bajo las mismas condiciones de medición. Debido a la mejora de los Sistemas de Medición, se recomienda que, para cualquier caso, el CV sea  $\leq 1\%$  en el nivel de prueba.

# Validación técnica o sistema de medición

Consiste en determinar si existe relación lineal entre la concentración y una propiedad física, química y/o biológica de la sustancia (**respuesta analítica**). Para determinar la linealidad de la técnica o sistema de medición, un analista debe preparar, de manera independiente, por lo menos cinco **diluciones por triplicado**, a partir de una solución patrón, midiendo su propiedad bajo las mismas condiciones.

1. La relación entre la concentración y la propiedad medida, debe ser altamente significativa.
2. Es recomendable que la ordenada al origen de la relación lineal simple, concentración-propiedad medida, sea estadísticamente igual a cero.
3. El coeficiente de determinación de la relación lineal simple debe ser mayor a 0.98.



# Validación

## Validación típica de un ensayo de HPLC

### Validación del método

- especificidad
- exactitud
- precisión
- linealidad
- robustez
- tolerancia

# PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

- **Especificidad:** Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra
- **Exactitud:** Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia.

# PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

- **Precisión:** Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea (repetibilidad)

# PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

- **Precisión Intermedia:** Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días

# PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

- **Reproducibilidad.** Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios.
- **Repetibilidad.** Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método.

# PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

- **Límite de Detección:** Concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada.
- **Límite de Cuantificación:** Concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables.

# PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

- **Linealidad** : Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado

# PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

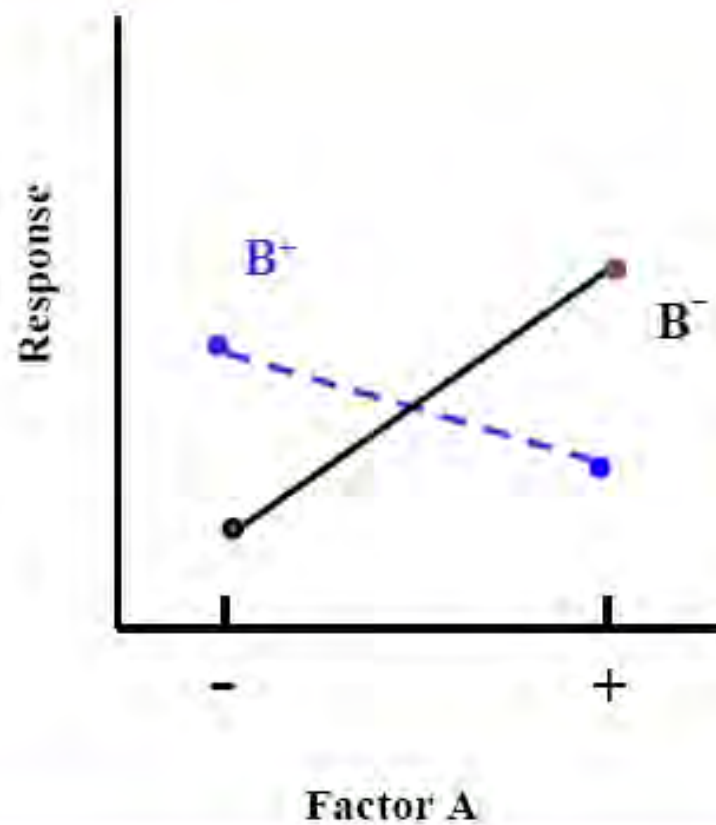
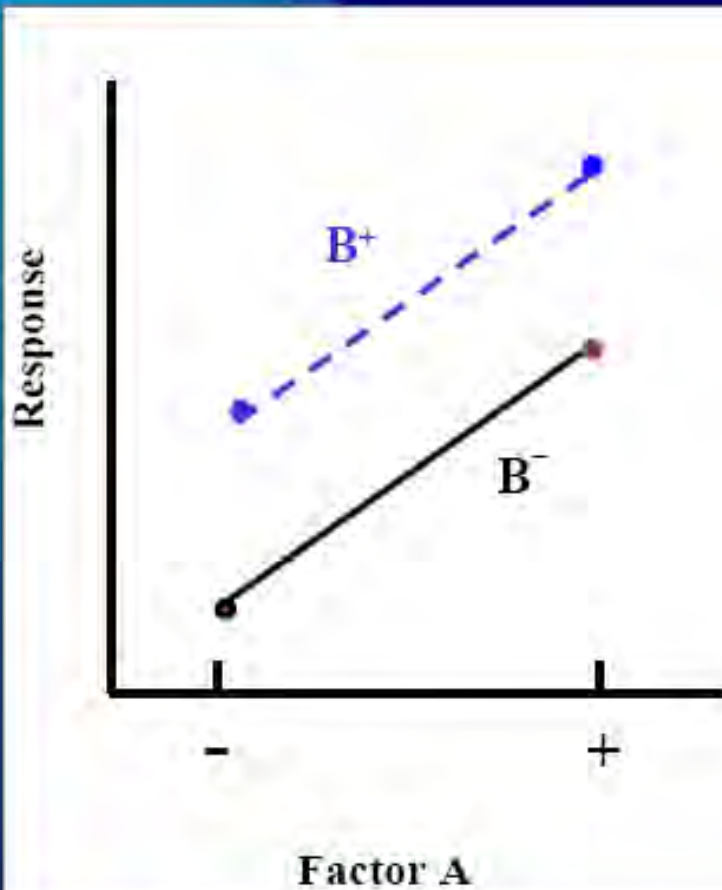
## Robustez

**Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método. (pH de fases, velocidad de flujo, etc)**



# PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

## Robustez



# PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

## Tolerancia y robustez

**Tolerancia.** Reproducibilidad de resultados analíticos obtenidos de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación, es decir factores externos del método. (columnas, equipos lotes reactivos, etc.)

**Robustez.** Reproducibilidad de resultados analíticos obtenidos de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación, es decir factores internos del método. (temperatura de la columna, presión, flujo, pH, fases móviles)

# **PARÁMETROS DE DESEMPEÑO**

## **Robustez**

**Se realiza por triplicado, se reporta contenido/potencia/valoración del analito para las muestras en condición normal y para las muestras de las otras condiciones.**

**Se calcula la media aritmética de la condición normal y la de los cambios y se calcula la diferencia absoluta.**

**Para métodos cromatográficos la diferencia debe ser  $\leq 2\%$**

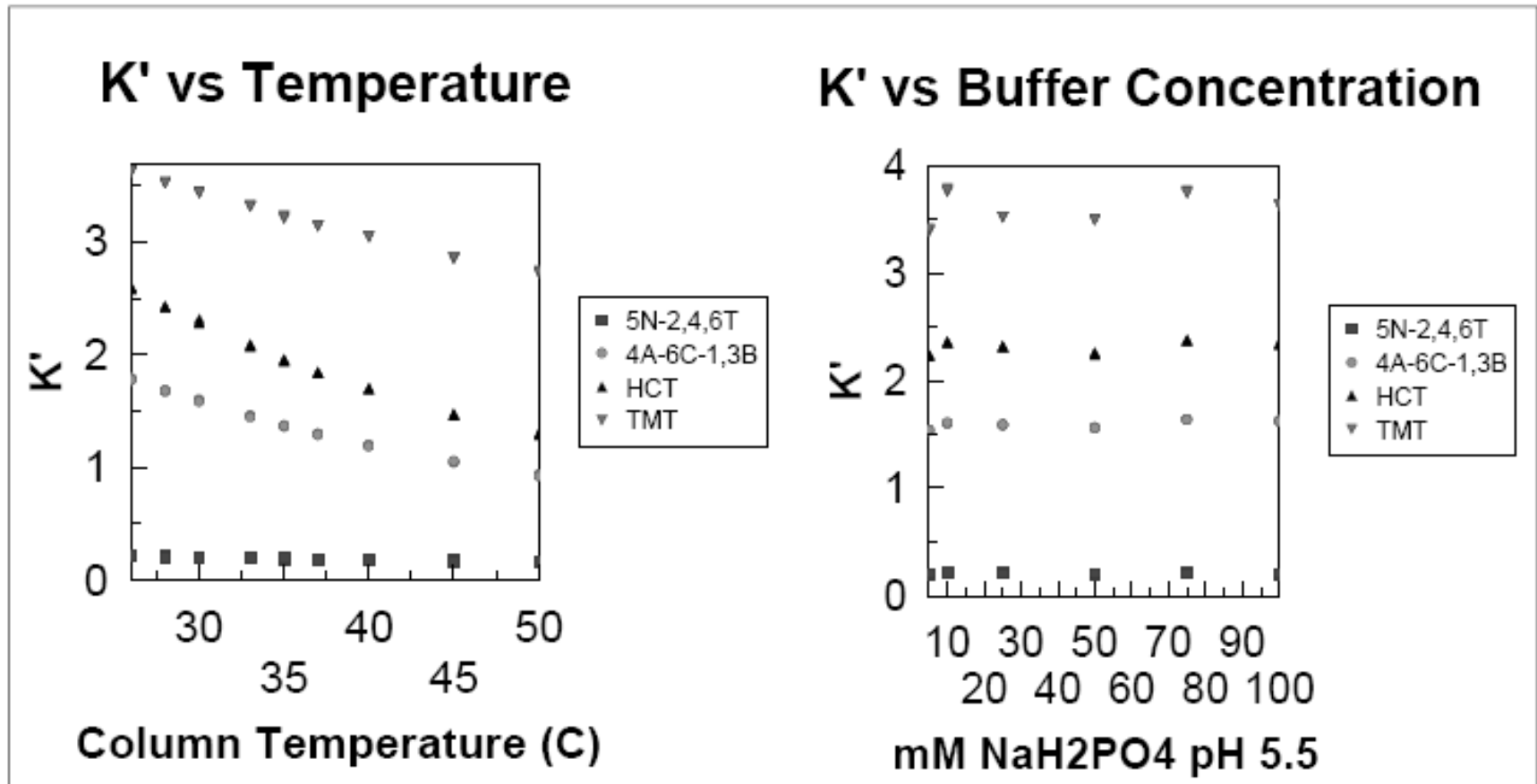
# Robustez

- Se puede hacer de dos maneras:
  - Variando una a una las variables o factores que se consideran sospechosos (estudio incompleto).
  - Realizando variaciones sistemáticas para determinar cómo varía el resultado del ensayo (estudio completo).

# PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

## Robustness Study

$k'$  Versus Temperature and Buffer Concentration

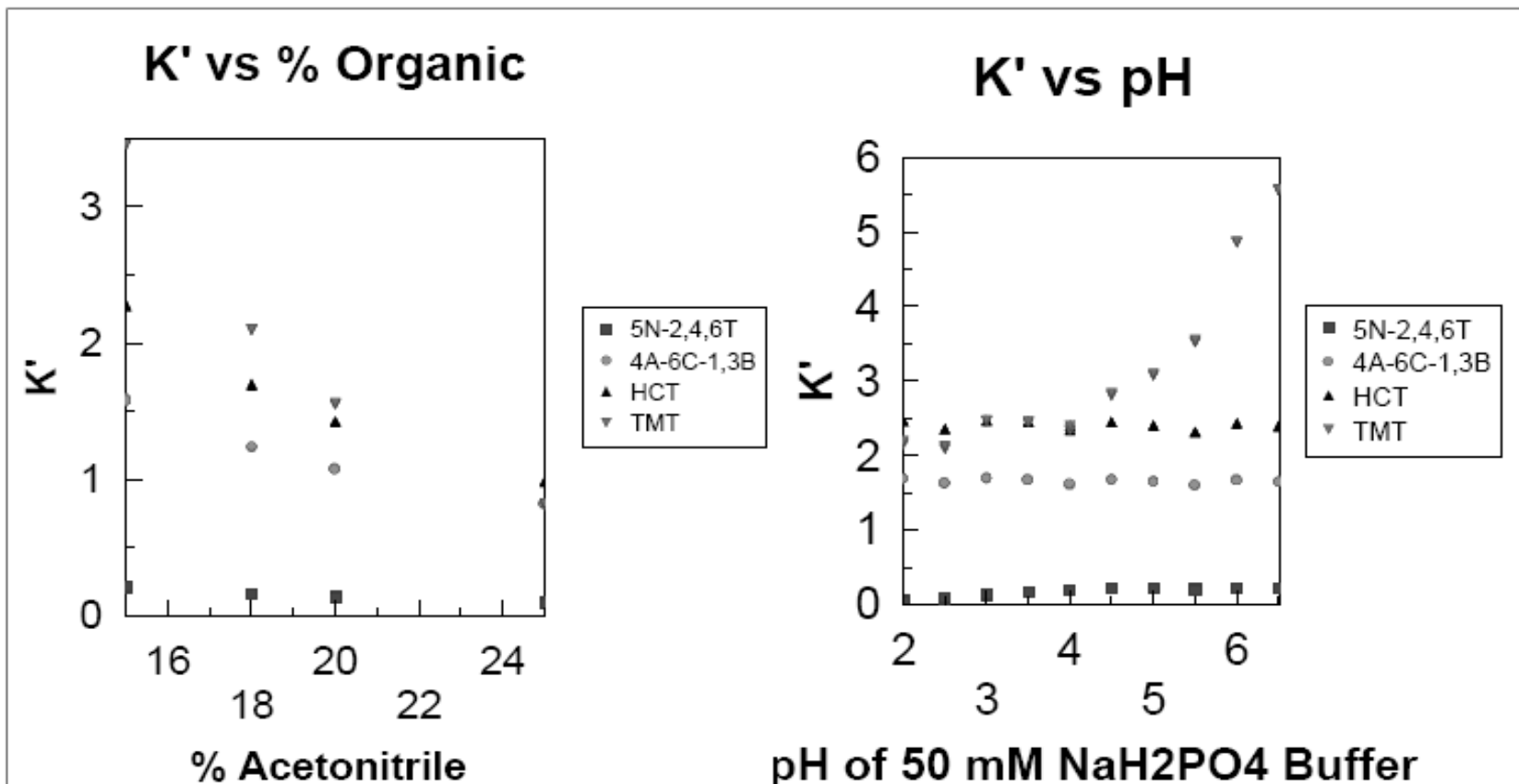


# PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

## Robustez

### HPLC Method Robustness Study

$k'$  Versus % Organic and pH

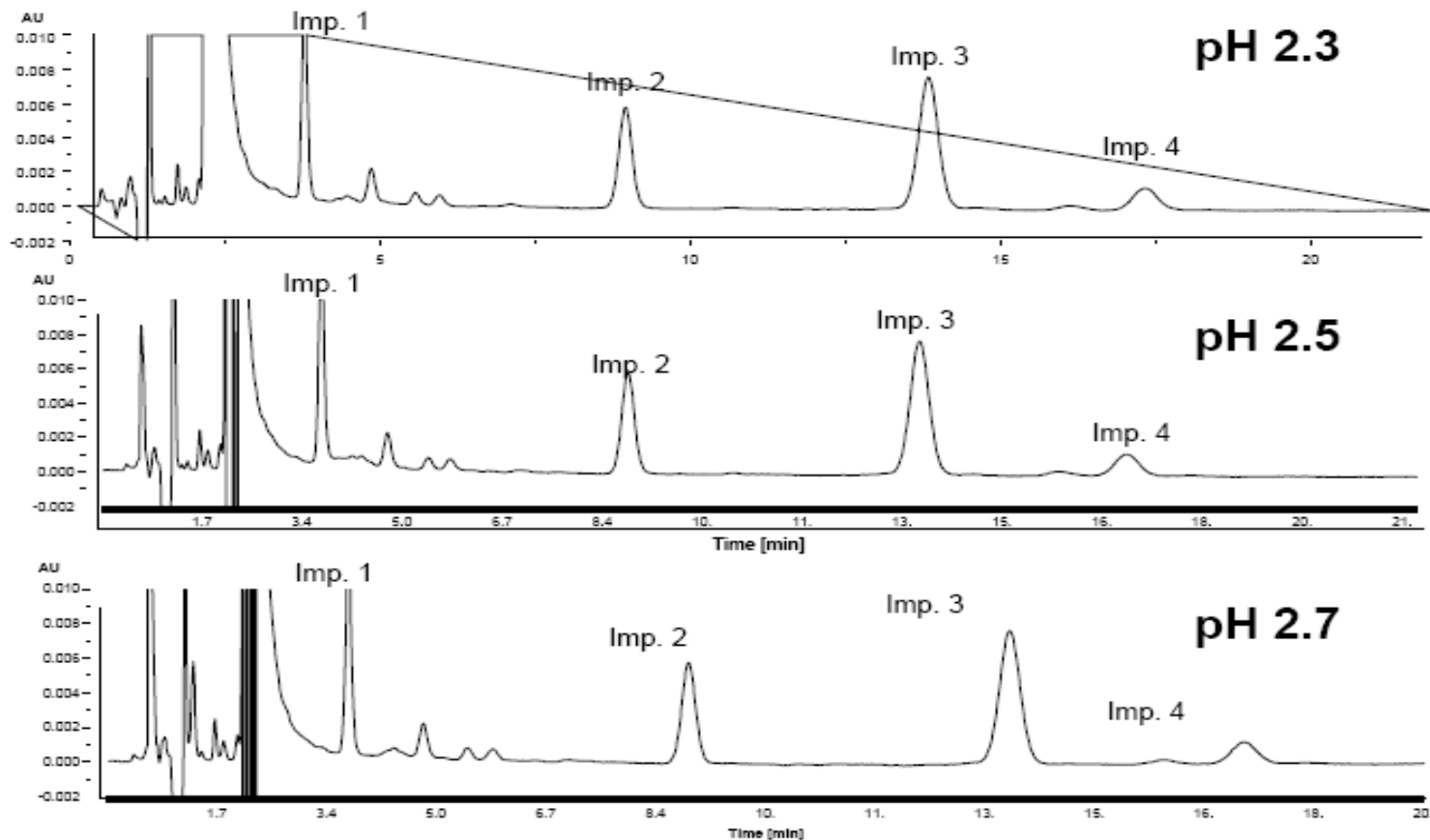


# PARÁMETROS DE DESEMPEÑO

## Robustez

### AZT: Robustness Testing

6% Methanol, 6% THF



# **PARÁMETROS DE DESEMPEÑO**

## **Tolerancia**

**Se fijan por lo menos 2 condiciones de uso y se analiza una misma muestra por lo menos por triplicado a cada condición. Se reporta el contenido/potencia/valoración.**

**Se calcula la media aritmética, desviación estándar y CV.**

**Para métodos cromatográficos el CV debe ser  $\leq 2\%$ .**



# **ESPECIFICIDAD, METODOLOGÍA Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN**

- **Establecer las posibles sustancias interferentes.**
- **Adicionar cantidades conocidas de éstas, solas o combinadas a la muestra.**
- **Evaluar respuesta al método, bajo las mismas condiciones de análisis.**

# **EXACTITUD del método, METODOLOGÍA Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN**

- **Preparar un placebo y adicionarle la cantidad del analítico equivalente al 100% de éste en la muestra**
- **Analizar 9 determinaciones del placebo adicionado por un mismo analista bajo las mismas condiciones usando como referencia la sustancia adicionada al placebo.**
- **Aceptabilidad IC debe contener el 100% y el**

# EXACTITUD, METODOLOGÍA Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

- Determinar la cantidad recuperada del analito y calcular el porcentaje de recobro de cada placebo o muestra adicionada. (Cociente de la cantidad recuperada respecto de la cantidad adicionada expresada en porcentaje)

# PRECISIÓN del método, METODOLOGÍA Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

- Precisión Intermedia. Analizar por triplicado un placebo adicionado, en dos días diferentes y por dos analistas diferentes
- Aceptabilidad  $CV \leq 2\%$ .

# LINEALIDAD del método, METODOLOGÍA Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

- Preparar un placebo y adicionarle la cantidad del analítico equivalente al 100% de éste en la muestra
- Seleccionar al menos 3 niveles: superior, medio e inferior de la cantidad del analito (intervalo)

# LINEALIDAD del método, METODOLOGÍA Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

- Preparar el placebo adicionado por triplicado para cada nivel, manteniendo constante la cantidad de placebo
- Determinar la cantidad recuperada del analito  
( $r^2 \geq 0,98$ .  $CV \leq 2\%$ )

# LINEALIDAD DEL MÉTODO

- Para métodos cromatográficos  $CV \leq 2\%$
- Se selecciona el 80 a 120 % para valoración y sustancias relacionadas.
- Se selecciona 60-140% para uniformidad de dosis.
- Se selecciona 40 a 130 % para disolución.
- Se selecciona 80 a 120% para contenido, valoración de impurezas.

# LINEALIDAD DEL MÉTODO

**Se reporta cantidad adicionada vs cantidad recuperada.**

**Se calcula pendiente, ordenada al origen IC para pendiente e IC para ordenada y el CV de la regresión.**

**Aceptabilidad**

**EL IC pendiente debe contener la unidad**

**El IC de la ordenada al origen debe**

**CV recobro  $\leq 2\%$**



# LINEALIDAD DEL MÉTODO

**Se puede reportar porcentaje de recobro**

**Aceptabilidad**

**EL IC debe contener el 100%**

**98-102% si es cromatográfico**

**CV recobro  $\leq$  2%**

# LD CON BASE EN SEÑAL DE RUIDO

MUESTRA	SEÑAL ANALÍTICA
BLANCO O RUIDO	3525
3* RUIDO	10575
ANALITO mg/mL	
0,5	4215
1	6954
1,5	9267
2	11045
2,5	13578

$$LD = \frac{3.3xS_b}{b}$$

# LD CON BASE A LA CURVA DE CALIBRACIÓN Y LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE REGRESIÓN

- Preparar por lo menos 3 concentraciones de la sustancia de interés a valores menores o que incluya la especificación de impureza
- Medir las respuestas analíticas
- Calcular el LD y el  $r^2$  ( $\underline{\geq}$  0,98)

$$LD = \frac{3.3xS_{y/x}}{b}$$

$$LD = \frac{3.3xS_{b0}}{b}$$

# LC CON BASE EN SEÑAL DE RUIDO

MUESTRA	SEÑAL ANALÍTICA
BLANCO O RUIDO	3525
10* RUIDO	35250
ANALITO mg/ml	
5	15228
10	26250
15	37145
20	42180
25	59624

$$LC = \frac{10xS_b}{b}$$

# LC CON BASE A LA CURVA DE CALIBRACIÓN Y LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE REGRESIÓN

➤ Preparar por lo menos 3 concentraciones de la sustancia de interés a valores menores o que incluya la especificación de contenido de la impureza

➤ Medir  $LC = \frac{10xS_{y/x}}{b}$  las respuestas analíticas

➤ Calcular el LC y el  $r^2 (\geq 0,98)$

$$LC = \frac{10xS_{y/x}}{b}$$

$$LC = \frac{10xS_{b0}}{b}$$

# ESTABILIDAD

- Establecer la etapa de análisis
- Muestras fraccionadas (dependientes)
- Muestras no fraccionadas (independientes)
- Condiciones de almacenaje
- Procesar por triplicado

# ESTABILIDAD

- Para muestras dependientes el analista debe procesar hasta la etapa preestablecida por lo menos por triplicado una muestra homogénea.
- Fraccionar cada una de las preparaciones de acuerdo a la condición.
- Analizar contenido/potencia/valoración  
Utilizar solución de referencia recientemente preparada.
- Sí el método contempla el uso de solución de referencia

# ESTABILIDAD

- Para muestras independientes a partir de una homogénea realizar por triplicado (contenido/potencia/valoración).
- Simultáneamente de la misma muestra, procesar el número de muestras necesarias para cada condición de almacenaje hasta la etapa preestablecida (preparaciones) al menos por triplicado.
- Analizar contenido/potencia/valoración  
Utilizar solución de referencia recientemente preparada.



# ESTABILIDAD

- Aceptabilidad

Calcular media aritmética del análisis inicial y de cada condición de almacenaje.

Calcular la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto al inicial.

$$|d_i| \leq 2\%$$

Se pueden obtener IC y se utiliza la distribución de Dunnet

# REVALIDACIÓN

- Establecer criterios apropiados para la revalidación
- Mantener un sistema de control de cambio ( cambios críticos)

# REVALIDACIÓN

Cambio	Impacta	Parámetro a validar
<b>Dispositivo de medición del instrumento de medición</b>	<b>Variación en sistema de medición</b>	<b>Precisión del sistema Adecuabilidad del sistema</b>
<b>Concentración de la solución de referencia</b>	<b>Exactitud de método</b>	<b>Linealidad del sistema y exactitud del método</b>
<b>Formulación del producto</b>	<b>Exactitud del método</b>	<b>Exactitud y repetibilidad del método. Linealidad del método Especificidad.</b>
<b>Equipos</b>	<b>Variación del método</b>	<b>Tolerancia</b>
<b>Proveedor de columnas</b>	<b>Variación del método</b>	<b>Tolerancia</b>

# DOCUMENTACIÓN

- Protocolo
  - Título/código del documento
  - Objetivo
  - Responsabilidades
  - Plan de prueba (parámetros de desempeño)
  - Criterios de aceptación
  - Resultados
  - Análisis de Resultados
  - Conclusión

A partir de un grupo importante de ensayos colaborativos organizados por AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) durante varios años Hortwitz<sup>[2]</sup> dedujo esta ecuación empírica:

$$CV(\%) = 2^{(1-0.5 \log C)}$$

*donde: C es la concentración del analito* (1)

Máximos coeficientes de variación porcentuales esperables en función de la concentración del analito a medir

% analito	Proporción de del analito	Coefficiente de Variación CV %
100	1	2
10	$10^{-1}$	2.8
1	$10^{-2}$	4
0.1	$10^{-3}$	5.7
0.01	$10^{-4}$	8
0.001	$10^{-5}$	11.3
0.0001	$10^{-6}$	16

# ISO-9000

- Definición:
- Una serie de sistemas de calidad que describe el proceso, la estructura organizativa, los procedimientos y los recursos que los fabricantes y proveedores utilizan para producir un producto de calidad constante, que cumple con las especificaciones definidas.
- Metas:
  - Calidad del producto
  - Armonización del comercio internacional
  - Proporcionar terminología coherente

# Calificación de diseño (DQ)

- Evidencia documentada del proceso utilizado para desarrollar, suministrar y mantener un producto de hardware o software
- Prueba de validación estructural
- Certificado de validación de producto S/W o H/W
- Prueba de validación funcional
- Certificado de Desempeño
- El propietario realizó una auditoría de proveedor



# Calificación de la instalación (IQ)

- Revisión de la documentación de toda la información pertinente para la correcta instalación de equipos y/o software
- Verificar la recepción del producto de software y hardware tal como se define en los documentos de requisitos funcionales y especificaciones funcionales
- Identificación de todos los componentes del producto de software y hardware

# Calificación operacional (OQ)

- Verificación documentada del rendimiento de cada componente del equipo
- Pruebas de salida reales frente a las esperadas
- Software
  - Módulo de separación (bomba)
  - Detector

# Calificación de desempeño (PQ)

- Verificación documentada del rendimiento del sistema (hardware y software)
- Verificar la integridad total del control del sistema
- Sistema analítico
  - Exactitud
  - Linealidad
  - Precisión

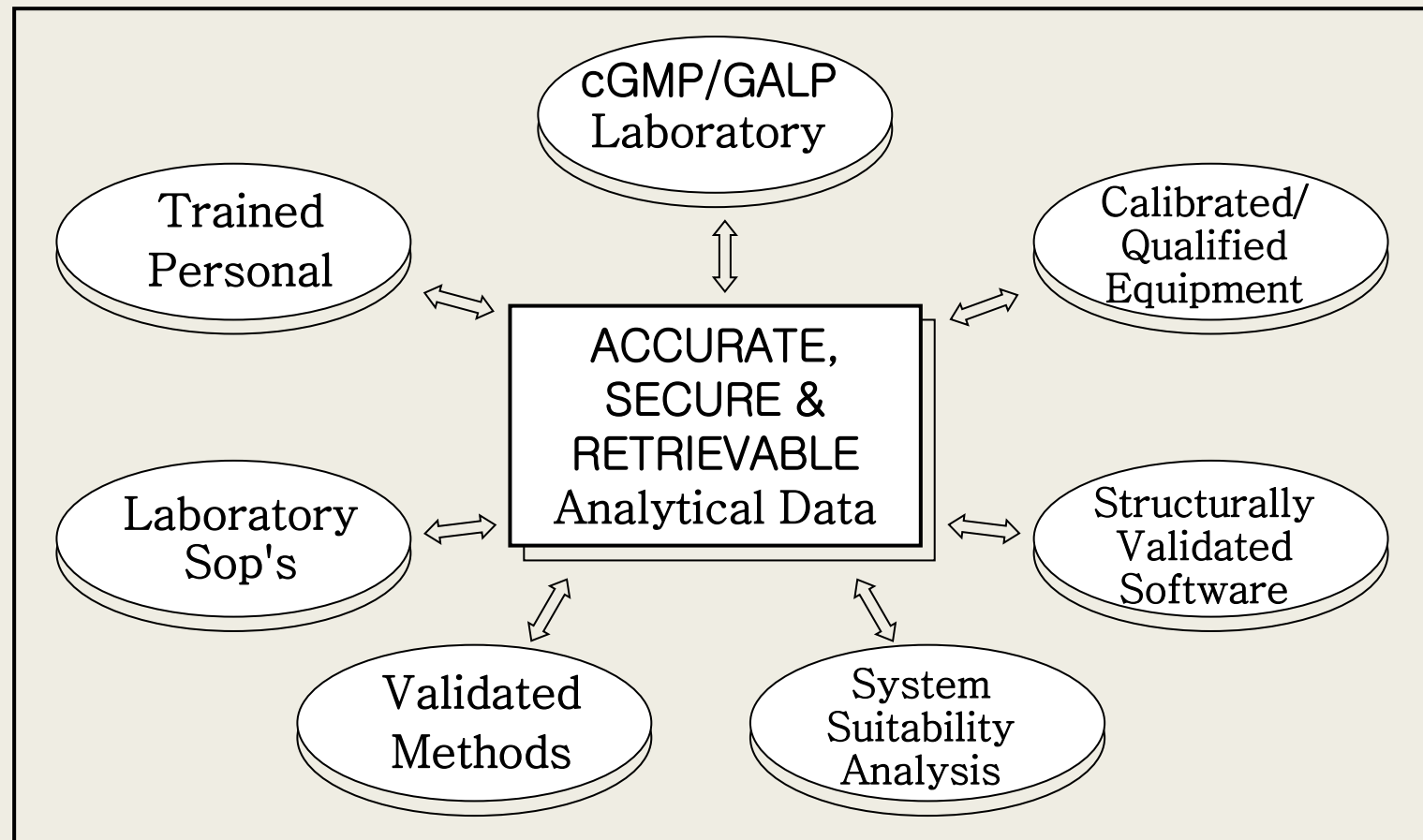
# Procedimientos de mantenimiento (MP)

- Procedimientos y registros recomendados para documentar el mantenimiento
- Minimice el riesgo de perder datos sin procesar y resultados analíticos
- Inspección/reemplazo de artículos normales de desgaste y mantenimiento
- Copia de seguridad y recuperación de archivos
- Archivo y recuperación de datos
- Seguridad

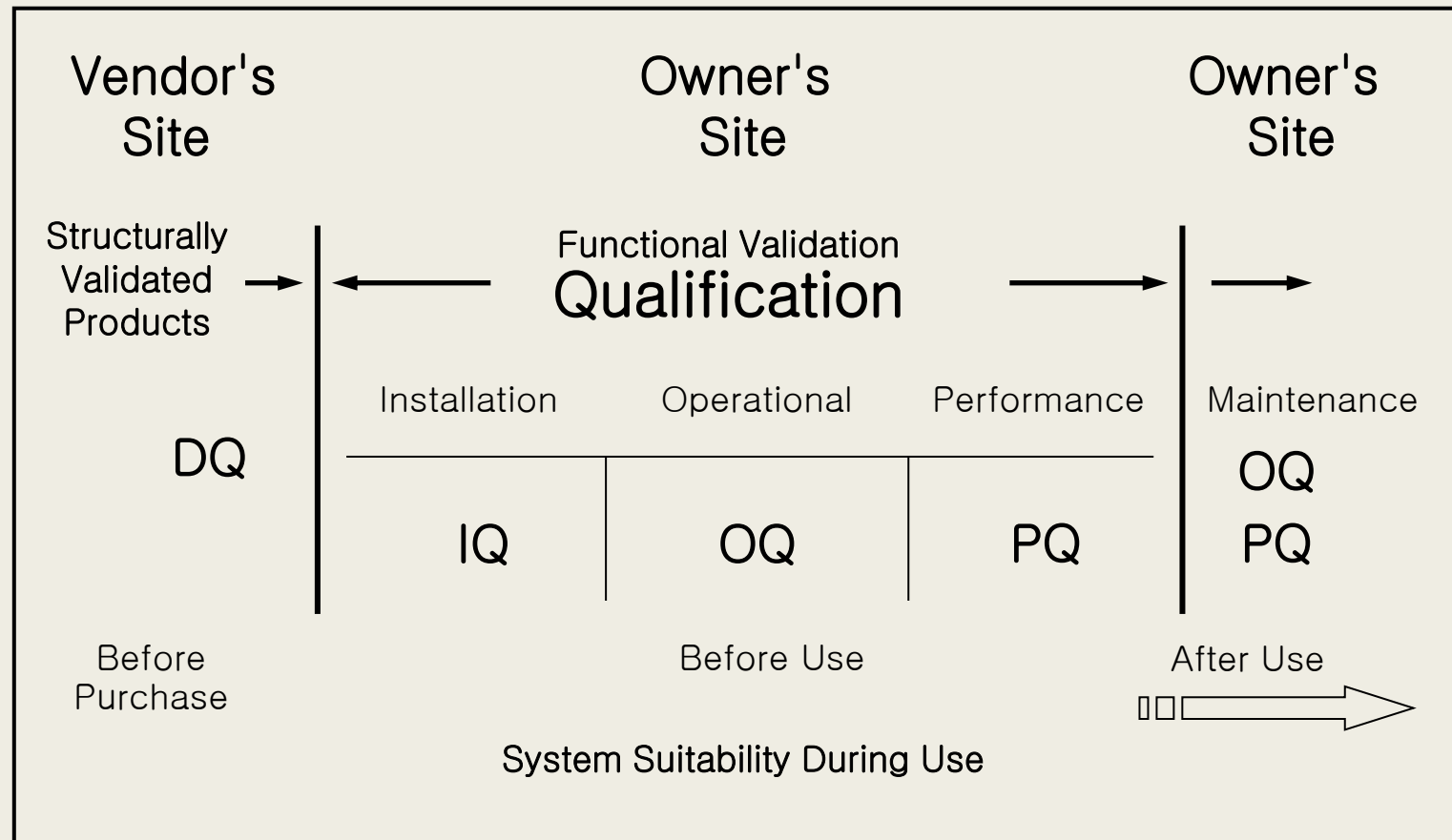
# Prueba de idoneidad del sistema

- Equipos, electrónicos, software, operaciones analíticas y muestras a analizar constituyen un sistema integral
- H/W, S/W y comprobaciones de análisis para garantizar la integridad del sistema antes, durante y después del análisis de muestras desconocidas
- Precisión del sistema
- Parámetros de separación
- Las pruebas de idoneidad del sistema por sí solas no son suficientes, aún se requiere calificación

# Requisitos para la integridad de los datos



El equipo utilizado debe ser de diseño apropiado, capacidad adecuada y mantenimiento adecuado



# Responsabilidades

## ■ Vendedor

- Utiliza el proceso adecuado para diseñar, desarrollar y producir productos validados
- Proporciona productos y servicios de soporte de validación
- Proporciona capacitación para operadores

## ■ Cliente

- Utiliza métodos validados
- Sistemas cualificados
- PNO para producir productos validados, (resultados)